

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

**NANOMATERYALLERİN *TETRAHYMENA*
THERMOPHILA ÜZERİNE TOKSİKOLOJİK
ETKİLERİNİN EKOTOKSİKOLOJİK YÖNTEMLERLE
SAPTANMASI**

Seda Berna BAYKAL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Enis MORKOÇ**

İSTANBUL 2009

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

**NANOMATERYALLERİN *TETRAHYMENA*
THERMOPHILA ÜZERİNE TOKSİKOLOJİK
ETKİLERİNİN EKOTOKSİKOLOJİK YÖNTEMLERLE
SAPTANMASI**

Seda Berna BAYKAL

(141103420060357)

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Enis MORKOÇ**

İSTANBUL 2009

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Socrates/Erasmus Öğrenci Değişim Programı kapsamında Münih Teknik Üniversitesi ile Helmholtzzentrum Muenchen; German Research Centre for Environmental Health bünyesinde, Ekolojik Kimya Enstitüsü'nde yürütülmüştür.

Tezin hazırlanmasında ve tamamlanmasında bilgilerini ve sabrını esirgemeyen danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Enis MORKOÇ'a ve Prof. Dr. Dr. Karl-Werner SCHRAMM'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca bu çalışmanın gerçekleşmesine öncülük eden İstanbul Teknik Üniversitesi Gemi İnşaatı ve Deniz Bilimleri Fakültesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Oya S. OKAY'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olan, karşılıksız destek vermenin ne demek olduğunu öğrendiğim canım aileme, tez çalışmama başladığım günden itibaren her nazımı çeken ve yardıma hazır bekleyen sevgili arkadaşlarıma da çok şey borçluyum. Altında sadece bir yüksek lisans öğrencisinin adı yazan bu tezin arkasında Türkiye sınırları içinde ve dışında yaşamış çok hikaye, keşfedilmiş yeni şehirler, yeni yüzler ve adı bu sayfaya sığmayacak kadar çok olan dostlarım var. Bu bilimsel yolculuğu aynı zamanda hayatımın en anlamlı yolculuğu haline getiren her şeye tekrar teşekkür ediyorum.

Aralık, 2009

Seda Berna BAYKAL

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
SEMBOLLER	VI
KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER	VIII
TABLolar	IX
BÖLÜM I. GİRİŞ ve AMAÇ	1
I.1 GİRİŞ	1
I.2 AMAÇ	2
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER	4
II.1 NANOTEKNOLOJİ	4
II.2 EKOTOKSİKOLOJİ (Çevre Toksikolojisi)	6
II.2.1 Ekotoksikolojide Kullanılan Terimler	7
II.2.2 Ksenobiyotik - Biyolojik Sistemin Etkileşimi	8
II.3 AKUATİK TOKSİKOLOJİ	9
II.3.1 Akuatik Toksikite Testlerine Genel Bakış	10
II.3.1.1 Doz-Cevap İlişkisi	11
II.3.1.2 Doz-Cevap Eğrileri.....	12
II.3.1.3 Akut Toksikite Testleri	12
II.3.1.4 Kronik Toksikite Testleri	13
II.3.1.5 Tek Türü Testler	13
II.3.1.6 Mikrokozmoz-Mezokozmoz	13
II.3.1.7 Alan Çalışmaları	14
II.3.2 Test Organizmalarının Seçimi	14

II.3.3 Test Organizmaları	14
BÖLÜM III. ÇALIŞMALAR.....	16
III.1 ÇALIŞMA PROBLEMİNİN TANIMI VE AMACI.....	16
III.2 TOKSİSİTE TESTLERİ	20
III.2.1 Test Organizması.....	20
III.2.2 Test Kimyasalları	22
III.2.2.1 Titanyum Dioksit (TiO ₂) Nanotoz	22
III.2.2.2 Demir Oksit (Fe ₃ O ₄) Nanotoz	23
III.2.3. Kültür Besiyerinin Hazırlanması.....	23
III.2.3.1 Deneysel Stok Kültürlerin Hazırlanması	24
III.2.3.2 Deney Ön Kültürlerinin Hazırlanması	25
III.2.4 Deney Çözeltilerinin Hazırlanması	25
III.2.5 Toksikite Testleri İçin Well-Plate'lerin Hazırlanması.....	26
III.3 ÖLÇÜMLER VE ANALİTİK HESAPLAMALAR.....	24
III.3.1 Etkin Hücrenin Hesaplanması.....	27
III.3.2 Biyokütlenin Hesaplanması.....	27
III.3.3 Ortalama Büyüme Oranlarının Hesaplanması.....	28
III.3.4 Büyüme İnhibisyonu	29
III.4 HÜCRELERİN GÖRÜNTÜLENMESİ.....	29
ÖLÜM IV. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	30
IV.1 SONUÇLAR.....	30
IV.1.1 Nanoparçacıkların Ekotoksikolojisi	30
IV.1.1.1 Nanoparçacıkların Çözünürlükleri.....	30
IV.1.1.2 Optik Yoğunluk Değerleri	31
IV.1.1.3 <i>T. Thermophila</i> Organik Kütle ve Ortalama Büyüme Oranları.....	33
IV.1.1.4 İnhibisyon Değerleri	36
IV.1.2 Görüntü Analizleri	37
IV.2 TARTIŞMA.....	38
BÖLÜM V. DEĞERLENDİRMELER ve ÖNERİLER.....	41
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	46

ÖZET

NANOMATERYALLERİN *TETRAHYMENA THERMOPHILA* ÜZERİNE TOKSİKOLOJİK ETKİLERİNİN EKOTOKSİKOLOJİK YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

Pek çok ticari üründe kullanılan nanomateryallerin sucul ekosistemlerle teması sıklıkla görülmektedir. Bu nedenle nanomateryallerin akuatik ekosistemlerde geçirdikleri değişimin (biyodönüşüm, biyobirikme, biyobozunum) açıklanması ve akuatik organizmalar üzerinde toksisitelerinin değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında titanyum dioksit (TiO₂) ve demir oksit (Fe₃O₄) metal nanoparçacıklarının silli bir protozoa türü olan *Tetrahymena thermophila* üzerindeki etkisi ve bu parçacıkların akuatik ortamdaki değişimleri incelenmektedir. Bu doğrultuda yapılan bu çalışmanın amacı, yürütülecek ekotoksikolojik testler yardımı ile nanoparçacıkların büyüme inhibisyon değerlerini saptamak ve görüntü analizleri yoluyla *Tetrahymena thermophila* hücreleri ile nanoparçacıkların ilişkisini incelemektir.

Çalışmalarda kullanılan her iki metal nanoparçacık da yüksek konsantrasyon değerlerinde (50-400 mg/L) *Tetrahymena thermophila*'da büyüme inhibisyonu tespit edilememiştir. Fakat 50 mg/L konsantrasyondan düşük değerlerde (3,12-25 mg/L) nanoparçacıklar büyüme inhibisyonu sergilemiştir. *Tetrahymena thermophila* hücrelerinin nanoparçacıkları bünyelerine aldığı ancak bu parçacıkları sindirmeden, hücre dışına verdikleri görüntü analizleri neticesinde ortaya çıkmıştır. Ayrıca hücre içine alınan küçük nanoparçacık kümelerini hücre içi salgılar yardımı ile daha büyük kümeler haline getirip hücre dışına attıkları da gözlemlenmiştir. Nanoparçacıkların yüzey özellikleri nedeniyle akuatik ortamlarda rastgele kümelenip çökme eğilimleri vardır. *Tetrahymena thermophila* ise test ortamında nanoparçacıkların kümelenme durumunu artırmış ve buna bağlı olarak da zamanla daha büyük parçacıkların oluşmasına ve bu parçacıkların daha hızlı çökmesine neden olmuştur. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar nanomateryallerin akuatik ortamdaki davranışlarını tanımlamakta önemli bir yer sunmaktadır.

Aralık, 2009

Seda Berna BAYKAL

ABSTRACT

ASSESSING THE EFFECT OF NANOMATERIALS ON *TETRAHYMENA THERMOPHILA* BY ECOTOXICOLOGICAL METHODS

Nanomaterials are used in many commercial products and frequently enter into the aquatic environments. Therefore their mobility (biotransformation, bioaccumulation, biodegradation) and evaluation of toxicity to aquatic environments are important concern. This thesis investigates the fate and effect of titanium dioxide (TiO₂) and iron oxide (Fe₃O₄) metal nanoparticles in ciliate protozoa *Tetrahymena thermophila*. In this context, the main aim of this study is assessing the growth inhibition of the nanoparticles by ecotoxicological tests and observing the interaction of nanoparticles and *Tetrahymena thermophila* cells by image analysis.

These nanoparticles did not exhibit significant cell growth inhibition in high concentration (50-400 mg/L) because of the turbidity whereas the nanoparticles under 50 mg/L concentrations (3,12-25-mg/L) presented cell growth inhibition. The image analyses indicate protozoan cells are able to ingest the nanoparticles but could not digest them. In addition, the cell was attributed the aggregation of ingested small nanoparticles into larger form and eventually excreted in the culture medium. Nanoparticles always have a tendency of sedimentation and randomly particle aggregation. Interestingly their aggregation are accelerated due to the presence of *Tetrahymena* and consequently clustered to larger particle over time. Therefore, this study introduced a platform for describing the fate of nanoparticles in to the aquatic environments.

December, 2009

Seda Berna BAYKAL

SEMBOLLER

- LC₅₀** : Maruz bırakılan populasyonun yarısını öldüren toksik madde konsantrasyonu
- NOEL** : Organizmada toksik etkinin görülmediği doz
- EC₅₀** : Populasyonunun yarısı üzerinde seçilen etkinin ortaya çıkmasına neden olan toksik madde konsantrasyonu
- TiO₂** : Titanyum dioksit
- Fe₃O₄** : Demir oksit
- μ_{i-j}** : Ortalama büyüme oranı değeri
- X_i** : i süresindeki biyokütle değeri
- X_j** : j süresindeki biyokütle oranı değeri
- % I_r** : Ortalama büyüme oranındaki yüzde inhibisyon değeri
- μ_c** : Kontrol gurubundaki ortalama büyüme oranı değeri
- μ_t** : Test grubu için ortalama büyüme oranı değeri

KISALTMALAR

nm	: Nanometre
Ppm	: (İng.: Parts per million) milyonda bir birim
PAH	: Polisiklik aromatik hidrokarbon
PCB	: Poliklorlu bifenil
PPY	: Proteos peptone yeast
THF	: Tetrahidrofuran
OD	: (İng.: Optical density) optik yoğunluk

ŞEKİLLER

SAYFA NO

Şekil II.1	Ekotoksikolojinin ilişkide olduğu disiplinler	6
Şekil II.2	Ekotoksikolojik testlerin sınıflandırılması	11
Şekil II.3	Doz-cevap eğrisinden LD ₅₀ değerinin hesaplanması	12
Şekil III.1	Nanomalzemelerin ekosistemlere yayılma yolları	17
Şekil III.2	Nanoparçacıkların kümeler oluşturarak kaynaşması	18
Şekil III.3	Nanoparçacıkların akuatik ekosisteme ulaştığında izleyeceği muhtemel yollar	19
Şekil III.4	<i>Tetrahymena thermophila</i>	21
Şekil III.5	<i>Tetrahymena thermophila</i> stok kültürleri.....	25
Şekil III.6	Erlenmayer içerisindeki <i>Tetrahymena thermophila</i> kültürü	25
Şekil III.7	Well plate'lerin deneyler için düzenlenmesi.....	26
Şekil III.8	<i>Tetrahymena</i> hücrelerini mikroskop altında saymak için kullanılan hemositometre	27
Şekil III.9	OD değerlerini biyokütle değerlerine çevirmek için oluşturulan kalibrasyon eğrisi	28
Şekil IV.1	Nanoparçacık çözeltileri; (a) sonikasyon banyosundan hemen sonra (b) 24 saat geçtikten sonra.....	31
Şekil IV.2	<i>T. Thermophila</i> 'da nano TiO ₂ ile maruziyet sonucu 24. saat ve 48. saat sonunda organik kütledeki değişim	34
Şekil IV.3	<i>T. Thermophila</i> 'da nano Fe ₃ O ₄ ile maruziyet sonucu 24 saat ve 48 saattin ardından organik kütledeki değişim.....	36
Şekil IV.4	Nano TiO ₂ ile maruziyetten sonra elde edilen inhibisyon değerleri.....	36
Şekil IV.5	Nano Fe ₃ O ₄ ile maruziyetten sonra elde edilen inhibisyon değerleri	37
Şekil IV.6	Maruziyetten bir saat sonra; (a) nanoparçacıklara maruz bırakılmış <i>T. thermophila</i> hücreleri ve (b) PPY medyum içinde nanoparçacıklar	37
Şekil IV.7	Maruziyetten 48 saat sonra; (c ₁ , c ₂) <i>T. thermophila</i> hücreleri (d) PPY içinde nanoparçacıklar	38

TABLolar

SAYFA NO

Tablo IV.1 TiO ₂ nanoparçacıklı örneklerden T ₀ -T ₂ 'de elde edilen ortalama OD değerleri	31
Tablo IV.2 Fe ₃ O ₄ nanoparçacıklı örneklerden T ₀ -T ₂ 'de elde edilen ortalama OD değerleri	32
Tablo IV.3 Kontrol grubunda (<i>T. Thermophila</i>) T ₀ -T ₂ 'de elde edilen ortalama OD değerleri	32
Tablo IV.4 Kontrol grubunda (<i>T. Thermophila</i>) ortalama büyüme oranı	33
Tablo IV.5 Nano TiO ₂ ile yürütülen toksisite testlerinden 24 (T ₁) saatte elde edilen organik kütle, ortalama büyüme oranı ve % inhibisyon değerleri.....	33
Tablo IV.6 Nano TiO ₂ ile yürütülen toksisite testlerinden 48 saatte (T ₂) elde edilen organik kütle, ortalama büyüme oranı ve % inhibisyon değerleri.....	34
Tablo IV.7 Nano Fe ₃ O ₄ ile yürütülen toksisite testlerinden 24. saatte (T ₁) elde edilen ortalama organik kütle, ortalama büyüme oranı ve % inhibisyon değerleri	35
Tablo IV.8 Nano Fe ₃ O ₄ ile yürütülen toksisite testlerinden 48. saatte elde edilen ortalama organik kütle, ortalama büyüme oranı ve % inhibisyon değerleri.....	35

BÖLÜM I.

GİRİŞ ve AMAÇ

I.1 GİRİŞ

Sözlük anlamı olarak “nano” kelimesi teknik bir ölçü birimi olarak kullanılmakta ve herhangi bir birimin milyarda biri anlamını taşımaktadır. Bir nanometre (nm) bir milimetrenin milyonda birine eşit bir uzunluk birimidir ve 10^{-9} m ye karşılık gelir. Bir nanometre içine yan yana ancak 2-3 atom dizilebilmekte ve yaklaşık 100-1000 atom bir araya gelerek nanoölçeklerde bir nesneyi oluşturmaktadır [1, 2, 3].

Nanoteknolojinin gelişmesiyle beraber, çeşitli alanlarda yararlanmak üzere sentetik olarak yeni yapı ve işlevler kazandırılan nanomalzemeler üretilmektedir. Bunun yanı sıra nanoboyutta parçacıklar, orman yangınları ve volkanik faaliyetler neticesinde oluşabileceği gibi viral parçacıklar ve ferritin gibi protein molekülleri şeklinde de doğada bulunmaktadır [4]. Nanoboyuttaki malzemeler, mikro ve makro boyuttaki malzemelerden yapısal boyutlarına özgü birtakım yapısal özelliklerle ayrılmaktadır. Malzemenin boyutu nanoölçek düzeyine yaklaştıkça (malzemeyi oluşturan atom sayısı 100 ler düzeyine indikçe), atom yapının geometrisi ve hatta atom sayısı fiziksel özelliklerin (iletkenlik, elektronik, optik, manyetik özellikler gibi) belirlenmesinde etken olmaktadır. Örneğin, nanoparçacığın iletkenliği o yapıya tek bir atom eklense bile değişebilmektedir. Benzer şekilde, nanoölçeklerde atomlar arası bağ yapısı da değişikliğe uğrayabilmektedir. Mekanik olarak malzeme güçlenirken ya da zayıflarken, elektriksel iletkenlik özelliği tümüyle değişebilmektedir [5].

Malzemenin boyutları nanoölçek düzeyine yaklaştıkça ortaya çıkan yeni özellikler sayesinde, nanomalzemeler endüstride geniş kullanım alanı bulmuş ve geliştirilmiş ürünler hızla gündelik yaşamımıza girmiştir [6]. Tekstil sektöründe giyim ürünlerinin yanı sıra teknik ürünlerde de nanomalzemeler kullanılmaktadır. Ziraai tekstiller, inşaat tekstilleri, spor tekstilleri, endüstriyel tekstiller, tıbbi tekstiller gibi teknik tekstil ürünleri nanomalzemeler kullanılarak geliştirilmektedir. Ayrıca

boya sanayisinde 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 kazandırılmış boyalar geliştirilmiştir. Nanoteknolojiden yararlanan bir başka sektör de kozmetik sektörüdür. Nanomalzemeler kullanılarak üretilen dış 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 [7].

Türkiye nanoteknolojiyi üretir hale gelebilmek ve gelişmekte olan uluslararası nanoteknoloji pazarında var olabilmek için çeşitli girişimlerde bulunmaktadır. Avrupa Birliği'nin 6. Çerçeve Programı (Nanoteknoloji ve Nanobilimler, Bilgi Tabanlı Çok Fonksiyonlu Malzemeler, Yeni Üretim Süreçleri ve Araçları) ve 7. Çerçeve Programı (Nanobilimler, Nanoteknolojiler, Malzemeler ve Yeni Üretim Teknolojileri) kapsamında Türkiye'nin nanoteknoloji araştırmalarının yapılandığı ve ivme kazandığı görülmektedir. TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) tarafından hazırlanan Vizyon 2023 Programı'na nanoteknoloji öncelikli alanlardan biri olarak alınmıştır [8]. Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi'nin (UNAM) 2005 yılında kurulması ile nanotekstil ürünleri, nanoelektronik aygıtlar, nanodetektörler ve nanoölçeklerde ölçüm aletlerinin geliştirilmesi çalışmaları hız kazanmıştır [2].

Nanoteknolojinin ve nanomalzemelerin uluslararası arenada önem kazanması ve kullanımının artması ile beraber başta EPA (Environment Protection Agency-Çevre Koruma Örgütü) olmak üzere ABD'de ve Avrupa'da çok sayıda kuruluş bu ürünlerin risk haritasını ortaya çıkarma çalışmalarına başlamıştır [9]. Nanoteknolojinin kullanım alanının genişliği ve hızla gelişip yayılması göz önünde bulundurulduğunda, nanomalzemelerin ekotoksikolojik etkilerinin saptanması çevre ve halk sağlığını korumada önem taşımaktadır [10].

1.2 AMAÇ

Nanoteknolojinin gelişimine paralel olarak nanomalzemelerin ve bu malzemeler kullanılarak geliştirilen ürünlerin üretim, taşınım, kullanım ve tüketim aşamalarında deşarjlarla ya da doğrudan akuatik ekosistemlere ulaşma riski ortaya

çıkmaktadır. Akuatik ekosistemlere, ortamın niteliğinin bozulmasına ve ortamdaki organizmaların olumsuz etkilenmesine neden olacak miktar ve yoğunlukta nanomalzeme karışması kirliliğe neden olmaktadır.

Ekosistemlerde herhangi bir organizmada meydana gelecek olumsuz bir etki besin zinciriyle ya da farklı türler arasındaki etkileşim sonucunda ekosistemin geri kalanını da etkileyebilir. Sentetik nanoparçacıkların akuatik ekosisteme girişiyle; alg, bakteri gibi tek hücreli organizmalardan, balıklar, akuatik memeliler gibi daha karmaşık omurgalılara kadar birçok farklı türün bu maddelerle teması kaçınılmaz hale gelmektedir [11]. Sentetik nanoparçacıkların akuatik ekosistemler üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için nanoparçacıkların; ekosistemlere giriş yolları, ekosistemlerde gösterdikleri dağılım, ortamdaki kalıcılıkları ya da bozunumları gibi konular ekotoksikolojik çalışmalar neticesinde açıklığa kavuşturulmalıdır. Ekotoksikoloji kimyasal ve fiziksel etkenlerin ekosistemlerdeki organizmalar, populasyonlar ve komüniteler üzerindeki toksik etkileri ile toksik etkenlerin taşınma yolları ve çevresel etkileşimlerini konu almaktadır [12].

Literatür araştırmaları sonucunda Türkiye’de nanoparçacıkların ekotoksikolojik etkileri hakkında daha önce yapılmış çalışmalara rastlanamamıştır. Nanoteknolojinin Türkiye’deki durumu göz önünde bulundurulduğunda bu çalışmanın bilime önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı; titanyum dioksit (TiO_2) ve demir oksit (Fe_3O_4) metal nanotozlarının protozoanın siliata sınıfından *Tetrahymena thermophila* üzerindeki toksikolojik etkisini ekotoksikolojik yöntemlerle ölçmek ve nanoparçacıklar ile organizmanın etkileşimini inceleyerek nanomalzemelerin akuatik ortamdaki davranışlarına açıklık getirmektir.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

Bu bölümde tez çalışmasının başlıca kavramları olan nanoteknoloji, ekotoksikoloji ve akuatik toksikolojiye değinilecektir.

II.1 NANOTEKNOLOJİ

Nanoteknoloji nesnelere 100 nm den daha küçük boyutlarda oluşturmakla ilgilenen bir bilim dalıdır [1, 3]. 1959 yılında Amerikan Fizik Cemiyeti'nden (APS-American Physical Society) Richard Feynman, nanoyapıların esas yapılardan daha farklı özellikler taşıdığını vurgulayarak bilim insanlarının dikkatini nanometre boyutlarına çekmiştir. Önce 1981 yılında taramalı tünelleme mikroskopunun (STM-Scanning Tunneling Microscopy), daha sonra 1985 yılında atomik kuvvet mikroskopunun (AFM-Atomic Force Microscopy) 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 tasarlanarak sentezlenmesi devri başlamıştır [8].

21. yüzyılda bilgi alma teknolojileri, malzeme bilimi, biyoteknoloji, çevre mühendisliği, kimya mühendisliği, elektrik mühendisliği, moleküler kimya gibi birçok farklı bilim dalındaki gelişmeler nanoölçekte ilerlemektedir [13]. Nanoalan gelecekteki mühendislik ve bilim çalışmalarının temelini oluşturacak bilimler arası araştırmaların ve eğitimin esas basamağı olarak görülmektedir.

Nanoteknoloji terimlerinde ortaya çıkan kargaşaya çözüm olarak, İngiliz Standartlar Kurumu (British Standards Institution) 2005 yılında terimlerin tanımlamalarını yayınlamıştır [14]. Genel olarak aşağıdaki ana tanımlar önerilmektedir.

Nanomalzeme: Bir ya da daha çok boyutu 1-100 nm olan ve nanoboyutta olmayan aynı malzemeye kıyasla birçok yeni özellikler kazanmış malzemelerdir.

Nanoparçacık: Bir ya da daha fazla boyutu nanoölçekte olan parçacıklardır.

Nanoölçek: Bir ya da daha fazla boyutu 100 nm ya da altında olan nesnelere ölçen orandır.

Nanobilim: Maddelerin atom, moleküler ve makro moleküler ölçekte işlenmesiyle ortaya çıkan yeni özellikler üzerinde çalışan bilim dalıdır.

Nanoyapı: Nanoölçekteki yapılardır.

Fullerenler (Buckminsterfullerene-Buckyballs): Bir karbon allotropu ailesidir. Saf karbondan oluşan fullerene molekülü futbol topunu andıran bir yapıya sahiptir [13,15].

Karbon nanotüpler (buckytubes): Grafitin 1-10 nm çapında ve birkaç mikrometre uzunluğunda bir silindir oluşturacak şekilde yuvarlanmasıyla elde edilmiş yapılardır [13,16]. Bir başka deyişle karbon nanotüpler, fullerenlerin silindir şeklindeki formlarıdır. Nanoelektronik ve nanomekanik devrelerde kullanılmak için elverişlidir [15].

Nanotozlar: Nanotozlar büyüklüğü 1-100 nm arası değişen bileşiklerdir. Nanotoz olarak üretilen materyaller; metaller, metal oksitler, boritler, karpitler, nitritler, sülfürler ve metal olmayan materyaller; karbon, kalay, silica ve silikon karpitler olarak sıralanabilir [14]. Nanotozların güncel kullanımına aşağıda örnekler verilmiştir [17].

Güneş kremleri ve kozmetik; titanyum dioksit ve zink oksit nanotozları güneş kremlerinde, diğer krem ve losyonlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kaplamalar; gözlük camlarında, merceklerde kullanılan çizilmeyi önleyen kaplamalar ve tıbbi amaçlı kullanılan camlara kendi kendini temizleme özelliği veren kaplamalar titanyum dioksit nanotozları içermektedir.

Patlayıcı maddeler, havai fişekler; mikro ölçekli tozlar yerine alüminyum nanotozlar, patlayıcı maddelerde ve havi fişeklerde yanma niteliklerini artırmak amacıyla kullanılmaktadır.

Zımparalar (abrasives); elmas nanotozlarından yapılmış zımparalar macunlar, mercekler ve aynalar gibi optik aletlerde istenilen yüksek parlaklığı elde etmek için kullanılmaktadır.

Yağlama maddeleri; yağların, yağlama özelliklerini geliştirmek amacıyla elmas nanotozlar kullanılmaktadır.

Boya korumaları; boyalara ilave edilen gümüş ve elmas nanotozları boyanın dış etkenlerle aşınmasını önler, koruma sağlar.

Bu çalışmada kullanılan nano titanyum dioksit (TiO₂) ve nano demir oksit (F₃O₄) ticari olarak önemli bir nanomalzeme sınıfı olan metal oksit nanotozlarındandır.

II.2 EKOTOKSİKOLOJİ (Çevre Toksikolojisi)

Ekotoksikoloji, son 40 yılda hızla gelişme gösteren yeni bir bilim dalıdır. 1969 yılında Fransa Bilimler Akademisi (Académie des Sciences) üyesi toksikolog René Truhaut ekotoksikolojiyi toksikolojinin doğal ya da yapay kirleticilerin ekosistemlere olan etkilerini konu alan bir alt dalı olarak tanımlanmıştır [12]. Ekoloji canlı varlıkların birbirleri ve çevreleriyle olan ilişkilerini konu alırken toksikoloji kimyasallar ile birey arasındaki etkileşimleri zararlı sonuçları yönünden incelemektedir. Ekotoksikoloji ise bu iki farklı bilim dalından da yararlanarak doğaya yayılmış kirletici maddelerin bireyler, populasyonlar ve komüniteler üzerinde oluşturduğu baskıyı, kirleticilerin kaynaklarını, geçiş yollarını, biyolojik dönüşümlerini, canlılar üzerindeki fizyolojik ve biyokimyasal zararlarını araştırmayı amaçlamaktadır [18].

Ekotoksikoloji birçok farklı bilim dalından faydalanan çok disiplinli bir bilimdir. Şekil II.1 de ekotoksikolojinin ilişkide olduğu farklı disiplinler görülmektedir.



Ekoloji; ekosistemdeki türlerle toksik maddelerin etkileşiminin, ekosistemin işlevinde ve yapısında meydana gelen olası etkiler üzerinden yorumlanmasını sağlarken, moleküler biyoloji ve farmakokinetik; toksik kimyasalların organizmada moleküler seviyedeki etkileşimini açıklar. Toksik bileşimin çevresel konsantrasyonunun belirlenmesinde ve organizma için tehlikeli dozun tespit edilmesi aşamasında ise analitik kimyaya başvurulur. Bunun yanı sıra ekosistemdeki abiyotik ve biyotik etkileşimlerin anlaşılabilmesi açısından organik kimya büyük bir kaynak oluşturur. Matematiksel modelleme, kimyasalların toksik etkilerinin olası sonuçlarını araştırmacılara önceden bildirmesi açısından önem taşır. Evrim biyolojisi ise türler arasında karşılaştırma yapılmasına olanak sağlarken türlerin değişen çevre koşullarına gösterdikleri uyumu açıklamada yardımcı olur. Ekotoksikologlar, ayrıca çevresel kirleticilerin biyolojik dönüşümlerinin açıklanmasında mikrobiyoloji ve moleküler genetikten yararlanır. Son olarak da risk analizi ile araştırmalar için rehber olacak taslaklar şekillendirir ve hipotezler geliştirirler [18].

II.2.1 Ekotoksikolojide Kullanılan Terimler

Toksik madde: Uygunsuz dozda ve belirli bir süre kullanıldığında biyolojik sistemde olumsuz, istenmeyen etkiler veya hasar oluşturabilme kapasitesine sahip maddeler veya etkenlerdir.

Ksenobiyotik: Doğada üretilmeyen ve belirli bir biyolojik sistemin elemanı olmayan genellikle sentetik olan kimyasallardır.

Toksisite: Bir kimyasal maddenin neden olduğu biyolojik zarar veya organizmaya zarar verme kapasitesidir.

Doz: Bir seferde verilen veya maruz kalınan madde miktarıdır.

Akut Toksisite: Toksik maddeye kısa süre (24 saat) zarfında bir ya da birçok kere maruz kalan organizmada oluşan toksisitedir.

Kronik Toksisite: Toksik maddeye uzun süre maruz kalan organizmada oluşan toksisitedir.

Letal Doz: Organizmada ölüme neden olan toksik madde konsantrasyonudur.

EC₅₀ (Median Effective Concentration): Populasyonunun yarısı üzerinde seçilen etkinin ortaya çıkmasına neden olan toksik madde konsantrasyonudur.

LC₅₀ (Median Letal Concentration): Maruz bırakılan populasyonun yarısını öldüren toksik madde konsantrasyonudur.

LD₅₀ (Median Letal Dose): Solunum yolu dışında bir yol ile organizmaya girerek etki gösteren, bir defada verilen katı veya sıvı haldeki kimyasal maddenin verildiği gruptaki hayvanların %50'sini öldüren dozudur.

LT₅₀ (Median Letal Time): Belirli bir konsantrasyonda toksik maddeye maruz kalan popülasyonun yarısının ölmesi için geçen süredir.

Tolerans Limiti (TL): Kimyasal maddeye maruz kalan canlının hayatta kalabileceği en yüksek toksik madde konsantrasyonudur.

NOEL (No Observed Effect Level): Organizmada herhangi bir toksik etkinin görülmediği dozdur.

Biyogösterge (biomarker): Kimyasalın organizmayla teması neticesinde, erken hücrel yanıtları yansıtan biyolojik, fizyolojik ve fonksiyonel göstergelerdir.

Biyozileme (biomonitoring): Bir ekosistemin kirliliğinin o ekosistemdeki organizmaların incelenmesi yoluyla saptanmasıdır.

Biyodenej (bioassay): Biyolojik etken bir maddenin etkinliğini, canlı organizma üzerinde göstererek saptama yoludur.

Risk: Herhangi bir kimyasal maddenin çevrede bulunan ya da bulunma ihtimali olan konsantrasyonunda oluşturabileceği zarardır. Tanımlanan bir tehlikenin olması ihtimali veya frekansı ile bu oluşumun etkilerinin büyüklüklerinin bir bileşkesidir.

Risk değerlendirme: Mevcut toksisite verilerinden hareketle, bir maddenin öngörülen miktarda ve şekilde kullanımı ile kişilerde, toplumda ve çevrede ortaya çıkabilecek muhtemel zararlı etkilerinin değerlendirilmesidir.

Biyobirikme (bioaccumulation): Kimyasal maddelerin fizyolojik olarak veya kimyasal işlevler yoluyla çevredeki biyolojik sistemlerde konsantrasyonun artmasıdır.

Biyodönüşüm (biotransformation): Toksik maddelerin ekosistemlerde biyolojik yollarla değişime uğramasına biyodönüşüm denilmektedir.

Biyobozunum (biodegradation): Kimyasal maddenin su ve toprakta kimyasal, fotokimyasal ve biyokimyasal reaksiyonlarla uğradığı değişimler biyobozunum adını almaktadır.

II.2.2 Ksenobiyotik-Biyolojik Sistemin Etkileşimi

Ekosistem içindeki en önemli iki işlev enerji transferi ve madde döngüsüdür. Toksik maddeler bunların en az birinin ya da her ikisinin işleyişini bozmaktadır. Enerji transferi güneş enerjisinin birincil üreticilere geçişiyle başlar ve besin zincirinin oluşmasıyla son tüketiciye kadar ulaşır. Basamaklar arasındaki sıkı ve

hassas ilişkiden dolayı bir basamaktaki organizmanın olumsuz etkilenmesi diğerlerinin de olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır. Üreticilerin sayısında meydana gelecek azalma daha üst basamaklardaki organizmaların sayısında da uzun süreli ve ciddi azalmaların gözlenmesine neden olur.

Ekosistemlere ulaşan toksik maddelerin organizmalarla etkileşimleri neticesinde ortaya çıkan moleküler toksik etkiler; hücrelerin yaşamında fonksiyonel önemi olan hücre altı düzeyde (subcellular) yapıların veya makro moleküllerin (DNA, RNA'lar ve enzimler gibi) dönüşümsüz olarak bozulması şeklinde kendini gösterir. Toksik maddeye maruz kalan hücrede; hacim düzenlenmesinde ve enerji metabolizmasında bozulmalar görülürken, lizozomlarda parçalanma, lipid peroksidasyonu, hücre içinde trigliserid birikimi gibi çeşitli temel yapısal değişiklikler meydana gelir. Belirtilen mekanizmaların toksik etkenler tarafından harekete geçirilmesi ile oluşan bozuklukların belirli bir derecenin üstüne çıkması da hücrenin ölümü ile sonuçlanır.

Toksik maddelerle populasyon etkileşimi üzerindeki çalışmalar populasyon genetiği çevresinde yoğunlaşmaktadır. Çevresel ortama toksik maddelerin girişi çok kuvvetli seçim bakışı (doğal seleksiyonu etkileyen çevresel karakteristikler) yaratmakta ve bazı genetik özellikler lehine ya da aleyhine iş görerek populasyonda değişime neden olmaktadır. Gen havuzunda (populasyondaki bütün genlerin toplamı) meydana gelen değişiklikler populasyonun yapısını etkilemektedir.

Komünite içindeki populasyonların kirlilikten etkilenmesi sadece o populasyonla sınırlı kalmaz. Etkilenen populasyonun ilişki içinde olduğu diğer populasyonlar da kirlilikten etkilenmektedir. Bu etkiler bir türün toksik bir maddeye maruz kalması sonucu komünitenin biyolojik çeşitliliğini bazen azaltmakta bazen de artırmaktadır. Benzer şekilde av-avcı ilişkileri de kirlilikten etkilenmektedir.

II.3 AKUATİK TOKSİKOLOJİ

Akuatik toksikoloji ekotoksikolojinin bir dalıdır. Endüstriyel kimyasallarla antropojenik ve doğal maddelerin; akuatik organizmalara, populasyonlara, komünitelere ve ekosistemlere etkilerini moleküler seviyeden tüm organizma seviyesine kadar farklı aşamalarda inceler [19]. PAH'lar (polisiklik aromatik hidrokarbon), PCB'ler (poliklorlu bifenil), organoklorlar (pestisitler, insektisitler-DDT, dioksin), organometaller (organokurşun, organociva, organokalay) gibi organik kirleticilerin yanı sıra civa, kurşun, kadmiyum gibi ağır metaller, silikon,

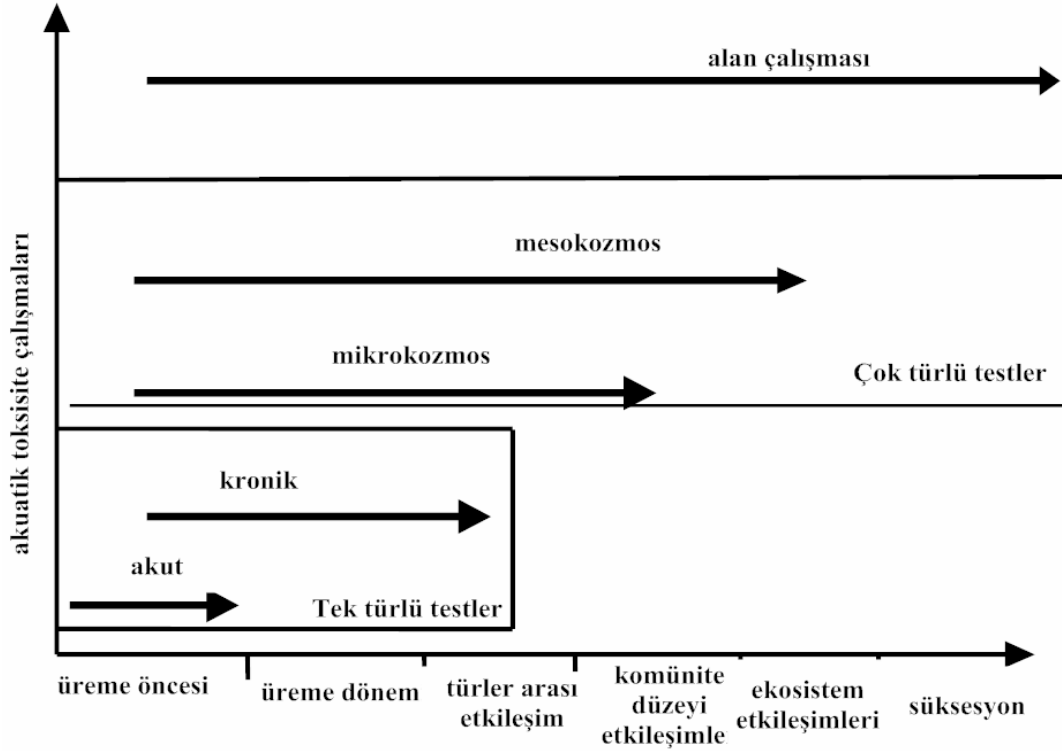
arsenik, antimon, selenyum gibi metaloitler ve karbondioksit, azot ve fosforlu bileşikler gibi inorganik kirleticiler akuatik ekotoksikolojinin incelediği kirletici maddelerdir. Son yıllarda yukarıda sıralanan kirleticilere ek olarak nanoteknolojideki gelişmeler neticesinde çeşitleri artan ve kullanım alanları genişleyen nanomalzemeler de akuatik ekosistemlerin güvenliğini tehlikeye sokmaktadır.

Akuatik toksikoloji çalışmalarında ksenobiyotiğin (xenobiotic) biyolojik sistemlerde meydana getirdiği zararlı etkileri saptamak, doz-cevap ilişkisini ve toksisite meydana getirdiği koşulları belirlemek, meydana gelen toksik etkinin niteliğini, niceliğini tanımlamak amacıyla akuatik toksisite testleri geliştirilmiştir [20]. Akuatik ortamlar; akarsular, göller, göletler, nehirler, haliçler, denizler, okyanuslar gibi farklı karakteristik özellikleri olan birçok ekosistem çeşidini barındırır. Dolayısıyla incelenecek türlerin ve ekosistemlerin çeşitliliği birçok farklı test türünün gelişmesine neden olmuştur.

II.3.1 Akuatik Toksisite Testlerine Genel Bakış

Testlerin sınıflandırılmasında iki önemli değişken söz konusudur. Birincisi testin biyolojik sisteme uygulanma süresi ikincisi de test sistemindeki türlerin bileşimidir. Şekil II.2 de ekotoksikolojik test türlerinin sınıflandırılması görülmektedir.

Akuatik toksisite testleri genel olarak organizmayla temas süresi ve sıklığına göre akut toksisite testleri, kronik toksisite testleri şeklinde sınıflandırılırken; testte kullanılan organizma türlerinin bileşimine göre; tek tür organizmayla yürütülen testler, mikrokozma, mezokozma ve alan çalışması şeklinde sınıflandırılmaktadır. [18].



Şekil II.2 Ekotoksikolojik testlerin sınıflandırılması [18]

Toksisite testleri kimyasal bileşiği üreten firmalarca veya araştırma laboratuvarınca OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) kılavuzları doğrultusunda yapılmaktadır. OECD Test Rehberi, kimyasalların insan ve çevre sağlığına zararlarının değerlendirilmesinde önem taşıyan özelliklerinin veya etkilerinin test edilmesi için gereken prosedürleri kapsamaktadır [21].

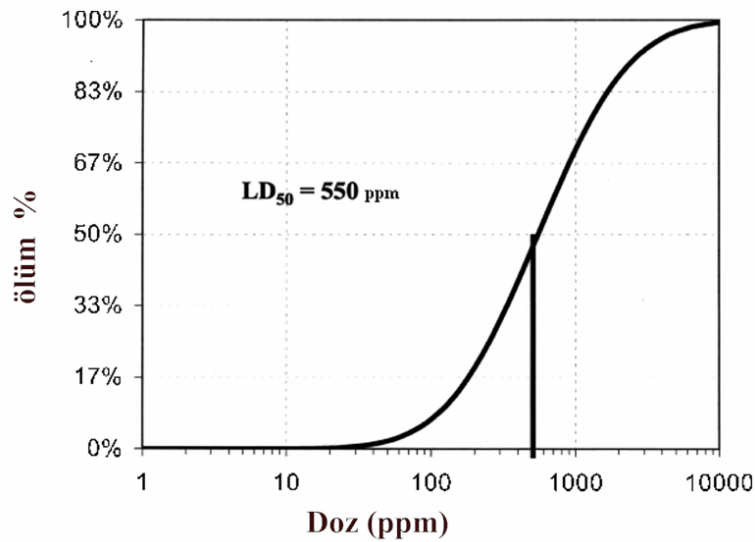
II.3.1.1 Doz-Cevap İlişkisi

Akuatik toksikolojide doz-cevap ilişkisi toksisite testlerinin temelini oluşturmaktadır. Doz ve biyolojik etki arasındaki ilişki doz-cevap ilişkisi olarak tanımlanmaktadır. Meydana gelen etkinin şiddeti, organizmada etki yerine ulaşan madde miktarına bağlıdır. Toksisite aynı bileşiğin farklı konsantrasyonlarında, aynı hayvan türünün farklı gruplarında değişkenlik gösterebilir. Benzer olarak kimyasal madde ile biyolojik sistemin teması neticesinde bazı organizmalarda düşük, bazı organizmalarda yüksek şiddetli etkiler gözlenebilir. Bunun yanı sıra hiçbir olumsuz etki gözlenmeyen organizmalar da bulunmaktadır. Bazı kimyasallar ise eşik konsantrasyonlarına ulaşına kadar organizmada hiçbir olumsuz etki yaratmazken, bazı kimyasalların çok düşük değerleri bile organizmada ölüme neden olabilir.

II.3.1.2 Doz-Cevap Eğrileri

Enzim, organizma, populasyon ya da komünitenin farklı konsantrasyonlardaki ksenobiyotiğe verdiği cevabı tanımlayan grafiklere doz-cevap eğrileri denir. Enzim inhibisyonu, DNA hasarı, davranışsal değişiklikler, ölüm ya da diğer değişimler toksik cevabın göstergesi olabilir. Doz-cevap eğrileri kullanılarak toksik etkinin hangi dozda oluşabileceği açıklanmaktadır. Doz-cevap eğrileri oluşturulurken kullanılan en yaygın yöntemde dozlar x eksenine, bu dozlara karşılık gelen cevap yüzdeleri de y eksenine yazılarak bir grafik çizilir ve karakteristik bir sigmoid eğri elde edilir. Bu grafiklerden LD_{50} , LC_{50} , EC_{50} ve NOEL değerlerine karşılık gelen doz, eğriden x eksenine indirilen dikey çizgi sayesinde bulunmaktadır (Şekil II.3).

Bir başka grafik yönteminde ise x eksenine log doz, y eksenine cevap yüzdeleri yazılır. Şekil II.3 deki gibi sigmoid bir eğri elde edilir. LD_{50} , LC_{50} , EC_{50} ve NOEL değerleri % 50 etkiye karşılık gelen doz kullanılarak hesaplanmaktadır.



Şekil II.3 Doz-cevap eğrisinden LD_{50} değerinin hesaplanması

II.3.1.3 Akut Toksikite Testleri

Akut toksisite testleri ksenobiyotik ile organizmanın temasından kısa bir süre sonra canlıda oluşan etkileri tayin etmek için düzenlenmiştir. Organizmanın ömrünün kısa bir süresini kapsayan testlerdir. Bu süre balıklar ve daphnia için 24-48 saat arasında değişmektedir. Fakat algler ve protistler gibi canlılar için yeni bir nesil oluşturma süresi 24 saatten az iken bazı canlılar için bu süre çok daha uzundur. Bundan dolayı tek hücreli canlılarla yapılan testler genellikle büyüme (growth) testleri ya da kronik testler olarak sınıflandırılmalıdır.

Akut testler maddenin doz-cevap ilişkisinin ve LD₅₀ değerinin saptamasına olanak tanır. Kimyasal maddelerin kısa süreli temasına bağlı akut toksik etkilerini değerlendirmek ve bileşiğin farklı temas yollarında, farklı hayvan türlerinde ve diğer bileşiklere kıyasla toksisitesi hakkında bilgi sahibi olmak için LD₅₀ değeri önem taşımaktadır.

II.3.1.4 Kronik Toksikite Testleri

Organizmanın; kimyasal maddeye uzun dönemde, düşük dozda ve tekrarlanan temasıyla ortaya çıkan toksik etkinin saptanması için geliştirilen toksisite testleridir. Bu testler kimyasal maddelerin organizmanın üreme, hayatta kalma, davranışsal, fizyolojik ya da diğer biyolojik fonksiyonlarında neden olacağı gecikmiş ve birikmiş etkilerini saptamak amacıyla uygulanılmaktadır.

II.3.1.5 Tek Türü Testler

Akuatik ortamdaki farklı besin düzeylerindeki belirli organizmalar ile yapılan testlerdir. Kimyasal maddenin, organizmanın enzim aktivitesi gibi biyokimyasal özellikleri ile büyüme oranı, üreme oranı, ölüm gibi fizyolojik özellikleri üzerindeki etkilerini araştırmak için uygulanmaktadır. Akuatik toksikolojide en yaygın uygulanan tek türü testler Daphnia 48-h akut toksisite testi ve Algal 96-h büyüme (growth) testidir.

II.3.1.6 Mikrokozmoz-Mezokozmoz

Ksenobiyotiklerin populasyon, komünite, ekosistem seviyesinde meydana getirdiği değişikliklerin incelendiği, birden fazla türü içeren, genelde kontrollü olan laboratuvar (mikrokozmoz) ve alan (mezokozmoz) çalışmalarıdır.

Mikrokozmoz çalışmaları bileşik ve kesintili olmak üzere iki şekilde yürütülmektedir. Bileşik mikrokozmozda; 10 tür alg, 5 tür zooplankton (cladoceran, amfipod, ostakod, protozoan ve rotifer) ve bakteri türleri bir galon su ve sediment bulunan bir cam kap içerisine yerleştirilerek floresan ışığın altına bırakılır. Bu sistemin avantajı değişik laboratuvarlarda uygulanabilirliğidir. Kesikli mikrokozmoz çalışmalarında ise, ekosistemden alınan doğal biyota bileşenlerinden oluşan birlikler laboratuvar ortamına taşınmaktadır. Bu çalışmaların kontrolü daha zordur [18].

Mezokozmoz çalışmalar mikrokozmoz çalışmalarından daha büyük alanlarda gerçekleşen deneysel çalışmalardır. Bu alanlar yapay göller, akarsular gibi

ekosistemin parçalarından ya da göl ağıkları gibi sınırlanmış alanlardan oluşmaktadırlar.

II.3.1.7 Alan Çalışmaları

Alan çalışmaları toksisite testleri içinde en masraflı ve en zor olandır. Gözlem yolu ve deneysel yol olmak üzere iki şekilde yürütülmektedir. Biyolojik organizasyonun tüm basamaklarını kapsar ve doğal sistemde var olan gelişimsel, mekansal ve zamansal değişikliklerden etkilenir. Laboratuvar çalışmalarından elde edilen verilerin alan çalışması sonuçlarıyla karşılaştırılması ekotoksikolojik araştırmalarda önemli bir yer tutmaktadır.

II.3.2 Test Organizmalarının Seçimi

Uygun test tipinin ve uygun test organizmasının seçilmesi toksikolojik testlerde güncel ve anlamlı sonuçlar elde etmek açısından önem taşımaktadır.

Toksisite testleri için seçilecek organizmalarda göz önünde bulundurulması gereken faktörler:

- 1- Mümkün olduğunca ekosistemi temsil eden yerli türler kullanılmalıdır.
- 2- Seçilecek türün temini kolay olmalı, test süresince yeterli sayıda birey temin edilebilmelidir.
- 3- Türler ekolojik ve ekonomik öneme sahip olmalıdır.
- 4- Tür içi ve türler arasındaki duyarlılık farklılık gösterdiğinden mümkün olduğunca geniş bir duyarlılık aralığına sahip organizmalar seçilmelidir.
- 5- Türlerin laboratuvar çalışmalarına adaptasyon kabiliyetlerinin yüksek ve kültürlerinin yapılabilir olması gerekmektedir.

II.3.3 Test Organizmaları

Toksikolojik testlerde canlı materyali oluşturacak organizmalar doğrudan doğal ortamdan temin edilebileceği gibi piyasadan satın alma yoluyla ya da laboratuvar vb. yapay koşullarda yetiştirme yollarıyla da elde edilebilir [19]. Akuatik toksisite testlerinde ayrıştırıcıları (bakteriler), birincil üreticileri (mikroorganizmalar-algler), birincil ve ikincil tüketicileri (mikroorganizmalar-omurgasızlar ve balıklar) kapsayan farklı taksonomik gruplara ait canlılar kullanılmaktadır.

Bakterilerden *Vibrio fischeri* testlerde sıklıkla kullanılan örnek türdür. Birincil üreticiler olan algler ve eğreltiotlarından (vasküler bitkiler-macrophytes) *Chlorella*

vulgaris, *Anabaena flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *Lemna minor*, *Hydrilla verticillata* türleri testlerde kullanılmaktadır.

Omurgasız canlılar pelajik ve bentik bölgedeki besin zincirinin ortasında yer alan tüketiciler olmaları nedeniyle akuatik ekosistemde kilit pozisyondadırlar. Pelajik besin zincirinde kabuklular (crustacea) ve rotiferler birincil tüketicileri oluştururken, bentik besin zincirinde kabuklular canlı ve ölü biyokütlenin en önemli ara dönüştürücüleridir.

Testlerde yaygın olarak kullanılan omurgasız canlılara örnek olarak; daphnidler (*Daphnia magna*, *D. pulex*, *D. pulicaria*, *Ceriodaphnia dubia*); amfipodlar (*Gammarus lacustris*, *G. faciatus*, *G. pseudolimnaeus*, *Hyaella azteca*); kopepodlar (*Acartia clausi*, *A. tonsa*); protozoalar (*Tetrahymena pyriformis*, *T. thermophila*); rotiferler (*Brachionus calyciflorus*, *B. Rubens*, *B. plicatilis*) verilebilir.

Sucul omurgalılar içerisinde balıklar toksisite testlerinde temel grubu oluşturmaktadır. Testlerde örnek olarak; *Oncorhynchus mykiss*, *Pimephales promelas*, *Salvelinus fontinalis*, *Carassius auratus*, *Pimephales promelas*, *Catostamus commersoni*, *Ictalurus punctatus*, *Lepomis macrochirus*, *Gasterosteus aculeatus*, *Brachydanio rerio*, *Poecilia reticulata* türleri kullanılmaktadır [20].

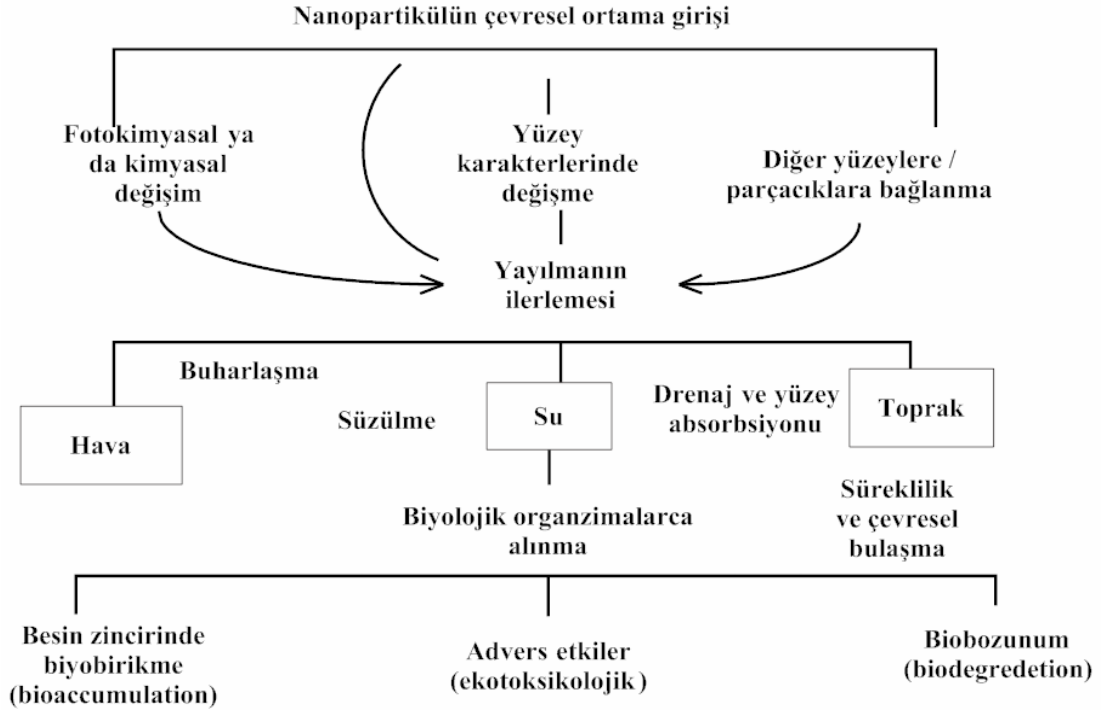
BÖLÜM III

ÇALIŞMALAR

III.1 ÇALIŞMA PROBLEMİNİN TANIMI VE AMACI

Yeni fiziksel ve kimyasal özellikler kazandırılmış nanoparçacıkların, kullanım alanlarının genişlemesiyle beraber üretim, nakil, uygulama ve imha süreçlerinde akuatik ekosistemler ile teması kaçınılmaz hale gelmiştir [15]. Nanomalzemelerin akuatik ekosistemler ile temas yollarını; belediye atıkları gibi noktasal kaynaklar (işletme ve belediyelerin arıtma tesisleri), çeşitli sanayi atıkları (gıda, tekstil, kağıt, kimya, metal, petrol sanayisi gibi) ve tarımsal kirlilik gibi dağınık kaynaklar oluşturmaktadır [23]. Bunun yanı sıra deniz ve su taşımacılığı da akuatik ekosistemle nanoparçacıkların temasında rol oynamaktadır.

Akuatik ekosistemlere ulaşan malzemelerin ortamda izleyecekleri yolların saptanması, farklı besin seviyelerinde biyobirikim ve biyodönüşüm süreçlerine açıklık getirilmesi insan ve çevre sağlığı açısından oluşacak riskleri belirlemede önem taşımaktadır. Şekil III.1 de nanomalzemelerin ekosistemlere yayılma yolları görülmektedir. Aynı zamanda nanoparçacıkların oluşturulma yöntemleri, kimyasal yapıları ve doğal akuatik bileşiklerle ilişkileri de ekotoksikolojik çalışmalar açısından dikkate alınması gereken konulardır.

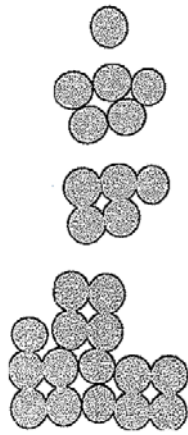


Şekil III.1 Nanomalzemelerin ekosistemlere yayılma yolları [7]

Akuatik ekosistemlere ulaşan nanoparçacıkların kimyasal ve fiziksel davranışlarını dolayısıyla toksisitelerini etkileyen birçok etken bulunmaktadır. Başta akuatik ekosistemlerin karmaşık fiziksel yapısı, örneğin askıdaki sediment parçaları, humik asit gibi doğal kolloidler ve mikrotabaka, nanoparçacıkların fiziksel davranışlarını tahmin etmemizi zorlaştırmaktadır [6, 10]. Bununla beraber suyun ve kıyasal zonların hidrodinamik ve morfolojik özellikleri nanoparçacıkların ortamdaki dağılımını etkilemektedir. Deniz ve akarsu ağzlarında, su tabakasının yüzey mikro katmanlarında; protein, karbonhidrat ya da yağ bileşenleri, nanoparçacıkların davranışları üzerinde etkili olmaktadır. Örneğin sucul ortamın en üstündeki lipit kısmı, fullerene ya da karbon nanotüp gibi lipofilik nanoparçacıkların lipit tabakayla kaplanma ihtimalini doğurabilir. Bu davranış, nanoparçacıkların yüzeye yakın tabakalardaki mikro canlılarla (bakteriler, protistler), birçok omurgasız türün pelajik yumurtaları, larvaları ve çeşitli balık türleriyle ilişkilerini ve ortamdaki dağılımlarını etkileyebilir [7].

Nanoparçacık-nanoparçacık etkileşim kuvvetleri ve nanoparçacık-sıvı etkileşimi, akuatik ortamda bulunan nanoparçacığın maruz kaldığı kimyasal ve fiziksel süreçlerin açıklanmasında ve serbest nanoparçacıkların zamanla geçirdikleri değişimleri tanımlamada anahtar rol oynamaktadır [7] .

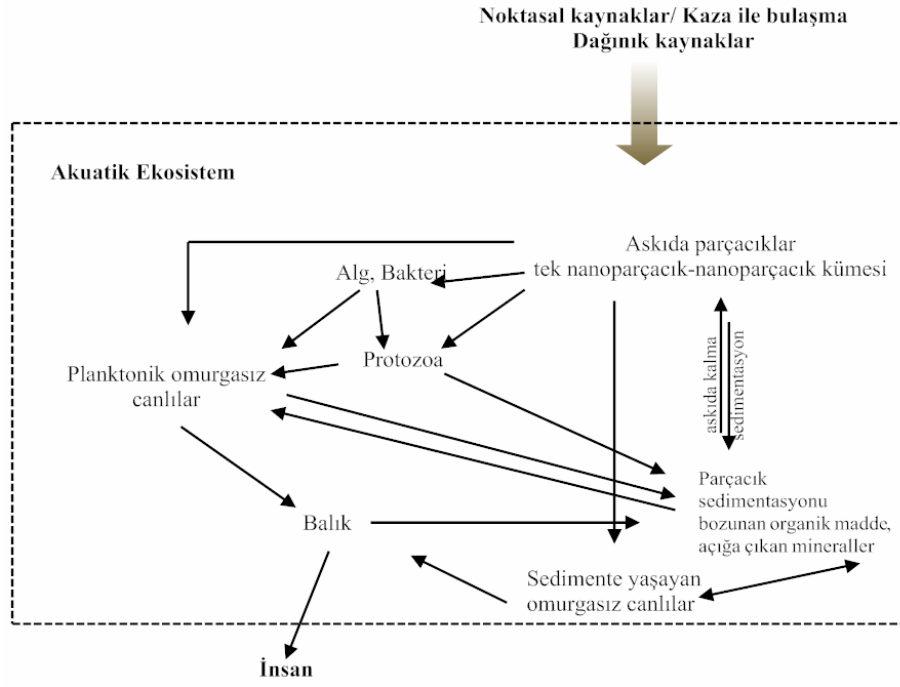
Nanoölçekte parçacık-parçacık etkileşiminde Van der Waals kuvveti, güçlü polar ve elektrostatik etkileşim ya da kovalent etkileşim hakimdir. Nanoparçacıklar arasında çekici ya da itici etkileşim kuvvetleri sonucunda ortaya çıkan kümelenmeler (Şekil III.2) bu parçacıkların ekosistemlerdeki davranışları üzerinde önemli derecede etkilidir [11] .



- İlk Nanoparçacıklar
- Nanoparçacıklar bir araya gelerek kümeler oluşturabilirler (agglomerates).
- Nanoparçacıklar ayrıca bir araya gelerek kaynaşırlar ve topaklar oluşturabilirler (aggregates).
- Topaklaşmış nanoparçacıklar da bir araya gelerek kümelenebilirler (agglomerated aggregates).

Şekil III.2 Nanoparçacıkların kümeler oluşturarak kaynaşması (agglomeration, aggregation) [11]

Nanoparçacıklar akuatik ekosisteme girdikten sonra bakteriler, algler, protozoanlar, planktonik omurgasızlar ve bentik omurgasızlar tarafından ya besin zinciri yolu ile ya da direkt su kolonundan farklı şekillerde alınırlar (Şekil III.3).



Şekil III. Nanoparçacıkların akuatik ekosisteme ulaştığında izleyeceği muhtemel yollar [24]

Sucul omurgalı canlılar nanoparçacıkları doğrudan ağız yoluyla ya da solungaçlar, burun gibi organlar ile yapılarına alırlarken, ökaryot hücrelerde nano ya da mikro ölçekte madde alımı endositoz ile gerçekleşir. Omurgasız hayvanlarda ise hepatopankreas; besinin alınımı, sindirimi, nutrient yedeklerinin depolanması, endositozla alınan besinlerin hücre içi lizozomal sindirimi işlemlerinden sorumludur [10].

Akuatik ekosistemdeki besin zincirinin alt basamaklarındaki her hangi bir populasyon değişikliğinde su ortamlarının sağlığını ağır şekilde etkileyecek sonuçlar ortaya çıkabilir.

Bu çalışmada, büyüme inhibisyon testleri uygulanarak titanyum dioksit (TiO_2) ve demir oksit-manyetit (Fe_3O_4) nanotozlarının tatlı su protozoanı *Tetrahymena thermophila* üzerindeki etki değerlerinin araştırılması ve ayrıca mikroskopik gözlem çalışmalarıyla akuatik ortamda nanoparçacıkların davranışlarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Testlerde kullanılacak *Tetrahymena thermophila* kültürlerinin PPY (Proteos peptone Based Yeast Enriched Medium) besiyerinde logaritmik çoğalmaları sağlanmaktadır. Nano TiO_2 ve nano Fe_3O_4 tozları ile PPY medyumda farklı

konsantrasyonlarda test çözeltileri hazırlanır ve hücre kültürleri eklenmiş 96 well-plate'e (kuyucuklu plaka) ilave edilir.

İnkübasyona bırakılan örneklerde hücre kültürlerinde büyüme oranındaki değişimler 24 ve 48 saat süreyle izlenir. Farklı konsantrasyonlardaki test maddesine maruz kalan *T. thermophila* kültürlerinde (test örneklerinde) sistem cevabı (response) olarak büyüme oranında düşüş meydana gelmesi beklenmektedir. Büyüme oranı biyokütlerdeki logaritmik artış şeklinde tanımlanmaktadır. Test çözeltilerinin uygulanan konsantrasyonları neticesinde elde edilen ortalama büyüme oranları ve konsantrasyon değerleriyle %X büyüme inhibisyonu (örneğin %50) hesaplanır ve EC_X (örneğin EC₅₀) şeklinde ifade edilmektedir [25].

Mikroskobik gözlem sırasında ise well-plate'lerden alınan test ve kontrol grubu örneklerindeki hücrelerin ve nanoparçacıkların birbirleriyle ve test medyumuyla etkileşimi neticesinde ortaya çıkan kümelenme durumları incelenir.

Bu çalışmada akuatik ekosistemlere ulaşan nanoparçacıkların ortamda izledikleri yol ve uğradıkları değişim (biyodönüşüm) hakkında gelecek çalışmalara ışık tutacak bulgular elde edilmesi amaçlanmıştır. Bununla beraber bu çalışma, bugüne kadar yapılan incelemeler içinde *Tetrahymena thermophila* ile TiO₂ ve Fe₃O₄ nanoparçacıklarını inceleyen ilk çalışma olması nedeniyle önem taşımaktadır.

III.2 TOKSİSİTE TESTLERİ

III.2.1 Test Organizması

Test organizması olarak bu çalışmada, bir tür tatlı su protozoanı olan *Tetrahymena thermophila* (Strain II2B) seçilmiştir (Şekil III.4). Bu türün biyolojik sınıflandırılması aşağıdaki şekildedir:

Domain: Eukaryota
Regnum: Protista
Subregnum: Protozoa
Phylum: Ciliophora
Klass: Oligohymenophorea
Ordo: Hymenostomatida
Family: Tetrahymenidae
Genus: *Tetrahymena*
Species: *T. thermophila*



Şekil III.4 *Tetrahymena thermophila* (Kenny Stritter, Ciliate Image Database) [26]

Tetrahymena silli bir protozoan cinsidir. *Tetrahymena thermophila* genellikle göllerde, akarsularda, göletlerde yaşayan *Tetrahymena* türlerinden biridir. 30-50µm boyutlarındadır ve temelde mikroskop ile izlenebilir. Organel olarak; çekirdek, endoplazmik retikulum, ribozom, golgi aygıtı, mitokondri, lizozom, peroksizom, mikrotubuluslar ve filamentler bulundurur. Farklı işlevleri olan iki hücre çekirdeğine sahiptir. Büyük çekirdek somatik (fiziksel) işlevden, küçük çekirdek üremeden sorumludur. Hareket organelleri sillerdir. Beslenme şekli olarak fagositoz görülür. Boşaltım, ritmik olarak şişen ve küçülen kofullarla gerçekleşir. Çoğalmaları ise eşeysiz olarak bölünmeyle gerçekleşir. Bu türün sayısı, bölünmeyle ortalama iki saatte iki katına çıkmaktadır [27].

Tetrahymena thermophila'nın model organizma olarak seçilmesinde; laboratuvar koşullarında kolay kültüre edilebilmesi, çevresel değişikliklere gösterdiği duyarlılık ve besin zincirindeki (birincil tüketici) yeri etkili olmuştur. Mikro faunanın elemanlarından akuatik protozoan türleri; algler, bakteriler ve su kolonunda askıda bulunan çeşitli mineral ve organik maddelerle beslenmektedir. Aynı zamanda bu türler mikro boyuttaki sucul omurgasız canlıların besin kaynağıdır. Bu nedenle

akuatik protozoan türleri, nanoparçacıkların akuatik ekosistemlerdeki davranışları ve toksisitesi araştırılırken hedef grubu oluşturmaktadır [28].

III.2.2 Test Kimyasalları

Bu çalışmadaki ekotoksosite testlerinde kullanılan nano TiO_2 ortalama 5 nm boyutunda, küre şeklinde, anataz yapısındadır ve $200-220 \text{ m}^2/\text{g}$ lık yüzey alanına sahiptir. Diğer nanoparçacık Fe_3O_4 ise 20-30 nm büyüklüğünde, küre şeklindedir ve $60 \text{ m}^2/\text{g}$ dan daha büyük bir yüzey alanına sahiptir (Sigma-Aldrich) [29]. Bu nanotozların sıvı ortamda dağılımını sağlamak için doğal tamponlu çözelti kullanılması (yaklaşık pH 7) ve sonikasyon yöntemi önerilmektedir

III.2.2.1 Titanyum Dioksit (TiO_2) Nanotoz

Nano TiO_2 birçok uygulamada katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Saydamlaştırıcı özelliğinden boyalarda, mürekkeplerde, kağıtlarda, plastik ürünlerde, güneş kremleri ve çeşitli kozmetik ürünlerinde yararlanılmaktadır. Yüzey alanlarının ana moleküllere oranla daha geniş olması nedeniyle nanomalzemeler kullanıldıkları alanlarda var olan uygulamaların verimlerinin artmasını sağlamaktadırlar [30].

Nanoölçekteki titanyum dioksit (TiO_2) molekülleri morötesi ışınlar (dalga boyu 10 ile 400 nm arasındaki ışınım, UV) maruz kaldığı zaman reaktif hale gelmektedir. Morötesi ışınlar TiO_2 çarptığı zaman katalitik bir reaksiyon başlamaktadır. Nano TiO_2 molekülleri foto bozunumu hızlandırmakta ve bu reaksiyonla nitrojen oksitler gibi kirlilik yaratan organik moleküller yok olmaktadır. Fotokatalik özelliği dolayısıyla nano titanyum dioksit kullanımının önemi günümüzde artmaktadır. Örneğin, binaların dış cephelerinde kullanılan nano TiO_2 katkılı boyalar yüzeylere bakteri ve kirin yapışmasını önlemekte ve kirin yağmurla kolayca yıkanıp gitmesini sağlamaktadır. TiO_2 nanoparçacıkları çevre teknolojilerinde; atık suların ve yeraltı sularının işlenmesinde, benzotiofenin (C_8H_6S , benzothiophene) dizel yakıtlardan temizlenmesinde ve nitrojen oksit (NO), sülfür oksit (SO_2) gibi hava kirleticilerinin azaltılmasında başarılı olarak kullanılmaktadır [15].

III.2.2.2 Demir Oksit (Fe₃O₄) Nanotoz

Metal nanoparçacıklar boyutlarına bağlı olarak optikal, elektronik, magnetik ve kimyasal özellikleri dolayısıyla optoelektronik (fotonik) aletler, katalizörler ve biyosensör uygulamaları için beklenen verimi sağlamaktadırlar [3].

Demir oksit nanoparçacıklar; magnetik veri depolanmasında, rezonans görüntüleme (MRI) ve katalistlerde kullanılmaktadır. Çevresel alanda da karbon tetraklorit ile kirlenmiş yeraltı sularının arıtımında sıklıkla kullanıldığı görülmektedir. Bununla beraber kanser ilaçlarının ve radyoaktif materyallerin tümör hücrelere taşınımı gibi birçok biyomedikal uygulamada demir nanoparçacıklarından yararlanılmaktadır. Son zamanlarda demir oksit nanoparçacıkların polimerlerde, tekstil ürünlerinde, yakıt hücrelerinde ve nanoelektronik aletlerde kullanımını sağlayacak araştırmalar hız kazanmıştır [30].

III.2.3. Kültür Besiyerinin Hazırlanması

Tetrahymena thermophila kültürü için maya ekstraktı, glukoz ve mineral tuzlarla zenginleştirilmiş proteoz pepton bazlı medyum kullanılmıştır (PPY medium, Plesner et al. 1964).

Kültürün çoğalması ya da kültüre nanoparçacıkların eklenmesi esnasında medyumdaki pH değişimini önlemek için pH 7.2 olarak ayarlanır.

Medyumun yapısını oluşturan organik ve inorganik bileşenler aşağıda belirtilen oranlarda bir araya getirilir.

1. Organik bileşenleri;

- a. 0.7 g/L maya ekstraktı (Merck)
- b. 3.5 g/L glukoz (Merck)
- c. 3.5 g/L proteoz pepton (Merck) oluşturmaktadır.

2. İnorganik bileşenler;

50 mg/L CaCl ₂ .2H ₂ O	100x konsantrasyonda eklenmiştir.
5 mg/L CuCl ₂ .2H ₂ O	Tuz çözeltisi 1
1.25 mg/L FeCl ₃ .6H ₂ O	

100 mg/L MgSO ₄ .7H ₂ O	100x konsantrasyonda eklenmiştir.
25 mg/L Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	Tuz çözeltisi 2
0.5 mg/L MnCl ₂ .4H ₂ O	
0.5 mg/L ZnCl ₂	

(Sigma veya Merck kalitesinde)

3. Tampon çözeltisi olarak 2.093 g/L Mops [3-N-(Morpholino) Propanosülfonic Acid] kullanılmıştır.

Tuz çözeltilerinin hazırlanması:

Tuz çözeltisi 1:

- a. 50 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılır ve 8.75 mL H_2O içinde çözülür (solüsyon a).
- b. 50 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılır ve 10 mL H_2O içinde çözülür (solüsyon b).
- c. 50 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılır ve 10 mL H_2O içinde çözülür (solüsyon c).

Çözelti a'ya 1 mL solüsyon b'den ve 0.25 mL solüsyon c'den eklenir.

Tuz çözeltisi 2:

- d. 100 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 25 mg $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılır ve 9.725 mL H_2O içinde çözülür (solüsyon d).
- e. 20 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tartılır ve 10 mL H_2O içinde çözülür (solüsyon e).
- f. 20 mg ZnCl_2 tartılır ve 10 mL H_2O içinde çözülür (solüsyon f).

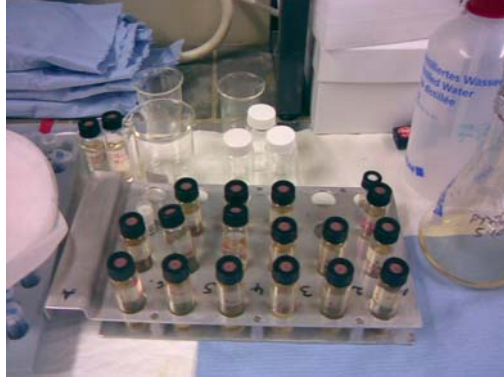
Çözelti d'ye 0.25 mL solüsyon e'den ve 0.025 mL çözelti f'den eklenir.

Medyum standart işlem prosedürüne bağlı kalınarak aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

Organik bileşenler belirtilen ölçülerde tartılır. Deiyonize su ile dereceli beherin 9/10 u doldurulur. Organik bileşikler bu beherin içinde magnetik karıştırıcı üzerinde çözdürülür. Tuz çözeltileri 1 ve 2 den 10 ar mL eklenir. Biyolojik tampon çözeltisi de behere eklendikten sonra pH metre yardımıyla pH 7.2 ye ayarlanır. Hacim deiyonize suyla son hacmine tamamlanır. Elde edilen bu karışım 300 mL lik erlenmayerlere her birinde 40 mL medyum olacak şekilde paylaşılır. Erlenmayerler 20 dakika süreyle otoklavda sterilize edilir. Steril medyumlar +4 °C de karanlık bir ortamda muhafaza edilir.

III.2.3.1 Deneysel Stok Kültürlerin Hazırlanması

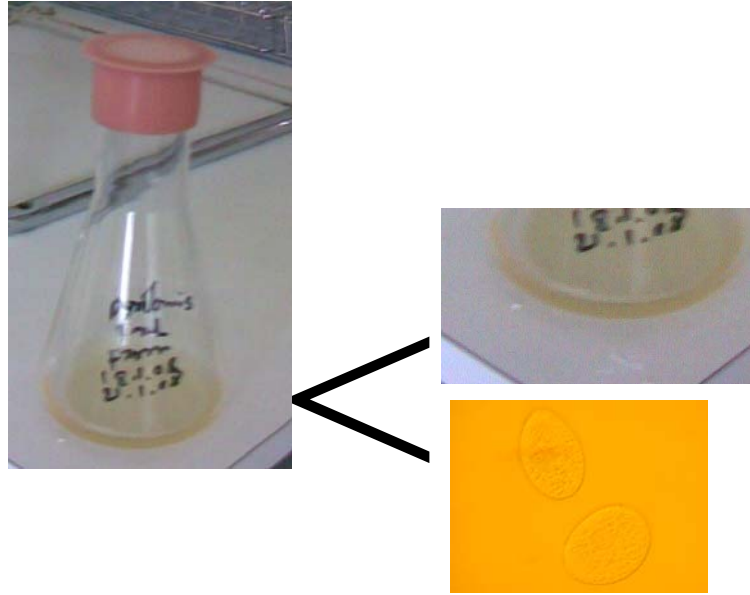
Bu kültürler uzun süreli kültürler olarak bilinir. Stok kültürler vidalı kapaklı 10 mL lik cam şişelerde hazırlanır. Her şişeye bir adet nohut ve 10 mL deiyonize su eklendikten sonra bir gece +4 °C de bekletilir ve ertesi gün 20 dakika otoklavda sterilizasyon işlemi gerçekleştirilir. Daha sonra her bir şişeye 100 µL *Tetrahymena* kültürü eklenir. Kültür bu şekilde uzun süre oda sıcaklığında saklanabilmektedir (Şekil III.5).



Şekil III.5 *Tetrahymena thermophila* stok kültürleri

III.2.3.2 Deney Ön Kültürlerinin Hazırlanması

Yürütülecek deneylerde hızlı çoğalan (logaritmik olarak) kültürlere ihtiyaç duyulur. Bunun için steril koşullarda stok kültürdeki hücrelerden 400 µL alınır ve daha önceden hazırlanan 300 mL lik erlenmayerdeki PPY medyum içine ekilir (Şekil III.6). Yeteri miktarda oksijen geçişine elverişli kapaklarla kapatılan erlenmayerler 24 °C de 24 saat süreyle inkübe edilir. Deneylerde kullanılacak kültürler testten bir gün önce hazırlanır.



Şekil III.6 Erlenmayer içerisindeki *Tetrahymena thermophila* kültürü

III.2.4 Deney Çözeltilerinin Hazırlanması

Deneylerde kullanılmak üzere PPY medyum içerisinde 1000 ppm nano TiO₂ (<25 nm), 1000 ppm nano Fe₃O₄ (<50nm) ve 200 ppm K₂Cr₂O₇ (Sigma Aldrich-Munich Germany) değerlerinde stok çözeltiler hazırlanır. Stok çözeltiler

nanoparçacıkların dağılımını sağlamak için deneylerden önce ultrasonik banyoda 30 d bekletilir.

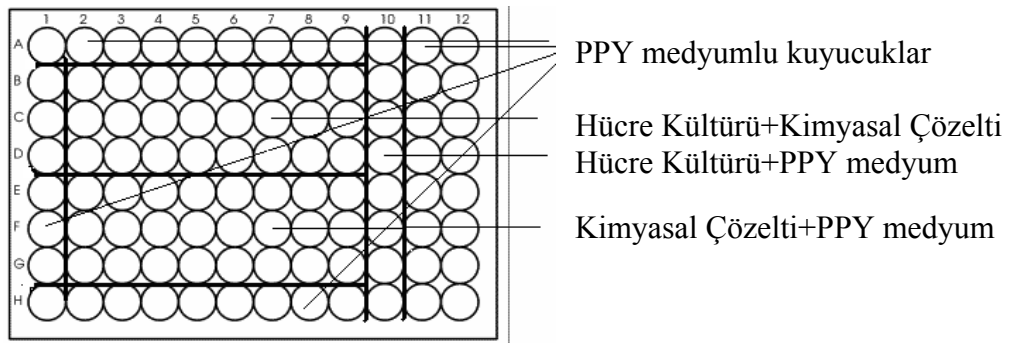
Steril koşullarda stok çözeltiler PPY medyum ile 1:2 oranında seyreltilerek 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 mg/L konsantrasyonlarda seriler hazırlanır.

III.2.5 Toksikite Testleri için Well-Plate'lerin Hazırlanması

Bu çalışmada; *Tetrahymena thermophila* kültürü 96 well-plate'te, sekiz farklı konsantrasyonda hazırlanan nano TiO_2 ve nano Fe_3O_4 çözeltilerine maruz bırakılmıştır.

96 well-plate'te her birinin hacmi 250 μ L olan 96 kuyucuk vardır. Kuyucuklar dikeyde sekiz sıra yatayda 12 sıra olacak şekilde yerleştirilmiştir.

Şekil III.7 de gösterildiği üzere well-plate'lerdeki paralel üç kolon 200 μ L kimyasal çözelti ve 50 μ L PPY medyum, diğer paralel üç kolon 200 μ L kimyasal çözelti (test grubu 2) ve 50 μ L *Tetrahymena thermophila* kültürü (test grubu 2) ile doldurulur. Bu kolonlara paralel bir kolona 200 μ L medyum, 50 μ L *Tetrahymena thermophila* kültürü (kontrol grubu) ve geri kalan kuyucuklara 250 μ L PPY medyum eklenerek örnekler testler için hazırlanır.



Şekil III.7 Well-plate'lerin deneyler için düzenlenmesi

Well-platelerdeki hücre yoğunlukları, inkübatöre yerleştirilmeden önce (T_0) ve 30 °C ye ayarlanan inkübatörde 24 (T_1) ve 48 (T_2) saatlik inkübasyonun ardından, spektrofotometrede (Spectra III, SLT, Austria) 550 nm dalga boyunda ölçülür.

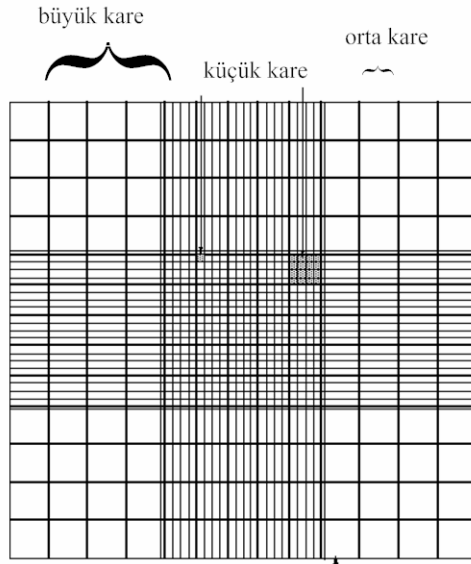
III.3 ÖLÇÜMLER VE ANALİTİK HESAPLAMALAR

III.3.1 Etkin Hücrenin Hesaplanması

Etkin hücre değerleri kontrol ve test gruplarında her bir konsantrasyon için ayrı ayrı hesaplanır. Bu değerler, kimyasal çözelti ve hücrelerin bulunduğu test grubu 2 den elde edilen OD değerlerinden aynı konsantrasyonda test grubu 1 den (sadece kimyasalın bulunduğu) elde edilen OD değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanır. Kontrol grubunda ise hücreli örneklerden elde edilen OD değerlerinden PPY medyumlu kuyucuklarda okunan OD değerlerinin çıkarılması etkin hücre değerini verir. Test grubunun ve kontrol grubunun biyokütle miktarları hesaplanırken bu değerler kullanılır.

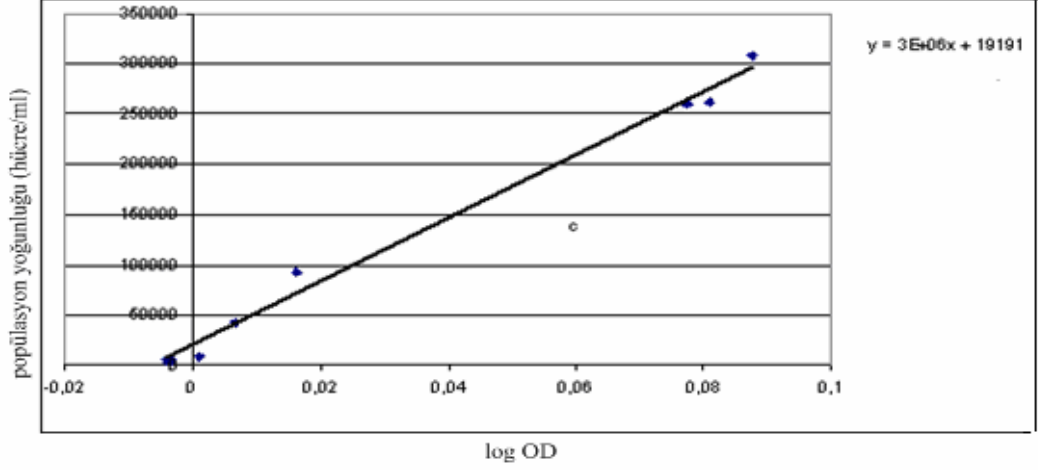
III.3.2 Biyokütlenin Hesaplanması

Biyokütle değerleri, ortalama büyüme oranının ve yüzde büyüme inhibisyonunun hesaplanmasında kullanılmaktadır. Kontrol grubunun spektrofotometrede okunan OD değerleri ile mikroskop altında hemositometre (counting chamber) (Şekil III.8) kullanılarak hesaplanan hücre yoğunlukları arasında bağlantı kurularak bir grafik elde edilir (Şekil III.9). Böylece etkin hücre değerleri (OD verileri) güvenilir bir şekilde biyokütle değerlerine çevrilir.



Hemositometrede dokuz büyük kare vardır.
Her bir büyük kare 16 orta kareden oluşur.
Her bir orta karede ise 25 küçük kare vardır.
Küçük karelerin alanı 0.0025 mm^2 dir.
Bir büyük karede;
 $25 \times 16 = 400$ küçük kare vardır.
Büyük karenin alanı;
 $400 \times 0.0025 \text{ mm}^2 = 1 \text{ mm}^2$ dir.
Büyük karenin hacmi ise;
 $1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3 = 0.1 \mu\text{L}$ dir.

Şekil III.8 *Tetrahymena* hücrelerini mikroskop altında saymak için kullanılan hemositometre



Şekil III.9 OD değerlerini biyokütle değerlerine çevirmek için oluşturulan kalibrasyon eğrisi

Testler için hazırlanan well-plate'lerdeki örneklerden 15 µl alınıp hemositometreye (Neubauer hemocytometer) yüklenmiş ve hücreler mikroskop altında sayılmıştır. Aşağıdaki Denklem III.1 kullanılarak hücre konsantrasyonu hesaplanmıştır.

Hücre konsantrasyonu = hücre sayısı/mL

$$\text{Hücre konsantrasyonu} = \frac{\text{büyük karedeki hücre sayısı} \times 10^4}{1 \text{ mL}} \times \text{seyreltme oranı}$$

(Denklem III.1)

III.3.3 Ortalama Büyüme Oranlarının Hesaplanması

Belirli bir zaman aralığında biyokütlerdeki logaritmik artış ortalama büyüme oranı olarak adlandırılmaktadır. Yürütülen testlerde her bir test ve kontrol örneği için aşağıda verilen Denklem III.2 ile ortalama büyüme oranları hesaplanır (OECD 201 talimatından yararlanılmıştır).

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$$

μ_{i-j} ; ortalama büyüme oranı

X_i ; i süresindeki biyokütle

X_j ; j süresindeki biyokütle oranı

(Denklem III.2)

III.3.4 Büyüme İnhibisyonu

Çalışmadaki her bir örnek için ayrı ayrı büyüme inhibisyon değerleri Denklem III.3 kullanılarak elde edilir.

$$\%Ir = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

% I_r; ortalama büyüme oranındaki yüzde inhibisyon

μ_c; kontrol gurubundaki ortalama büyüme oranı

μ_t; test grubu için ortalama büyüme oranı

(Denklem III.3)

III.4 HÜCRELERİN GÖRÜNTÜLENMESİ

İnkübasyona bırakılmadan önce (T₀) ve 48 saatlik (T₂) inkübasyondan sonra well-plate'lerden alınan organizmalı örnekler %10'luk formaldehit (1:1 v/v) eklenerek hücre kültürü hareketsiz hale getirilir ve lama alınarak mikroskop altında incelenir. Sadece nanoparçacıkların bulunduğu örnekler ise doğrudan lama alınarak mikroskop altında incelenir.

BÖLÜM IV.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

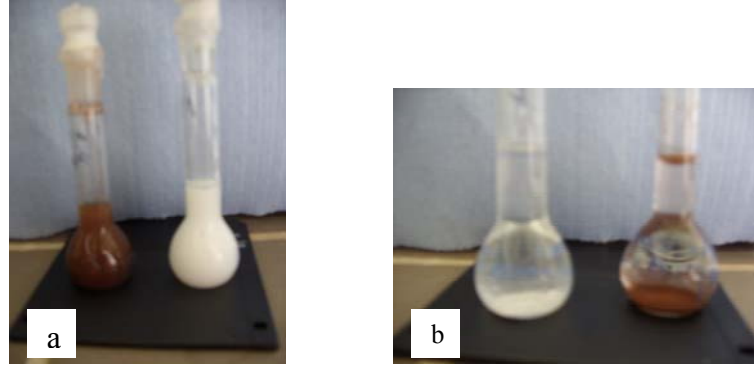
IV.1 SONUÇLAR

IV.1.1 Nanoparçacıkların Ekotoksikolojisi

TiO₂ ve Fe₃O₄ nanotozlarının *Tetrahymena thermophila* üzerinde uygulanan yüksek konsantrasyonlarında (50-400 ppm) inhibisyon değerleri tespit edilemezken, nano TiO₂ 25 ppm ve altı konsantrasyonlarda (25, 12.5, 6.25, 3.12 ppm), nano Fe₃O₄ 12.5 ppm ve altı konsantrasyonlarda (12.5, 6.25, 3.12) inhibisyona neden olmuştur (Şekil IV.4, Şekil IV.5). Testlerde kullanılan nanotozların suda çözünürlüklerinin düşük olması ve kümelenme durumu nedeniyle gösterdikleri bulanık yapı neticesinde OD ölçümünde elde edilen sonuçlar ile bir doz-cevap eğrisi oluşturulamamıştır.

IV.1.1.1 Nanoparçacıkların Çözünürlükleri

TiO₂ ve Fe₃O₄ nanotozlarının suda çözünürlüklerinin düşük olması nedeniyle test çözeltileri sonikasyon banyosunda tutularak nanoparçacıkların çözelti içinde dağılımı sağlanmıştır. 30 d'lık sonikasyonun ardından nanoparçacık çözeltileri bulanık bir yapı göstermişlerdir. Şekil VI.1 de görüldüğü gibi çözeltilerin kararlı yapıda olmaması nedeniyle 24 saat içinde parçacıklar tortular oluşturarak dibe çökmüşlerdir.



Şekil IV.1 Nanoparçacık çözeltileri;
(a) sonikasyon banyosundan hemen sonra, (b) 24 saat geçtikten sonra

IV.1.1.2 Optik Yoğunluk Değerleri

TiO₂ ve Fe₃O₄ nanoparçacıkları ve *T. thermophila* ile well-plate'lerde yürütülen toksisite testlerinde başlangıçta (T₀), 24. saat (T₁) ve 48. saat (T₂) sonunda elde edilen ortalama OD değerleri aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo IV.1 TiO₂ nanoparçacıklı örneklerden T₀-T₂'de elde edilen ortalama OD değerleri

Kons. mg/L		TiO ₂ +PPY OD Değerleri (Test grup I)			TiO ₂ + PPY+Hücre OD Değerleri (Test grup II)		
		T ₀	T ₁	T ₂	T ₀	T ₁	T ₂
C ₁	400	2,01	1,82	1,79	2,03	1,33	1,00
C ₂	200	1,42	1,33	1,30	1,24	0,54	0,65
C ₃	100	0,87	0,64	0,59	0,71	0,30	0,51
C ₄	50	0,43	0,30	0,27	0,43	0,24	0,41
C ₅	25	0,28	0,20	0,18	0,29	0,22	0,40
C ₆	12,50	0,19	0,14	0,13	0,20	0,21	0,42
C ₇	6,25	0,14	0,12	0,11	0,15	0,20	0,40
C ₈	3,125	0,12	0,11	0,10	0,13	0,19	0,40

Tablo IV.2 Fe₃O₄ nanoparçacıklı örneklerden T₀-T₂'de elde edilen ortalama OD değerleri

Kons. mg/L		Fe ₃ O ₄ +PPY OD Değerleri (Test grup I)			Fe ₃ O ₄ +PPY+Hücre OD Değerleri (Test grup II)		
		T ₀	T ₁	T ₂	T ₀	T ₁	T ₂
C ₁	400	2,57	2,52	2,53	0,44	0,59	0,69
C ₂	200	1,34	1,36	1,42	0,39	0,43	0,49
C ₃	100	0,73	0,74	0,81	0,38	0,45	0,48
C ₄	50	0,46	0,45	0,45	0,33	0,43	0,43
C ₅	25	0,28	0,27	0,27	0,27	0,37	0,40
C ₆	12,50	0,20	0,19	0,19	0,26	0,39	0,39
C ₇	6,25	0,16	0,15	0,14	0,26	0,40	0,41
C ₈	3,125	0,14	0,13	0,13	0,24	0,37	0,38

Nano TiO₂ ve nano Fe₃O₄ ile yürütülen testlerde Tablo IV.1 ve Tablo IV.2 deki verilere göre, test grubu I örneklerinde T₀-T₂'de 400-3.125 ppm konsantrasyon aralığında OD değerlerinin konsantrasyonla orantılı olarak düştüğü görülmektedir. Test grubu II de ise uygulanan konsantrasyonlardaki değişim ile elde edilen OD değerleri arasında düzenli bir ilişki yoktur. Test kimyasallarının kümelenmesi, dibe çökmesi ya da biyokütlede meydana getirdiği değişim gibi çeşitli nedenlere bağlı olarak OD değerleri farklılık göstermiştir.

Tablo IV.3 Kontrol grubunda (*T. Thermophila*) T₀-T₂'de elde edilen ortalama OD değerleri

T ₀ (başlangıç)	T ₁ (24. saat)	T ₂ (48. saat)
0,08	0,18	0,38
Blank		0,08

Testlerde kontrol grubunda, *T.thermophila* populasyonunda; T₀'da düşük OD değerleri elde edilirken, T₁ ve T₂ de hücrelerin hacimlerinin artmasına ve populasyonun üremesine bağlı olarak OD değerleri yükselmiştir.

IV.1.1.3 *T. Thermophila* Organik Kütle ve Ortalama Büyüme Oranları

TiO₂ ve Fe₃O₄ nanoparçacıkları ve *T. thermophila* ile yürütülen toksisite testlerinden elde edilen ortalama büyüme oranları ve % inhibisyon değerleri aşağıdaki tablolarda toplanmıştır.

Tablo IV.4 Kontrol grubunda (*T. Thermophila*) ortalama büyüme oranı

Zaman	Organik kütle (Biomass)	Büyüme Oranı (Growth rate)
T ₀ (başlangıç)	20091	2,81
T ₁ (24. saat)	332091	0,97
T ₂ (48. saat)	876191	1,888

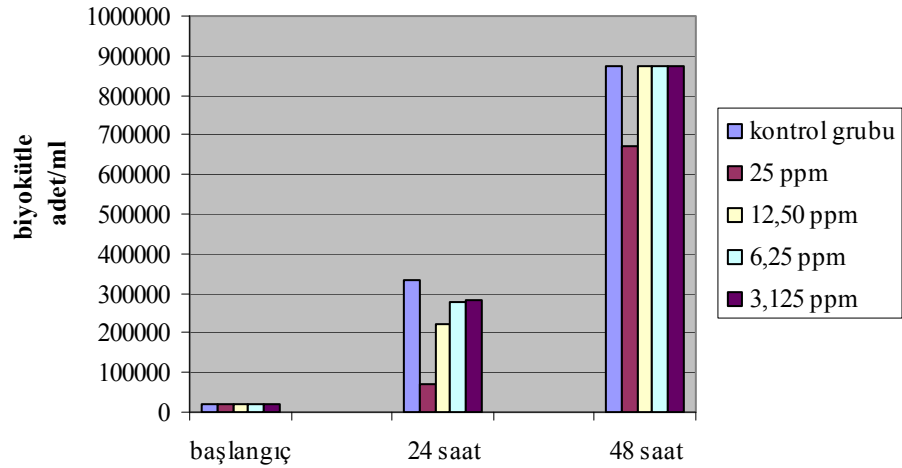
Tablo IV.5 Nano TiO₂ ile yürütülen toksisite testlerinden 24 (T₁) saatte elde edilen organik kütle, ortalama büyüme oranı ve % inhibisyon değerleri

Kons. mg/L		Organik kütle (Biomass)	Büyüme Oranı (Growth rate)	İnhibisyon
C ₁	400	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>
C ₂	200	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>
C ₃	100	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>
C ₄	50	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>
C ₅	25	68591	2,28	96,28
C ₆	12,50	223591	1,36	60,67
C ₇	6,25	275791	1,15	47,81
C ₈	3,125	281391	1,18	38,97

Tablo IV.6 Nano TiO₂ ile yürütülen toksisite testlerinden 48 saatte (T₂) elde edilen organik kütle, ortalama büyüme oranı ve % inhibisyon değerleri

Kons. mg/L		Organik kütle (Biomass)	Büyüme Oranı (Growth rate)	İnhibisyon
C ₁	400	tespit edilememiştir	tespit edilememiştir	tespit edilememiştir
C ₂	200	tespit edilememiştir	tespit edilememiştir	tespit edilememiştir
C ₃	100	tespit edilememiştir	tespit edilememiştir	tespit edilememiştir
C ₄	50	422191	2,86	tespit edilememiştir
C ₅	25	671591	1,19	36,80
C ₆	12,50	871591	1,23	34,74
C ₇	6,25	872191	1,31	30,72
C ₈	3,125	914191	1,45	23,44

Nano TiO₂ için 25 ppm konsantrasyona kadar uygulanan dozlarda *T. thermophila*'da 24. saat ve 48. saat için organik kütle, ortalama büyüme oranı ve % inhibisyon değerleri hesaplanamamıştır (Tablo IV.5 ve Tablo IV.6). Nanoparçacıkların test örneklerinde göstermiş olduğu kümelenme ve çökme neticesinde ortaya çıkan bulanıklık nedeniyle OD ölçümlerinin etkilenmesinin bu duruma yol açmış olabileceği düşünülmektedir.



Şekil IV.2 *T. Thermophila*'da nano TiO₂ ile maruziyet sonunda 24. saat ve 48. saat sonunda organik kütledeki değişim (Tablo IV.5 ve Tablo IV.6 verileri kullanılmıştır.)

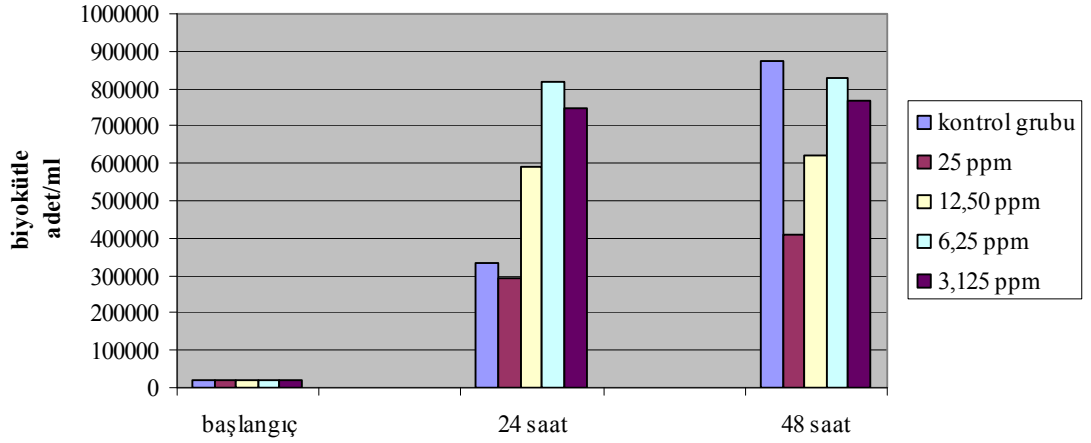
24 saatte, 25 ppm konsantrasyonda nano TiO₂ organik küttele en yüksek düşüğe neden olmuştur. 48 saatin sonunda ise yine 25 ppm de en düşük organik kütle değeri görülmektedir. 25 ppm den düşük konsantrasyonlarda birbirine yakın değerler elde edilmiştir (Şekil IV.2).

Tablo IV.7 Nano Fe₃O₄ ile yürütülen toksisite testlerinden 24. saatte (T₁) elde edilen ortalama organik kütle, ortalama büyüme oranı ve % inhibisyon değerleri

Kons. mg/L		Organik kütle (Biomass)	Büyüme Oranı (Growth rate)	İnhibisyon
C ₁	400	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>
C ₂	200	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>
C ₃	100	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>
C ₄	50	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>
C ₅	25	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>
C ₆	12,50	588691	0,05	94,21
C ₇	6,25	820191	0,01	86,67
C ₈	3,12	749691	0,03	90,35

Tablo IV.8 Nano Fe₃O₄ ile yürütülen toksisite testlerinden 48. saatte elde edilen ortalama organik kütle, ortalama büyüme oranı ve % inhibisyon değerleri

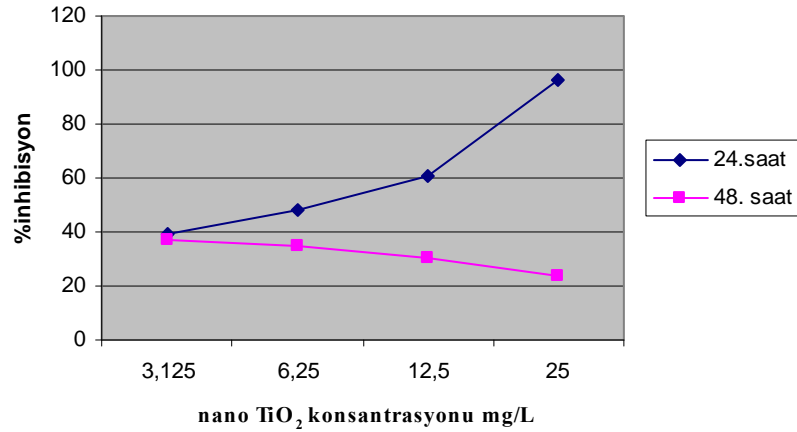
Kons. mg/L		Organik kütle (Biomass)	Büyüme Oranı (Growth rate)	İnhibisyon
C ₁	400	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>
C ₂	200	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>
C ₃	100	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>
C ₄	50	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>
C ₅	25	409191	<i>tespit edilememiştir</i>	<i>tespit edilememiştir</i>
C ₆	12,50	619191	0,57	69,96
C ₇	6,25	829191	0,48	74,71
C ₈	3,125	769191	0,44	76,70



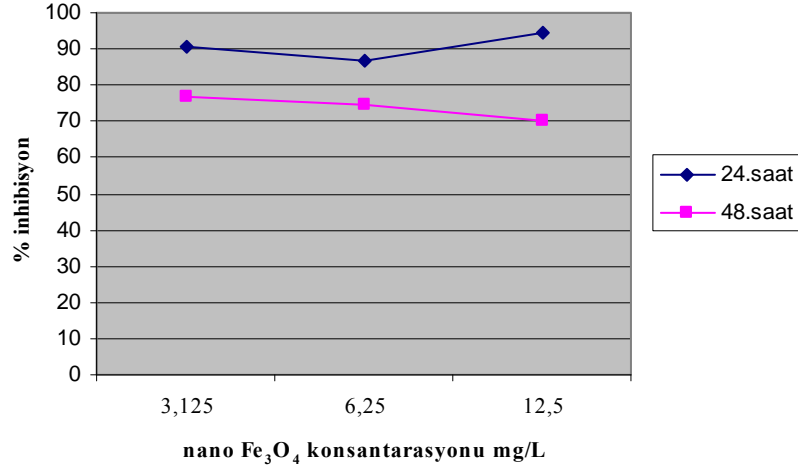
Şekil IV.3 *T. Thermophila*'da nano Fe₃O₄ ile maruziyet sonunda 24 saat ve 48 saatin ardından organik kütledeki değişim (Tablo IV.7 ve Tablo IV.8 verileri kullanılmıştır.)

24 saatte kontrol grubundaki nano Fe₃O₄'ün 25 ppm konsantrasyonda organik kütlede en yüksek düşüşe neden olduğu görülmektedir. 48 saatin ardından yine 25 ppm konsantrasyonda en düşük organik kütle değeri görülmektedir. 25 ppm den düşük konsantrasyonlarda ise birbirine yakın değerler elde edilmiştir.

IV.1.1.4 İnhibisyon Değerleri



Şekil IV.4 Nano TiO₂ ile maruziyetten sonra elde edilen inhibisyon değerleri (Tablo IV.5 ve Tablo IV.6 verileri kullanılmıştır.)

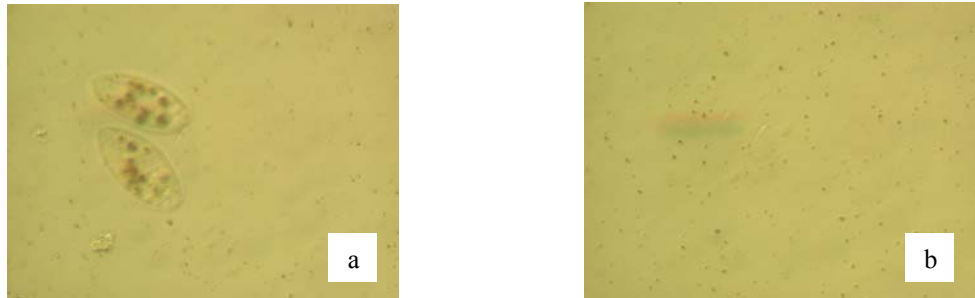


Şekil IV.5 Nano Fe₃O₄ ile maruziyetten sonra elde edilen inhibisyon değerleri (Tablo IV.7 ve Tablo IV.8 verileri kullanılmıştır.)

IV.1.2 Görüntü Analizleri

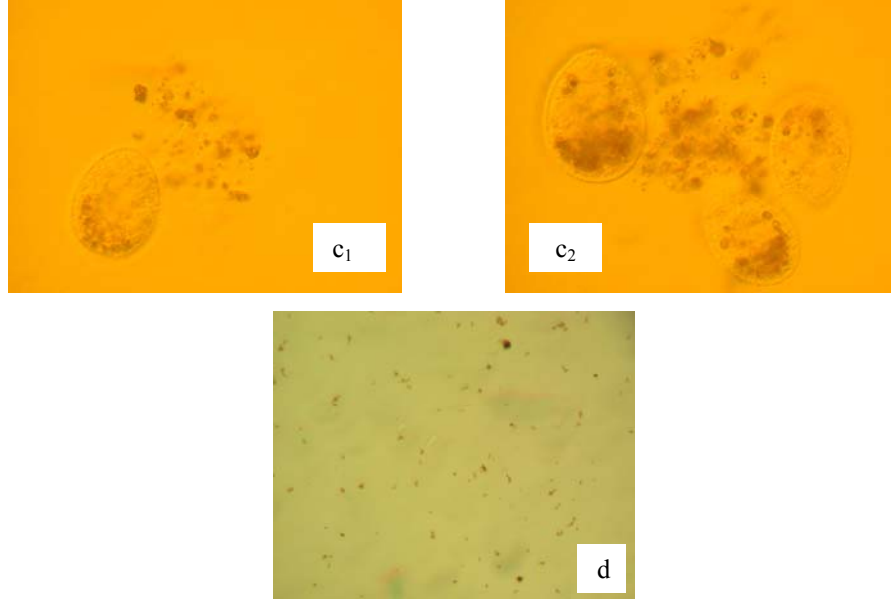
Mikroskopik çalışmalar ile testler için hazırlanan nanoparçacık çözeltilerinin parçacık yapısı incelenmiş, nanoparçacıkların solüsyonlarında, çeşitli büyüklükte parçacıkların olduğu ve bu parçacıkların zamanla kendi aralarında kümelenerek daha büyük yapıları oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmada önemli sonuçlardan bir tanesi *Tetrahymena thermophila* hücreleriyle nanoparçacıklar arasındaki etkileşim mikroskop altında incelendiğinde elde edilmiştir. Nanoparçacıklara maruz bırakılan *Tetrahymena thermophila* hücrelerinin nanoparçacıkları bünyelerine aldıktan sonra bu parçacıkları hücre içinde sindirmeden dış ortama daha büyük parçacıklar halinde geri verdikleri gözlenmiştir (Şekil IV.7). *Tetrahymena thermophila* hücrelerinin nanoparçacıkların kümelenmesinde ve sedimentasyonunda hızlandırıcı etkisi olduğu görüntü analizleriyle ortaya çıkmıştır.



Şekil IV.6 Maruziyetten bir saat sonra; (a) nanoparçacıklara maruz bırakılmış *T. thermophila* hücreleri ve (b) PPY medyum içinde nanoparçacıklar

Bir saat içinde hücrelerin nanoparçacıkları bünyelerine aldıkları (a), serbest nanoparçacıkların ise test medyumunda kümelenmeye başladığı (b) görülmektedir (Şekil IV.6).



Şekil IV.7 Maruziyetten 48 saat sonra; (c₁, c₂)*T. thermophila* hücreleri (d) PPY içinde nanoparçacıklar

48 saat sonunda hücrelerin sindiremeden dışarıya attıkları nanoparçacık boyutlarının (c₁, c₂) test medyumunda kümelenen nanoparçacık boyutlarından (d) daha büyük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil IV.7).

IV.2 TARTIŞMA

Her iki nanoparçacık için de yüksek konsantrasyonlarda (50-400 ppm) toksisitenin elde edilememesinde nanoparçacıkların kümelenme durumu önemli bir etkidir. Kümelenme durumu parçacık konsantrasyonunun çözültide artmasıyla beraber daha kolay ortaya çıkar. Nanoparçacıkların PPY besiyerinde homojen dağılımının gerçekleşmemesi, nanoparçacıkların kümelenmeleri ve nanoparçacık kümelerinin çökelmeleri test medyumundaki serbest halde bulunan nanoparçacıkların zamanla azalmasına neden olmuştur. Bu durum da hücrelerin nanoparçacıklara temasını zorlaştırmış ve maruziyetini etkilemiştir.

Bu çalışmada testlerde kullanılan nano TiO₂ ve nano Fe₃O₄ parçacıkları suda çözünmezler. PPY medyumda (pH 7) hazırlanan nanotoz çözülteleri sonikasyonun ardından homojen bir yapı kazanmıştır. Fakat test ölçümlerinin devam ettiği süre (48

saat) zarfında çözeltilerin koloidal bir yapı aldığı ve katı fazdaki materyalin kümelenerek sıvı fazdan zamanla ayrıldığı gözlemlenmiştir.

Kümelenmenin ardından parçacıklar nanoboyutlarını kaybetmektedir. Bu durum da doz-cevap ilişkisini etkilemektedir [1]. Nanoparçacıkların test çözeltisi içinde iyi bir şekilde dağılımını sağlamak için genel olarak üç farklı metot kullanılmaktadır; kimyasal çözücü kullanımı, sonikasyon ile çözme ve uzun süre karıştırma ile çözme. Her üç metodun da test düzeni için yararlı ve sakıncalı yönleri bulunmaktadır [1].

Nanoparçacık çözeltileri testlerde, organik bir çözücü olan tetrahidrofur (THF) kullanılarak hazırlanır ve ardından buharlaştırılıp ortamdaki uzaklaştırılır [32]. Süzme ve buharlaştırma işlemlerinden geçse bile THF'nin, nanoparçacıkların kümeleri arasında sıkışma durumu söz konusu olabilir ve THF ortamdaki tamamen uzaklaştırılamayabilir [33]. Bu durum testin sonucu üzerinde etkili olabilir [5]. Karıştırarak çözme ve sonikasyon ile çözme yöntemlerinin avantajı ise test sistemine dışarıdan kimyasal bir maddenin müdahalesinin olmamasıdır. *Daphnia magna*'nın THF'de çözme yöntemi ve karıştırarak çözme (water-stirring solubilization) yöntemiyle ayrı ayrı hazırlanan C₆₀ nanoparçacıklarıyla teması neticesinde, THF'de çözünerek hazırlanan C₆₀ nanoparçacıklarının suda karıştırma metoduyla hazırlananlardan daha yüksek ölüm oranına neden olduğu görülmüştür [34]. C₆₀ ve *Pimephales promelas* (fathead minnow) ile yürütülen bir başka çalışmada ise THF ile hazırlanan nanoparçacıklara 6-18 saat maruz bırakılan organizmalarda ölüm oranı %100 tespit edilirken suda karıştırma yöntemiyle hazırlanan nanoparçacıkların organizmalar üzerinde aynı süre zarfında olumsuz bir etki oluşturmadığı görülmüştür [33].

Yapılan çalışmalarda THF'de hazırlanan parçacıkların daha yüksek toksik etki göstermesinin, nanoparçacıkların ortamda daha iyi dağılım göstermesi mi yoksa THF'nin kendisinin toksik olmasından kaynaklanan bir durum mu olduğu konusunda net bir sonuca ulaşılamamıştır. Bu nedenle THF yöntemi bu çalışmada tercih edilmemiştir. Test sistemine dışarıdan kimyasal bir maddenin eklenmesine gerek duyulmadan, kısa sürede (birkaç dakika ya da birkaç saat) örneklerin hazırlanmasına olanak tanıdığı için bu çalışmada sonikasyon yöntemi tercih edilmiştir.

Çalışmada yüzey alanları farklı olan metal nanotozlar kullanılmıştır. Şekil IV.4 ve Şekil IV.5 te görüldüğü üzere, *Thetrahymena thermophila* üzerinde aynı konsantrasyonlarda nano TiO₂, nano Fe₃O₄'e göre daha düşük inhibisyona neden

olmuştur. Nanomalzemelerin yüzey alanı; kümelenme durumunu aynı zamanda nanoparçacıkların çevredeki davranışlarını ve diğer kirleticilerle muhtemel etkileşimlerini etkileyen önemli bir özelliktir. [35].

Nanoparçacıkların kümelenme durumunda test organizması *Tetrahymena thermophila*'nın da etkili olduğu düşünülebilir. Test organizması *Tetrahymena thermophila*'nın fiziksel zarara uğramaması için well-plate'ler hazırlandıktan sonra çalkalanmadan inkübatöre yerleştirilmiştir ve inkübasyon periyodu boyunca çalkalanmamıştır. Bu durum koloidal yapıdaki nanoparçacık kümelerinin zamanla çökmesine ve organizmalarla temasının kısıtlanmasına neden olmuş olabilir. *Tetrahymena thermophila* hücreleri silleri ile hareket edebildikleri için çökelmezler bu nedenle çökelmiş nanoparçacıklar ile temasları azalır. *Tetrahymena* silleri ile suda akım oluşturarak ortamdaki maddelerin fagositoz ile hücre içine alınmalarına yardımcı olur. Maddelerin belirli bir büyüklükte olmaları hücre içine alınmaları için yeterlidir. Bu türün başka bir seçici mekanizması bulunmamaktadır [36]. Görüntü analizlerinde *Tetrahymena thermophila* hücrelerinin nanoparçacıkları hücre içine aldıktan sonra vakuolde sindirime uğratamadığı ve bu maddeleri daha büyük boyutlarda kümeler halinde hücre dışına verdiği görülmüştür. Bu durum test ortamında daha büyük formlarda nanoparçacık kümelerinin oluşmasına neden olmuştur.

BÖLÜM V.

DEĞERLENDİRMELER VE ÖNERİLER

Günümüzde nanoteknoloji dünya çapında ekonomik büyümede, sağlık sektöründe ve üretim teknolojilerinin geliştirilmesinde büyük 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.

Bir maddeyi tehlikeli olarak tanımlayabilmek için o maddenin sadece toksisitesini belirlemek yeterli değildir. Maddenin maruziyeti ya da organizmalarla olası temas yolları hakkında bilgiye de ihtiyaç vardır. Nanoparçacıkların ekotoksikolojisi hakkındaki bilginin yetersiz oluşu gelecekte karşı karşıya kalınacak problemlerin çözümünü zorlaştıracaktır. Bu nedenle nanoparçacıkların ekosistemlerdeki davranışları, ortamlarda izleyecekleri yollar ve organizmalar üzerindeki etkilerini araştırabilmek için günümüzde yaygın olarak çeşitli kimyasallar için kullanılan bir takım toksikolojik ve ekotoksikolojik test metotlarının dışında yeni yöntemler geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Nanoparçacıkların ekosistemlerde izleyecekleri yolların tanımlanmasında ve etkilerinin saptanmasında kümelenme durumlarına açıklık getirilmesi öncelikli olarak ele alınmalıdır. İleride yapılacak çalışmalarda nanoparçacıkların koloidal çözeltilerinin doğal ekosistemlerde gösterecekleri kararlılığın ve kümelenme üzerinde organik maddenin (humik asit gibi) etkisinin araştırılması için yüzey suyu örneklerinden yararlanılabilir. Bunun yanı sıra parçacıkların kümelenmelerinin ardından nano boyutlarını koruyup korumadıkları ve kümelenen parçacıkların sedimente taşınıp burada yaşayan canlılarla etkileşimleri konularına açıklık getirecek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Ayrıca maruziyet süresini artırarak gerçekleştirilecek deneylerle canlıların uzun vadede davranışlarındaki değişikliklerin incelenmesi de nanoparçacıkların akuatik ekosistemler üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılmasında önemli bulgular sağlayabilir. Bu çalışmada; seçilen iki metal oksit (TiO_2 , Fe_3O_4) nanotozun tek bir canlı türü üzerindeki büyüme inhibisyonunun ve etki konsantrasyonunun

araştırılmasına yönelik akut (24-48 saat) testler uygulanmıştır. Oysaki av-avcı ilişkisi içinde olan canlılarla yürütülecek kronik testler vasıtasıyla uzun vadede nanoparçacıkların izleyeceği yollar ve besin zincirinde oluşturacağı etkilerin araştırılması ekotoksikolojik çalışmalara ışık tutabilir. Çünkü nanoparçacıkların akuatik organizmalar üzerinde subletal ve kronik etkilerini araştıran çok fazla çalışma bulunmamaktadır [40, 41].

Nanoparçacıkların ekosistemler üzerindeki etkilerini tartışmak için uluslararası kuruluşların düzenlediği birçok kongre ve toplantılar bulunmaktadır. Türkiye’de ise nanoparçacıkların ekotoksikolojisi konusu gözden kaçmaktadır. lke genelinde bu konu üzerinde çalışmalara hızla başlanması ve konuya gereken önemin gösterilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Crane, M.; Handy, R.D.; Garrod, J.; Owen R.: “Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles”, *Ecotoxicology*, 17 (2008), 421-437
- [2] Çıracı, S.: “Nanoteknolojinin Doğuşu : “Türkiye’ de nanoteknoloji”, *Bilim ve Teknik*, 8 (2005)
- [3] Mark, R.; Wiesner, P E.; Bottero, J.: “Environmental Nanotechnology Applications and Impacts of Nanomaterials”, Inc. McGraw-Hill, (2007), 231-331
- [4] Goldman, L.; Coussens, C.: “Implications of Nanotechnology for Environmental Health Research”, *Environmental Health Sciences, Research and Medicine*, 70 (2005) 6-9
- [5] Oberdörster, G; Stone, V.; Donaldson, K.: “Toxicology of Nanoparticles: A Historical Perspective”, *Nanotoxicology*, 1(1) (2007), 2-25
- [6] Handy R.D., Owen, R.; Valsami-Jones, E.: “The Ecotoxicology of Nanoparticles and Nanomaterials: Current Status, Knowledge Gaps, Challenges, and Future Needs”, *Ecotoxicology*, 17 (2008), 315-325
- [7] Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (Scenihr), European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General Directorate C - Public Health and Risk Assessment C7 - Risk Assessment: “The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies ”, (2006)
- [8] TÜBİTAK Nanoteknoloji Strateji Grubu: “Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri Vizyon 2023 Projesi”, Ankara, Türkiye, (2004)
- [9] Wiesner, M.R.; Lowry, G.V.; Alvarez, P.; Dionysiou, D.; Biswas, P.: “Assessing The Risks of Manufactured Nanomaterials”, *Environmental Science & Technology*, 14 (2006) 15
- [10] Moore, M.N.: “Do Nanoparticles Present Ecotoxicological Risks for The Health of The Aquatic Environment” *Environmental International*, 32 (2006) 967-976
- [11] Bouldin, J.L.; Ingle T.M.; Sengupta, A.; Alexander, R.; Hannigan, R.E.; Buchanan, R.A.: “Aqueous Toxicity and Food Chain Transfer of Quantum Dots in Freshwater Algae and *Ceriodaphnia dubia*”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9 (2008), 1958-1963
- [12] Cairns, J.; Niederlehner, B.R.: “Ecological toxicity testing: scale, complexity, and relevance” www.books.google.com.tr (Erişim tarihi: **Şubat 2008**)

- [13] Nowack, B.; Bucheli, T.D.: “Occurrence, Behavior and Effects of Nanoparticles in The Environment”, *Environmental Pollution*, 150:1 (2007) 5-22
- [14] www.britishstandarts.co.uk “Vocabulary Nanoparticles” British Standarts, 71 (2005) (Erişim tarihi: **Mayıs 2008**)
- [15] Ju-Nam, Y.; Lead, J.R.: “Manufactured Nanoparticles: An Overview of Their Chemistry, Interactions and Potential Environmental Implications”, (2008)
- [16] O’Connell M.J.: “Carbon Nanotubes Properties and Applications”, *Boca Raton London New York USA*, (2006),18-31
- [17] Pritchard D.K.: “Literature review explosion hazards associated with nanopowders”, (2004)
- [18] Landis, W.G.; Yu, M: “Introduction to Environmental Toxicology: Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems”, Lewis Publishers, (1995)
- [19] Alak, G.; Özdemir, N.; Atamanalp, M.: “Akuatik Toksikolojide Stres Proteinleri ”, (2006)
- [20] Özdemir, N.; Atamanalp, M.: “Akuatik Toksikoloji Testlerinde Rotiferler ”, (2006)
- [21] İyi Laboratuvar Uygulamaları (GLP); Kimyasal Madde ve Ürünler: “Ulusal GLP Sisteminin Kurulmasına Yönelik Çalışmalar”, Çevre ve Orman Bakanlığı, Ankara, (2008), 6-27
- [22] Schmitt-Jansen, M.; Veit, U.; Dudel, G.; Altenburger, R.: “An Ecological Perspective in Aquatic Ecotoxicology: Approaches and Challenges”, *Basic And Applied Ecology*, 9 (2008), 37-345
- [23] Kane, A.S.: “Applied Toxicology The Study of Poisons”, UM Aquatic Pathobiology Center, (2001)
- [24] Baun, A.; Hartmann, N.B.; Grieger, K.; Kusk, K.O.: “ Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing”, *Ecotoxicology*, 17 (2008), 387-395
- [25] OECD Guidelines for The Testing of Chemicals:“Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test Proposal for Updating Guideline” 201, (2002)
- [26] www.research.plattsburgh.edu/ciliates/bigpicture.asp?bigpic=263 (Erişim tarihi: **Ocak 2008**)
- [27] www.ciliate.org/genetics.shtml (Erişim tarihi: **Ocak 2008**)

- [28] Borm, P.J.A.; Robbins, D.; Haubold, S.; Kuhlbusch, T.; Fissan, H.; Donaldson, Ken.; Schins, R.; Stone, V.; Kreyling, W.; Lademann, J.; Krutmann, J.; Warheit, D.; Oberdorster, E.: “The Potential Risks of Nanomaterials: A Review Carried Out for ECETOC ”, *Particle and Fibre Toxicology*, 3:11 (2006)
- [29] www.en.wikipedia.org/wiki/Polyvinylpyrrolidone (Erişim tarihi: **şubat 2008**)
- [30] Arabe, K.C.: “ Nanopowders Drive Industry Innovation, www.news.thomasnet.com/IMT/archives/2003/04/nanopowders_dri.html, (Erişim tarihi: **Mayıs 2008**)
- [31] www.sigma-aldrich.custhelp.com/ , (Erişim tarihi: **Ocak2008**)
- [32] Oberdörster, E.: “ Manufactured Nanomaterials (fullerenes, C₆₀) induced oxidative stres in brain of juvenile largemouth bas ”, *Environmental Health Perspectives*, 112 (2004), 1058-1062
- [33] Zhu, S; Oberdorster, E.; Haasch ,M.L.: “ Toxicity of an Engineered Nanoparticle (Fullerene, C₆₀) in Two Aquatic Species , *Daphnia* and Fathead minnow ”, *Marine Environmental Research*, 62 (2006), 5-9
- [34] Oberdörster, G.; Oberdörster, E.; Oberdörster, J.: “Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving From Studies of Ultrafine Particles ”, *Environmental Health Perspectives*, 113:7 (2005), 823-839
- [35] Lovern, S.B.; Klapper, R.: “*Daphnia magna* Mortality When Exposed to Titanium Dioxide and Fullerene (C₆₀) Nanoparticles ”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25:4 (2006), 1132-1137
- [36] Hund-Rinke, K; Simon, M.:] “ Ecotoxic Effect of Photocatalytic Active Nanoparticles (TiO₂) on Algae and Daphnids ”, *Environmental Science and Pollution*, 1- 8 (2006)
- [37] Velzeboer, I.; Hendriks, A.J.; Ragas, A.M.J.; Meent D.: “Aquatic Ecotoxicity Tests of Some Nanomaterials”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27:9 (2008), 1942-1947
- [38] Adams, L.K.; Lyon D.Y.; Alvarez, P.J.J.: “Comparative Eco-Toxicity of Nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO Water Suspensions”, 40 (2006), 3527-3532
- [39] Griffitt, R.J.; Luo, J.; Gao, J.; Bonzongo, J.C.; Barber, D.S.: “Effects of Particle Composition and Species on Toxicity of Metallic Nanomaterials in Aquatic Organisms”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27:9 (2008), 1972–1978
- [40] Oberdörster, E.; Zhu, S.; Blickley, T.M.; McClellan-Green, P.; Haasch, Mary L.: “Ecotoxicology of Carbon-Based Engineered Nanoparticles: Effects of Fullerene (C₆₀) on Aquatic Organisms”, *Carbon*, 44 (2006), 1112-1120
- [41] Luo, J.: “Toxicity and Bioaccumulation of Nanomaterials in Aquatic Species”, *Water Environment Federation*, (2007)

ÖZGEÇMİŞ

S. Berna BAYKAL 1984 yılında Ardahan'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini İstanbul'da tamamladıktan sonra 2002 yılında Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'ne girdi ve 2006 yılında mezun oldu. 2006 yılında Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Bilimleri Anabilim Dalında eğitime başladı.