

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

***Artemia salina*'da  $TiO_2$ ,  $AgTiO_2$  ve  $ZnOTiO_2$  NANOPARTİKÜLLERİNİN  
SULU SÜSPANSİYONLARININ TOKSİSİTESİ, BİRİKİMİ VE  
KÜMELEŞMESİNİN BELİRLENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Uzman Biyolog Yeşim ÖZKAN**

**OCAK 2014**

**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

***Artemia salina*'da TiO<sub>2</sub>, Ag TiO<sub>2</sub> ve ZnOTiO<sub>2</sub> NANOPARTİKÜLLERİNİN  
SULU SÜSPANSİYONLARININ TOKSİSİTESİ, BİRİKİMİ VE  
AGREGASYONUNUN BELİRLENMESİ**

**Uzman Biyolog Yeşim ÖZKAN**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
“DOKTOR (BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ)”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 23/12/2013**  
**Tezin Savunma Tarihi : 21/01/2014**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. İlhan ALTINOK**

**Trabzon 2014**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalında**  
**Yeşim ÖZKAN tarafından hazırlanan**

***Artemia salina*'da TiO<sub>2</sub>, AgTiO<sub>2</sub> ve ZnOTiO<sub>2</sub> NANOPARTİKÜLLERİNİN**  
**SULU SÜSPANSİYONLARININ TOKSİSİTESİ, BİRİKİMİ VE**  
**AGREGASYONUNUN BELİRLENMESİ**

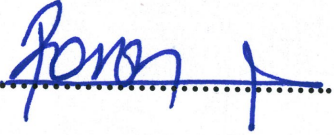
**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 25/12/2013 gün ve 1535 sayılı**  
**kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

**DOKTORA TEZİ**

**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

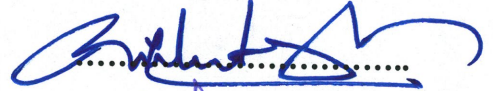
**Başkan : Prof.Dr. Muhammet BORAN**



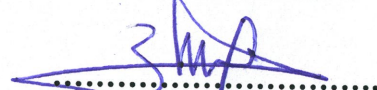
**Üye : Prof.Dr. İlhan ALTINOK**



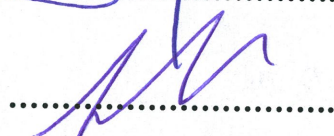
**Üye : Prof.Dr. Bülent VEREP**



**Üye : Prof.Dr. Bilal KUTRUP**



**Üye : Doç.Dr. Erol ÇAPKIN**



**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilimdalı doktora programında yürütülmüştür. “*Artemia salina*’da  $TiO_2$ ,  $AgTiO_2$  ve  $ZnOTiO_2$  nanopartiküllerinin sulu süspansiyonlarının toksisitesi, birikimi ve kümeleşmesinin belirlenmesi” adlı bu çalışma Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Doktora öğrencisi olarak beni kabul eden ve doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın araştırma konusunun belirlenmesi ve tez haline getirilmesinde yol gösteren değerli danışmanım Prof. Dr. İlhan ALTINOK’a içtenlikle teşekkür ederim. Doç. Dr. Erol ÇAPKIN ve K.T.Ü Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuvar ekibine yardımları için teşekkür ederim. Nanopartikülleri temin eden Prof. Dr. Münevver SÖKMEN’e, laboratuvar aşamasında yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Hasan İLHAN ve Uzman İlhan İRENDE’ye, deney düzeneğinin kurulmasında yardım eden Leyla UZUNLAR ve Şenol ŞAHİN’e teşekkür ederim

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme ve isimlerini saymadığım arkadaşlarıma ve her zaman yanımda olan Volkan YILMAZ’a müteşekkirim.

Yeşim ÖZKAN

Trabzon 2014

## TEZ BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Artemia salina*’da  $TiO_2$ ,  $AgTiO_2$  ve  $ZnOTiO_2$  nanopartiküllerinin sulu süspansiyonlarının toksisitesi, birikimi ve kümeleşmesinin belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. İlhan ALTINOK’un sorumluluğunda tamamladığımı, verileri ve örnekleri kendim topladığımı, analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun davrandığımı ve aksi bir durumun ortaya çıkması halinde her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 23/12/2013

Yeşim ÖZKAN

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

ÖNSÖZ .....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XI
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Nanopartiküller ve Kullanım Alanları .....	3
1.3. Toksikoloji .....	4
1.4. Toksikolojik Testler .....	5
1.5. Toksikolojinin Alt Grupları .....	7
1.6. Çevre Toksikoloji (Ekotoksikoloji) .....	7
1.7. Nanotoksikoloji.....	7
1.8. Akuatik Toksikoloji .....	9
1.9. Nanopartiküllerin Toksisitesini Etkileyen Faktörler.....	9
1.10. Nanopartiküllerin Canlılardaki Toksik Etki Mekanizması .....	10
1.11. Nanopartiküllerin Alıcı Ortamlara Salınımı .....	11
1.12. Toksikolojik Çalışmalarda Deney Organizmalarının Seçimi .....	13
1.13. Tuzlusu Karidesi ( <i>Artemia salina</i> ).....	14
1.14. Nanopartiküller ile İlgili Önceki Yapılan Çalışmalar .....	15
1.14.1. TiO <sub>2</sub> Nanopartikülü ile Yapılan Çalışmalar .....	15
1.14.2. ZnO Nanopartikülü ile Yapılan Çalışmalar .....	17
1.14.3. Ag Nanopartikülü ile Yapılan Çalışmalar.....	18
1.15. Çalışmanın Önemi ve Amacı .....	19
2. MATERYAL VE METOT .....	21
2.1. Nanopartikül Temini.....	21
2.1.1. ZnOTiO <sub>2</sub> Nanopartiküllerinin Hazırlanışı .....	21

2.1.2.	AgTiO <sub>2</sub> Nanopartiküllerinin Hazırlanışı.....	21
2.2.	Test Organizması .....	21
2.3.	Nanopartiküllerin Sulu Süspansiyonlarının (Test Çözeltilerinin) Hazırlanışı.....	22
2.4.	Nanopartiküllerin Boyut Dağılımı ve Karakterizasyonu .....	22
2.5.1.	Deney Düzeneginin Hazırlanması .....	23
2.6.	Nanopartiküllerin Akut Toksisitesinin Belirlenmesi .....	24
2.7.	Nanopartiküllerin Akümülyasyon ve Eliminasyon Deneyi .....	25
2.8.	İstatistiksel Analizler .....	26
3.	BULGULAR.....	27
3.1.	Akut Toksisite Testi.....	27
3.2.	Kullanılan Nanopartiküllerin ICP-MS Analizi .....	31
3.2.1.	AgTiO <sub>2</sub> Nanopartikülü ICP-MS Analizi.....	31
3.2.2.	ZnOTiO <sub>2</sub> Nanopartikülü ICP-MS Analizi .....	36
3.2.3.	TiO <sub>2</sub> Nanopartikülü ICP-MS Analizi.....	41
3.3.	Nanopartiküllerin Hidrodinamik Boyutu .....	43
3.4.	Kuru Nanopartiküllerin Boyutları.....	44
4.	TARTIŞMA .....	46
5.	SONUÇLAR.....	53
6.	ÖNERİLER.....	56
7.	KAYNAKLAR .....	57
8.	EKLER.....	66
	ÖZGEÇMİŞ	

## Doktora Tezi

### ÖZET

#### *Artemia salina*'da TiO<sub>2</sub>, Ag TiO<sub>2</sub> ve ZnOTiO<sub>2</sub> NANOPARTİKÜLLERİNİN SULU SÜSPANSİYONLARININ TOKSİSİTESİ, BİRİKİMİ VE KÜMELEŞMESİNİN BELİRLENMESİ

Yeşim ÖZKAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. İlhan ALTINOK  
2014, 67 Sayfa, 2 Ek Sayfa

Bu çalışmada, TiO<sub>2</sub> AgTiO<sub>2</sub> ve ZnOTiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin *Artemia salina* naupli larvaları üzerine olan toksik etkileri ve akuatik stabilitesi araştırılmıştır. Akut maruziyet deneyleri deniz suyunda naupli organizmasında 0,0003125 den 100 mg/l'e değişen konsantrasyonda 24, 48, 72 ve 96 saat süresince yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar probit analiz yöntemine göre 24, 48, 72 ve 96 saat için belirlenmiş olup LC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla, TiO<sub>2</sub> için, 381,600; 70,122; 41,263; 18,771; AgTiO<sub>2</sub> için 23,027; 3,743; 1,064; 0,785 ve ZnOTiO<sub>2</sub> için 5,111; 0,296; 0,143 ve 0,119 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre; AgTiO<sub>2</sub> deki Ag nanopartik miktarı açısından konsantrasyonlar arasında fark bulunamazken, Ti'nin 0,01-0,1 mg/L ve 0,01-1 mg/l arasında istatistiksel fark vardır. ZnOTiO<sub>2</sub>'de Ti miktarı 0,01-0,5 mg/l anlamlı fark 0,1-1 mg/l çok anlamlı fark, Zn'nin 0,01-0,1 ile 0,1-1 mg/l ve TiO<sub>2</sub>'de 100-50 mg/l arasında anlamlı fark vardır. Nanopartikül miktarı açısından konsantrasyonlar ve birikim arasında AgTiO<sub>2</sub>'nin Ag ve Ti, ZnOTiO<sub>2</sub>'nin Zn ve Ti miktarı arasında anlamlı fark varken TiO<sub>2</sub>'nin Ti miktarı açısından anlamlı fark gözlenmemiştir. Mikroskop incelemelerinde ise nanopartiküllere maruz kalan *Artemia*'ların gözlerinde değişim, bağırsaklarında genişleme, dış kabuk şeklinde bozulma ve ekstremite kaybı ve malformasyon tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nanopartikül, TiO<sub>2</sub>, AgTiO<sub>2</sub> ve ZnOTiO<sub>2</sub>, *Artemia salina*, Akut toksisite



PhD. Thesis

## SUMMARY

### EFFECTS OF AQUEOUS SUSPENSIONS OF TiO<sub>2</sub>, AgTiO<sub>2</sub> ve ZnOTiO<sub>2</sub> NANOPARTICLES ON *Artemia salina*: ASSESSMENT OF NANOPARTICLE AGGREGATION, ACCUMULATION, AND TOXICITY

Yeşim ÖZKAN

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Fisheries Technology Engineering Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. İlhan ALTINOK  
2014, 67 Pages, 2

Aquatic stability and toxic effects of TiO<sub>2</sub>, AgTiO<sub>2</sub> and ZnTiO<sub>2</sub> nanoparticles were investigated on *nauplii* larvae of *Artemia salina*. Acute exposure tests were conducted for 24, 48, 72 and 96 hours on *nauplii* organisms with the concentrations ranges between and 0,03125-100 mg/L for TiO<sub>2</sub>, 0,003125 and 10 mg/L for AgTiO<sub>2</sub> and 0,0003125 and 1 mg/L for ZnTiO<sub>2</sub>. The results were obtained according to probit analyzes and LC<sub>50</sub> values for 24, 48, 72 and 96 hours were 381,600, 70,122, 41,263 and 18,771 mg/L for TiO<sub>2</sub>; 23,027, 3,743, 1,064 and 0,785 mg/l for AgTiO<sub>2</sub>; 5,111, 0,296, 0,143 and 0,119 mg/L for ZnOTiO<sub>2</sub>, respectively. Also, according to multiple comparison test; there were significant differences between the Ag concentration in AgTiO<sub>2</sub> nanoparticles. There were significant differences between 0,01 and 1 mg/L, and 0,01 and 0,1 mg/L of Ti. There were significant differences 0,01-0,5 mg/L, 0,1-1 mg/L of Ti, and 0,01-0,1 with 0,1-1 mg/L amount of Zn and 100-50 mg/L of TiO<sub>2</sub>. There were significant differences between the amount of Ag and Ti in AgTiO<sub>2</sub>, Zn and Ti in ZnOTiO<sub>2</sub>. There was no difference in terms of the amount of Ti in TiO<sub>2</sub> nanoparticles. After exposing *nauplii* to nanoparticles, morphological changes such as dilatation of intestine, distortions in the shape of the hull structure, limb loss and malformation were observed.

**Key Words:** Nanoparticle, TiO<sub>2</sub>, AgTiO<sub>2</sub>, ZnOTiO<sub>2</sub>, *Artemia salina*, Acute toxicity

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

- Şekil 1. *Artemia salina* larvaları için oksijen ve sürekli karıştırma ile nanopartiküllerin çökmesini önleyerek homojen karışım ortamı sağlayan toksikolojik test sistemi. .... 24
- Şekil 2. Farklı konsantrasyonlarda ki nanopartiküllere maruz kalan *Artemia salina* larvalarının gözlerinde görülen anormallikler. Normal göz yuvarlak ve siyah renkte iken (kontrol), nanopartiküllere maruz kalan artemiaların göz rengi kaybı (A3, A4, B3, C4), göz şeklinde değişim (A1, A2, A4, B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3) ve gözde silikleşme (A3, B3) ..... 29
- Şekil 3. Nanopartiküllerin *Artemia salina*'da sebep oldukları morfolojik değişimler. A) hiçbir nanopartiküle maruz kalmamış *Artemia salina*, B) nanopartiküllere maruz kalan *Artemia*'larda bağırsak genişlemesi ve dış kabuk yapısında görülen anormallikler C) nanopartiküllere maruz kalan *Artemia*'larda anten kaybı ve deformasyon ..... 30
- Şekil 4. AgTiO<sub>2</sub> nanopartikülüne 24 saat maruz bırakılan *Artemia*'ların bünyesine aldığı Ag miktarı (A) ve bu süre sonunda temiz deniz suyuna alınarak 24 saat sonra bağırsaktan attığı Ag miktarı (E)..... 33
- Şekil 5. AgTiO<sub>2</sub> nanopartikülüne 24 saat maruz bırakılan *Artemia*'ların bünyesine aldığı Ti miktarı (A) ve bu süre sonunda temiz deniz suyuna alınarak 24 saat sonra bağırsaktan attığı Ti miktarı (E)..... 35
- Şekil 6. ZnOTiO<sub>2</sub> nanopartikülüne 24 saat maruz bırakılan *Artemia*'ların bünyesine aldığı Ti miktarı (A) ve bu süre sonunda temiz deniz suyuna alınarak 24 saat sonra bağırsaktan attığı Ti miktarı (E)..... 38
- Şekil 7. ZnTiO<sub>2</sub> nanopartikülüne 24 saat maruz bırakılan *Artemia*'ların bünyesine aldığı Zn miktarı (A) ve bu süre sonunda temiz deniz suyuna alınarak 24 saat sonra bağırsaktan attığı Ti miktarı (E)..... 40
- Şekil 8. TiO<sub>2</sub> nanopartikülüne 24 saat maruz bırakılan *Artemia*'ların bünyesine aldığı Ti miktarı (A) ve bu süre sonunda temiz deniz suyuna alınarak 24 saat sonra bağırsaktan attığı Ti miktarı (E)..... 42
- Şekil 9. Kuru haldeki ZnOTiO<sub>2</sub> nanopartikülünün SEM görüntüsü ..... 44
- Şekil 10. Kuru haldeki AgTiO<sub>2</sub> nanopartikülünün SEM görüntüsü..... 45
- Şekil 11. Kuru haldeki TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün SEM görüntüsü ..... 45

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. Yükleme yapılan katalizörlerde Bragg eşitliği ile hesaplanan tanecik boyutu .....	23
Tablo 2. <i>Artemia</i> 'lar üzerine nanopartiküllerin toksik etkisini belirlemek üzere kullanılan nanopartiküllerin konsantrasyonları.....	25
Tablo 3. Nanopartiküllerin <i>Artemia salina</i> (naupli) bireylerine etkisinin LC <sub>50</sub> değerleri ....	28
Tablo 4. Çoklu karşılaştırma testi (Tukey): AgTiO <sub>2</sub> nanopartikülü içindeki Ag miktarı... 32	
Tablo 5. Çoklu karşılaştırma testi (Tukey): AgTiO <sub>2</sub> nanopartikülü içindeki Ti miktarı.....	34
Tablo 6. AgTiO <sub>2</sub> nanopartikülüne 24 saat maruz bırakılmış <i>Artemia</i> 'ların, normal deniz suyunda 24 saat sonunda çıkarttıkları Ag ve Ti nanopartikül yüzdeleri .....	35
Tablo 7. Çoklu karşılaştırma testi (Tukey): ZnOTiO <sub>2</sub> nanopartikülü içindeki Ti miktarı... 37	
Tablo 8. Çoklu karşılaştırma testi (Tukey): ZnOTiO <sub>2</sub> nanopartikülü içindeki Zn miktarı.. 39	
Tablo 9. ZnTiO <sub>2</sub> nanopartikülüne 24 saat maruz bırakılan <i>Artemia</i> 'ların, normal deniz suyunda 24 saat sonunda çıkarttıkları Zn ve Ti nanopartikül yüzdeleri.....	40
Tablo 10. Çoklu karşılaştırma testi (Tukey): TiO <sub>2</sub> nanopartikülü içindeki Ti miktarı.....	41
Tablo 11. TiO <sub>2</sub> nanopartikülüne 24 saat maruz bırakılan <i>Artemia</i> 'ların normal deniz suyunda 24 saat sonunda çıkarttıkları Ti nanopartikül yüzdeleri.....	42
Tablo 12. Nanopartiküllerin sulu süspansiyonlarının MasterSizer'daki boyut ölçümü (µm).....	43

## SEMBOLLER DİZİNİ

ANOVA	Varyans Analizi
ZnO	Çinko oksit
AgO	Gümüş oksit
Ag	Gümüş
LC <sub>50</sub>	Canlıların %50'sini öldüren letal konsantrasyon
mm	Milimetre
nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
TiO <sub>2</sub>	Titanyum dioksit
A	Akümülyasyon
E	Eliminasyon
Ppb	Milyarda bir

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Nanoteknoloji, nanometre boyutundaki nesnelere inceleyen bilim dalı olup biyoloji, kimya, fizik ve çeşitli mühendislik programlarıyla bütünleşmiş bir bilim olarak bilim dünyası tarafından kabul edilmektedir (Lehn, 2002). Bu sebeple de değişik disiplinler değişik şekillerde nanoteknolojiyi tanımlamıştır. Yaygın olarak kullanılan tanım ise; 100 nanometre (nm) ve daha küçük nm ölçekli madde imalatı, manipülasyonu, hassas yerleştirme ölçüm veya modelleme olarak tanımlanır (Meyer ve Kuusi, 2000).

Nanoteknoloji uygulamaları geleneksel materyallerin temel, fiziksel, kimyasal özelliklerinin değişmesine sebep olur. Bu değişiklikler, geleneksel materyallerin boyutlarının nano ölçeklere indirgenmesinden kaynaklanır ki böylece mükemmel elektrik, optik ve mekanik özellikleri olan yeni materyaller/malzemeler oluşturulur (McWilliams, 2006).

Nanopartiküller, doğada doğal olarak; orman yangınları, volkanik patlamalar gibi doğa olayları tarafından üretilen atmosferik parçanın bir kısmı, hem de mevcut endüstriyel süreçler sonucu örneğin kaynak, metal erimesi, otomobil egzozu ve endüstriyel süreçler boyunca üretilen dumanlardan da meydana gelebilir (Nel, 2005). Ayrıca Fullerenler ve karbon nanotüpleri kretase-terziyer zaman sınırında maden ocaklarında ve jeolojik tortularda da tespit edilmiştir (Chijiva vd., 1999).

İnsanoğlu evrimsel aşamaları boyunca havadaki nano boyutlu parçacıklara maruz kalmasına rağmen, son yüzyılda antropojenik kaynaklardan dolayı bu maruziyeti önemli ölçüde artmıştır. Son yıllarda ise nanopartiküllerin sağlığa etkileri dünya genelinde endişe yaratmakta ve bu durum hızla dikkat çekmektedir (Chen vd., 2006).

Çevredeki nanomateryallerin üç büyük kaynağı vardır. Bunlar antropojenik kaynaklar, kasıtsız (unintentional) kaynaklar ve mühendislik nanomateryallerinin üretimi ve kullanımınıdır. Karbon temelli nanomateryaller mühendislik nanopartikülü olup tek katmanlı/duvarlı karbon nano tüp, çok katmanlı karbon nano tüp, ve çift katmanlı karbon nano tüp olmak üzere üç şekilde sınıflandırılır. Metal ve metal oksit nanopartiküller mühendislik nanopartikülü olabildiği gibi doğal olarakta bulunmaktadır. Kuantum noktaları mühendislik nanopartikülü olup CdTe, CdSO<sub>4</sub> ve CdSe örnek olarak verilebilir.

Bu nanopartiküller içerisinde özellikle son birkaç yıl içinde, mühendislik nanopartiküllerin toksikolojik özellikleri üzerinde araştırmalar da büyük bir artış olmuştur çeşitli mühendislik nanopartiküllerinin oldukça yaygın kullanımı sonucu potansiyel maruz kalmayı da artırmıştır. İmal edilen nanopartiküllere karşı canlılar nefes alma, deri ve oral yolla maruz kalmaktadır (Borm vd., 2006).

Malzemenin boyutları nano ölçek düzeyine yaklaştıkça ortaya çıkan yeni özellikleri sayesinde, nanomalzemeler endüstride geniş kullanım alanı bulmuş ve geliştirilen ürünler hızla gündelik yaşama girmiştir (Handy vd., 2008). Tekstil sektöründe giyim ürünlerinin yanı sıra teknik ürünlerde de nanomalzemeler kullanılmaktadır. Ziraî tekstiller, inşaat tekstilleri, spor tekstilleri, endüstriyel tekstiller, tıbbi tekstiller gibi teknik tekstil ürünleri nanomalzemeler kullanılarak geliştirilmektedir. Ayrıca boya sanayinde de nanoteknolojik malzemelerden yararlanılmış, binaların çoğunlukla dış cephelerinde ve gerektiğinde iç cephelerinde kullanılmak üzere; kendi kendini temizleme, yüksek koruma, koku giderme, antimikrobiyal ve antibakteriyal gibi özellikler taşıyan boyalar geliştirilmiştir. Nanoteknolojiden yararlanan bir başka sektör de kozmetik sektörüdür. Nanomalzemeler kullanılarak üretilen diş macunu, güneş kremleri, ruj, göz farı, tıraş losyonu, nemlendirici, deodorant gibi çeşitli ürünler raflarda yerlerini almıştır. Diğer bir endüstri dalı olan otomotiv endüstrisi de; hafif motor ve çerçeve parçalarının yapımı, sürtünmeye karşı dirençli boyaların üretimi, aşınmaya karşı koruyucu tabakalar geliştirilmesi gibi alanlarda nanoteknolojiden faydalanmıştır (Scenihr, 2006). Bu nanomateryallerin ve nanopartiküllerin güvenliği/toksisitesi hakkında bilgiler ise günümüzde hala yetersizdir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar da nanopartiküllerin boyutu, şekli, kimyası, kristalinitesi, zeta potansiyeli, yüzey özellikleri ve yığılma (küme/agregat oluşturma) durumu toksisitesini değiştiren kritik parametreler olduğunu rapor etmiştir.

Nanopartiküllerin toksik özellikleri, onların kimyasal kompozisyonuna miktarına, çözünürlüğüne, şekline, yüzey alanına ve yüzey yükleri gibi parametrelerine bağlıdır. Ayrıca nanopartiküllerin üretimi sırasında kaynaklanan safsızlıklarında toksisitesini büyük oranda etkilemektedir (Kaplan vd., 2007).

Nanoteknolojinin hızlı gelişmesi ile üretilen/mühendislik nanopartiküllerin potansiyel sağlığa ve çevreye tehlikeleri son yıllarda endişe yaratmaktadır (Service, 2005; Nel vd., 2006). Nanoteknolojinin sağlık üzerine etkileri konusunda bu alanda ilerlemiş ülkelerde farklı derecelerde hassasiyetlerini göstermektedirler. Örneğin, Rusya nanoteknoloji alanındaki gelişmiş olmasına rağmen, insan sağlığı ve çevre üzerindeki

nanomalzemelerin etkileri ile ilgili konulara yeterince önem vermemiştir (Tretyakov, 2007; Krysanov vd., 2010). Oysa Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Topluluğu bu problemleri çözmek için özel programlar geliştirmiştir (Service, 2005).

Nanoteknolojinin ve nanomalzemelerin uluslararası arenada önem kazanması ve kullanımının artmasıyla ABD'de ve Avrupa'da çok sayıda kuruluş bu ürünlerin risk haritasını ortaya çıkarma çalışmalarına başlamıştır (Wiesner vd., 2006). Nanoteknolojinin kullanım alanının genişliği ve hızla gelişip yayılması göz önünde bulundurulduğunda, nanomalzemelerin ekotoksikolojik etkilerinin belirlenmesi çevre ve halk sağlığını korumada önemlidir (Moore, 2006).

## **1.2. Nanopartiküller ve Kullanım Alanları**

1981 yılında taramalı tünelleme mikroskopunun (STM), daha sonra 1985 yılında atomik kuvvet mikroskopunun (AFM) keşfi, yüzeyde bulunan atomların ve moleküllerin gözlenmesine, atomsal düzeyde tepkimelerin izlenmesine olanak tanımıştır. Böylece 20. yüzyılın son çeyreğinde nanoteknolojiyle tanışılmış ve doğada bulunmayan yeni nanoyapıların atomsal düzeyde sentezlenmesine başlanmıştır (TÜBİTAK, 2004).

Son yıllarda, dünya ülkeleri nanoteknoloji alanındaki yatırımlara oldukça yüklü kaynaklar ayırmaktadır. Bu ülkelerin başında ABD gelmekte, sırasıyla Japonya Rusya, Almanya Fransa, Çin, Güney Kore İngiltere, Hollanda ve Kanada takip etmektedir. 21. yüzyılda bilgi alma teknolojileri, malzeme bilimi, biyoteknoloji, çevre mühendisliği, kimya mühendisliği, elektrik mühendisliği ve moleküler kimya gibi birçok farklı bilim dalındaki gelişmeler nano ölçekte ilerlemektedir (Nowack ve Bucheli, 2007). Nano alan gelecekteki mühendislik ve bilim çalışmalarının temelini oluşturacak bilimler arası araştırmaların ve eğitimin esas basamağı olarak görülmektedir.

İmal edilmiş nanopartiküllerden olan karbon 60 (fulleren, buckyballs), bir karbon allotropu ailesidir. Saf karbondan oluşan fulleren molekülü futbol topunu andıran bir yapıya sahiptir. Bunlara otomobillerde ve spor malzemelerinde kullanılan karbon kompozitler ve dönme hareketi yapan elektronik elemanlar örnek verilebilir (Nowack ve Bucheli, 2007; Ju-Nam ve Lead, 2008). Karbon nanotüpler (buckytubes), grafitin 1-10 nm çapında ve birkaç mikrometre uzunluğunda bir silindir oluşturacak şekilde yuvarlanmasıyla elde edilmiş yapılardır (O'Connel, 2006; Nowack ve Bucheli, 2007). Bir başka deyişle karbon nanotüpler, fullerenlerin silindir şeklindeki formlarıdır ve

nanoelektronik ve nanomekanik devrelerde kullanılmak için elverişlidirler (Ju-Nam ve Lead, 2008).

Nanotozlar, büyüklüğü 1-100 nm arası değişen bileşiklerdir. Nanotoz olarak üretilen materyaller; metallere, metal oksitler, boritler, karpitler, nitritler ve sülfürler iken metal olmayan materyaller ise karbon, kalay, silika ve silikon karpitler olarak sıralanabilir (Pritchard, 2004). Titanyum dioksit ve çinko oksit nanotozları; güneş losyonu, kozmetik, boya ve kaplamalar, ayrıca içme sularındaki kontaminantların uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Gözlük camlarında, merceklerde kullanılan çizilmeyi önleyen kaplamalar ve tıbbi amaçlı kullanılan camlara kendi kendini temizleme özelliği veren kaplamalar titanyum dioksit nanotozları içermektedir. Mikro ölçekli tozlar yerine alüminyum nanotozlar, patlayıcı maddelerde ve havai fişeklerde yanma niteliklerini artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Elmas nanotozlar; zımpara, macun, mercek ve ayna gibi optik aletlerde istenilen yüksek parlaklığı elde etmek için kullanılmaktadır. Yağların, yağlama özelliklerini geliştirmek amacıyla da elmas nanotozlar kullanılmaktadır. Boyalara ilave edilen gümüş ve elmas nanotozları boyanın dış etkenlerle aşınmasını önlemek ve koruma sağlamak için kullanılmaktadır. Nanobakır, aşınmayı önleyici yağ katkıları, elektriksel materyaller, bilgisayar donanımları ve askeri malzemelerde kullanılmaktadır. Nanogümüş ise daha çok antimikrobiyal özelliğiyle bilinmektedir. Bu nedenle tekstil sanayinde bakteri eliminasyonu koku önleyici, gıda paketlenme ve beyaz eşya sanayisinde de kullanılmaktadır (Mark vd., 2007). Nanoteknoloji alanındaki ürün çeşitliliği, teknolojinin gelişmesine paralel olarak hızlı bir şekilde artmaktadır. Ürün sayısı 2005 yılında 54 iken 2010 yılında bu sayı 1317 ye ulaşmıştır (Xue ve Hwang, 2011).

### **1.3. Toksikoloji**

Toksikoloji kimyasal ve fiziksel etmenlerin canlı organizmalar ve ekosistemler üzerindeki zararlı, tahrip edici etkilerini inceleyen ve bu etmenlerden dolayı ortaya çıkan riskleri belirleyen bilim dalıdır. Toksikoloji kelime anlamı olarak zehir bilimini ifade eder ve maddelerin canlı organizmalar üzerine istenmeyen, zararlı ve olumsuz etkilerini inceler. Her yıl endüstriyel, ilaç, kozmetik ve gıda katkı maddesi olarak üretilen pek çok kimyasal madde bir yandan avantaj sağlarken bir yandan da daha çok kimyasal maddeye maruz kalınmasına neden olmaktadır. Son yıllarda ise hızla yaşantımıza her gün nanoteknolojiyle üretilen ürünler girmektedir. Bu maddeler ve ürünler az veya çok oranda toksik etki



meydana getirebilirler ve sağlık için tehlikeli sonuçlar ortaya çıkabilir. Bu kimyasal maddelerin etkilerini bilmek ve onlara toksik düzeyde teması önlemek toksik etki oluşum riskini azaltmaktadır. Bu anlamda zararlı etkenlerden korunmak, olası riskleri belirlemek ve bilgilendirmek ve zehirlenmelerde yeni tedavi yaklaşımları geliştirmek toksikolojinin uğraşları arasındadır (Güner, 2008).

Nanopartiküller, kimyasal maddeler ve radyasyon formunda ki fiziksel ajanlar gibi bütün yabancı maddeler ksenobiyotikler olarak adlandırılır ve bunlar toksikolojinin ilgi alanına girer. Ksenobiyotik, organizmanın normal metabolizması için gerekli olmayan çeşitli yollarla dışarıdan vücuda alınan tüm yabancı maddelere denir. Ksenobiyotiklerin biyolojik sistemlerde oluşturdukları olumsuz, istenmeyen etkileri toksik etki olarak tanımlanır. Toksikite ise ksenobiyotiklerin toksik etki oluşturmasıdır (Güner, 2008).

#### **1.4. Toksikolojik Testler**

Toksikite deneyleri, toksik maddelerin zararlı etkilerini ve su kalitesini belirlemek, atıkları ve bu atıkların boşaltıldığı alıcı ortamları izlemek, gıda zincirinin üst seviyesindeki canlıları korumak, insanlar tarafından tüketilen su ürünlerinin sağlık açısından zararlı olup olmadıklarını belirlemek ve toksik maddelerin organizmalar üzerindeki uyarıcı etkilerini ve biyolojik birikimini gözlemlemek için kullanılmaktadır. Ayrıca, farklı toksik maddelerin canlı organizmalara olan etkilerini karşılaştırmak ve bu toksik maddelere karşı tepkilerini ölçmek amacıyla da bu testler yaygın olarak kullanılmaktadır (Klauning, 2000; Leblond vd., 2001).

Uygun yol ve dozda alınmayan her madde zehir etkisi yapabilir. Bu etki bir yapı değişikliği şeklinde olabileceği gibi biyokimyasal lezyon şeklinde de olabilir. Ortaya çıkan etki, geri dönüşümlü olabileceği gibi hücre ölümü şeklinde de olabilir (Vural, 1996). Canlı hücreler üzerinde kimyasal maddelere bağlı önemli yapı ve fonksiyon değişikliklerinin saptanması ve yorumlanması amacıyla deneysel toksikolojik çalışmalar yapılmaktadır (Loomis, 1978).

Toksikite testleri, sadece kimyasal maddelerin canlı organizmalar üzerindeki zararlı etkilerini açıklamak için yapılmaz. Bu maddelerin toksik etkilerinin görülmeyeceği doz değerlerini saptamak için de yapılır. Eğer uzun süreli madde maruziyetine bağlı toksik etkiler araştırılacak ise, deneyin yapıldığı zaman periyodu içerisinde de aynı özellikte maddelerin, su hacimlerinin ve test koşullarının uygulanması gerekir (Altınok vd., 2011).

Beklenen toksik etkinin görülmesine yönelik testlerde, bu etkiyi oluşturduğu bilinen bir kimyasal maddenin, pozitif kontrol grubuna uygulanması ve deneyin sağlıklı işlediğinin test edilmesi gerekir (Saygı vd., 1991; CPMP, 2000).

Toksikolojik testlerde kullanılan deney hayvanları farklı konsantrasyonlarda toksik maddelerin bulunduğu ortamda tutularak bu maddelerin hayvanlar üzerindeki etkileri araştırılır. Bu araştırmalarda; ölümler, üreme ve denge bozuklukları, gelişme durumları, yüzme yetenekleri, histolojik ve biyokimyasal değişimler ve organların aktiviteleri gibi faktörler incelenir. Testlerde kullanılan materyal tek bir kirletici olabileceği gibi birden fazla madde içeren kompleks bir karışım da olabilir (APHA, 1992; Laufer ve Nation, 1999). Toksik maddenin belirli miktarlarda çözeltileri kullanılacağı için bu maddenin bir çözücü yardımıyla çözülebilir olması gerekmektedir. Kullanılan bu çözücü maddelerin de toksik etkilerinin dikkate alınması gerekir (EPA, 1993; Ünsal, 1998; Altınok, 2004).

Toksisite testleri; testin süresine, test ortamına, toksik madde ilavesine ve amaçlarına göre sınıflandırılmaktadır. Test sürelerine göre yapılan sınıflandırmada testler, akut ve kronik olmak üzere iki şekilde gruplandırılır. Akut toksikolojik testler, deney süresi 24, 48, 72 ve 96 saatlik zaman dilimleri kullanılarak yapılmaktadır. Deney süresi, deneyde kullanılacak canlı türüne göre de değişiklik göstermektedir. Bu süre boyunca kullanılan organizmanın büyüme ve gelişimi de göz önünde bulundurulmalıdır. Kronik testlerde deney süresi bir hafta ile bir ay arasında olabilir veya daha uzun süreler de kullanılabilir. Bu test türünde genellikle farklı toksik madde miktarlarının organizmaların üreme ve gelişmeleri üzerine etkileri incelenmektedir (FAO, 1987; Ünsal, 1998).

Toksikolojik testler, deney ortamına kirletici ilavesine göre statik, yarı statik ve sürekli akış sistemli olacak şekilde üç gruba ayrılmaktadır. Statik testlerde deneye tabi tutulacak organizmalar uygun bir düzenek içerisinde hazırlanmış deney ortamına konur ve deney süresi boyunca herhangi bir değişiklik yapılmaz. Bu deneylerde metabolizma sonucu oluşan atıkların su kalitesinde meydana getireceği olumsuzlukları gidermek amacıyla genellikle 96 saatlik süre tercih edilmektedir. Yarı statik toksik testlerde, deney ortamı belirli zaman aralıklarıyla yenilenmekte olup, bu zaman aralıkları toksik madde ve deneyde kullanılan organizma türüne göre değişmektedir. Bu test türünde genellikle farklı zaman dilimleri tercih edilmektedir. Bu sayede, statik testlerde metabolizma atıkları ve diğer bazı nedenlerden kaynaklanan su kalitesindeki değişimlerin olumsuz etkileri ortadan kaldırılmış olmaktadır. Sürekli akış sistemli testlerde ise, deney ortamı devamlı olarak yenilenir ve deney süresince su kalitesinde metabolizma atıkları nedeniyle herhangi bir

değişiklik meydana gelmez. Bu testler kısa süreli toksik deneyler için tercih edilmekle birlikte, doğal ortam şartlarını en iyi şekilde temsil etmektedir (FAO, 1987; Ünsal, 1998).

### **1.5. Toksikolojinin Alt Grupları**

Toksikoloji gelişme sürecinde olan bir bilim dalı olduğu için alt dalları sayıca ve kapsam olarak değişim göstermektedir. 1974 yılında Loomis toksikolojiyi çevre toksikolojisi, ekonomik toksikoloji ve forensik toksikoloji olarak 3 gruba ayırmıştır. 1987 yılında ise bu sınıflama Hodgson tarafından çevre toksikolojisi, besin toksikolojisi, endüstriyel toksikoloji, klinik toksikoloji ve forensik toksikoloji olarak yeniden düzenlenmiştir. Günümüzde bu sayıyı arttırmak mümkündür son yıllarda ise yeni bir bilim dalı olarak nanotoksikoloji bilim dalı ortaya çıkmıştır.

### **1.6. Çevre Toksikoloji (Ekotoksikoloji)**

Çevre toksikolojisi, çevrede bulunan kimyasal maddelerin yayılımlarını ve canlılar ve ekosistem üzerindeki zararlı etkileri ile bu zararlı etkilerin önlenmesi konusunda çalışmalar yapan toksikolojinin alt dalıdır.

### **1.7. Nanotoksikoloji**

Nanotoksikoloji, nanopartiküllerden kaynaklanan sağlığa zararlı etkilerin açıklandığı toksikolojinin yeni bir dalı olarak ifade edilmektedir (Donaldson vd., 2004). Nanoteknoloji endüstrisi, maddelerin nano ölçekte alışılmamış özellikler kazanmasının keşfedilmesiyle hızlı bir gelişme göstermiştir ve nanopartiküllerin bu özellikleri aynı zamanda potansiyel toksisiteleri ve ekotoksikolojileri hakkında endişelere sebep olmuştur. Değişen kuantum davranışları ve reaktivitelerinin artması, imal edilmiş nanopartikülleri sanayide pek çok uygulamada kullanılabilir hale getirmiştir, fakat bu maddeler çevre ve canlı organizmalar üzerinde beklenmedik etkiler meydana getirebilmektedir (Handy vd., 2008). Bunun yanında, nanopartiküller küçük boyutları sayesinde bir bariyer oluşturarak diğer ksenobiyotiklerin membran ve hücrelerarası bağlantılardan geçerek canlı organizma hücrelerine girişini engellemektedirler. Nanopartiküllerin reaktivitelerinin artması

potansiyel olarak zararlı hücrel etkiler oluşturabilmekte ve canlı organizmalara zarar verebilmektedir. Bugüne kadar imal edilmiş nanopartiküllerin, özellikle sucul ortamlardaki canlı organizmalar üzerindeki etkilerinin araştırıldığı pek az çalışma mevcuttur (Oberdörster vd., 2007; Crane vd., 2008; Griffitt vd., 2008; Kroll vd., 2009). Bu nanopartiküllerin bilinen maddelerden farklı ve eşsiz özellikler göstermesi ve bu özelliklerinin iyi derecede bilinmemesi toksisite deneylerinde bazı istenmeyen durumlara sebep olabilmektedir. Bu yüzden, nanopartiküllerin özelliklerini belirlemek için detaylı karakterizasyon çalışmaları yapılmaksızın günümüzde yapılan in vitro toksik test metotları, nanopartikül toksisite değerlendirme çalışmaları için elverişli değildir (Schulze vd., 2008). Nanopartiküllerin bilinen kimyasallardan farklı özellikler göstermesi, toksisite testlerinde kullanılan malzeme ve destek malzemeler ile etkileşime girmelerine neden olmaktadır, bu nedenle nanopartikül risk değerlendirme çalışmalarında farklı maruz bırakma teknikleri kullanılmalı ve uygun bir kontrol sistemi oluşturulmalıdır.

Risk değerlendirmesi yapılan in vitro nanotoksikolojik çalışmalarda nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri uygun bir test sisteminin kurulumunu sınırlamaktadır. nanopartiküllerin toksisitelerini belirlemek için kullanılan test metotları nanospesifik özelliklerden etkilenmeyecek şekilde dizayn edilmelidir (Nel vd., 2006). Bunun yanında, son zamanlarda gerçekleştirilen nanopartiküllerin risk değerlendirme çalışmalarında kullanılan test sistemlerinin standardizasyon eksikliği nedeniyle, elde edilen sonuçlar bakımından farklı laboratuvarlar arasında önemli farklılıklar göze çarpmaktadır (Lilienblum vd., 2008). Bu çalışmada nanopartiküller için sulu fazda yapılması düşünülen toksisite testlerini standart hale getirecek ve farklı laboratuvarlar tarafından yapılan çalışma sonuçları arasındaki karşılaştırılabilirlik sorununu ortadan kaldıracak yeni bir test sistemi geliştirilmiştir. Yapılan değerlendirme ve doğrulama çalışmaları sonucunda, yeni geliştirilen bu test sisteminin nanopartiküllerin spesifik özelliklerinden etkilenmediği ve genel bir in vitro toksisite test prosedür standardı oluşturduğu kanıtlanmıştır. Nanopartiküllerin yapışkanlık ve çökme özelliklerinden dolayı toksisite denemelerinde tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar elde edilememektedir. Bu nedenle, toksisite deneylerine başlamadan önce nanopartiküllerin karakteristik özelliklerinin dikkatli bir şekilde belirlenmesi ve risk değerlendirmesi için metot oluşturulacağı zaman ayrıntılı bir doğrulama işleminin yapılması gerekmektedir.

### **1.8. Akuatik Toksikoloji**

Akuatik toksikoloji, ekotoksikoloji biliminin bir alt dalı olup kimyasal ve diğer antropojenik (insan etkisiyle oluşan) veya biyotik olmayan maddelerin akuatik (sucul) organizmalara karşı toksik etkilerini kalitatif (nitel) ve kantitatif (nicel) olarak inceleyen çalışmaların bütünüdür (Forbes ve Forbes., 1994). Toksik etkiler öldürücü olabildiği gibi canlıların büyüme, üreme, gelişme, biyokimyası, fizyolojisi ve davranışları üzerinde değişikliklere neden olabilmektedir. Akuatik toksikoloji sucul ekosisteminin parçaları olan su, sediment ve besin maddelerindeki kimyasal maddelerin konsantrasyonlarıyla yakından ilişkilidir (Bat ve Raffaelli., 1998a, b) .

Genel olarak akuatik organizmalar akut (kısa süreli) ve kronik (uzun süreli) olarak toksik maddelere maruz bırakılır. Akut toksik etkiler 7-9 gün veya daha kısa süreli olup genellikle 96 saattir. Akut etkiler genellikle öldürücü olarak incelenir. Kronik etkiler ise genellikle düşük konsantrasyonlardaki kirleticilerin uzun süreli (hafta, yıl, ay) etkileri incelenerek değerlendirilir. Bu süre genellikle 28 gün olarak uygulanır. Kronik etkiler öldürücü olabildiği gibi toksik olup öldürücü olmayabilir. Bu etkiler genellikle canlının embriyo veya larval dönemlerinde veya üreme dönemlerinde yâda canlının ömrü kısa ise tüm hayatı boyunca incelenebilir. Toksik olup öldürücü olmayan etkiler ise davranış (yüzme, beslenme, av-avcı ilişkisi, kirleticilerden kaçış), fizyolojik (büyüme, üreme ve gelişme), biyokimyasal (kan enzimleri, iyon düzeyleri) ve histolojik olarak gözlenir (Rand, 1995; Rand vd., 1985). Bazı toksik etkiler ise dolaylı yoldan ölüme neden olabilmektedir. Örneğin; yüzme yeteneğinin yavaşlaması ile avcılara yem olması veya beslenememesi veya bentik olan türlerin kendisini sedimente gömerek koruyamaması sebebiyle ölümlere neden olabilir (Bat, 1997; Bat, 1998; Bat ve Raffaelli., 1998a, b).

### **1.9. Nanopartiküllerin Toksisitesini Etkileyen Faktörler**

Mühendislik nanopartiküllerinin sıra dışı özelliklerinin potansiyel tehlikelerini (toksisite) değerlendirmek için yeni araştırmacı yaklaşımlara gereksinim vardır. Partiküllerin boyutu küçüldüğü zaman, toksisite eğiliminin arttığı hatta aynı materyalin toplu/yığın (bulk) (örneğin, siyah karbon, TiO<sub>2</sub>) halde nispeten atıl (etkisiz) durumda olduğu yapılan çalışmalarla kaydedilmiştir. Bulara ek olarak, partiküllerin boyutunu,

kaplama etkisi, yüzey işlemleri, morötesi ışın (UV) ile yüzey uyarım ve partikül toplama parçacık boyutunu değiştirebilir (Farre vd., 2009).

Klasik (mikro ölçek) maddeler ile kıyaslandığında nanopartiküllerin, büyük yüzey alanı ve nano ölçeklerinden dolayı ciddi toksisite üreten biyolojik sistemlerle daha verimli şekilde etkileşebilir. Çünkü nanomaddelerin nano boyutlu yüzey alanları, yüzey özellikleri (nanopartikül atomlarının yaklaşık %40-50'si yüzey üzerinde bulunur), kimyasal reaksiyon, fiziksel absorpsiyon yeteneği, vb gibi pek çok temel özellikleri ile ve nanopartiküllerin boyutları ile ilişkilidir. Tüm bu faktörler *in vivo*'da güçlü nanotoksikolojik davranışlara hükmeder (Zhao vd., 2007). Bununla birlikte, geleneksel toksikolojik araştırma yaklaşımları genellikle fiziksel boyutu ve yüzey alanının etkilerini göz önünde bulundurmaz (Farre vd., 2009).

### **1.10. Nanopartiküllerin Canlılardaki Toksik Etki Mekanizması**

Nanopartiküller canlı organizmalarda birkaç farklı mekanizmayla toksik etki oluşturabilirler. *In vivo* nanotoksitenin ana moleküler mekanizması, oluşan serbest radikaller nedeniyle canlı vücudunda hücrel oksidatif stres meydana gelmesidir (Lanone ve Boczkowski, 2006). Nanopartiküllere aşırı miktarda maruz kalma durumunda, serbest radikaller; lipid, protein ve DNA'nın oksidasyonuna sebep olarak biyolojik bileşenlerde hasar meydana getirirler. Oksidatif stres, hücrel inflamasyonun oluşması ve artmasında önemli rol oynar. İltihaplanma oluştuğunda redoks duyarlı transkripsiyon faktörü, protein-1 aktivatörü ve kinaz miktarında artış meydana gelir (Rahman, 2000; Rahman vd., 2005; Lanone ve Boczkowski, 2006). Serbest radikaller, yabancı maddelere karşı fagositik hücre etkisi, antioksidan madde miktarının yetersiz olması, geçiş metallerinin varlığı, çevresel faktörler ve bazı nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri gibi birkaç farklı faktörden meydana gelebilir (Lanone ve Boczkowski, 2006). Nanopartiküllerin ürettiği potansiyel serbest radikallerin yavaş temizlenmesi ve dokularda birikim oluşturması, ayrıca retikuloendotelial sisteme ait organlarda çok sayıda fagositik hücrenin yaygın olarak bulunması, karaciğer ve dalak gibi organları oksidatif stresin ana hedefi haline getirmektedir. Bunun yanında, böbrek ve akciğer gibi yüksek miktarda kan akışı olan organlar da nanopartiküllere maruz kalındığında olumsuz etkilenebilen organlardır.

Nanopartiküller canlı hücre içerisindeki hücrel bileşenlerle etkileşime girebilir, hücrel fonksiyonları bozabilir veya değiştirebilir ve reaktif oksijen türleri oluşturabilirler.

Nanopartiküllerin mitokondri ve hücre çekirdeği ile etkileşime girmelerinin zehirlenmenin ana kaynağı olduğu düşünülmektedir. Gümüş ile kaplanmış altın nanopartiküller, fullerenler, blok kopolimer tanecikleri ve karbon nanotüpler hücre içerisindeki mitokondriye yerleşebilir ve apoptoze (programlı hücre ölümü) ya da reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olabilirler. Bunun sonucunda da oluşan hücre DNA hasarı, hücre döngüsünde aksama, mutagenез ve apoptozis zehirlenmenin ana kaynağını teşkil eder (Unfried vd., 2007). Günümüzde hala tartışılan bir durum olmasına rağmen, nanopartiküllerin makrofaj ve nötrofillerdeki serbest radikal kaynakları olan NADPH oksidaz ve ksantin oksidazın artmasına neden olabileceği düşünülmektedir (Lanone ve Boczkowski, 2006).

Nanopartiküllerin diğer toksisite mekanizmalarının, buldukları ortamla çok hızlı bir etkileşime girmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Nanopartiküller dolaşım sistemine girdiklerinde kan bileşenleriyle etkileşime girerek hemoliz ve trombozise sebep olabilirler. Bununla birlikte, nanopartiküllerin bağışıklık sistemi ile etkileşimi sonucunda canlılarda immünotoksisteyi arttırdıkları tespit edilmiştir (Dobrovolskaia ve McNeil, 2007).

### **1.11. Nanopartiküllerin Alıcı Ortamlara Salınımı**

Nanopartiküllerin sucul ortamlara karışması araştırılması gereken yeni çevresel problemlere neden olmaktadır. Bilim adamları öncelikli olarak araştırılmaya gerek duyulan alanlar; küçük partiküllerin hidrodinamik davranışları, nanopartiküllerin daha büyük sedimentler ve kolloit partiküllerle ilişkisi, lipofilik organik bileşiklere ve metallere bağlanma özellikleri, diğer kimyasal kirleticilerle oluşan ve toksisitenin artmasına sebep olan sinerjistik etki, nanopartiküllerin canlı organizmalar tarafından vücuda alınma yolları, parçacık büyüklüğü ve yüzey özelliklerinin önemi ve nanopartiküllerin sucul ekosistemler üzerindeki etkileri olarak sıralanmaktadır (Moore, 2006).

Endüstriyel atıkların çoğunun ve şehirsal atıksu deşarjlarının nehirlere, göllere ve kıyısularda karıştığı iyi bilinen bir gerçektir. Bu nedenle, nano ölçekli endüstriyel ürünler ve yan ürünlerin de sucul ortamlara karışması kaçınılmazdır (Daughton, 2004). Bununla birlikte, çevresel izleme tekniklerinin yetersiz olması ve maddelerin normal ve nano formlarının ayırt edilmesindeki zorluklardan dolayı nanopartiküllerin çevreye salınımı ve miktar konusunda çok az bilgi mevcuttur. Günümüzdeki modelleme teknikleri

nanopartiküllerin çevresel konsantrasyonlarını  $\mu\text{g/L}$  düzeylerinde tespit edebilmektedir (Boxall vd., 2007). Örneğin,  $\text{TiO}_2$ -nanopartiküllerin İskandinav sucul ekosistemlerinde tahmin edilen konsantrasyonu 0,0007 ile 0,0245  $\mu\text{g/L}$  arasında değişmektedir (Mueller ve Nowack, 2008; Perez vd., 2009).

Yapılan çalışmalar farklı sucul ortamlarda askıda katı maddelerin, kimyasal kirleticilerin ayırımı ve uzak mesafelere taşınımı konusunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca, nehirlerin ve kıyısız bölgelerin hidrodinamik ve morfolojik özellikleri de nanopartiküllerin dağılım sınırlarını belirlemektedir (Smedes, 1994). Denizel ve kıyısız sucul çevrelerde; şeker, protein ve lipid içeren deniz yüzey suyu mikrotabakası nanopartiküllerin davranışlarında önemli rol oynamaktadır. Özellikle lipid kısmı, lipofilik nanopartiküllerin ayrışmasında önemli bir faktör olmaktadır (fullerenler ve karbon nanofiberler). Şüphesiz bu durum nanopartiküllerin su ekosistemlerindeki davranışlarını ve biyolojik olarak kullanılabilirliğini etkilemektedir. Yüzealtı denizel ve kıyısız ekosistemleri, pekçok omurgasız canlı ve balık türlerine ait pelajik yumurta ve larvaları içeren geniş mikrobiyal topluluklara sahiptir (Wurl ve Obbard, 2004). Nanopartiküllerin sucul organizmalar tarafından vücuda alınım yolları; direkt olarak yutma, solungaçlar aracılığıyla giriş, koku alma organları ve deri yoluyla vücut duvarından geçiş şeklindedir. Protista ve metazoanlar gibi ökaryotik organizmalar nano (<100 nm) ve mikro (100 nm-100,000 nm) ölçekli partiküllerin hücrel olarak içselleştirilmesi için endositoz ve fagositoz olarak ifade edilen çok gelişmiş süreçlere sahiptir (Pelkmans ve Helenius, 2002; Reiman vd., 2004). Omurgasız canlılarda hücrel bağışıklık sistemi, bağırsak epiteli ve hepatopankreas, yutulan nanopartiküller için muhtemel hedef bölgeleri iken (Moore, 1990), balıklarda ise karaciğer nanopartiküller için muhtemel hedef organdır. Nanopartiküller bağırsak epiteli üzerinden endositik taşınım yoluyla geçerek hepatik portal dolaşım sistemi aracılığıyla hepatositlere ulaşır ve endositoz işlemiyle süreç sonlanır (Smedsrud vd., 1984).



### 1.12. Toksikolojik Çalışmalarda Deney Organizmalarının Seçimi

Akuatik toksisite çalışmalarında deney organizmalarının seçimi oldukça önemlidir. Toksikolojik testlerde güncel ve anlamlı sonuçlar elde etmek için sadece uygun test tipinin değil aynı zamanda uygun test organizmasında seçilmesi gerekmektedir (Rand, 1995). Önceleri sadece balık türleri seçilirken şimdilerde daha duyarlı oldukları kanıtlanan omurgasız hayvanlar seçilmektedir. Genel olarak bu organizmalarda aranan özellikler şöyledir; seçilecek organizmanın ekolojik ve ekonomik olarak öneme sahip olması, geniş coğrafik dağılım göstermesi ve yılın tüm zamanlarında istenildiğinde bulunabilmesi, kimyasal maddelere karşı duyarlı olması, kullanılan bireylerin genel olarak parazitten ve hastalıklardan etkilenmemiş olması ve fiziksel olarak herhangi bir zarar görmemiş olması, kullanılacak tür hakkında yeterli biyolojik ve fizyolojik bilgilere sahip olunması ve son olarak kullanılan deney o tür için uygun olması gerekmektedir (Bat ve Raffaelli., 1998; Bat vd., 1999). Yine bu organizmaların tür içi ve türler arasında duyarlılık farklılığı gösterdiğinde mümkün olduğunca geniş bir duyarlılığa sahip olmalıdır. Türlerin laboratuvar çalışmalarına adaptasyon kabiliyetlerinin yüksek ve kültürlerinin yapılabilir olması gerekmektedir. Seçilecek türler en az bir ay süreyle laboratuvarda sağlıklı şartlarda muhafaza edilmelidir. Türlerin biyolojilerinin, tuzluluk, pH ve sıcaklık isteklerinin önceden bilinmesi gerekmektedir. Organizmanın gıda zincirindeki düzeyi, ekonomik yönden önemi ve en hassas evresi bilinmelidir. Ayrıca, denemede kullanılacak organizmalar uygun boyda olmalıdır (Greenberg vd., 1985; Rand, 1995).

Akuatik toksikolojide test türlerinin seçimi daha çok araştırmanın amacına bağlı olmakla birlikte, omurgalılar içerisinde balıklar temel grubu oluşturmaktadır. Toksikolojik testlerde yaygın olarak kullanılan balık türleri; kaynak alabalığı, gökkuşacağı alabalığı, japon balığı, sazan balığı, golyan balığı, kanal yayın balığı, güneş balığı, turna balığı, dikence balığı zebra balığı ve lepistes balığıdır. Balıkların yanı sıra bakteriler, algler, yüksek yapılı bitkiler, protozoa, sölenlerata, rotifer, annelidler, krustasea, su böcekleri ve yumuşakçalar da testlerde kullanılan diğer gruplardır (Pascoe ve Edwards, 1989).

Bu çalışmada, tuzlu su karidesi (*Artemia salina*)'da maruz bırakma çalışmaları yürütüldü bu türün, laboratuvar şartlarına uyum kabiliyetlerinin yüksek olması ve kolay yaşatılabilmesi, kimyasallara karşı duyarlı olması, genel fizyolojisi ve davranışlarının iyi bilinmesi hayat evresinin kısa olması, yumurtalarının (kistlerin) kolaylıkla yılın her mevsiminde temin edilebilmesi ve laboratuvarda yumurtalarının kolay açılabilmesi, eskiden

beri toksisite çalışmalarında indikatör tür olarak kullanılması gibi özellikleri sebebiyle tercih edilmiştir.

### 1.13. Tuzlusu Karidesi (*Artemia salina*)

Ergin bir *Artemia* yaklaşık olarak 8-10 mm boyunda uzun bir vücut, iki tane saplı göz, dokusal bir sindirim sistemi, duyuşsal antenler ve 11 çift toraks (güğüş) uzantısına sahiptir. Erkekler karnının arka kısmında 1 çift üreme organına sahiptir. Dişü *Artemia*' lar karınlarının altında 11. uzantının hemen arkasında bulunan yumurta kesesi sayesinde kolayca ayırt edilebilir. Ayrıca karın içersinde ovaryumlar bulunur. Normalde olgunlaşan yumurtalar yumurta kesesine dökülür, burada döllenir, kuluçka evresini tamamlar ve naupli olarak dişüyi terk eder. Ancak olağanüstü koşullarda (örneğin çok yüksek tuzluluk ve çok düşük oksijen seviyesi) embriyo sadece gastrula evresine kadar gelişir ve etrafı yumurta kesesi etrafında bulunan bir bez tarafından salgılanan kalın bir kabukla çevrilir. Kist adı verilen dayanıklı yumurtalar, yumurta kesesini terk ederek suya geçerler. Optimum şartlar altında *Artemia* birkaç ay yaşayabilir. 8 günde ergenlik evresine ulaşır ve her dört günde 300 yumurta (kist) ya da naupli üretir. *Artemia* dünyada 500 civarında doğal ve yapay gölde yaşayabilmektedir. Tropik, subtropik ve ılıman iklim göllerindeki kıyısız ve iç sularda yaşamını sürdürebilir. Her ne kadar tuzlu su karidesi olarak bilinirse ve yaşadığı sular genelde yüksek tuzluluğa sahipse de tüm yüksek tuzlu göllerde rastlanmayabilir. Örneğin ülkemizdeki Tuz Gölünde fazla yaygın değildir. Yaşadığı suların sıcaklığı 6-35°C arasında değişebilirken, ‰35'lere kadar ulaşan tuzluluklarda yaşayabilirler. Besin partiküllerini filtre ederek beslenirler fakat seçici değildirler yani uygun büyüklükteki canlı cansız organik, inorganik materyalleri (bakteri, mikroalg, detritus) tüketebilir. Fakat birinci derecede tercih ettikleri gıda fitoplanktondur. Tüm hayatları boyunca planktonik formdadırlar yani su hareketleri ile taşınırlar (MEGEP, 2008).

Erkekler 7. abdominal segmentin ilkinde bir çift penise sahiptir dişü *Artemia* aynı segmentte tam olarak 11. torakopodda bulunan yumurta kesesi veya uterusla kolayca ayırt edilebilir. Ergin dişüler yetişme koşullarına ve embriyo gelişimini bağılı olarak ya ovipar ya da ovovivipar olarak yaklaşık her 140 saatte bir yumurtlarlar. Dişülerde ovulasyondan (çiftleşme sonucu döllenme) sonra meydana gelen yumurtlamayı bir kabuk değıştirme takip eder. Döllenmiş yumurtalar genelde anne tarafından bırakılan serbest yüzen *Naupli*'lere doğru (ovovivipar üreme) bir gelişim gösterir. Sıra dışı koşullarda (örneğin

yüksek tuzluluk, düşük oksijen seviyelerinde) embriyolar sadece gastrula safhasına kadar gelişir. Bu durumda (uterusta bulunan kahverengi kabuk bezleri tarafından salgılanan) kalın bir kabuk ile çevrelenirler, metabolik uyku haline (kışuykusu) geçerler ve sonra dışı tarafından bırakılırlar (ovipar üreme).

Prencipte hem oviparlık hem de ovoviviparlık tüm *Artemia* ırklarında bulunur ve dişiler gelecekteki tek bir yumurtlamadan itibaren üreme modlarını değiştirebilirler. Dişiler hem ovovivipar hem de ovipar olarak üremek için genetik eğilimlerinde farklılaşabilirler. Hiçbir *Artemia*'nın ovovivipar *Naupli* üretme kabiliyetini tamamen kaybetmediği bilinmektedir. Yumurtalar yüksek tuzlu sularda çoğunlukla yüzerler ve biriktikleri ve kurudukları kıyılara sürüklenirler. Bu dehidrasyon (suyunu kaybetmesi) işlevi sonucu olarak kış uykusu mekanizması genelde inaktif hale geçer; kistler bu anda hareketsiz bir durumdadır ve en uygun kuluçkalama şartlarında su aldığı daha sonraki embriyonik gelişimlerini yeniden kaldığı yerden başlatabilirler. En iyi koşullar altında tuzlu su karidesi naupliustan yaklaşık 8 günde ergin hale kadar büyüdüğü, birkaç ay kadar yaşayabilirler ve her 4 günde bir 300 *Naupli* veya yumurtadan fazla bir hızda üreyebilirler.

#### **1.14. Nanopartiküller ile İlgili Önceki Yapılan Çalışmalar**

Nanopartiküllerin zararlı etkilerininin araştırıldığı toksikolojik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Fullerenler ( $C_{60}$ ), boyutları ve fizikokimyasal özellikleri iyi bilinen nanoyapılar olmaları nedeniyle yapılan ilk çalışmaların pek çoğunda kullanılmıştır. Son yıllara kadar nanopartiküllerin toksisiteleri hakkında çalışmaların çoğu memeli hayvanlar (fare, domuz vb.) ile yapılan çalışmalarken son zamanlarda çalışılması daha kolay olan omurgasız canlılar kullanılmaya başlanmıştır.

##### **1.14.1. $TiO_2$ Nanopartikülü ile Yapılan Çalışmalar**

$TiO_2$  nanopartiküllerine maruz kalan gökkuşağı alabalıklarının beyinlerinde herhangi bir hasar oluşmamasına rağmen, solungaçlarında oksidatif stres kaynaklı hasarlar tespit etmişlerdir. Bu da göstermektedir ki, beyinde bir hasar oluşumu nanopartikül türüne bağlı olarak değişmektedir (Federici vd., 2007).

Zebra balığı, dafniya ve alg türleri titanyum oksit nanopartikülüne hemde çözünür tuzlar olarak gümüş, bakır, aliminyum ve kobalta maruz bıraktıkları çalışmalarında, nano gümüş ve nano bakır test edilen tüm organizmalarda 48 saat içinde 40 ve 60 µg/L kadar düşük bir ortalama letal konsantrasyonlarda toksisiteye neden olmuştur. Oysaki, *Daphnia pulex* yetişkinlerinde titanyum oksit testlerin hiçbirinde toksik olmadığı gözlenmiştir. Metallerin nanopartikül formları ve yığın formları çözünür formlarından daha az toksik olduğu rapor edilmiştir (Griffitt vd., 2008).

TiO<sub>2</sub>, diğer nanopartiküllere göre daha düşük oranda toksik etki göstermektedir. Yavru sazan balıklarıyla (*Cyprinus carpio*) yapılan deneylerde yüksek nanopartikül konsantrasyonlarında dahi ölüm görülmezken solunum sisteminde doza bağlı olarak stres oluşumu ve oksidatif stres etkisi ve nedeniyle süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz ve lapteroksidaz enzim miktarında değişiklikler tespit edilmiştir (Hao vd., 2009).

*Daphnia magna*, TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün akümülyasyon (birikim) analizi ve kronik toksisite (21 gün) ve modifiye akut (72 saat) toksisitesini çalışmışlardır. TiO<sub>2</sub> nanopartikülü geleneksel 48 saat maruz kalma süresi içinde Dafniya'a minimal toksisite uygulandığında toksik etki olmadığı bulunmuştur, fakat maruz kalma süresi 72 saate uzatıldığı zaman yüksek toksisite gösterdiği gözlenmiştir. Dafnialarda, 21 gün TiO<sub>2</sub> nanopartikülüne kronik mazuriyete bağlı üreme kusurlarının yanında ağır büyüme geriliği ve ölüm gözlemlenmiştir. TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün önemli bir miktarı dafnialarda biriktiği bulunmuştur (Zhu vd., 2010).

Zebra balığı embriyolarını döllenmeden serbest yüzme evresine kadar TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerine maruz bırakıldığı çalışmada kuluçka evresi, yaşam kalitesi ve malformasyon (sakatlık) oranının TiO<sub>2</sub> nanopartikülü tarafından etkilenmediği rapor edilmiştir. Ancak ortalama ve maksimum hız ve aktivite düzeyi de dâhil olmak üzere larva yüzme parametrelerini önemli ölçüde etkilediği kaydedilmiştir (Chen vd., (2011),).

Bakteri hücrelerinde metal oksitin mutajenik potansiyeli ve hücre alımını, *Salmonella typhimurium* da agleramasyon olmadan çıplak ZnO ve TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerini kullanarak gözlemlenmiştir. Hücre içindeki nanopartiküllerin tekdüze dağılımı ve içselleştirmesi TEM analiziyle gösterilmiştir. ZnO ve TiO<sub>2</sub> nanopartikül konsantrasyonuna bağlı olarak *Salmonella typhimurium* hücrelerinde önemli ölçüde içselleştirdiği akım sitometre verileri ile kanıtlamıştır. Bu nanopartiküllerin *S. typhimurium* 'un TA98, TA1537 ve *E. Coli* (WP2uvrA) suşlarında kullanılmıştır mutajenik potansiyellerinin zayıf olduğu gösterilmiştir (Kumar vd., 2011).

Titanyum dioksit nanopartiküllerinin ( $\text{TiO}_2$ ) akut toksisitesi ve oksidatif stresi olgun deniz kulağı (*Haliotis diversicolor supertexta*)'nda akut etkisini gözlenmemiştir. Antioksidan enzim süperoksit dismutaz aktivitesini önemli ölçüde 1,0 mg/l konsantrasyonundaki  $\text{TiO}_2$  nanopartikülünde arttığı enzimatik olmayan antioksidan içeriğinin önemli ölçüde 0,1 ila 10 mg /l arasında değişen  $\text{TiO}_2$  gruplarında azaldığını bulmuştur. Lipid peroksidasyonu seviyesinin ise  $\text{TiO}_2$  nanopartiküllerinde doza bağımlı olarak arttığı bulunmuştur (Zhu vd., 2011).

$\text{TiO}_2$  nanoaprtiküllerinin (10-30 nm) etkisi ve akuatik stabilitesini *Artemia salina* üzerinde araştırmışlardır. Akut maruziyet hem yetişkin hemde larval formda yürütülmüştür.  $\text{TiO}_2$  nanopartikülü tüm süspansiyonlarında hızlı agregasyonu gözlenmiştir. Fakat hem larva hemde yetişkin bireylerde önemli birikim olmamıştır. Nanopartiküller bağırsaklarda depolanmıştır. Fakat 24 saat de çalışılan konsantrasyonlarda önemli toksisite ve ölüm kaydedilmemiştir (Ateş vd., 2012).

#### 1.14.2. ZnO Nanopartikülü ile Yapılan Çalışmalar

Hücre içinde (in vivo)' da bakır nanopartiküllerinin (3.5 nm) toksisitesi,  $\text{LD}_{50}$ , morfolojik değişiklikleri ve patolojik incelemeleri değerlendirmek için deney farelerin kan biyokimyasal indeksleri mikro bakır parçacıkları (17  $\mu\text{m}$ ) ve bakır iyonları ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ile karşılaştırmalı olarak incelemiştir. Sonuçlar nano ve iyonik bakır parçacıklarının toksisitesinin orta seviyede, mikro bakırın ise toksik olmadığını göstermektedir. Nano bakır parçacıkları böbrek, karaciğer ve dalakda birikmesinden dolayı bu organlarda ciddi toksikolojik etkiler bulunmuştur (Chen vd., 2006).

Suda çözünür ZnO nanopartiküllerinin mutajenitesini ames testinde *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 ve TA1537 ve *Escherichia coli* WP2 uvrA/pKM101 suşları kullanarak preinkübasyonda S9'lu metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda test edilmiş olup tüm bu suşlarda mutajenite bulunmamıştır (Yoshid vd., 2009).

ZnO partiküllerinin zebra balığının larva ve embriyo gelişimi üstüne toksisitesi değerlendirdikleri çalışmalarında; 48 saat içinde mikro ölçekli ZnO nanopartikül agregatları zebra balığında embriyo ve larvaları için doza bağımlı toksisite gösterdiği kaydedilmiş ve yine yumurtadan çıkma oranının azalttığı ve perikardiyal ödeme neden olduğunu rapor etmişlerdir (Zhu vd., 2009).

Zebra balığına döllenen sonra 96 saatlik embriyo larva testi nano ZnO süspansiyonu'nun zebra balığı embriyolarını öldürdüğü (50 ve 100 mg/l) ve hasarlı embriyolarda kuluçka larvaların vücut uzunluğunu kısalttığı ve 96 saat maruziyetinden sonra kuyruk malformasyonuna sebep olduğunu kaydetmişlerdir (Bai vd., 2010).

Sediment organizmalarında kritik yaşam döngüsü parametrelerinde Zn'nin nano ölçekli, yığın ve çözünür formlarını karşılaştırmışlardır. Amfipod *Corophium volutator*'un tam bir yaşam döngüsü boyunca (100 gün), ZnO nanopartikülü ( $35 \pm 10$  nm), yığın (bulk) ( $160 \pm 81$  nm) ve Zn iyonları ( $ZnCl_2$ )'nin etkilerini sedimentte üreme, büyüme ve ölüm oranları incelendiğinde, su ile maruz kalan çinkonun 0,2-1,0 mg/l aralığında tüm formları için maruz kalan canlıların üreme oranını etkilediği ve büyüme de gecikme olduğu gözlemlenmiştir. Çinko mineralinin elemental bileşimi ZnO nanopartikülü,  $Zn^+$  ve yığın ZnO'a maruz kalan organizmalarda da farklı sonuçlar gözlenmemiştir (Fabrega vd., 2012).

*Chlorella vulgaris* ve *Scenedesmus dimorphus* iki alg türünde ZnO nanopartiküllerinin toksik etkisini incelemişlerdir. *Chlorella* türleri için ZnO nanopartikül toksisitesi *Scenedesmus* türlerinden çok daha fazladır (Pendashte, vd., 20013).

### 1.14.3. Ag Nanopartikülü ile Yapılan Çalışmalar

Toksik veya toksik olmayan nanomateryallerin maruziyetini takiben zebrabalığı solungaçlarının yanıtı üzerine nanoparçacık kompozisyon etkileşimi ve çözünmesi incelenmiştir. Dişi zebrabalığı 48 saatte nanobakır, nanogümüş yâda çözünür bakır ve gümüş maruziyetinde gözlenen konsantrasyonlarda toksik olmadığını kaydetmişlerdir (Griffitt vd., 2009).

Gümüş nanopartiküllerinin aerobik metabolizmasını sürdüremeyen balıklarda kritik oksijen basıncı ve bazal metabolizma hızı tarafından ifade edilen oksijen tüketimi üzerine etkisini Avrasya levrek (*Perca fluviatilis*)'inde incelediler ve sonuçlar gümüş nanopartiküllerinin bazal metabolizma hızına etkisi yoktur (Bilberg vd., 2010).

Gümüş (Ag) nanopartiküllerinin balıklarda toksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarında, golyon balığı embriyolarında 96 saat  $LC_{50}$  değerleri 35 ve 100 nm boyutlarındaki nanopartiküller için sırasıyla 9,4 ve 10,6 mg/l olarak hesaplanmıştır. Ayrıca konsantrasyona bağlı olarak larva anormalliklerinde artış görülmüştür (Laban vd., 2010).

10, 35 ve 600-1,600 nm boyutunda Ag nanopartiküllerinin etkisini gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nda incelemişlerdir. Solungaçları, karaciğer ve böbrekler

içine nanopartikül alımı optik emisyon spektrometresi (ICP - OES) ile ölçüldüğünde birikim en fazla solungaçlarda ve karaciğerde olduğu tespit edilmiştir (Scown vd., 2010).

*Polyalthia longifolia* yaprağından D-sorbitol kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin antimikrobiyal aktivitesi olduğunu bulmuşlardır. Ag nanopartiküllerinin gram pozitif bakterilerden ziyade gram negatiflerde daha geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulmuşlardır (Kaviya, vd., 2011).

### 1.15. Çalışmanın Önemi ve Amacı

Özellikle sucul çevreler nanopartiküllere maruz kalma konusunda risk altında bulunan ortamlardır. Nanopartiküllerin su ortamındaki davranışları, sucul organizmalar tarafından vücuda alınma kapasitesi ve oluşabilecek potansiyel toksik etkileri konusunda halen çok az çalışma vardır. Nanopartiküllerin çevremizde oluşturduğu risklerin belirlenebilmesi için öncelikle sucul organizmalar üzerindeki etkilerinin detaylı olarak araştırılması gerekmektedir. Sucul ortamda organizmalar üzerindeki etkilerin anlaşılabilmesi için nanopartiküllerin vücuda alınım mekanizması, davranışları ve maruz kalma yönteminin iyi anlaşılması gerekir. Sucul canlıların su ortamındaki muhtemel nanopartikül alınımını tahmin edilebilmek için bunların su sütunundaki küme oluşturma eğilimi, uzun ömürlülüğü ve çevrede bulunan doğal organik maddelerle olan etkileşimi gibi fiziksel özelliklerinin de iyi bilinmesi gerekir. Nanopartiküller suda çözünme özelliğine sahip değildir, bu nedenle buldukları su ortamı hareketsiz ise tabana çökme ya da ortamda bulunan diğer materyallere tutunma eğilimindedirler. Bu yüzden nanotoksikolojik çalışmalarda geleneksel statik toksikolojik test düzenekleri kullanılamamaktadır. Dolayısıyla, nanotoksikoloji denemeleri için hareketli su ortamı sağlayan yeni bir test sisteminin geliştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, *Artemia salina* (naupli) kullanılarak ticari amaçla imal edilen  $TiO_2$ 'nin ve  $TiO_2$ 'ye yüklenen ZnO ve Ag nanopartiküllerin yeni bir test sistemi geliştirilerek genel ekotoksikolojik ve karakteristik özelliklerinin belirlenmesi ve bu nanopartiküllerin akuatik stabilitesinin tespit edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla;

Kullanılan test canlılarına zarar vermeden homojen bir karışım ortamı sağlayan nanopartikül test sistemi geliştirilmesi,

Doz-etki deneyleri yapılarak nanopartiküllerin letal ( $LC_{50}$ ) ve subletal konsantrasyonlarının belirlenmesi,

Testlerde kullanılan nanopartiküllerinlerin akuatik stabilitesinin (Hidrodinamik boyutunun) konsantrasyon ve zamana bağlı olarak değişiminin belirlenmesi ve bunların birbiriyle kıyaslanması,

Test organizmasının 24 saat maruz bırakma sonunda ne kadarını bünyesini aldığı ve yine 24 saat süre sonunda bağırsaklardan ne kadarını elimine ettiğinin belirlenmesi,

Test organizmasının maruz bırakma sonunda olası morfolojik değişimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Nanopartikül Temini

Toksikolojik deneylerde  $TiO_2$ ,  $ZnOTiO_2$ ,  $AgTiO_2$  nanopartikülleri kullanıldı. Saf anataz formundaki  $TiO_2$  (Titanyum dioksit) (%99,0 saflıkta) nanopartikülü Sigma Aldrich, Almanya'dan temin edildi.  $ZnOTiO_2$ , (çinkooksit titanyum dioksit)  $AgTiO_2$  (gümüş titanyum dioksit) nanopartikülleri ise KTÜ Fen Fakültesi kimya laboratuvarında Prof. Dr. Münevver SÖKMEN tarafından sentez edildi.

#### 2.1.1. $ZnOTiO_2$ Nanopartiküllerinin Hazırlanışı

ZnO metal oksit  $TiO_2$  fotokatalizörüne %1 oranında yüklendi. 10 g  $TiO_2$  katalizörü ile 10 ml su karıştırılarak bulamaç haline getirildi. 0,3355 gr ZnO, karışıma ilave edilerek 400 °C de 6 saat kalsine edildi. Daha sonra desikatörde soğutularak koyu renkli ağzı kapalı şişede saklandı.

#### 2.1.2. $AgTiO_2$ Nanopartiküllerinin Hazırlanışı

%1 oranında Ag'ün  $TiO_2$  fotokatalizörüne yüklendi. 10 g  $TiO_2$  ile 9,2 ml 0,1 M  $AgNO_3$  çözeltisi karıştırılarak bulamaç haline getirildi. Karışıma 10 ml %1  $Na_2CO_3$  karıştırılarak 400°C'lik kül fırınında 6 saat aralıksız kalsine edildi. Daha sonra desikatörde soğutularak koyu renkli ağzı kapalı şişede saklandı.

### 2.2. Test Organizması

*Artemia salina* kistleri (salt lake aquafeed premium *artemia* cysts) deniz suyunda inkübe edildi. Deniz suyu olarak Karadeniz deniz suyu (Ordu Kıyıları/merkez) ve yapay okyanus tuzu kullanıldı. Alınan deniz suyu bir gün laboratuvarında dinlendirildikten sonra 30-µm milipor selüloz filtre ile süzüldü kist halindeki *Artemia*'lar 12 saat boyunca 4°C de distile suda hidratlandı ve batan kistlerden yüzenleri ayırt etmek için yıkandı. Batan kistler

soğuk deiyonize suyla yıkandı ve huni ya da pipet yardımıyla toplandı. Yaklaşık 3 gram önceden temizlenmiş kistler 1,5 litre deniz suyu içeren ve hava taşlarıyla havalandırılan konik plastik şişelerde  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi ve *Artemia* 24 saat içinde yumurtadan çıktı. Florasan lambalar tarafından devamlı 1.500 lx aydınlatmayla günüşiği sağlandı.

*Artemia* sayımı, Sorgeloos (1980) tarafından belirlenen prosedüre göre yapıldı. Yapılan her çalışma için *Artemia* sayısı ayrı ayrı belirlendi. Kısaca, yumurtadan çıkan *Artemia naupli* larvasını içeren çözeltilerden temiz bir beher içerisine 100 ml konuldu. Homojenliğin sağlanması bakımından sürekli karıştırma altında bu stok çözeltilerden 1 ml alındı ve deniz suyu ile 100 ml'ye seyreltildi. Yine sürekli karıştırma altında seyreltilen bu yeni çözeltilerden 0,1 ml alınıp sayım için petri tabağına konuldu. *Naupli*'nin sayısı bu hacimde stereo mikroskop (Leica S8APO) altında sayım yapılarak tespit edildi. Bu sayım, her eliminasyon (bağırsaktan atma), akümülyasyon (bağırsakta biriktirme) ve  $\text{LC}_{50}$  çalışmaları için ayrı ayrı gerçekleştirildi.

### **2.3. Nanopartiküllerin Sulu Süspansiyonlarının (Test Çözeltilerinin) Hazırlanışı**

İstenilen konsantrasyonlarda stok çözeltilerini, hazırlamak için test maddeleri olan  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnOTiO}_2$  ve  $\text{AgTiO}_2$  nanopartikül tozlarını deiyonize suda dispersiyonla hazırlandı. Daha sonra bu çözelti 20 saniye vortekslendi ve nanopartiküllerin stok çözeltileri hazırlanırken, suda dağılımı artırmak ve suda nanopartiküllerin maksimum dağılımını sağlamak için ultra sonik su banyosu (Bandelin, sonorex) kullanıldı. Tüm bu aşamalardan sonra belirlenen test konsantrasyonları stok çözeltilerden seyreltme yoluyla hazırlandı.

### **2.4. Nanopartiküllerin Boyut Dağılımı ve Karakterizasyonu**

$\text{TiO}_2$ ,  $\text{AgTiO}_2$  ve  $\text{ZnOTiO}_2$  nanopartiküllerin boyut dağılımı ve morfolojisi SEM (Scanning electron microscope), Master Sizer (Malvern Hydro 2000 mu) partikül boyut ölçümü ve XRD (x ışını difraktometre) ile karakterize edildi. MasterSizer ile sulu süspansiyonlarının boyut dağılımı 3 farklı zamanda ölçüm değerleri alınarak boyut değişimleri belirlendi. İlk ölçüm süspansiyonlar hazırlandıktan hemen sonra (taze stok solüsyonu) diğeri 24 saat sonunda üçüncü ise 96 saat sonra yapıldı. Nanopartiküllerin kuru

(toz halinde) boyut ölçümü ise XRD ile belirlendi (Tablo 1). SEM ile de nanopartiküllerin agregasyon (küme/yığın oluşturma) morfolojisini belirlemek için görüntü alındı.

Tablo 1. Yükleme yapılan katalizörlerde Bragg eşitliği ile hesaplanan tanecik boyutu

Katalizörler	FWHM ( $\beta$ )	Radyan (R)	2-Theta	D (tanecik boyutu, nm)
TiO <sub>2</sub>	0,197°	3,43x10 <sup>-3</sup>	25,580	44,01
(%1) AgTiO <sub>2</sub>	0,186°	3,24x10 <sup>-3</sup>	25,332	43,0
(%1) ZnOTiO <sub>2</sub>	0,180°	3,14x10 <sup>-3</sup>	25,253	45,2

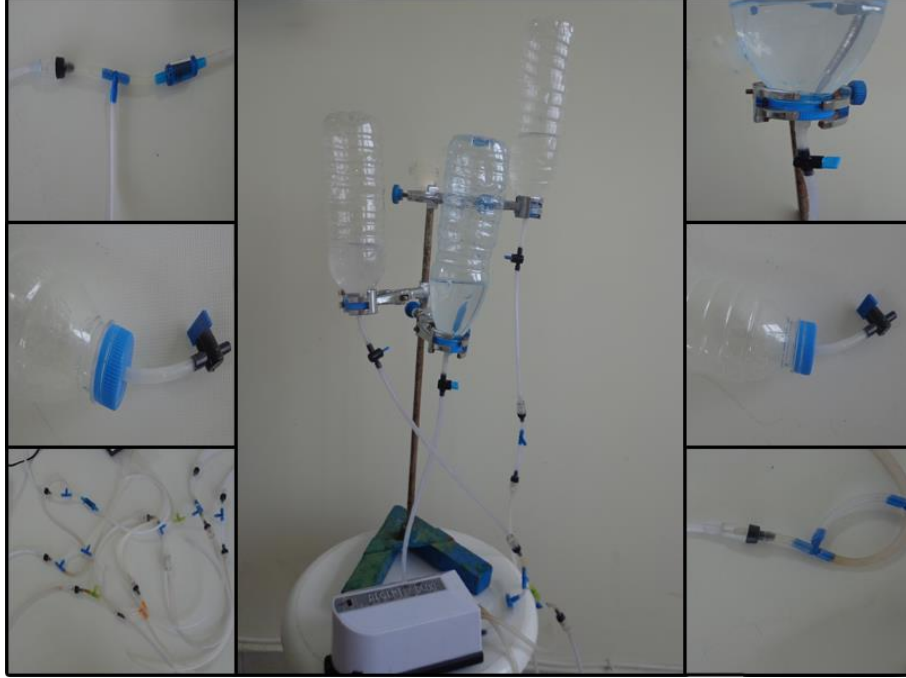
## 2.5. Akut Toksikite Çalışması

### 2.5.1. Deney Düzenekinin Hazırlanması

Nanopartiküller bilinen maddelerden çok daha farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptirler. Buldukları sulu ortam içerisinde küme oluşturma ve tabana çökme eğiliminde olduklarından sulu fazda toksik etkilerinin araştırılmasında hareketli sistem kullanılmalıdır. Bu nedenlerle toksik testler için hareketli bir ortam sağlayan ancak test canlılarını etkilemeyecek şekilde yeni bir test sistemi geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Bu amaçla maruz bırakma deneylerinde 2 litrelik konik polietilen şişeler kullanıldı. Bu şişelerin kapaklarından ince plastik boru girebilecek şekilde delik açıldı. Deney sırasında kapaktan sıvının çıkmasının önlenmesi için dıştan silikon ve parafilm ile kapatıldı. Bu plastik borunun diğer ucu ise akvaryum hava pompasına bağlandı. Kapağa takılan borunun ucuna *artemia*'ların kolay toplanması ve hava girişini kontrol edilebilmesi için vana takıldı. Bir akvaryum hava pompası ile akümülyasyon ve eliminasyon deneyleri için 2 şişe (1000 ml), LC<sub>50</sub> için ise 4 şişenin (100 ml) havalandırılması sağlandı. Böylelikle hava pompası vasıtasıyla organizmaların zarar görmeyeceği şekilde devamlı karıştırma ile homojen karışım sağlanırken, aynı zamanda *artemia* için sürekli oksijen sağlandı. Hava pompasını birden fazla şişede kullanmak için motorun çıkış yerine ince boru takıldı ve bu borunun serbest ucu T ile takılarak çoğaltma sağlandı ve her bir şişeye giden borunun ucuna ise suyun geri kaçmasını önlemek için çekvalf takıldı (Şekil 1). Ayrıca zamanla su buharlaşmasını önlemek amacıyla sistemin üst kısmına plastik kapak konuldu. 24 ve 96

saatlik test süresince bu sistemler kullanıldı. Deney süresince su değişimi yapılmadı ve herhangi bir müdahalede bulunulmadı.



Şekil 1. *Artemia salina* larvaları için oksijen ve sürekli karıştırma ile nanopartiküllerin çökmesini önleyerek homojen karışım ortamı sağlayan toksikolojik test sistemi.

## 2.6. Nanopartiküllerin Akut Toksisitesinin Belirlenmesi

Akut maruz bırakma, OECD 202 test rehberine göre (OECD 2004) 24, 48, 72 ve 96 saat *Artemia naupli* larvası için yürütüldü. Her bir zaman dilimi için deneme düzeneği ayrı ayrı kuruldu.  $TiO_2$ ,  $AgTiO_2$  ve  $ZnOTiO_2$  nanopartiküllerinin toksik konsantrasyonunu belirlemek için farklı konsantrasyonlarda nanopartiküller kullanıldı (Tablo 2). Kontrol gruplarına ise hiçbir kimyasal eklenmedi. Çalışmalar konik plastik şişelerde (iç hacmi 0,5 ve 2 litre) üçlü ölçümlerle (üç tekrarlı) gerçekleştirildi. Akümülayon ve eliminasyon deneyleri için maruz bırakma deneyi, 1000 ml de yürütülürken,  $LC_{50}$  deneyleri için Her konsantrasyon 100 ml olarak hazırlandı. Denemelerde 2. günün sonunda stereo mikroskop altında en hareketli, tüm ekstremiteleri tam sağlıklı olduğu gözlenen bireyler seçilerek herbir şişeye 50 birey konuldu. Çalışılan tüm konsantrasyonlar 24, 48, 72 ve 96. saatlerde mikroskop altında ölen canlıların (*naupli*) sayımı yapıldı. Deneme üç tekerrür halinde

yapıldı. Havalandırma maruz bırakma sırası boyunca süspansiyondan nanopartiküllerin çökmesini önlemek için konik şişenin dibine kadar uzanan bir hat ile sağlandı. Deneyler 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ortamda  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de sıcaklıkta yapıldı. Ortamın pH'sı maruz kalmanın sonunda ve başında ölçüldü ve bu değer  $7,80\pm 2$  olarak belirlendi. Maruz bırakma süresince *Artemia*'lara yem verilmedi.

Tablo 2. *Artemia*'lar üzerine nanopartiküllerin toksik etkisini belirlemek üzere kullanılan nanopartiküllerin konsantrasyonları

Nanopartiküller	Çalışılan konsantrasyonlar (mg/l)
AgTiO <sub>2</sub>	$31,25 \times 10^{-4}$ ; $6,25 \times 10^{-3}$ ; 0,125; 0,025; 0,05; 0,1; 1, 5 ve 10
ZnOTiO <sub>2</sub>	$31,25 \times 10^{-5}$ ; $6,25 \times 10^{-4}$ ; $1,25 \times 10^{-3}$ ; $25 \times 10^{-2}$ ; $5 \times 10^{-2}$ ; 0,01; 0,1 ve 0,5
TiO <sub>2</sub>	$31,25 \times 10^{-3}$ ; $6,25 \times 10^{-2}$ ; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 10; 50 ve 100

Akut toksisite çalışmasından sonra nanopartiküllere maruz bırakılan larvalar (naupli) da gözlenen değişimler faz kontrast mikroskobu (Nikon Eclipse 80i) altında mikroskobik incelemelerle kaydedilmiştir. Maruz bırakılan her grup, kontrol grubu ile kıyaslanarak olası anormallikler belirlenerek resimleri çekildi.

## 2.7. Nanopartiküllerin Akümülyasyon ve Eliminasyon Deneyi

Önceden belirli miktarda tartılan *artemia* kistleri yukarıda belirtilen prosedüre göre deniz suyunda yumurtadan çıkarıldı ve 1,5 litre deniz suyuna 3 gr *artemia* yumurtası konularak *naupli* elde edildi. Eliminasyon ve akümülyasyon çalışması için *artemia* sayısını belirlemeden önce çıkmayan yumurtaları çözültiden temizlemek amacıyla yaklaşık 48 saat sonunda konik şişelerdeki yumurta naupli karışımı geniş bir kaba boşaltıldı. Bu karışımda çıkmayan yumurtaların üstte nauplinin altta kalması için bir süre çökmeye bırakıldı. Bekleme sonrası, üstte ince bir tabaka halinde yumurtlar görüldü. Bu yumurtalar uygun göz açıklığına sahip kepçe ve spatul yardımıyla toplandı. Yumurtalar toplandıktan sonra 12 litrelik *artemia* stok çözültisinden 100 ml alındı ve daha sonra 100 mililitreden de 1 ml alınarak stereo mikroskop altında sayım yapılarak her konsantrasyona ne kadar canlı düştüğü hesaplandı. Eliminasyon için 1 ml'de 376 canlı sayılırken akümülyasyon için 50 birey sayıldı ve maruz bırakma çalışması yapıldı. Toplanan *artemialar* içerisindeki gerçek

metal konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometresi (XSERIES 2 ICP-MS) ile analizi yapıldı.

Maruz bırakma sonunda toplanan *Artemia* lar plankton ağı üzerinde deiyonize suyla iyice yıkandı. Temiz örnekler 0.45 mm whatman filtre kâğıdından geçirildi. Bu toplanan numuneler analize kadar cam şişede  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Enstrümantal analizler Arslan vd. (2000 ve 2011) protokolüne göre yapılmıştır; Her bir numune hassas terazide 0,1 gr olacak şekilde tartıldı, tartılan bu numuneler teflon krozelere konuldu. Bu teflon krozeler kullanılmadan önce saf suyla yıkandı ve  $80^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat etüvde kurutuldu. Tartılan numunenin üzerine 2 ml konsantre  $\text{HNO}_3$  (nitrik asit) ve 0.5 ml HF (hidrojen florür) eklendi. Havalandırmalı çeker ocak içine konulan  $60^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanan hot plate de 2 saat bekletildi. Numuneler soğduktan sonra krozelerde kalan tortu ağız kapatılarak analize kadar saklandı.

Yakma işlemi yapılan örnekler cihaz analizinden hemen öncesinde külleri çözmek için %65'lik  $\text{HNO}_3$  den her örneğe 3 ml konuldu, daha sonra üzerine 12 ml saf su konuldu böylelikle her numune 5 kat seyreltilmiş oldu. Daha sonra bu numunelerden 2 ml alındı ve  $0,22\ \mu\text{m}$ 'lik (por çapı) filtreden geçirilerek üzerine 6,6 ml deiyonize su eklendi böylelikle örneğin içerisindeki nitrik asit %2 oranına düşürüldü. Son seyreltmeden sonra cihaz analizi yapıldı. Analiz sonucunda cihaz okumayı yapamadığından örneklerden 10  $\mu\text{l}$  alınarak üzerine 10 ml %2  $\text{HNO}_3$  konularak 100 kat ek seyreltme yapılarak analiz yapıldı.

## 2.8. İstatistiksel Analizler

Tüm deneyler bağımsız olarak üç kez tekrarlandı ve veriler standart sapma ile ortalama olarak kaydedildi.  $\text{LC}_{50}$  değeri probit analizi ile hesaplandı. ANOVA, Tukey ve Dunnet çoklu karşılaştırmalar ile varyans tek yönlü analiz ile maruz kalan gruplar ve kontrol grupları arasında akümülyasyon ve eliminasyon ile konsantrasyonlar arasında anlamlı farklılıkları tespit etmek için SPSS 18 paketi kullanıldı. Tüm veri analizlerinde 0,05 ve 0,01 anlamlılık seviyesine göre değerlendirildi.

### 3. BULGULAR

*Artemia salina*'da letal konsantrasyonu belirlemek için LC<sub>50</sub> çalışması, 24 saat sonunda nanopartiküllerin biriken miktarını belirlemek için akümülyasyon (A) ve 24 saat içinde bünyesine aldığı nanopartikülün 24 saat sonunda ne kadarını çıkarttığını belirlemek için eliminasyon (E) deneyleri yapıldı. Nanopartiküllerin sudaki stabilitesini belirlemek içinde nanopartiküllerin hidrodinamik boyut ölçümü, yine nanopartiküllerin toz halinde (kuru) boyutlarını belirlemek için XRD (x ray diffraction) ölçümü yapıldı. Nanopartiküllerin agregasyonunu gözlemlemek için SEM (scanning electron microscope) görüntüsü alındı. Yapılan tüm istatistik ve grafik çalışmaları SPSS paket programı ve Exel programı kullanılarak yapıldı.

#### 3.1. Akut Toksikite Testi

Denemede AgTiO<sub>2</sub>, ZnOTiO<sub>2</sub> ve TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerin dokuz farklı konsantrasyonda naupli bireylerinde toksik etkisini saptamak için 24, 48, 72 ve 96 saatlik zaman dilimleri dikkate alınarak her biri zaman için probit analiziyle LC<sub>50</sub> değerleri belirlendi (Tablo 3). Biyodeneyleerde, deneyin yapıldığı ortam ve şartlarla birlikte kontrol grubu kullanıldı. Her kontrolde, deney ortamıyla aynı sayıda naupli (50 birey) konuldu, kontrol grubundaki naupli bireyleri nanopartiküllerin değişik konsantrasyonlarına maruz kalanlar arasındaki değişimler deney süresince karşılaştırdı ve kaydedildi. Deney canlılarında zaman ve konsantrasyon artışıyla birlikte davranış bozuklukları, hareketlerde yavaşlama ve vücut ekstremitelelerinde şekilsel bozukluklar gözlemlendi.

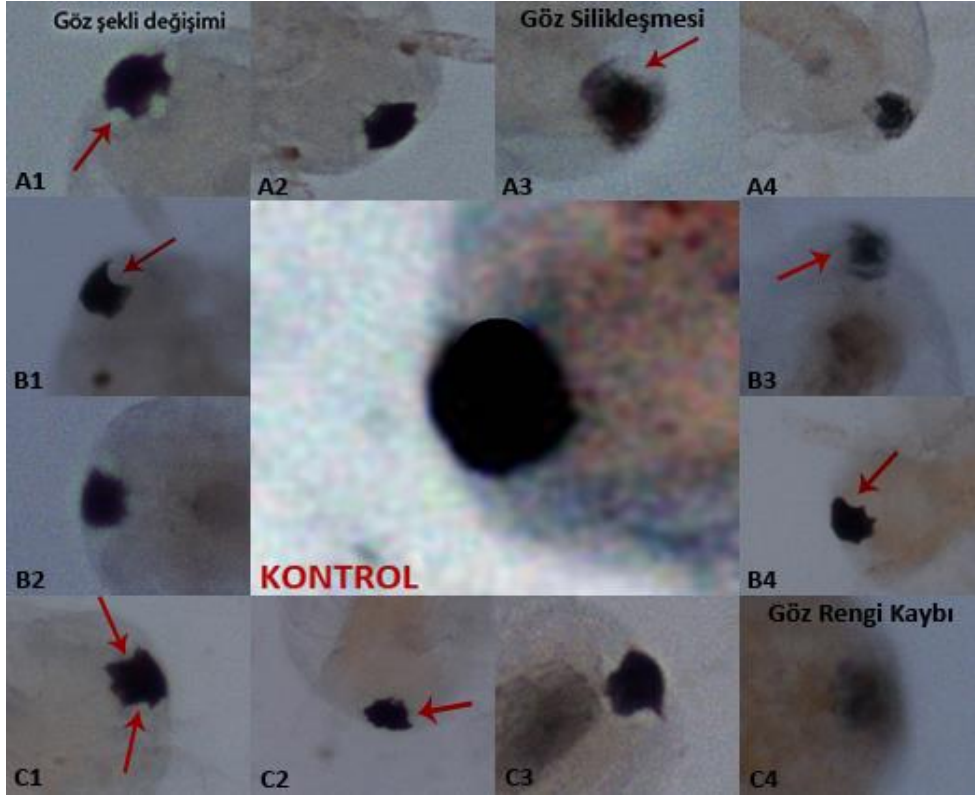
Tablo 3. Nanopartiküllerin *Artemia salina* (naupli) bireyelerine etkisinin LC<sub>50</sub> değerleri

Nanopartiküller	LC <sub>50</sub> değerleri			
	24 Saat	48 Saat	72 Saat	96 Saat
TiO <sub>2</sub>	381,600 mg/l	70,122 mg/l	41,263 mg/l	18,771 mg/l
AgTiO <sub>2</sub>	23,027 mg/l	3,743 mg/l	1,064 mg/l	0,785 mg/l
ZnOTiO <sub>2</sub>	5,111 mg/l	0,296 mg/l	0,143 mg/l	0,119 mg/l

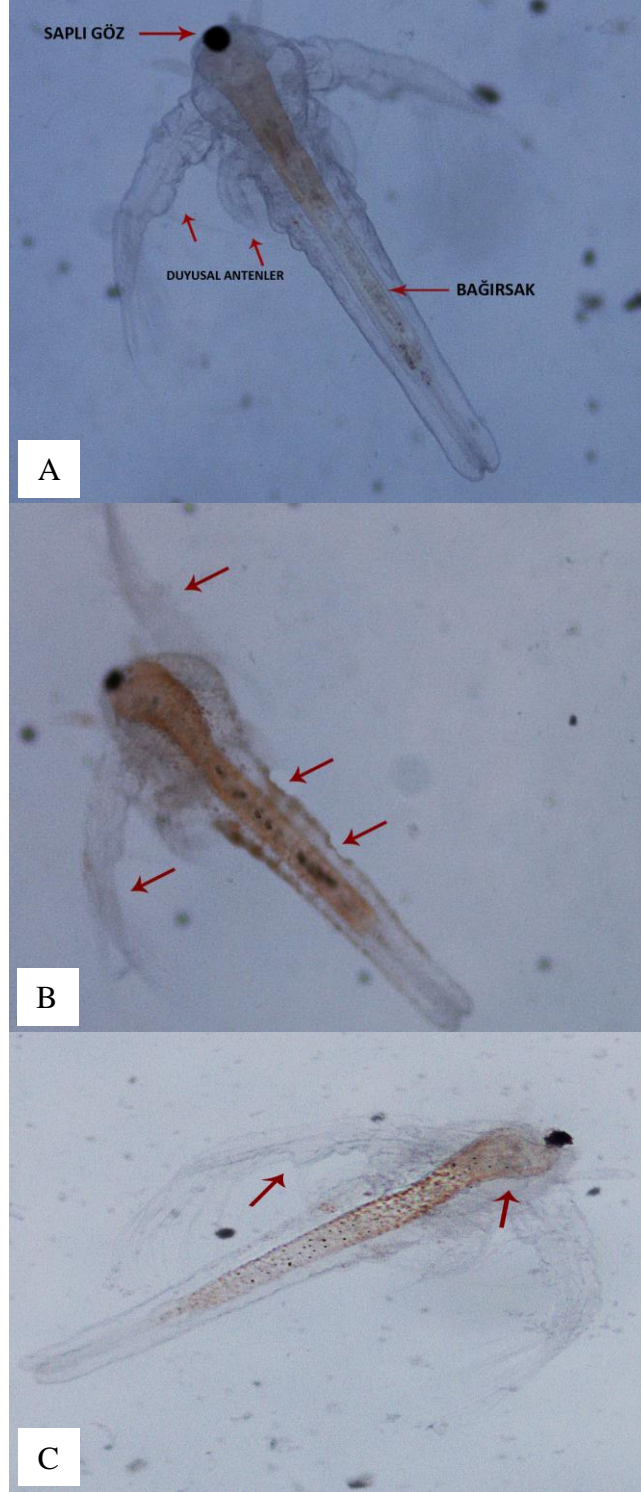
TiO<sub>2</sub>, AgTiO<sub>2</sub> ve ZnOTiO<sub>2</sub> nanopartikülleri için 24 saat akut toksik etki için belirlenen LC<sub>50</sub> değerleri diğer zamanlar için belirlenen LC<sub>50</sub> değerlerine göre çok yüksektir. Bu da şunu göstermektedir ki nanopartiküllerin 24 saat için toksik etkisi çalışılan tüm konsantrasyonlarda oldukça düşüktür. Zaman artışıyla birlikte nanopartiküllerin toksik etkisi artmıştır.

Kontrol grubundaki artemialarda vücut boyunca uzanan sindirim sistemi norma kalınlıkta gözlenen bir değişim yoktur ve bağırsağın içi hemen hemen boştur. Ekstremiteler (anten)'de herhangi bir eksilme veya malformasyon gözlenemedi (şekil 3). Buna karşılık, AgTiO<sub>2</sub>, ZnOTiO<sub>2</sub> ve TiO<sub>2</sub> nanopartiküllere maruz bırakılan *artemia* 'ların kontrol grubu bireyleri ile kıyaslandığında özellikle göz yapısında değişim (göz yuvarlalığının şeklinin değişmesi, göz yuvarlağının küçülmesi ve göz siyahlığının renginin silikleşmesi; şekil 2), bağırsak genişlemesi (sindirim sistemindeki değişim; şekil 3), dış kabuk yapısının şeklinde bozulma ve ekstremiteler (anten vb) kaybı ve malformasyon (şekil 3) mikroskopik incelemelerde ilk gözle görünen değişimleridir.





Şekil 2. Farklı konsantrasyonlarda ki nanopartiküllere maruz kalan *Artemia salina* larvalarının gözlerinde görülen anormallikler. Normal göz yuvarlak ve siyah renkte iken (kontrol), nanopartiküllere maruz kalan artemiaların göz rengi kaybı (A3, A4, B3, C4), göz şeklinde değişim (A1, A2, A4, B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3) ve gözde silikleşme (A3, B3)



Şekil 3. Nanopartiküllerin artemia salina'da sebep oldukları morfolojik değişimler. A) hiçbir nanopartiküle maruz kalmamış *Artemia salina*, B) nanopartiküllere maruz kalan *Artemia*'larda bağırsak genişlemesi ve dış kabuk yapısında görülen anormallikler C) nanopartiküllere maruz kalan *Artemia*'larda anten kaybı ve deformasyon

## 3.2. Kullanılan Nanopartiküllerin ICP-MS Analizi

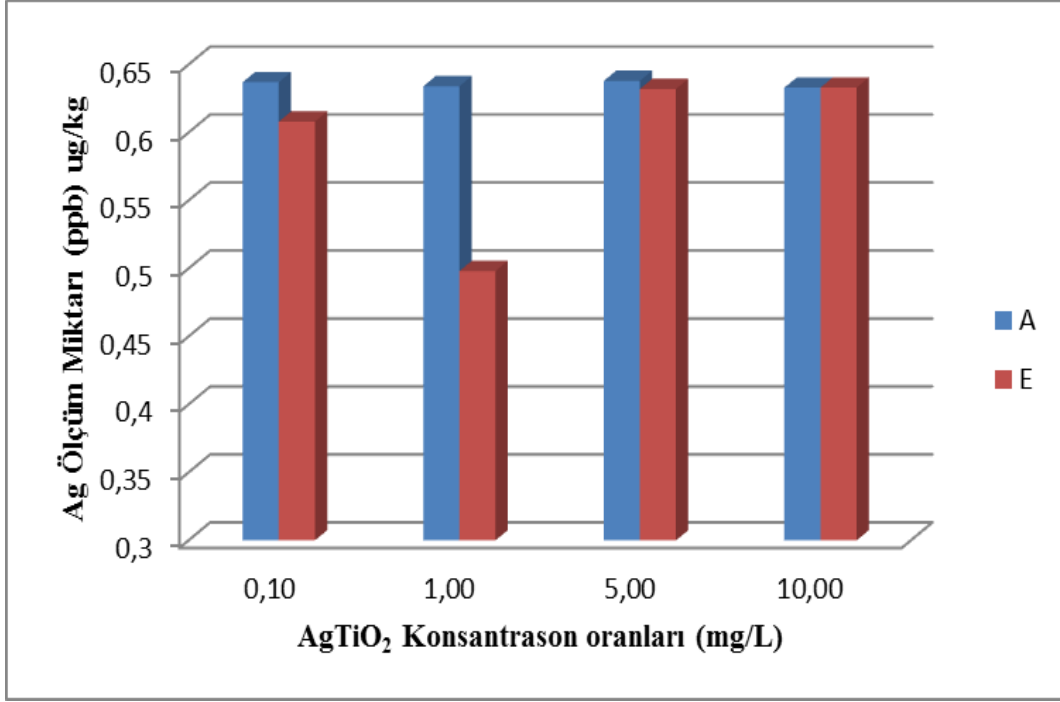
### 3.2.1. AgTiO<sub>2</sub> Nanopartikülü ICP-MS Analizi

*Artemia*'ların 24 saat maruz bırakıldığı AgTiO<sub>2</sub> nanopartikülünü süspansiyondan alma miktarı (A) ile yine 24 saat sonra bağırsaklarından çıkardıkları (E) nanopartikül miktarının konsantrasyonlara bağlı olarak anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için çoklu karşılaştırma testi ile uygulandı. Bu testte AgTiO<sub>2</sub> nanopartikülü içinde Titanyum (Ti) ve Gümüş (Ag) miktarları ayrı ayrı belirlendi ve her konsantrasyon diğer konsantrasyonlar ile birikim ve eliminasyon bakımından teker teker istatistiki olarak karşılaştırıldı. AgTiO<sub>2</sub> nanopartikülünün içindeki Ag miktarı konsantrasyona bağlı olarak çoklu karşılaştırma testi yapıldı ve tüm konsantrasyonların Ag miktarı bakımından anlamlı farklılığın olmadığı belirlendi (Tablo 4). Titanyum miktarı bakımında yapılan çoklu karşılaştırma testinde ise 0,01 mg/l ile 0,1 mg/l konsantrasyonları arasında anlamlı fark, 0,01 mg/l ile 1 mg/l konsantrasyonları arasında ise çok anlamlı fark vardır (Tablo 5). Bağımlı değişkene göre yapılan istatistikte ise, AgTiO<sub>2</sub>'nin içerdiği Ag (gümüş) nanopartikül miktarı açısından konsantrasyonlar ve birikim (akümülyasyon ve eliminasyon) arasında anlamlı fark vardır (Şekil 5). AgTiO<sub>2</sub> nanopartikülü içindeki Ti (titanyum) miktarına göre konsantrasyon ve birikimi (akümülyasyon ve eliminasyon) arasında çok önemli fark gözlemlendi (Şekil 6).

Tablo 4. Çoklu karşılaştırma testi (Tukey): AgTiO<sub>2</sub> nanopartikülü içindeki Ag miktarı

(I) doz	(J) doz	Ortalama Fark (I-J)	Standart Hata	Gruplararası Anlamlılık Farkı	95% Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
0,1 mg/l	1 mg/l	57,37	34,32	0,479	163,36	48,62
	5 mg/l	-6,19	34,32	1,000	112,18	99,80
	10 mg/l	25,26	34,32	0,945	-80,73	131,24
1 mg/l	0,1 mg/l	57,37	34,32	0,479	-48,62	163,36
	5 mg/l	51,18	34,32	0,583	-54,81	157,17
	10mg/l	82,63	34,32	0,167	-23,36	188,61
5 mg/l	0,1 mg/l	6,19	34,32	1,000	-99,80	112,18
	1 mg/l	51,18	34,32	0,583	157,17	54,81
	10 mg/l	31,45	34,32	0,886	-74,54	137,43
10mg/l	0,1 mg/l	25,26	34,32	0,945	131,24	80,73
	1 mg/l	82,63	34,32	0,167	188,61	23,36
	5 mg/l	31,45	34,32	0,886	137,43	74,54

Yukarıdaki çoklu karşılaştırma tablosunda Tukey testi sonuçlarına göre, AgTiO<sub>2</sub> içindeki Ag miktarı açısından konsantrasyonlar arasında P<0,05 anlamlılık seviyesinde fark görülmemiştir.



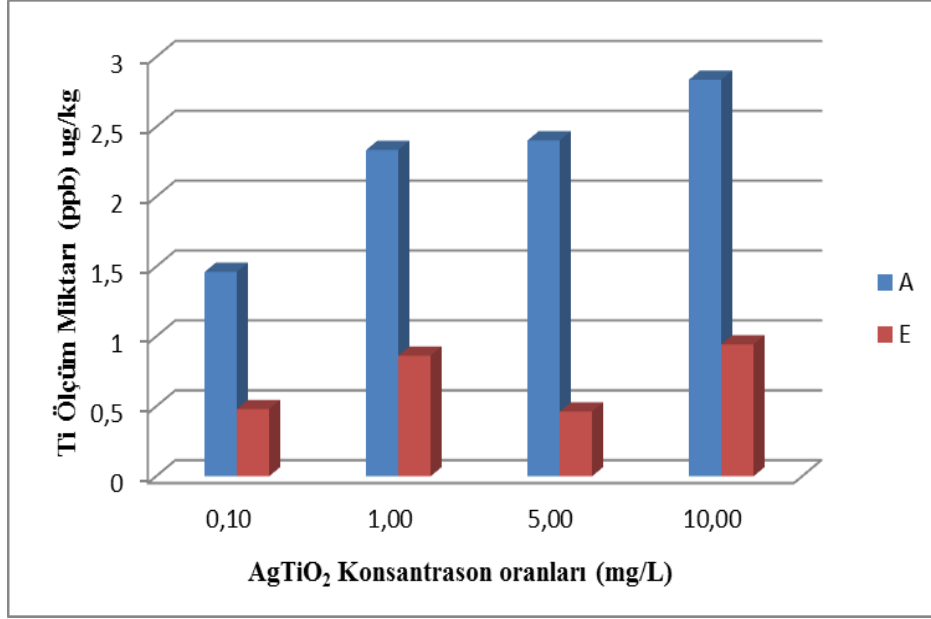
Şekil 4. AgTiO<sub>2</sub> nanopartikülüne 24 saat maruz bırakılan *Artemia*'ların bünyesine aldığı Ag miktarı (A) ve bu süre sonunda temiz deniz suyuna alınarak 24 saat sonra bağırsaktan attığı Ag miktarı (E)

AgTiO<sub>2</sub>'de Ag (gümüş) nanopartikül miktarı açısından konsantrasyonlar (P=0,041) ve birikim (P=0.026) (akümülyasyon ve eliminasyon) arasında P<0,05 seviyesinde anlamlı fark vardır.

Tablo 5. Çoklu karşılaştırma testi (Tukey): AgTiO<sub>2</sub> nanopartikülü içindeki Ti miktarı

(I) doz	(J) doz	Ortalama Fark (I-J)	Standart Hata	Gruplararası anlamlılık Farkı	95% Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
0,1 mg/l	1 mg/l	-0,63*	0,165	<b>0,01</b>	-1,12	-0,13
	5 mg/l	-0,46	0,165	0,07	-0,96	0,03
	10 mg/l	-0,92*	0,165	<b>0,00</b>	-1,42	-0,42
1 mg/l	0,1 mg/l	0,63*	0,165	<b>0,013</b>	0,13	1,12
	5 mg/l	0,17	0,165	0,752	-0,33	0,66
	10 mg/l	-0,30	0,165	0,334	-0,79	0,20
5 mg/l	0,1 mg/l	0,46	0,165	0,07	-0,03	0,96
	1 mg/l	-0,17	0,165	0,75	-0,66	0,33
	10 mg/l	-0,46	0,165	0,07	-0,95	0,04
10 mg/l	0,1 mg/l	<b>0,92*</b>	0,165	<b>,000</b>	0,42	1,42
	1 mg/l	0,30	0,165	,334	-0,20	0,79
	5 mg/l	0,46	0,165	,073	-0,04	0,96

Yukarıdaki çoklu karşılaştırma tablosunda Tukey testi sonuçlarına göre AgTiO<sub>2</sub> içindeki Ti miktarı açısından; 0,1 mg/l ile 1 mg/l konsantrasyonları arasında  $P < 0,05$  seviyesinde anlamlı fark vardır, 0,1 mg/l ile 10 mg/l arasında ise  $P < 0,01$  seviyesinde çok önemli fark vardır.



Şekil 5. AgTiO<sub>2</sub> nanopartikülüne 24 saat maruz bırakılan *Artemia*'ların bünyesine aldığı Ti miktarı (A) ve bu süre sonunda temiz deniz suyuna alınarak 24 saat sonra bağırsaktan attığı Ti miktarı (E)

AgTiO<sub>2</sub> nanopartikülü içindeki Ti (titanium) miktarına göre konsantrasyon (P=0,01) ve birikimi (akümülsasyon ve eliminasyon, P=0,00) arasında P<0,01 seviyesinde çok önemli fark gözlenmiştir.

Tablo 6. AgTiO<sub>2</sub> nanopartikülüne 24 saat maruz bırakılmış *Artemia*'ların, normal deniz suyunda 24 saat sonunda çıkarttıkları Ag ve Ti nanopartikül yüzdeleri

	Konsantrasyonlar (mg/l)			
	0,1 mg/l	1 mg/l	5 mg/l	10 mg/l
Titanyum (%)	67	63	81	77
Gümüş (%)	0,5	21,5	0,5	0

*Artemia*'nın, Ti ve Ag konsantrasyonlarının kendi arasında değerlendirildiğinde nanopartikülleri elimine etme (bağırsaktan atma) farkı görülmezken, AgTiO<sub>2</sub> nanopartikülü içindeki biriktirdiği (bağırsağa alınma) Ti'nin tüm konsantrasyonlarda büyük bir kısmını bağırsaktan atmasına rağmen Ag'nin 1 mg/l (%21,5) konsantrasyonu hariç diğer tüm konsantrasyonlarda bağırsaklardan atıldığı belirlenmiştir.

### 3.2.2. ZnOTiO<sub>2</sub> Nanopartikülü ICP-MS Analizi

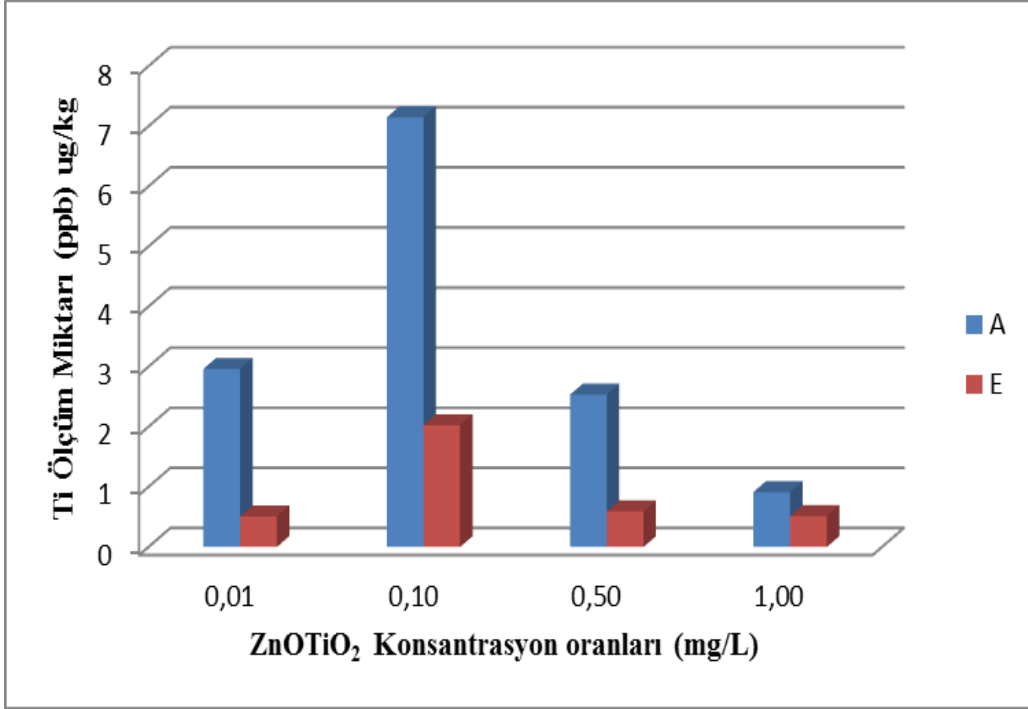
*Artemia*'ların 24 saat maruz bırakıldığı ZnOTiO<sub>2</sub> nanopartikülünü süspansiyondan alma miktarı (A) ile yine 24 saat sonra bağırsaklarından çıkardıkları (E) nanopartikül miktarının konsantrasyonlara bağlı olarak anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için çoklu karşılaştırma testi ile uygulandı. Bu testte ZnOTiO<sub>2</sub> nanopartikülü içinde Çinko (Zn) ve Titanyum (Ti) miktarları ayrı ayrı belirlenmiş ve her konsantrasyon diğer konsantrasyonlar ile birikim ve eliminasyon bakımından teker teker istatistiki olarak karşılaştırıldı. ZnOTiO<sub>2</sub> nanopartikülünün içindeki Ti miktarı konsantrasyona bağlı olarak çoklu karşılaştırma tesiti sonucu 0,1 mg/l ile 0,01 mg/l, 0,5 mg/l konsantrasyonları arasında anlamlı fark, 0,1 mg/l ile 1 mg/l konsantrasyonları arasında ise çok anlamlı fark vardır (Tablo 7). ZnOTiO<sub>2</sub> içindeki Zn miktarı değerlendirmesinde ise 0,01 mg/l ile 0,1 mg/l ve 0,1 mg/l ile 1 mg/l konsantrasyonlar arasında istatistiki olarak önemli fark vardır (Tablo 8). Bağımlı değişkene göre yapılan istatistikte ise, ZnOTiO<sub>2</sub>'de titanyum nanopartikül miktarı açısından konsantrasyonlar ve birikim (Eliminasyon ve Akümülyasyon) arasında çok önemli fark bulunmuştur (Şekil 7). ZnOTiO<sub>2</sub>'de Zn (titanyum) nanopartikül miktarı açısından konsantrasyonlar ve birikim arasında çok önemli fark vardır (Şekil 8).



Tablo 7. Çoklu karşılaştırma testi (Tukey): ZnOTiO<sub>2</sub> nanopartikülü içindeki Ti miktarı

(I) doz	(J) doz	Ortalama Fark (I-J)	Standart Hata	Gruplararası anlamlılık Farkı	95% Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
	0,1 mg/l	<b>-2,85*</b>	0,73	<b>0,01</b>	-5,03	-0,67
0,01 mg/l	0,5 mg/l	0,17	0,73	0,10	-2,01	2,36
	1 mg/l	1,02	0,73	0,52	-1,16	3,21
	0,01 mg/l	<b>2,85*</b>	0,73	<b>0,01</b>	0,67	5,04
0,1 mg/l	0,5 mg/l	<b>3,02*</b>	0,73	<b>0,00</b>	0,84	5,21
	1mg/l	<b>3,87*</b>	0,73	<b>0,00</b>	1,69	6,06
	0,01 mg/l	-0,17	0,73	0,10	-2,36	2,01
0,5 mg/l	0,1 mg/l	<b>-3,02*</b>	0,73	<b>0,00</b>	-5,21	-0,85
	1mg/l	0,85	0,73	0,66	-1,34	3,03
	0,01 mg/l	-1,02	0,73	0,52	-3,21	1,16
1 mg/l	0,1 mg/l	<b>3,87*</b>	0,73	<b>0,00</b>	-6,06	-1,69
	0,5 mg/l	-0,84	0,73	0,66	-3,03	1,34

Yukarıdaki çoklu karşılaştırma tablosunda Tukey testi sonuçlarına göre ZnOTiO<sub>2</sub> içindeki Ti miktarı açısından; 0,1 mg/l ile 0,01 mg/l, 0,5 mg/l konsantrasyonları arasında  $P < 0,05$  seviyesinde anlamlı fark varken 0,1 mg/l ile 1 mg/l konsantrasyonları arasında  $P < 0,01$  seviyesinde çok önemli fark vardır.



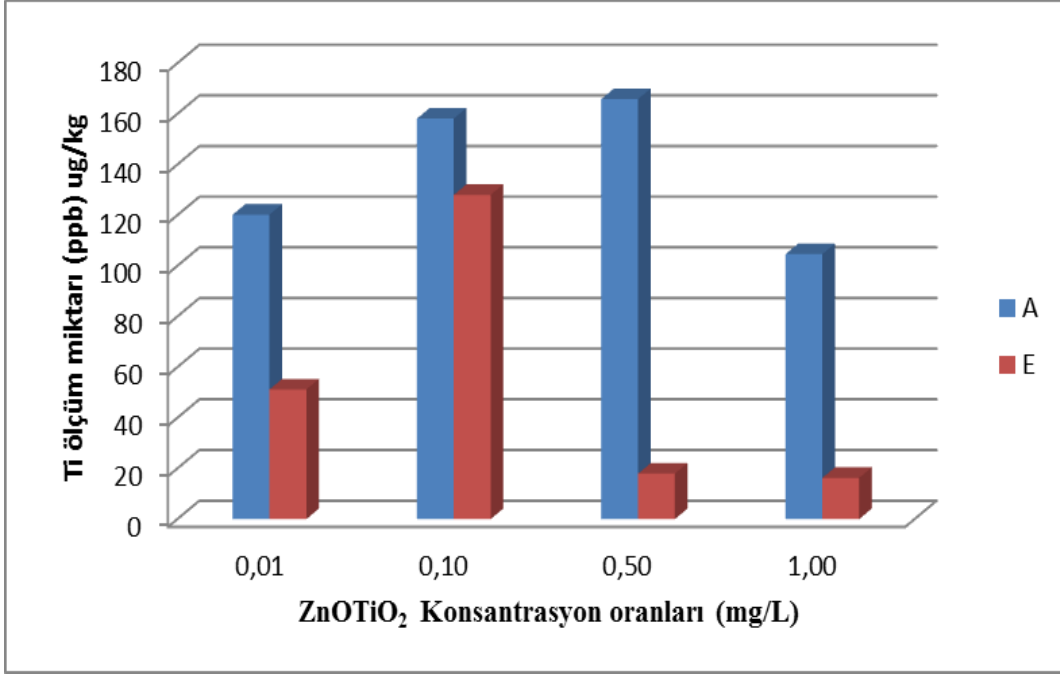
Şekil 6. ZnOTiO<sub>2</sub> nanopartikülüne 24 saat maruz bırakılan *Artemia*'ların bünyesine aldığı Ti miktarı (A) ve bu süre sonunda temiz deniz suyuna alınarak 24 saat sonra bağırsaktan attığı Ti miktarı (E)

ZnOTiO<sub>2</sub>'de Ti (titanyum) nanopartikül miktarı açısından konsantrasyonlar ve birikim (Eliminasyon ve Akümülyasyon) arasında çok önemli fark vardır ( $P < 0,01$ ).

Tablo 8. Çoklu karşılaştırma testi (Tukey): ZnOTiO<sub>2</sub> nanopartikülü içindeki Zn miktarı

(I) doz	(J) doz	Ortalama Fark (I-J)	Standart Hata	Gruplararası anlamlılık Farkı	95% Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
	0,1 mg/l	<b>-57,37*</b>	18,12	<b>0,039</b>	-111,91	-2,83
0,01 mg/l	0,5 mg/l	-6,19	18,12	0,986	-60,73	48,35
	1 mg/l	25,26	18,12	0,528	-29,29	79,80
	0,01 mg/	<b>57,37*</b>	18,12	<b>0,039</b>	2,83	111,91
0,1 mg/l	0,5 mg/l	51,18	18,12	0,068	-3,36	105,72
	1mg/l	<b>82,63*</b>	18,12	<b>0,004</b>	28,08	137,17
	0,01 mg/l	6,19	18,12	0,986	-48,35	60,73
0,5 mg/l	0,1 mg/l	-51,18	18,12	0,068	-105,72	3,36
	1mg/l	31,45	18,12	0,352	-23,10	85,99
	0,01 mg/l	-25,26	18,12	0,528	-79,80	29,29
1 mg/l	0,1 mg/l	<b>-82,63*</b>	18,12	<b>0,004</b>	-137,17	-28,08
	0,5 mg/l	-31,45	18,12	0,352	-85,99	23,10

Yukarıdaki çoklu karşılaştırma tablosunda Tukey testi sonuçlarına göre ZnOTiO<sub>2</sub> içindeki Zn miktarı açısından; 0,01 mg/l ile 0,1 mg/l ve 0,1 mg/l ile 1 mg/l konsantrasyonlar arasında anlamlı fark vardır ( $P < 0,05$ ).



Şekil 7. ZnTiO<sub>2</sub> nanopartikülüne 24 saat maruz bırakılan *Artemia*'ların bünyesine aldığı Zn miktarı (A) ve bu süre sonunda temiz deniz suyuna alınarak 24 saat sonra bağırsaktan attığı Ti miktarı (E)

ZnOTiO<sub>2</sub>'de Zn (titanyum) nanopartikül miktarı açısından konsantrasyonlar (P=0,00) ve birikim (Eliminasyon ve Akümülyasyon) (P=0,00) arasında çok önemli fark vardır (P<0,01).

Tablo 9. ZnTiO<sub>2</sub> nanopartikülüne 24 saat maruz bırakılan *Artemia*'ların, normal deniz suyunda 24 saat sonunda çıkarttıkları Zn ve Ti nanopartikül yüzdeleri

	Konsantrasyonlar (mg/l)			
	0,01 mg/l	0,1 mg/l	0,5 mg/l	1 mg/l
Titanyum (%)	83	72	76,7	44
Çinko (%)	57,5	9	89,2	84,5

*Artemia*'nın, Zn konsantrasyonlar arasında nanopartikülleri elimine etme (bağırsaktan atma) farkı bakımından sadece 0,1 mg/l konsantrasyonun da çok düşük değer gözlemlendi. Zn ve Ti kendi arasında kıyaslandığında da Zn'nin yüzde atım oranı daha fazladır.

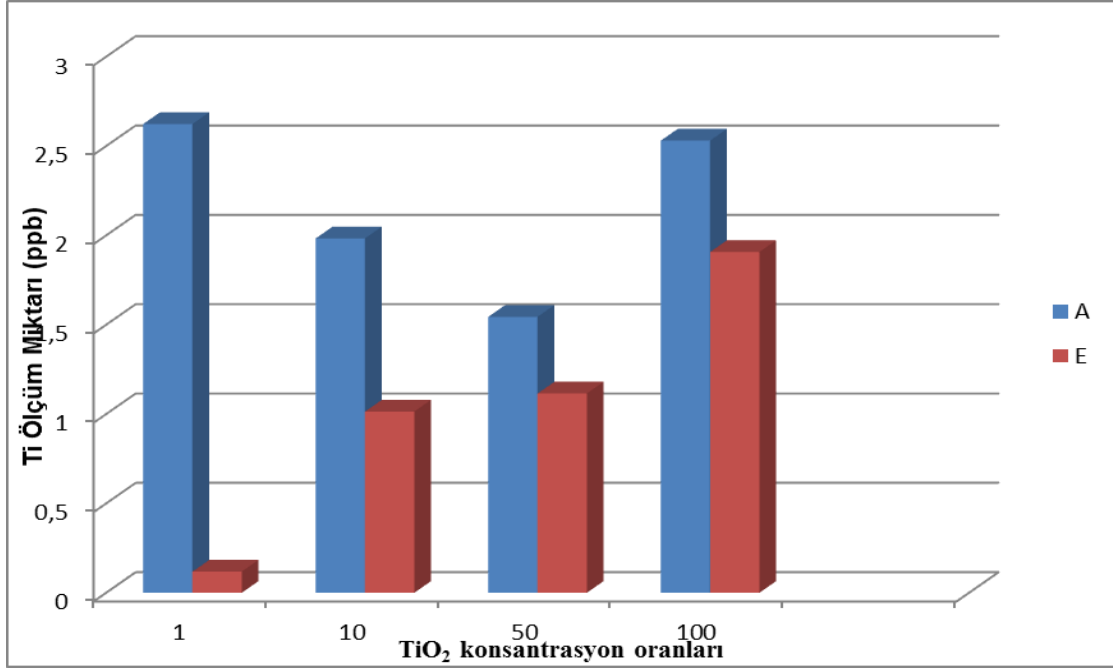
### 3.2.3. TiO<sub>2</sub> Nanopartikülü ICP-MS Analizi

*Artemia*'ların 24 saat maruz bırakıldığı TiO<sub>2</sub> nanopartikülü süspansiyondan alma nanopartikülü alma miktarı (A) ile yine 24 saat sonra bağırsaklarından çıkardıkları (E) nanopartikül miktarının konsantrasyonlara bağlı olarak anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için çoklu karşılaştırma testi yapıldı. Bu testte TiO<sub>2</sub> nanopartikülü içinde Titanyum (Ti) miktarları belirlenmiş ve her konsantrasyon diğer konsantrasyonlar ile birikim ve eliminasyon bakımından karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmada, TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün içindeki Ti miktarı 100 mg /l konsantrasyonu ile 50 mg/l konsantrasyonu arasında anlamlı bir fark olduğu bulundu (Tablo 10). Bağımlı değişkene göre yapılan istatistikte ise, TiO<sub>2</sub>'de Ti (titanyum) nanopartikül miktarı açısından konsantrasyonlar ve birikim (Eliminasyon ve Akümülyasyon) arasında anlamlı fark olmadığı kaydedildi (Şekil 9).

Tablo 10. Çoklu karşılaştırma testi (Tukey): TiO<sub>2</sub> nanopartikülü içindeki Ti miktarı

(I) doz	(J) doz	Ortalama Fark (I-J)	Standart Hata	Gruplararası anlamlılık Farkı	95% Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
1 mg/l	10 mg/l	-0,13	0,45	0,99	-1,48	1,22
	50 mg/l	0,04	0,45	1,00	-1,30	1,39
	100 mg/l	-1,35	0,45	0,05	-2,70	0,01
10 mg/l	1 mg/l	0,13	0,45	0,99	-1,22	1,48
	50 mg/l	0,17	0,45	0,98	-1,18	1,52
	100 mg/l	-1,22	0,45	0,08	-2,57	0,13
50 mg/l	1 mg/l	-0,04	0,45	1,00	-1,39	1,31
	10 mg/l	-0,17	0,45	0,98	-1,51	1,18
	100 mg/l	<b>-1,39*</b>	0,45	<b>0,04</b>	-2,74	-0,039
100 mg/l	1 mg/l	1,35	0,45	0,051	-0,01	2,70
	10 mg/l	1,22	0,45	0,081	-0,13	2,57
	50 mg/l	<b>1,39*</b>	0,45	<b>0,043</b>	0,04	2,74

Yukarıdaki çoklu karşılaştırma tablosunda Tukey testi sonuçlarına göre  $TiO_2$  içindeki Ti miktarı açısından; 100 mg /l konsantrasyonu ile 50 mg/l konsantrasyonu arasında anlamlı bir fark olduğu bulundu ( $P < 0,05$ ).



Şekil 8.  $TiO_2$  nanopartikülüne 24 saat maruz bırakılan *Artemia*'ların bünyesine aldığı Ti miktarı (A) ve bu süre sonunda temiz deniz suyuna alınarak 24 saat sonra bağırsaktan attığı Ti miktarı (E)

$TiO_2$ 'de Ti (titanyum) nanopartikül miktarı açısından konsantrasyonlar ve birikim arasında fark bulunamadı ( $P > 0,05$ ).

Tablo 11.  $TiO_2$  nanopartikülüne 24 saat maruz bırakılan *Artemia*'ların normal deniz suyunda 24 saat sonunda çıkarttıkları Ti nanopartikül yüzdeleri

Konsantrasyonlar	Ti (%)
1 mg/l	96,5
10 mg/l	49
50 mg/l	27,8
100 mg/l	61

*Artemia*'nın, Ti (titanyum) konsantrasyonları arasında nanopartikülleri bağırsaktan çıkarma oranı artan konsantrasyonlarla birlikte azalma gözlenmiştir, fakat 100 mg/l konsantrasyonunda bir artış söz konusudur.

### 3.3. Nanopartiküllerin Hidrodinamik Boyutu

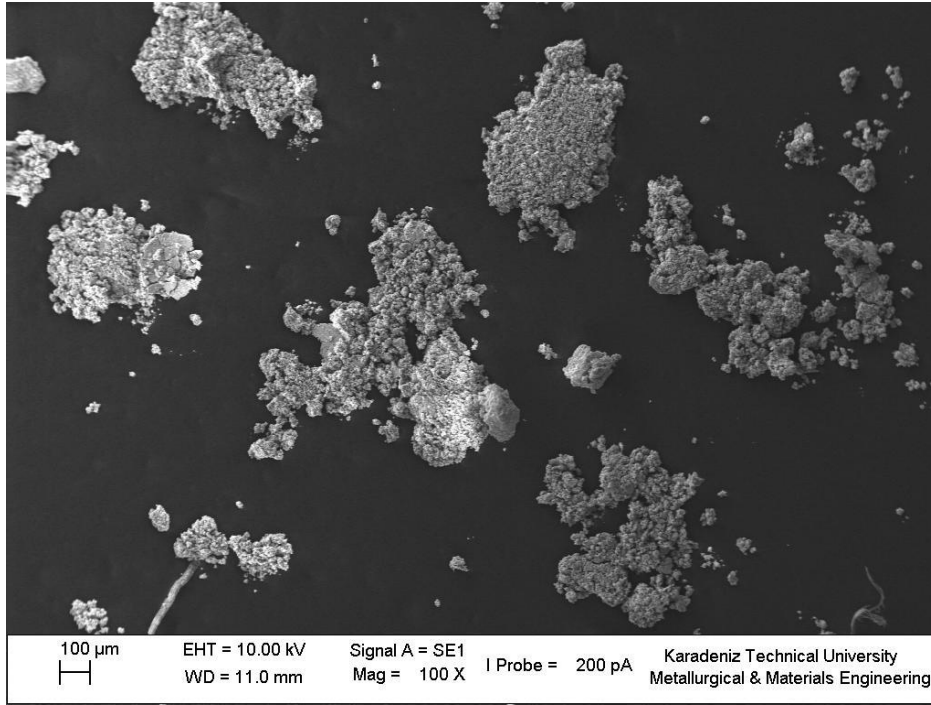
MasterSizer cihaz ölçümünde nanopartiküllerin tahmini hidrodinamik boyutlarının ortalama ölçümleri alınmıştır (Tablo 12). Tabloyu incelediğimizde zamanla birlikte boyutta küçülme görülmektedir. Nanopartiküllerin ölçülen en yüksek hidrodinamik boyut  $\text{TiO}_2$ , 9,014  $\mu\text{m}$  olup taze hazırlanan stok sölüsyonunda, ölçülen en küçük hidrodinamik boyut  $\text{TiO}_2$ , olup 0,267  $\mu\text{m}$  dir.

Tablo 12. Nanopartiküllerin sulu süspansiyonlarının MasterSizer'daki boyut ölçümü ( $\mu\text{m}$ )

<b>Konsantrasyonlar</b>	<b>0. Saat</b>	<b>24. Saat</b>	<b>96. Saat</b>
0.01 mg/l $\text{ZnOTiO}_2$	4,548	1,236	0,806
0.1 mg/l $\text{ZnOTiO}_2$	6,709	6,158	6,055
0.5 mg/l $\text{ZnOTiO}_2$	5,990	-	5,195
1 mg/l $\text{ZnOTiO}_2$	6,990	-	4,134
1 mg/l $\text{TiO}_2$	-	1,234	0,791
10 mg/l $\text{TiO}_2$	4,919	0,416	0,267
50 mg/l $\text{TiO}_2$	3,611	0,934	0,291
100 mg/l $\text{TiO}_2$	9,014	2,446	1,236
0.1 mg $\text{AgTiO}_2$	2,162	1,786	1,437
1 mg $\text{AgTiO}_2$	1,989	1,785	1,616
5 mg $\text{AgTiO}_2$	4,620	4,550	4,427
10 mg $\text{AgTiO}_2$	3,333	1,484	1,049

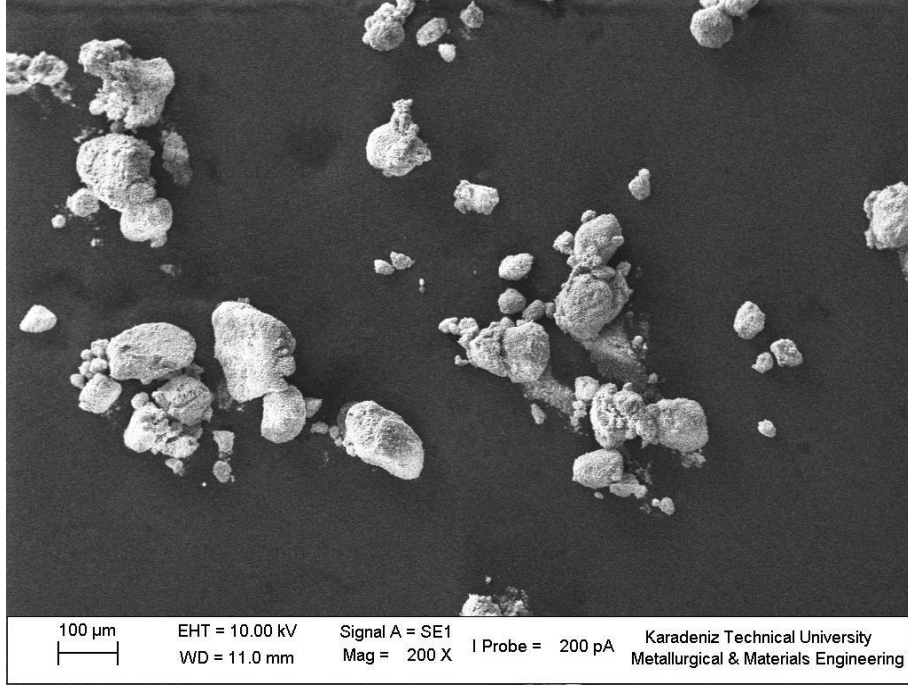
### 3.4. Kuru Nanopartiküllerin Boyutları

Toz (kuru) haldeki  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{AgTiO}_2$  ve  $\text{ZnOTiO}_2$  nanopartiküllerinin karakterizasyonun kümeleşmesinin ve morfolojisini (yüzey özelliklerini) belirlemek için 100 ve 200 kat oranlarda büyütülerek SEM (taramalı elektron mikroskobu) analizi yapılmış olup Şekil 10' de görüldüğü üzere  $\text{ZnOTiO}_2$  nanopartikül tanelerinin irili ufaklı kümeler oluşturup, bu kümelerin gözenekli yapıda olduğu görülmektedir.  $\text{AgTiO}_2$  nanopartikülünün ise daha iri kümeler oluşturmuş ve yüzeyi pürüzsüzdür (Şekil 11).  $\text{TiO}_2$ 'nin ise diğer nanopartiküllere kıyasla oluşturduğu kümeler daha küçük ve nanopartiküllerin bir araya gelmesiyle yüzeyinde oluşan gözenekler küçüktür (Şekil 12).

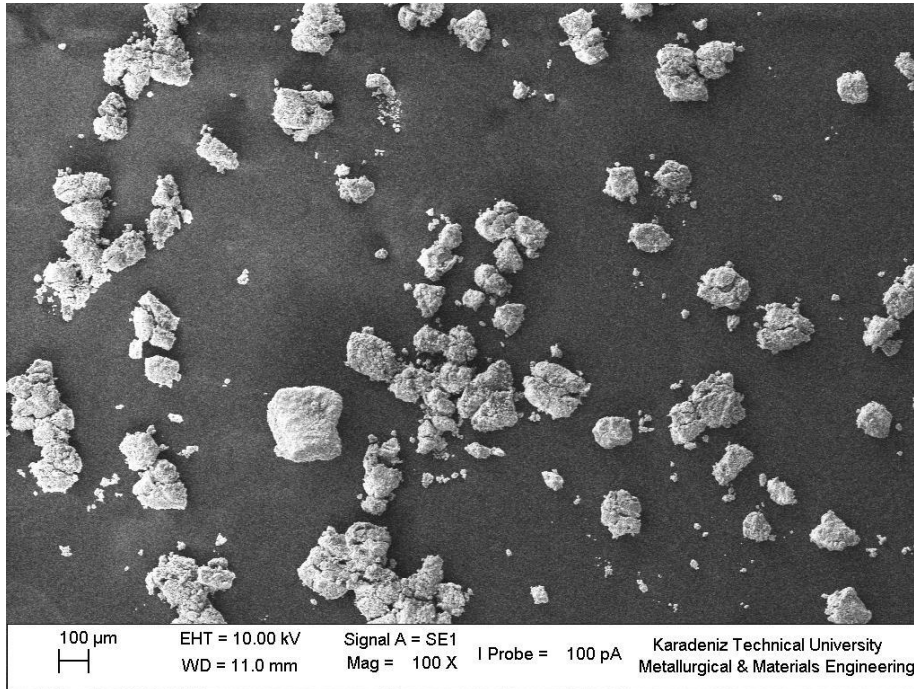


Şekil 9. Kuru haldeki  $\text{ZnOTiO}_2$  nanopartikülünün SEM görüntüsü





Şekil 10. Kuru haldeki AgTiO<sub>2</sub> nanopartikülünün SEM görüntüsü



Şekil 11. Kuru haldeki TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün SEM görüntüsü

#### 4. TARTIŞMA

Nanopartiküllerin toksik etkileri ve biyobirikimlerini belirlemek için yapılan toksikolojik çalışmalarında genellikle balık türleri kullanılmıştır. Bu çalışmada ise, uygulanabilirliği daha kolay olan kabuklu omurgasız türü olan *Artemia salina* larvası kullanıldı. *Artemia*, 50 µm den küçük ince partikülleri kolayca yiyebilen filtre beslenen bir türdür (Hund-Rinke ve Simon, 2006; Zhu vd., 2010). Nanoboyutlu TiO<sub>2</sub> üretilen nanopartiküllerin en popüler olanlardan biri olup giderek tüketici ürünlerinin çoğunda yer almaktadır. TiO<sub>2</sub> nanopartikülü güneş kremi, kozmetik, boya, yüzey kaplama ve hava kirliliğinin önlenmesi ve medikal uygulamalar gibi pek çok kullanım alanı bulunmaktadır. Bu kadar geniş uygulama alanı olmasından dolayı son alıcı ortama olan sucul çevrede etkisinin değerlendirilmesi gerekmektedir.

*Artemia salina* TiO<sub>2</sub> nanopartikülü (44,1 nm)'ne maruz bırakıldığında LC<sub>50</sub> değerleri 381,600- 18,771 mg/l aralığında değişmektedir. Bu değerlere bakıldığında maruziyet süresinin uzamasıyla TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün letal konsantrasyon değeri düşmektedir. LC<sub>50</sub> 24 saatte hesaplanan letal konsantrasyonunu 96 saatte gösterebilmesi için 20,3 kat azalması gerekmektedir. Ateş vd. (2012) *Artemia salina* yetişkin ve larvalarında TiO<sub>2</sub> nanopartikülü (10-30 nm)'nün toksik etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında maruz kalma süresi arttıkça hem naupli hemde yetişkin *Artemia* larvalarında istatistiksel olarak toksik etkinin değişmediğini ve ölüm oranının nauplide %6'dan %18'e, yetişkin *artemia*'da %5'den %14' (LC<sub>50</sub>>100 mg/l) çıkmaktadır. Ayrıca organizmaların olgunluk durumlarına bağlı olarak toksik etkilerinin uzayan maruziyet süresi boyunca değiştiği ve larvanın yetişkin *artemia*'dan daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir. Daha önceki ekotoksikolojik çalışmalarda, TiO<sub>2</sub> nanopartikülün maruz kalma süresi, maruz kalma konsantrasyonu, fiziko kimyasal özelliği ve nano boyutuna ve canlının türüne bağlı olarak farklı değerlendirmeler yapılmıştır. 25-100 nm TiO<sub>2</sub>'nin 3 mg/l den az konsantrasyonlarda dafniyaların hareketsizliğine az bir etkisi olduğunu ve güneş ışığı verilen ortamada toksik etkisinin fazla olduğunu kaydetmişlerdir (Hund-Rinke ve Simon, 2006). *D. magna*'da 48 saatlik akut toksisitesinin 30 nm TiO<sub>2</sub>'nin 100-500 nm'ye oranla çok yüksek olduğunu göstermişlerdir (Lovern ve Klaper 2006). TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün *D. magna* üstünde statik akut toksisite testinde EC<sub>50</sub> değerini bulmak için 0,1- 100 mg/l konsantrasyonları arasında 48 saatin sonunda etkilenmediğini ve TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün sucul çevrede düşük tehlike

gösterdiğini kaydetmişlerdir (Warheit vd., 2007). Deniz kulağı (*Heliotis diversicolor supertexta*)'da TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün 1-10 mg/l maruz kalmada akut toksik olmadığını (Zhu vd., 2011), *D. magna* nano ve nano boyutlu olmayan TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin 48 saatlik akut toksisite çalışmasında letal etkili olmadığını kaydetmişlerdir (Wiench vd., 2009). *Naupli* için TiO<sub>2</sub> nanopartikülünde ki Ti miktarı 1-100 mg/l süspansiyonlarının 24 saat maruz kalma birikimi 2,963- 0,915 (ppb) arasında olup 24 saat bağırsakların partiküllerden temizlenmesi sağlandıktan sonra ölçülen Ti miktarı 2,027-0,508 değerleri arasında ölçülmüştür.

*Artemia*'nın, Ti konsantrasyonları arasında nanopartikülleri bağırsaktan çıkarma miktarı artan konsantrasyonlarla birlikte azaldığı kaydedilirken 100 mg/l konsantrasyonda diğerlerine oranla bir artış söz konusudur örneğin, 100 mg/l konsantrasyonda canlı %96,5 atmayı başarırken 50 mg/l'de %27,8 atmıştır. Tüm bu değerlere bakıldığında, TiO<sub>2</sub>'deki Ti miktarı akümülyasyon ve eliminasyon arasında sadece 100 mg /l ile 50 mg/l konsantrasyonu arasında anlamlı bir fark olduğu ve yine TiO<sub>2</sub>'de Ti (titanium) nanopartikül miktarı açısından konsantrasyonlar ve birikim arasında istatistiksel olarak fark olmadığı kaydedilmiştir. Önceki yapılan çalışmalara paralel olarak bu tez çalışmasında da benzer sonuçlar elde edilmiş olup zamana ve konsantrasyona bağlı olarak ölçülen Ti miktarı artmıştır, fakat bu artışın 24 ve 96 saat için istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Eliminasyon için bu değer TiO<sub>2</sub> içeriğinde %3-12 azalmaya karşılık gelmektedir (Ateş vd., 2012,). Bu çalışmayla kıyaslandığında ise 24 saat maruz kalmada Ti miktarı daha fazladır, fakat titaniumun bağırsaktan atılma oranı bizim çalışmamıza göre çok daha az orandadır, bu farklılığın nanopartikül boyutundan kaynaklanabileceğini düşünülmektedir. Her iki çalışmada da istatistiksel olarak zaman ve konsantrasyona bağlı olarak sonuçlarda anlamlı farklılık yoktur. *Artemia*'larla aynı takson içinde yer alan *Daphnia magna* (su piresi)'da TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerini vücut da önemli miktarda biriktiğini bulmuşlar (0.1 mg/l için  $5,66 \times 10^4$  ve 1 mg/l için  $1,18 \times 10^5$ ) ve *D. magna*'nın yutulan tüm nanopartiküllerin dışarı atamakta yetersiz kaldığı ve bu sebeple gözlenen toksisitenin vücuttaki TiO<sub>2</sub> birikimi ile ilişkili olabileceğini düşünmektedirler (Zhu vd., 2010). TiO<sub>2</sub> nanopartikülünün yüksek birikimi ve düşük atım oranı (bağırsaktan atma) TiO<sub>2</sub> nanopartikülü ile kronik maruz bırakılan *D. magna*'da besin alımı ve filtre etme oranında azalmaya sebep olduğu görülmüştür (Hanazato, 2001).

ZnO nanopartikülü UV korumalı güneş kremleri, elektronik uygulamalar şeffaf UV koruma filmleri, kimyasal sensörler, seramik emici malzeme ve son olarakta kişisel bakım

ürünleri, için kullanılmaya başlandı (Auffan vd., 2011; Pendashte vd., 2013). Endüstriyel ve endüstriyel olmayan çinko nanopartiküllerin artan uygulamaları dikkate alındığında, bunların sucul çevreye girmesiyle sonuçlanan potansiyel toksik etkisini araştırmak gerekmektedir.

Bu çalışmada titanyum üzerine yüklenen ZnO nanopartikülünün ( $ZnOTiO_2$  45,2 nm) omurgasız tuzlu karidesi (*Artemia salina*)’da akut toksik etkisi, birikimi ve eliminasyonu değerlendirilmiştir.  $ZnOTiO_2$  nanopartikülü içinde ki Ti ve Zn nanopartikül miktarının canlıda birikimi ve eliminasyonu konsantrasyonlara göre değiştiği gözlenmiştir. Ti miktarının 0,1 mg/l ile 0,01 mg/l, 0,5 mg/l ve 0,1 mg/l ile 1 mg/l, Zn miktarının ise 0,01 mg/l ile 0,1 mg/l ve 0,1 mg/l ile 1 mg/l konsantrasyonlar arasında birikim ve eliminasyon arasında ve  $ZnOTiO_2$ ’de Ti ve Zn nanopartiküllerinin miktarı açısından konsantrasyonlar ve birikim (eliminasyon ve akümülyasyon) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık kaydedilmiştir.

*Artemia*’nın, Zn ve Ti nanopartiküllerinin konsantrasyonlar arasında nanopartikülleri elimine etme (bağırsaktan atma) oranına baktığımızda Zn ve Ti’nin aşağı yukarı aynı oranlarda ve oldukça yüksek oranlarda bağırsaktan atılımının gerçekleştiği görülmektedir (Tablo ek 2). Sadece Zn’nin 0,1 mg/l konsantrasyonundaki eliminasyonda ciddi oranda düşük değer gözlenmiştir. Genel olarak Zn’nin artan konsantrasyonla birlikte bağırsaktan atım oranı artma eğilimindedir. Zn ve Ti’nin *artemia*’da birikimine bakıldığında da bu nanopartiküller arasında ciddi oranda farklılık olduğu görülmektedir örneğin, 0,01 mg/l konsantrasyon da çinko birikimi 120,2 iken aynı konsantrasyonda Titanyumun birikimi 2,963 ppb olup çok yüksek oranda nanopartikülleri alım farklılığı vardır, bu farklılığın tüm konsantrasyonlarda olduğu görülmektedir. Bu birikim değerlerine bakıldığında Zn’nin 0,5 mg/l konsantrasyonda 165,8 ppb ile Ti’nin ise 0,1 mg/l ile 7, 149 ppb ile en etkin şekilde bünyesine almaktadır.

$ZnOTiO_2$  nanopartikülünün zamana ve konsantrasyona bağlı olarak toksik etkisi değerlendirildiğinde, akut toksik etkisinin zamanla artmakta olup 24. saatte 5.111 mg/l iken 48. saatte 17 kat azalarak aynı toksik etkiyi 0,296 mg/l de göstermektedir. Kısaca, zaman artışıyla birlikte  $ZnOTiO_2$  nanopartikülü akut toksik etkiyi göstermek için çok daha az konsantrasyonların (miktar) yeterli olduğu görülmektedir. Ayrıca, mikroskopik incelemelerde ZnO nanopartikülüne maruz bırakılan *artemia*’ların tüm konsantrasyonlar da bağırsakların normalden fazla genişlemesi bazı maruz bırakılan konsantrasyonlarda göz

küçülmesi ve siyahının silikleşmesi göz yuvarlağının şeklinin değişmiş ve dış kabuk yapısında bozulma gibi morfolojik değişimlere sebep olduğu gözlenmiştir.

Karasal omurgasız isopod (*Porcellio scaber*)’de ZnO nanopartikülü, solüsyondaki ZnCl<sub>2</sub> ve makrotoz ZnO formunda biyoakümüülasyonunu değerlendikleri çalışmalarında, çinkonun bu üç kaynağında *P. Scaber* tarafından alınan çünko miktarı biyoakümüülasyon faktörü ve Zn’nin alım verimliliği çinko kaynağına bağlı olarak değişmediği gözlenmiştir yani sonuçlar her üç çinko kaynağında da benzerdir. Alınan çinkonun miktarı ve biyoakümüülasyonu doza bağımlı olmadığı ve çinkonun bazı istisnalar hariç her konsantrasyonda benzerdir. Ayrıca, *P. scaber* tarafından alınan ortalama çinko verimliliği, %10 dur (Pipan-Tkalec vd., 2009). Bu sonuçlar bu yapılan tez çalışmasıyla kıyaslandığında farklılıklar olduğu görülmektedir, bizim çalışmamızda konsantrasyona bağlı olarak alım miktarı değişirken, Pipan-Tkalec vd. (2009)’un yapmış olduğu çalışmada doza bağlı olmadığı kaydedilmiştir. Zebrabalığı embriyo ve larva gelişimi üzerine ZnO nanopartiküllerinin toksisitesi ve kültür ortamında ZnO kümeleşmesini (agregasyon) değerlendirildiği çalışmada 48 saatte mikro ölçekli ZnO nanopartikülleri kültür ortamına yerleştiği ve bu ZnO agregasyonunun (kümeleşmesinin) larva ve embriyo üzerine doza bağlı toksik etkisinin, yumurtlamayı azaltması ve perikardial ödeme sebep olduğu bulunmuştur (Zhu, vd., 2009).

30 nm boyutlu ZnO nanopartikülünün özellikleri sulu süspansiyonda karakterize ettikleri çalışmalarında, zebra balığı embriyo-larva fertilizasyondan 96 saat sonra ZnO nanopartikülünün toksisitesini değerlendirdiler. 50 ve 100 mg/l ZnO nanopartikülü ve Zn<sup>+2</sup> maruz kalmada embriyonik ölüm sırasıyla %28,3 ± 14,5 ve 65,0 ± 8,9 olduğu kaydedilmiştir. 0,598-6,305 mg/l konsantrasyon aralığında Zn<sup>+2</sup> embriyo ölümüne yol açmamıştır. 1-10 mg/l artan konsantrasyonda nano ZnO’ya maruz kalan embriyolarda yumurtlama oranı azalmıştır, 0,598 mg/l de Zn<sup>+2</sup>,de etkilenmemişken Zn<sup>+2</sup>,artan konsantrasyonlarında yumurtlama oranı azalmıştır (Bai vd., 2010). Zebra balığında ZnO nanopartikülü, yığın (bulk) ZnO ve Zn<sup>2+</sup> artan partikül konsantrasyonuyla akut toksik etkisinin doza bağımlı olduğunu göstermişlerdir (Xiong vd., 2011). Konsantrasyon 2 mg/l’i geçtiğinde Zebra balığı ölümü, partikül konsantrasyonu artmasıyla birlikte artmaktadır. ZnO nanopartikülü ve yığın ZnO için 30 mg/l de %100 ölüm gözlendi. 96 saat için hesaplanan LC<sub>50</sub> değerleri ise ZnO nanopartikülü için 4,92 mg/l ve yığın ZnO için 3,31 mg/l dir. Zn<sup>2+</sup> çözültisi için 8,062 mg/l olarak kaydedilmiştir. *Daphnia magna*’da ZnO ve ZnO nanopartikülünün toksik etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında 48 saat maruz

birakmada EC<sub>50</sub> değeri 1 mg/l olarak bulmuşlardır (Wiench vd., 2009). Sedimentte yaşayan *Corophium volutator*'un gelişimi, üretkenliği ve hayatta kalması üzerine etkilerini ve kronik etkilerini ZnO nanopartikülünün çözüdür ve yığın (buluk) ve iyon formları halinde incelediler. *C. volutator*'un yaşam süresi üzerine çinkonun tüm formlarının etkili olduğu ve spesifik gelişimini ise maruz bırakmanın 23. Gününden sonra önemli ölçüde azalttığını kaydetmişlerdir (Fabrega, 2011). Sedimentte çözüdür çinko ve yığın çinkonun yüksek konsantrasyonu ile uzun süreli teması sonucu bu azalan gelişim oranının sonucu olabileceğini belirtmektedirler. Çinkonun yavaş gelişime sebep olan subletal etkileri, gecikmeli cinsel olgunlaşma ve indirgenmiş doğurganlığa, 0,2-1 mg/l konsantrasyon aralığında sebep olmaktadır. Tüm bu sonuçlara bakıldığında çinkonun az veya çok oranda toksik etkili olduğu görülmektedir. Bu toksik etkinin farklı çalışmalarda farklı oranlarda olduğu görülmektedir. Bu toksik etkinin farklılığının öncelikle çinkonun boyutuna bağlı olabileceği, konsantrasyon/doz miktarı, maruz kalma süresi (akut/kronik) canlının kütlesine ve yaşam şekline maruz kalma şekline ve çinko nanopartikülünün formuna (yığın, toz yada iyon ) bağlı olarak değişmekte olduğu söylenebilir.

Gümüş partikülleri sterilizasyon ve antibakteriyel özellikleri gibi olumlu etkileri sebebiyle çeşitli tüketici ürünlerinde oldukça fazla kullanılmaktadır. Bununla birlikte Ag nanopartiküllerinin çeşitli hücreler üzerinde güçlü akut toksik etkileri olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Bae, 2010). Son zamanlarda akuatik çevreye gümüş nanopartikülü içeren nano ürünlerin atılması, çeşitli organizmalar üzerinde katalitik ve biyosidal etkilerinden dolayı potansiyel toksisitesi ile ilgili kaygıları artırmıştır (Asharani vd., 2009; Naddy vd., 2007). şimdiye kadar gümüş (Ag) nanopartikülü ile yapılan çalışmalar daha çok omurgalı (balık ve fare) canlılar ve bakteriler kullanılarak yapılmış olup bu çalışmada Ag nanopartikülünün omurgasız canlıda birikimi üzerine yapılmış ikinci çalışmadır. Bu çalışmada kullandığımız Ag nanopartikülü TiO<sub>2</sub> nanopartiklüne yüklenerek gümüş titanyum dioksit (AgTiO<sub>2</sub>) nanopartikülü olarak çalışılmıştır.

Yapılan bu tez çalışmasında, titanyum dioksit (TiO<sub>2</sub>) üzerine yüklenen gümüş (Ag) nanopartikülü (43 nm)'nin omurgasız tatlı su karidesi (*Artemia salina*) larvalarında 24, 48, 72 ve 96. saatlerde akut toksik etkilerini değerlendirmek amacıyla 0,003125 mg/l'den 10 mg/l konsantrasyon aralığında maruz bırakılarak LC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Bu değerlere bakıldığında 24. saatte akut toksik etkisini oldukça yüksek konsantrasyonda gösteriyorken zaman artışıyla birlikte (48, 72 ve 96) akut toksik etkisini oldukça düşük konsantrasyonlarda gösterdiği söylenebilir. AgTiO<sub>2</sub>'nin 24. saatte gösterdiği akut toksik

etkiyi 48 saatte gösterebilmek için konsantrasyonunun 6 kat azalması, 72 saatte gösterebilmesi için 21,6 kat ve 96. saatte ise 29,3 kat azalması gerekmektedir, dolayısıyla bu sonuçlara bakıldığında gümüş nanopartikülünün toksik etkisinin zamanla arttığı söylenebilir. Yapılan bu tez çalışmasının aksine, filtre beslenme yapan *Daphnia magna*'da su bazlı gümüş nanopartikülü ve AgNO<sub>3</sub> (gümüş nitrat)'a 20- 500 µg/l konsantrasyon aralığında 48 saatlik akut maruziyete bırakarak LC<sub>50</sub> değerini hesaplandığı çalışmada Ag nanopartikülünün 48 saatlik maruz bırakmada ölüm gözlenmediğinden LC<sub>50</sub> değeri hesaplanamamıştır dolayısıyla 48 saatte toksik etkili olmadığı kaydedilmiştir (Zhao ve Wang 2011). Aynı çalışmada AgNO<sub>3</sub> için bu değer 2,51 µg/l olarak hesaplanmıştır. Bu sebeple, herhangi bir gümüş nanopartikülünün potansiyel toksik etkisinin çözelti içine salınan Ag iyonlarından kaynaklanabileceğini belirtilmiştir. Yine yapılan bu tez çalışmasında paralel sonuçları olan, Allen vd., (2010) çalışmasında, *Daphnia magna*'da çeşitli gümüş nanopartikülünün toksisitesini yiyeceğin varlığında ve yokluğunda değerlendirmişlerdir. Buna göre çeşitli AgNO<sub>3</sub> ve Ag nanopartiküllerinin 48 saatlik akut maruz bırakma sonunda belirlenen dokuz farklı kombinasyonunun LC<sub>50</sub> değerleri şöyledir; AgNO<sub>3</sub> için LC<sub>50</sub> değeri filtresiz 1,1; filtreli 0,7; sitrat yüklenmiş 1,1; kahve yüklenmiş 1,0; Ag nanopartikülü için yüklü filtreli 4,4; yüklü filtresiz 31,5; besin varlığında yüklü 176,4 ve filtreli yüklenmemiş için 1,4 µg/l olarak hesaplanmıştır. Burada *D. magna*'nın gümüş nanopartikülüne bağlı toksik etkisi doza bağımlı olarak değiştiğini kaydedilmiştir. Zebra balığının embriyonik gelişiminde Ag nanopartikülünün lethal dozunu belirlemek için bölünme safhasında ve hayati gelişim safhalarında çeşitli konsantrasyonlarda maruz bıraktıkları çalışmalarında, maruz kalan Zebra balıklarında yüksek doza bağımlı anormallikler gözlenmiştir (Lee vd., 2007). Ag nanopartiküllerin düşük konsantrasyonda ise normal gelişen zebra balıklarında yüksek yüzdelerde deformasyon ve ölüm gözlenmiştir. Yapılan bu tez çalışmasında Ag nanopartikülünün toksik etkisini maruz kalan Artemia'ların mikroskopik incelemelerinde de görülmektedir. Çalışılan tüm konsantrasyonlarda az yâda çok oranda anormallikler gözlenmiş olup, genellikle dış kabuk şeklinin bozulması, göz şeklinin ve büyüklüğünün değişmesi, ekstremite kaybı şeklinde değişimlere sebep olmuştur.

Yapılan bu tez çalışmasında, AgTiO<sub>2</sub> sentez nanopartikülü için çalışılan konsantrasyonlarda Ag ve Ti'nin birikim ve eliminasyon miktarlarının, konsantrasyonlara göre, Ag için anlamlı farklılık kaydedilmezken Ti nanopartikülü için 0,1 mg/l ile 1 mg/l ve 0,1 mg/l ile 10 mg/l arasında anlamlı farklılık kaydedilmiştir. Konsantrasyonları

akümülyasyon ve eliminasyon açısından karşılaştırıldığında ise Ag ve Ti nanopartikülü için anlamlı fark olduğu kaydedilmiştir. Konsantrasyonlara göre Ti ve Ag'nin akümülyasyon ve eliminasyon değerlerine bakıldığında naupli'nin, Ag'nin Ti'a kıyasla vücuduna gümüş biriktirme oranı hem daha az hem de bağırsağından daha az oranda attığı görülmüştür. Ag ve Ti'nin 'nin bağırsaktan atma oranının yüzdelerine bakıldığında Ag için %0-0,5 Ti için ise %63-81 oranında değiştiğini görülmektedir (Tablo 1). Kısaca, vücuda alınan Ti'nin büyük bir oranı vücuttan atımı başarılmışken Ag'nin 1mg/ l (%21,5) konsantrasyonu hariç diğer tüm konsantrasyonlarda neredeyse Ag'yi atmakta başarılı olmadığı görülmektedir. Bu tez çalışmasının aksine, Ag nanopartikülünün büyük bir kısmını biriktirdiğini kaydetmişler ve *Daphnia magna*'da Ag nanopartikül birikim miktarını 48 saat maruz bırakma sonrasında ölçmüşlerdir. Bu birikimin sadece doku değil aynı zamanda bağırsaklarda tutulan ve hatta absorplanan yıkanamayan nanopartikülleri de içerdiğini belirtmiştir (Zhao, vd., 2011). Ag nanopartiküllerinin ortamdaki konsantrasyonu ile dafniya'lardaki konsantrasyonları arasında doğrusal ve pozitif ilişki olduğunu kaydetmişlerdir. Ortamdaki nanopartiküllerin sadece %23'lk kısmını alamamıştır, dolayısıyla Ag nanopartiküllerinin yüksek birikimi başardığı bunun da sebebi Ag nanopartikülünü yemesinden dolaydır. Ayrıca, Ag nanopartiküllerinin birikimi, dafniyaların yiyecek alımının engellenmesi ve bağırsaklarında nanopartiküllerin atılmasına sebebi olduğu düşünülmektedir.

Nanopartiküllerin hidrodinamik boyutlarının ortalama ölçümleri alınmıştır. Genel olarak nanopartiküllerin zamana ve konsantrasyona bağlı olarak agregasyon (küme/yığın) artma egilimindedir fakat zamanla birlikte bunun tam aksi görülmüştür, nanopartiküllerin agregasyonunda yani boyutunda azalma gözlenmiştir. Genel olarak nanopartiküllerin zaman artışıyla birlikte boyut küçülmesinin sebebi; nanopartiküllerin sulu süspansiyonlarını hazırlanmasında ultrasonik banyo (sonikatör) kullanılması böylelikle sonikasyonun nanopartiküllerin agregasyonu önlemede ve iyi bir dispersiyon (dağılım) sağladığını, ayrıca havalandırma ile süspansiyonların homojenliğinin sağlanması yani etkili bir sürekli karıştırmanın sağlandığı söylenebilir.



## 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, yeni bir nanopartikül test sistemi geliştirilerek  $TiO_2$ ,  $ZnOTiO_2$  ve  $AgTiO_2$  nanopartiküllerinin sulu süspansiyonlarının toksik etkilerini araştırmak için test modeli olarak filtre beslenme yapan tuzlu su karidesi *Artemia salina* larvalarında doz etki deneyleri yapılmıştır.  $TiO_2$ ,  $ZnOTiO_2$  ve  $AgTiO_2$  nanopartiküllerinin letal ( $LC_{50}$ ) konsantrasyonu, canlıdaki biyobirikimi ve eliminasyonu çalışmaları ile bu nanopartiküllere maruz kalan naupli larvalarının morfolojik değişimlerini saptamak için faz-kontrast mikroskobu ile incelemeler yapılmıştır. Bunun yanında, nanopartiküllerin karakterizasyonunu için nanopartiküllerin maruziyet ortamında deney süresine bağlı olarak hidrodinamik boyut ölçümü ile yüzey özelliklerini belirlemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve toz boyutunu belirlemek için ise X ışını difraktometresi (XRD) kullanılmıştır.

Geliştirilen test ortamı canlılara zarar vermeden homojen bir karışım ortamı sağlayan nanopartikül test sistemi için göre  $LC_{50}$  deneylerini yürütmek için 300 ml, birikim ve eliminasyon deneyleri için ise 1500 ml polietilen şişeleri ile canlıya oksijen sağlamak ve nanopartiküllerin çökmesini engellemek ve devamlı karıştırma sağlamak için akvaryum hava pompası kullanılmıştır. Bu statik test sistemi ile nanopartiküllerin akut toksik etkisini belirlemek için 24, 48, 72 ve 96. saatlerde  $LC_{50}$  değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler sırasıyla  $TiO_2$  için 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1, 10; 50 ve 100 mg/l konsantrasyonlarda; 381,600; 70,122; 41,263 ve 18,771 mg/l,  $ZnOTiO_2$  için, 0,0003125; 0,000625; 0,00125; 0,0025; 0,005; 0,01; 0,1; 0,5 ve 1 mg/L konsantrasyonlarda, 5,111; 0,296; 0,143 ve 0,119 mg/l ve  $AgTiO_2$  için ise 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 10; 50 ve 100 mg/l konsantrasyonlarda 23,027; 3,743; 1,064 ve 0,785 mg/l olarak hesaplanmıştır.

$TiO_2$ ,  $ZnOTiO_2$  ve  $AgTiO_2$  nanopartiküllerin *artemia* larvasında 24 saatte birikimi (akümülyasyon) ve 24 saat bu nanopartiküllere maruz bırakıldıktan sonra temiz deniz suyuna alınan *artemia* 'ların 24 saat sonra bağırsaktan bu nanopartikülleri bağırsaktan atma (eliminasyon) miktarları ICP-MS metal analizleri sonucunda belirlenmiştir.

$TiO_2$  nanopartikülünde Titanyum (Ti) birikim miktarı 1, 10, 50 ve 100 mg/l konsantrasyonlarda 24 saat maruz kalma sonunda ortalama değerleri sırasıyla 2,963, 7,149; 2,536; 0,915 ppb dir. Eliminasyon için ölçülen Ti miktarı ise 0,508; 2,027; 0,591 ve 0,514 olarak ölçülmüştür.  $TiO_2$ 'deki Ti miktarı akümülyasyon ve eliminasyon arasında sadece 100

mg /l konsantrasyonu ile 50 mg/l konsantrasyonu arasında anlamlı bir fark olduğu ( $P<0,05$ ) ve yine  $TiO_2$ 'de Ti (titanyum) nanopartikül miktarı açısından konsantrasyonlar ve birikim arasında istatistiksel olarak fark olmadığı kaydedilmiştir.

$AgTiO_2$  içindeki Ag miktarının, konsantrasyonların çoklu karşılaştırma testinde fark gözlenmemişken, konsantrasyonların akümülyasyon ve eliminasyon ile karşılaştırılmasında  $P<0,05$  seviyesinde fark gözlenmiştir. Ti miktarı açısından bakıldığında, konsantrasyonların çoklu karşılaştırılmasında 0,01 mg/l ile 0,1 mg/l arasında  $P<0,05$  seviyesinde anlamlı fark varken, 0,01 mg/l ile 1 mg/l arasında  $P<0,01$  seviyesinde çok önemli fark vardır.  $AgTiO_2$  nanopartikülü içinde Ti miktarına göre konsantrasyon ( $P=0,01$ ) ve akümülyasyon ile eliminasyon (birikim,  $P=0,00$ ) arasında çok önemli fark vardır. Konsantrasyonlara göre Ti ve Ag'nin akümülyasyon ve eliminasyon arasında  $P<0,01$  seviyesinde çok önemli fark vardır.

$ZnOTiO_2$  nanopartikülü içinde ki Ti miktarını istatistiksel olarak konsantrasyonların kendi aralarında karşılaştırmasında 0,1 mg/l ile 0,01 mg/l, 0,5 mg/l konsantrasyonları arasında  $P<0,05$  seviyesinde anlamlı fark varken 0,1 mg/l ile 1 mg/l konsantrasyonları arasında  $P<0,01$  seviyesinde çok önemli fark vardır.  $ZnOTiO_2$ 'de Ti (titanyum) nanopartikül miktarı açısından konsantrasyonlar ( $P=0,01$ ) ve birikim (eliminasyon ve akümülyasyon) ( $P=0,01$ ) arasında çok önemli fark vardır ( $P<0,01$ ).  $ZnOTiO_2$  nanopartikülü içinde ki Zn miktarı karşılaştırmasında ise 0,01 mg/l ile 0,1 mg/l ve 0,1 mg/l ile 1 mg/l konsantrasyonlar arasında anlamlı fark vardır ( $P<0,05$ ).  $ZnTiO_2$ 'de Zn (titanyum) nanopartikül miktarı açısından konsantrasyonlar ( $P=0,00$ ) ve birikim (eliminasyon ve akümülyasyon) ( $P=0,00$ ) arasında çok önemli fark vardır ( $P<0,01$ ).

$TiO_2$ ,  $ZnOTiO_2$  ve  $AgTiO_2$  nanopartiküllerine 24 saat maruz bırakılan *Artemia* (naupli)'ların mikroskopik incelemeleri yapılmıştır. Genel olarak kontrol grubu ile kıyaslandığında nanopartiküllere maruz bırakılan grupların özellikle göz yapısında değişim (göz yuvarlalığının şeklinin değişmesi, göz yuvarlağının küçülmesi ve göz siyahlığının renginin silikleşmesi), bağırsak genişlemesi (sindirim sistemindeki değişim), dış kabuk yapısının şeklinde bozulma ve ekstremitte kaybı bu incelemelerde ilk gözle görülen malformasyonlardır. Sonuç olarak deneylerde kullanılan bu nanopartiküllerin değişik konsantrasyonlarda zamana bağlı olarak toksik etkili olduğu, vücutta birikme özelliğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Özellikle akuatik ortamdaki sucül omurgasız canlılar üstünde nanopartiküllerin davranışları, organizmalar tarafından vücuda alınma mekanizması ve potansiyel toksik etkileri hakkında halen çok az bilgi mevcuttur. Yapılan

bu çalışma, nanopartiküllerin çevremizde oluşturduğu risklerin tespit edilebilmesine kolaylık sağlayabilecek ve gelecekte yapılması düşünülen çalışmalara ışık tutabilecektir.

Nanopartiküllerin hidrodinamik boyutlarının ortalama ölçümleri alınmıştır. Zamanla birlikte kümeleşme artmıştır, nanopartikül süspansiyonu hazırlandıktan hemen sonra alınan ölçümlerde kümeleşme (agregasyon) en yüksekken zamanla birlikte (24 ve 96. saatler) agregasyon azalmakta en az ise 96. saate olduğu kaydedilmiştir. En yüksek ve en düşük boyutlar  $\text{TiO}_2$ , için  $\text{AgTiO}_2$  ve  $\text{ZnOTiO}_2$  nanopartikülleri için sırasıyla 9,014-0,267; 4,620-1,437 ve 6,990-0,806  $\mu\text{m}$  dir. Özellikle  $\text{TiO}_2$  için zamanla çok büyük oranda nanopartikül boyutunda küçülme olmuştur.

## 6. ÖNERİLER

Nanoteknoloji günümüz dünyasında ekonomik büyümede, sağlık sektöründe ve üretim teknolojilerinin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda nanomalzemelerin üretim, geliştirme, taşınma, kullanım ve sonrasında imha işlemleri esnasında farklı ekosistemlerle teması kaçınılmazdır. Bundan dolayı nanomalzemelerin çevre sağlığı üzerinde oluşturabileceği riskler göz önünde bulundurulmalıdır.

Nanopartiküllerin çevresel düzeylerinin günümüzde çok düşük seviyelerde olduğu düşünülmeyle birlikte bu konuda yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu nedenle yeni izleme, ölçme ve görüntüleme tekniklerinin geliştirilerek ekotoksikolojik çalışmalar vasıtasıyla çevresel seviyelerinin zararlı düzeyde olup olmadığı belirlenmelidir.

Nanopartiküllerin ekosistemlerde izleyecekleri yolların tanımlanmasında ve etkilerinin belirlenmesinde küme oluşturma ve sedimantasyon özelliklerinin açıklığa kavuşturulması gerekir. Yapılacak çalışmalarda nanopartiküllerin kolloidal çözeltilerinin doğal ekosistemlerde gösterecekleri kararlılığın ve kümelenme üzerinde diğer organik maddelerin etkisinin araştırılması için yüzey suyu örneklerinden yararlanılmalıdır. Ayrıca, kümelenmenin ardından nano boyutlarını koruyup korumadıkları ve kümelenen parçacıkların sedimente taşınıp burada yaşayan canlılarla etkileşimleri konularının ayrıntılı olarak değerlendirilmesi gerekir.

Maruz kalma süresini artırarak gerçekleştirilecek deneylerle canlıların uzun vadede davranışlarındaki değişikliklerin incelenmesi de nanopartiküllerin sucul ekosistemler üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılmasında önemli bulgular sağlayabilir. Av-avcı ilişkisi içinde olan canlılarla yürütülecek kronik testler vasıtasıyla uzun vadede nanopartiküllerin izleyeceği yollar ve besin zincirinde oluşturacağı etkilerin araştırılması ekotoksikolojik çalışmalara ışık tutabilecektir.

Nanopartiküllerin ekosistemler üzerindeki etkilerini tartışmak için uluslararası kuruluşların düzenlediği birçok kongre ve toplantılar bulunmaktadır. Ülkemizde ise nanopartiküllerin ekotoksikolojisi konusuna yeterince ilgi gösterilmemektedir.

Ülke genelinde bu konu üzerindeki çalışmalara hız verilmesi ve konuya gereken önemin gösterilmesi gerekmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- Allen, H.J., Impellitteri, A.C., Macke, A. D., Heckman, J.L., Poynton, C.H., Lazorchak, M.J., Govindaswamy, S., Roose, L.D., and Nadagouda, N.M., 2010. Effects from Filtration, Capping Agents, and Presence/Absence of Food on The Toxicity of Silver Nanoparticles to *Daphnia magna*, Environmental Toxicology and Chemistry, 29, 2742-2750.
- Auffan, M., Flahaut, E., Thill, A., Mouchet, F., Carriere, M., Gauthier, L., Achouak, W., Rose, J., Wiesner M. and Bottero, J., 2011. Ecotoxicity: Nanoparticle Reactivity and Living Organisms, Nanoethics and Nanotoxicology, Springer Berlin Heidelberg, 325-357.
- Altinok, I., 2004. Toxicity and Therapeutic Effects of Chloramin-T for Treating *Flavobacterium columnare* Infection of Goldfish, Aquaculture, 239, 47-56.
- Altinok, I., Capkin, E. ve Boran, H., 2011. Influence of Bioassay Volume, Water Column Height, and Octanol-Water Partition Coefficient on the Toxicity of Pesticides to Rainbow trout, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 86, 596-600.
- Asharani P.V., Mun, G.L.K., Hande, M.P. Valiyaveetil S., 2009. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells, ACS NANO, 3, 279–290.
- APHA/AWWA/WEF, 1992. Standart Metods for the Examination of Water and Wastwater, 18th Edition, Washington D.C. ISBN 0-87553-207-1.
- Arslan, Z., Ateş, M., McDuffy, W., Agachan, M.S., Farah, I.O., Yu, W.W. ve Bednar, A.J., 2011. Probing Metabolic Stability of CdSe Nanoparticles: Alkaline Extraction of Free Cadmium from Liver and Kidney Samples of Rats Exposed to CdSe Nanoparticles, Journal of Hazardous Materials, 192, 192-199.
- Arslan, Z., Ertaş, N., Tyson, J.F., Uden, P.C. ve Denoyer, E.R., 2000. Determination of Trace Elements in Marine Plankton by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), Fresenius journal of Analytical Chemistry, 366, 273-282.
- Ateş, M., Daniels, J., Arslan, Z. Farah, O.İ. 2012. Effects of Aqueous suspensions of Titanium Dioxide Nanoparticles on *Artemia Salina*: Assessment of Nanoparticle Aggregation, Accumulation, and Toxicity. Environ. Monit. Assess. DOI 10.1007/s10661-012-2794-7.
- Bae, E., Park, H., Lee, J., Kim, Y., Yoon, J., Park, K., Choi, K., and Yi, J., 2010. Bacterial Cytotoxicity of The Silver Nanoparticle Related to Physicochemical Metrics and Agglomeration Properties, Environmental Toxicology and Chemistry, 29, 10, 2154-2160.

- Bai, W., Zhang, Z., Tian, W., He, X., Ma, Y., Zhao, Y. ve Chai, Z., 2010. Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles to Zebrafish Embryo: A Physicochemical Study of Toxicity Mechanism, J. Nanopart Res. 12 1645-1654.
- Bat, L., 1997. Studies on the Uptake of Copper, Zinc and Cadmium by the Amphipod *Corophium volutator* in the Laboratory, Turkish J. Mar. Sci., 3,2, 93-109.
- Bilberg, K., Malte, H., Wang, T., Baatrup, E., 2010. Silver Nanoparticles and Silver Nitrate Cause Respiratory Stress in Eurasian Perch (*Perca fluviatilis*), Aquat. Toxicol. Jan 31,96,2, 159-65.
- Borm, JA. P., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins, R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J., Krutmann, J., Warheit, D. ve Oberdorster, E., 2006. The Potential Risks of Nanomaterials: a Review Carried Out For Ecetoc, Particle and Fibre Toxicology, 3:11 doi:10.1186/1743-8977-3-11.
- Boxall, A.B.A., Chaundhry, Q., Sinclair, C., Jones, A., Aitken, R., Jefferson, B. ve Watts, C., 2007. Current and Future Predicted Environmental Exposure to Engineered Nanoparticles. Report by The Central Science Laboratory (CSL) York for the Department of the Environment and Rural Affairs (DEFRA), UK.
- Buzea, C., Blandino, I.P. ve Robbie, K., 2007. Nanomaterials and Nanoparticles, Sources and Toxicity Biointerphases 2, 4, 17-172.
- Brunner, T.J., Wick, 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. Environ. Sci. Technol. 40,14,4374-4381.
- Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G., Wang, T., Ye, C., Zhao, F., Chai, Z., Zhu, C., Fang, X., Ma, B. Wan, L. 2006. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vitro. Toxicology letters, 163, 109-120.
- Chen, D., Zhang, D., Yu, J.C ve Chan, K.M., 2011. Effects of Cu<sub>2</sub>O Nanoparticle and CuCl<sub>2</sub> on Zebrafish Larvae and a Liver Cell-Line, Aquatic Toxicology, 105, 344-354.
- CPMP, 2000. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: Evaluation of Medicines for Human Use. Note for Guidance on Repeated Dose Toxicity, CPMW/SWP/1042/99, 1-9.
- Crane, M., Handy, R.D., Garrod, J. ve Owen, R., 2008. Ecotoxicity Test Methods and Environmental Hazard Assessment for Engineered Nanoparticles, Ecotoxicology, 17, 421-437.
- Daughton, C.G., 2004. Non-Regulated Water Contaminants: Emerging Research, Environmental Impact Assessment Review, 24, 711-732.
- DeWitt, T.H., Swartz, R.C., ve Lamberson, J.O., 1989. Measuring the Acute Toxicity of Estuarine Sediments, Environ. Toxicol. And Chem, 8, 1035-1048.

- Dobrovolskaia, M.A. ve McNeil, S.E., 2007. Immunological Properties of Engineered Nanomaterials. Nature Nanotechnology, 2, 469-478.
- Donaldson, K., Stone, V., Tran, C., Kreyling, W. ve Borm, P.J.A., 2004. Nanotoxicology, Occupational and Environmental Medicine, 61, 727-728.
- EPA, 1993. Methods for Measuring The Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Washington D.C., EPA/600/4-90/027F.
- Fabrega, J., Tantra, R., Amert, A., Stolpe, B., Tomkins, J., Fry, T., Lead, .J., Tylert, R.C. ve Galloway, S.T. 2012. Sequestration of Zinc from Zinc Oxide Nanoparticles and Life Cycle Effects in the Sediment Dweller Amphipod *Corophium volutator*. Environ. sci. technol. 46, 2, pp 1128-1135.
- FAO, 1987. Manual of Methods in Aquatic Environment, Parth 10, Shorterm Static Bioassays, Fisheries Technical Paper, 247, Roma.
- Farre, M., Gajda-Schranz, K., Kantiani, L., ve Barcelo, D., 2009. Ecotoxicity and Analysis of Nanomaterials in the Aquatic Environment. Anala Bioanal Chem, 393,81-95.
- Federici, G., Shaw, B.J. ve Handy, R.D., 2007. Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles to Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Gill Injury, Oxidative Stress, and Other Physiological Effects. Aquatic Toxicology, 84, 415-430.
- Forbes, V.E., ve Forbes, T.L., 1994. Ecotoxicology in Theory and Practice. First edition, Chapman and Hall, London.
- Güner, U., 2008. Toksikoloji, Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Toksikoloji Ders Notları.
- Greenberg, A.E., Trussell, R.R. ve Clesceri, L.S., 1985. Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, Sixteenth Edition.
- Griffitt, R., Lou, J., Gao, J., Bonzongo, J.C., Barber, S.D. 2008. Effects of particle Composition and Species on Toxicity of Metallic Nanomaterials in Aquatic Organisms. Environmental Toxicology and Chemistry, 27, 9, 1972-1978.
- Griffitt, R.J., Hyndman, K., Denslow, N.D. ve Barber, D.S., 2009. Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles. Toxicological Science, 107, 404-415.
- Hanazato, T., 2001. Pesticide Effects on Freshwater Zooplankton: An Ecological Perspective. Environ. Pollut. 112, 1-10.

- Handy, R.D., Owen, R. ve Valsami-Jones, E., 2008. The Ecotoxicology of Nanoparticles and Nanomaterials: Current Status, Knowledge Gaps, Challenges, and Future Needs, Ecotoxicology, 17, 315-325.
- Hao, L., Wang, Z. ve Xing, B., 2009. Effect of Sub-Acute Exposure to TiO<sub>2</sub> Nanoparticles on Oxidative Stress and Histopathological Changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Environmental Sciences, 21, 1459-1466.
- Ingersoll, C.G., 1995. Sediment Tests, Fundamentals of Aquatic Toxicology, Second Edition, Effects, Environmental Fate and Risk Assessment, Taylor and Francis Publ, 231-255.
- Ju-Nam, Y. ve Lead, J.R., 2008. Manufactured Nanoparticles: An Overview of Their Chemistry, Interactions and Potential Environmental Implications.
- Kaplan, Ş.Ş., Karanfil, T., ve Kitiş, M., 2007. Nano-Materyallerin Potansiyel Çevresel Etkileri, 7. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, Yaşam Çevre Teknoloji, 24-27 Ekim, İzmir.
- Kaviya, S., Santhanalakshmi, J. ve Viswanathan, B., 2011. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Polyalthia longifolia* Leaf Extract along with D-Sorbitol: Study of Antibacterial Activity. Hindawi Publishing Corporation Journal of Nanotechnology, Article ID 152970, 5 page.
- Klauning, J.E., 2000. Pesticide Toxicology, Evaluating Safety and Risk, Purdue Pesticide Programs, Purdue University Cooperative Extension Service, PPP-40, Indiana University School of Medicine.
- Kolesnichenko, A.V., Timofeev, M.A., ve Protopopova, M.V., 2008. Toxicity of Nanomaterials, 15 Years of Studies, Ros. Nanotechnol, 3, 3-4, 54-61.
- Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D. ve Schnekenburger, J., 2009. Current In Vitro Methods in Nanoparticle Risk Assessment: Limitations and Challenge, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 72, 370-377.
- Krysanov, E.Yu., Pavlov, D.S., Demidova, T.B., Dgebuadze, Yu.YU. 2010. Effects of Nanoparticles on Aquatic Organisms. Biology Bulletin, 37, 4, 406-412.
- Kumar, A., Pandey, A.K., Singh, S.S., Shanker, R. Dhawan, A. 2011. Cellular Uptake and Mutagenic Potential of Metal Oxide Nanoparticles. Chemosphere.
- Laban, G., Nies, L.F., Turco, R.F., Bickham, J.W. ve Sepulveda, M.S., 2010. The Effects of Silver Nanoparticles on Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) Embryos, Ecotoxicology, 19, 185-195.
- Landis, W.G. ve Yu, Ming-Ho., 1995. Introduction to Environmental Toxicology: Impacts of Chemicals upon Ecological Systems, Lewis Publ. CRC Press, Inc, Londra.



- Lanone, S. ve Boczkowski, J., 2006. Biomedical Applications and Potential Health Risks of Nanomaterials: Molecular Mechanisms, *Current Molecular Medicine*, 6, 651-663.
- Laufer, B. ve Nation, P.A., 1999. Vocabulary-Size Test of Controlled Productive Ability, *Language Testing*, 16, 36-55.
- Leblond, V.S., Bisson, M. ve Hontela, A., 2001. Inhibition of Cortisol Secretion in Dispersed Head Kidney Cells of Rainbow Trout (*O. mykiss*) by Endosulfan, An Organochlorine Pesticide, *General and Comparative Endocrinology*, 121,1, 48-56.
- Lee, J.K., Nallathamby, D. P., Browning, M. L., Osgood, J., and NancyXu, X., 2007. In Vivo Imaging of Transport and Biocompatibility of Single Silver Nanoparticles in Early Development of Zebrafish Embryos, NIH-PA Author Manuscript, 28, 1,2, 133-143.
- Leger, Ph., Bengston, P.A., Simpson, K.L., Sorgeloos, P., 1986. The Use and Nutritional Value of *Artemia* as a Food Source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 24, 521-623.
- Lehn, J.M., 2002. Toward Self-Organization and Complex Matter. *Science*, 295:2400-2403.
- Lilienblum, W., Dekant, W., Foth, H., Gebel, T., Hengstler, J.G., Kahl, R., Kramer, P.J., Schweinfurth, H. ve Wollin, K.M., 2008. Alternative Methods to Safety Studies in Experimental Animals: Role in the Risk Assessment of Chemicals under the New European Chemicals Legislation (REACH), *Archives of Toxicology*, 82, 211-236.
- Loomis, T.A., 1978. *Essentials of Toxicology*, 3rd Edition, Philadelphia, Lea and Febiger, 157-232.
- Lovern, S.B., and Klaper, R., 2006. *Daphnia magna* Mortality When Exposed to Titanium Dioxide and Fullerene (C60) Nanoparticles, *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1132-1137.
- Luoma, S.N., ve Ho, K.T., 1993. Appropriate Uses of Marine and Estuarine Sediment Bioassays, *Handbook of Ecotoxicology*, Oxford Blackwell Sci. Publ. London, 1, 193-226.
- Mark, R., Wiesner, P.E. ve Bottero, J., 2007. *Environmental Nanotechnology Applications and Impacts of Nanomaterials*, Inc. McGraw-Hill, 231-331.
- McWilliams A, 2006. BBC Report highlights. nanotechnology: a realistic market assessment, [http://www. Bcc research.com/report/NANO31B.html](http://www.Bccresearch.com/report/NANO31B.html). accessed.
- MEGEP 2008. Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, *Artemia Kültürü*, Ankara.
- Meyer, M., Kuusi, O., 2002. Nanotechnology: Generalizations in an Interdisciplinary Field of Science and Technology, Vol., No.2 (2004), pp. *International Journal for Philosophy of Chemistry*, 10, 153-168.

- Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles Present Ecotoxicological Risks for the Health of the Aquatic Environment, Environmental International, 32, 967-976.
- Mueller, N.C. ve Nowack, B., 2008. Exposure Modelling of Engineered Nanoparticles in The Environment, Environmental Science & Technology, 42, 4447-4453.
- Naddy, R.B., Gorsuch, J.W., Rehner, A.B., Mcnerney, G.R., Bell, R.A., and Kramer, J.R., 2007. Chronic Toxicity of Silver Nitrate to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*, and Potential Mitigating Factors, Aquat Toxicol, 84,1-10.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., and Li, N. 2005. Toxic potential of materials at the nano level. *science* 311, 622-627.
- Nowack, B. ve Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, Behavior and Effects of Nanoparticles in The Environment, Environmental Pollution, 150,1, 5-22.
- Nowak, B., 1992. Histological Changes in Gills Induced by Residues of Endosulfan, Aquatic Toxicology, 23, 65-83.
- O'Connell, M.J., 2006. Carbon Nanotubes Properties and Applications, Boca Raton London New York USA, 18-31.
- Oberdorster G, Oberdorster E. ve Oberdorster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ Health Perspect, 113,823-839.
- Oberdörster, G., Stone, V. ve Donaldson, K., 2007. Toxicology of Nanoparticles: A Historical Perspective, Nanotoxicology,1, 2-25.
- OECD 202, 2004. Guideline for Testing of Chemicals, 'Daphnia Sp., Acute Immobilisation Test'.
- Pascoe, D. ve Edwards, R.W., 1989. Aquatic Eco.: Fundamental Concepts and Methodologies. Volume II. CRC Press, Inc., Boca Raton Florida, 203, 93-126.
- Pelkmans, L. ve Helenius A., 2002. Envocytosis via caveolae, *Traffic*, 3, 311-320.
- Pendashte, H., Shariati, F., Keshavarz, A., ve Ramzanpour, Z., 2013. Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles to *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* Algae Species, World Journal of Fish and Marine Sciences 5, 5, 563-570.
- Perez, S., Farre, M. ve Barcelo, D., 2009. Analysis, Behaviour and Ecotoxicity of Carbon-Based Nanomaterials in the Aquatic Environment, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 28, 820-832.
- Persoone, G., Van De Vel, A., Van Steertegem, M., ve De Nayer, B., 1989. Predictive Value of Laboratory Tests with Aquatic Invertebrates: Influence of Experimental Conditions, Aquatic Toxicology, 14, 149-166.

- Pipan-Tkalec, Z., Drobne, D., Jemec, A., Romih, T., Zidar, P., and Bele, M., 2009. Zinc Bioaccumulation in a Terrestrial Invertebrate Fed a Diet Treated With Particulate ZnO or ZnCl<sub>2</sub> Solution, Toxicology, Tox-50391; No of pages 6.
- Pritchard, D.K., 2004. Literature review explosion hazards associated with nanopowders.
- Rahman, I., 2000. Regulation of Nuclear Factor- $\kappa$ B, Activator Protein-1, and Glutathione Levels by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Dexamethasone in Alveolar Epithelial Cells, Biochemical Pharmacology, 60, 1041-1049.
- Rahman, I., Biswas, S.K., Jimenez, L.A., Torres, M. ve Forman, H.J., 2005. Glutathione, Stress Responses, and Redox Signaling in Lung Inflammation, Antioxidants & Redox Signaling, 7, 42-59.
- Rand, G.M., 1995. Fundamentals of Aquatic Toxicology. Second Edition. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment, Taylor and Francis Publ. Washington.
- Reiman, J., Oberle, V., Zuhom, I.S. ve Hoekstra, D., 2004. Size-Dependant Internalization of Particles Via the Pathways of Clathrin and Caveolae-Mediated Endocytosis, Biochemical Journal, 377, 159-169.
- Saygı, Ş., Deniz, G., Kutsal, O. ve Vural, N., 1991. Chronic Effect of Cadmium on Kidney, Liver, Testes and Fertility of Male Rats, Biological Trace Element Research, 31, 209-214.
- Schulze, C., Kroll, A., Lehr, C.M., Schäfer, U.F., Becker, K., Schnekenburger, J., Schulze Isfort, C., Landsiedel, R. ve Wohleben, W., 2008. Not Ready to Use-Overcoming Pitfalls When Dispersing Nanoparticles in Physiological Media, Nanotoxicology, 2, 51-61.
- Scown, T.M., Santos, E.M., Johnston, B.D., Gaiser, B., Baalousha, M., Mitov, S., Lead, J.R., Stone, V., Fernandes, T.F., Jepson, M., van Aerle, R. ve Tyler, C.R., 2010. Effects of Aqueous Exposure to Silver Nanoparticles of Different Sizes in Rainbow Trout, Toxicological Sciences, 115, 521-534.
- Service, R.F., 2005. Nanotechnolo. Calls Rise for More Research on Toxicology of Nanomaterials, Science 310, 1609.
- Smedes, F., 1994. Sampling And Partition of Neutral Organic Contaminants in Surface Waters with Regard to Legislation, Environmental Quality and Flux Estimations, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 57, 215-229.
- Smedsrud, T., Dannevig, B.H., Tolleshaug, H. ve Berg. T., 1984. Endocytosis of A Mannoseterminated Gglycoprotein and Formaldehyde-Treated Human Serum Albumin in Liver and Kidney Cells from Fish (*Salmo alpinus* L.), Developmental & Comparative Immunology, 8, 579-588.

- Smith, E.H., ve Logan, D.T., 1993. Invertebrate Behavior as an İndicator of Contaminated Water and Sediments, *Aquatic Toxicology and Risk Assessment: 2nd volu. ASTM STP 1216*, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA pp. 48-61.
- Sorgelos, P., 1980. Availability of References *Artemia* Cysts, *Marine Ecology Progress Series*, 3, 363-364. The Royal Society and the Royal Academy of Engineering: Nanoscience and nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties.
- TÜBİTAK 2004. Nanoteknoloji Strateji Grubu, Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri Vizyon 2023 Projesi, Ankara, Türkiye.
- Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L.O., Von Mikecz, A., Grether-Beck, S. ve Schins, R.P.F., 2007. Cellular Response to Nanoparticles: Target Structures and Mechanisms, *Nanotoxicology*, 1, 52-71.
- Ünsal, M., 1998. Kirlilik Deneyleri-Yöntemler ve Sonuçların Değerlendirilmesi-T.C. Tarım ve Orman Köyişleri Bakanlığı Bodrum Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yay. No:11.168s.
- Vural, N., 1996. Toksikoloji, A.Ü.Ecz.F. Yayınları No: 73, Ankara, A.Ü. Basımevi, 1-20.
- Wiench, K., Wohlleben, W., Hisgen, V., Radke, K., Salinas, E., Zok, S., ve Landsiedel, R., 2009. Acute and Chronic Effects of Nano- and Non-Nano-Scale TiO<sub>2</sub> and ZnO Particles on Mobility and Reproduction of The Freshwater İnvertebrate *Daphnia magna*, *Chemosphere* 76, 1356-1365.
- Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Alvarez, P., Dionysiou, D. ve Biswas, P., 2006. Assessing the Risks of Manufactured Nanomaterials, *Environmental Science & Technology*, 40, 4336-4345.
- Wurl, O. ve Obbard, J.P., 2004. A Review of Pollutants in the Sea-Surface Microlayer (SML): A Unique Habitat for Marine Organisms, *Marine Pollution Bulletin*, 48, 1018-1030.
- Xiong, D., Fang, T., Yu, L., Sima, X., and Zhu, W., 2011. Effects of Nano-Scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and Their Bulk Counterparts on Zebrafish: Acute Toxicity, Oxidative Stress and Oxidative Damage, *Science of the Total Environment* 409, 1444-1452.
- Xue, A. ve Hwang, D., 2011. Nanotechnology Funding: Corporations Grab the Reins, *Lux Research*, April.
- Yoshida, R., Kitamura, D., Maenosono, S., 2009. Mutagenicity of Water-Soluble ZnO Nanoparticles in Ames Test, *J. Toxicol. Sci.* 34, 119-122.
- Zhao, Q., Pang, X.F., Liu, L.W., Deng, B., 2007. The Biological Effect of İron Oxide and Its Hydrate Nanoparticles, *Solid State Phenom.* 121-123, 2, 735-738.

- Zhao, C. ve Wang, W., 2011, Comparison of Acute and Chronic Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Nitrate to *Daphnia magna*, Environmental Toxicology and Chemistry, 30, 4, 885-892.
- Zhu, X., Chang, Y., Chen, Y. 2010. Toxicity and bioaccumulation of TiO<sub>2</sub> nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*, chemosphere volume 78. issue 3, pages 209-215.
- Zhu, X., Wang, J., Zhang, X., Chang, Y. and Chen, Y. 2009. The Impact of ZnO Nanoparticle Aggregates on the Embryonic Development of Zebrafish (*Danio rerio*). Nanotechnology, 20, 19.
- Zhu, X., Zhou, J. ve Cai, Z. 2011. The Toxicity and Oxidative Stress of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles in Marine Abalone (*Haliotis Diversicolor Supertexta*). Marine Pollution Bulletin 63, 334-338.

## 8. EKLER

Ek 1. *Artemia*'nın AgTiO<sub>2</sub> içinde 24 saat sonraki Ti (titanyum) ve Ag (gümüş) nanopartiküllerinin A (akümülyasyon) ve E (eliminasyon) miktarları (PPb)

AgTiO <sub>2</sub> (Gümüş titanyumdioksit)	Ti (titanyum)	Ag (gümüş)
0,1 mg/L A	1,462	0,637
	E	0,634
1 mg/L A	2,334	0,634
	E	0,498
5 mg/L A	2,403	0,638
	E	0,632
10 mg/L A	2,838	0,633
	E	0,633

Ek 2. *Artemia*'nın ZnOTiO<sub>2</sub> içinde 24 saat sonraki Ti (titanyum) ve Zn (gümüş) nanopartiküllerinin A (akümülyasyon) ve E (eliminasyon) miktarları (PPb)

ZnOTiO <sub>2</sub> (Gümüş titanyumdioksit)	Zn (çinko)	Ti (titanyum)
0,01 mg/L A	120,2	2,963
	E	0,508
0,1 mg/L A	158,1	7,149
	E	2,027
0,5 mg/L A	165,8	2,536
	E	0,591
1 mg/L A	104,6	0,915
	E	0,514

Ek 3. *Artemia*'nın TiO<sub>2</sub> içinde 24 saat sonraki Ti (titanyum) nanopartiküllerinin A (akümülayon) ve E (eliminasyon) miktarları (PPb)

<b>TiO<sub>2</sub> (Titanyumdioksit)</b>		<b>Ti (titanyum)</b>
<b>1 mg/L</b>	<b>A</b>	2,630
	<b>E</b>	0,118
<b>10 mg/L</b>	<b>A</b>	1,983
	<b>E</b>	1,014
<b>50 mg/L</b>	<b>A</b>	1,544
	<b>E</b>	1,115
<b>100 mg/L</b>	<b>A</b>	2,630
	<b>E</b>	1,907

## ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Ordu'nun Derinçay Köy'ünde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ordu'da tamamladı. 2000 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümünde lisans öğrenimine başladı ve 2004 yılında bu fakülteden mezun oldu. 2005 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji/Zooloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitime başladı ve 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümünde doktora öğrenimine başladı şu anda Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalında Doktorasına devam etmektedir. 2009 yılından bu yana Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyolojisi Bölümü Hidrobiyoloji A.B.D'nda araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. İngilizce bilmektedir.