

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BAKIR VE BAKIR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN *Artemia salina*'DAKİ
BİRİKİM, ELİMİNASYON VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ
Işıl Canan ÇİÇEK ÇİMEN

Anabilim Dalı: Su Ürünleri

DANIŞMAN
Doç. Dr. Durali DANABAŞ

II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet ATEŞ

TUNCELİ – 2019

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAKIR VE BAKIR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN *Artemia salina*’DAKİ
BİRİKİM, ELİMİNASYON VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ
Işıl Canan ÇİÇEK ÇİMEN
(Enstitü No: 131106201)

Anabilim Dalı: Su Ürünleri

DANIŞMAN
Doç. Dr. Durali DANABAŞ

II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet ATEŞ

TUNCELİ – 2019

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAKIR VE BAKIR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN *Artemia salina*'DAKİ
BİRİKİM, ELİMİNASYON VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**İŞİL CANAN ÇİÇEK ÇİMEN
DOKTORA TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 16/04/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

İmza:.....

Doç. Dr. Durali DANABAŞ
(Munzur Üniversitesi)

İmza:.....

Doç. Dr. Erkan CAN
(Munzur Üniversitesi)

İmza:.....

Prof. Dr. Fulya BENZER
(Munzur Üniversitesi)

İmza:.....

Prof. Dr. Kenan KÖPRÜCÜ
(Fırat Üniversitesi)

İmza:.....

Doç. Dr. M. Enis YONAR
(Fırat Üniversitesi)

ÜYE

ÜYE

Bu tez, Enstitümüz Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Prof. Dr. Numan YILDIRIM
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Proje No: TÜBİTAK-ÇAYDAG-114Y087

NOT: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı "Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu"ndaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Nanopartikül (NP) (<100 nm) içeren ürünlerin kullanımının artmasıyla birlikte, sucul sistemler ve besin zincirini oluşturan organizmaların antropojenik faaliyetler sonucu salınan NP'lerin etkisiyle risk altında olmalarından dolayı, bu çalışmada, deniz suyu ortamında yaşayan birincil tüketici zooplankton türlerinden *Artemia salina*'nın metal bazlı bakır (Cu) ve bakır oksit (CuO) NP'lere maruz bırakılmasıyla nanotoksosite testleri gerçekleştirilmiştir. Denemede, toplam 7 grup (Kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm) oluşturulmuş ve üç tekerrür ile çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan Cu ve CuO NP'lerine karakterizasyonu; Transmisyon/Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM), Dinamik Işık Saçılımı (DLS), Zeta Potansiyeli, X-ışını Difraksiyon (XRD), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) ve UV-Görünür Spektroskopisi yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Organizmalarda NP'lere bağlı birikim ve eliminasyon oranının belirlenmesi Endüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS) analiziyle yapılmıştır. Zooplanktonlarda NP etkileri faz kontrast mikroskopuyla görüntülenmiştir. Zooplanktonlardaki toksik etkiler, mortalite ve oksidatif stres belirteçlerinden olan glutatyon (GSH) ve tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) testleriyle incelenmiştir. Çalışmanın 24., 48. ve 72. saatlerinde Cu NP'lerin GSH seviyelerinde kısmi artışlara neden olduğu belirlenmiştir. Cu (60-80 nm) NP'ne maruz bırakılan *A. salina*'da artan konsantrasyon oranlarıyla paralel olarak TBARS değeri artmış ve en yüksek artış 5 ppm grubunun 24. saatinde gözlenmiştir. Sonuçlar, NP'lerin organizmalar üzerindeki farklı etkilerini göstermekle birlikte, NP'lerin birikim ve eliminasyon oranlarında farklılıklar olduğunu göstermiştir. Organizmadaki birikim oranı, NP konsantrasyonu ile paralel bir artış göstermiştir. Cu NP'lerinde birikim oranları, 0,2 ve 1 ppm konsantrasyonlarında 48. saatte artış ve 72. saatte düşüş eğilimi göstermiş olup, tüm diğer konsantrasyonlarda ise süre artışına paralel olarak bir artış eğiliminin olduğu saptanmıştır. CuO (40 nm) NP'lerinde ise 10 ppm konsantrasyonu hariç, 48. saatte düşüş ve 72. saatte artış eğilimleri görülmüş olup, 10 ppm konsantrasyonunda ise zaman ortalamaları arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Cu (60-80 nm) NP'lerin LC_{50} değeri 52,37 mg/L; CuO (40nm) NP'lerin LC_{50} değeri 55,39 mg/L olarak bulunmuştur. NP'lerin metal iyon salınımlarının ise, her bir NP'de farklılık gösterdiği gözlenmiştir. NP'lere maruz bırakılan zooplanktonların yüzeylelerinin NP'ler ile sarıldığı gözlemlenmiştir.

Çalışmada çok yönlü yapılan analizler sonucunda, Cu ve CuO NP'lerin organizmada birikim yapmakla birlikte, deney organizmasında toksik etkilerinin olduğu ve aynı paralellikle oksidatif stres oluşturduğu da görülmektedir. Bu nano boyuttaki malzemelerin artan kullanım alanları ile birlikte, çevre için büyük bir problem olarak karşımıza çıkabileceği belirlenmiştir. Buna bağlı olarak besin zincirinde yer alan organizmalar tarafından alınan NP'ler, dokuda birikim yaptığında daha üst tüketici organizmalar için tehlike oluşturabilecektir. Bu partiküllerin kullanımı ve doğaya bulaşması ile ilgili bir kontrol mekanizması oluşturulmalı ve etkileri üzerinde daha geniş çalışmalar da yürütülmelidir.

Antahtar Kelimeler: Nanopartikül, Cu, CuO, Karakterizasyon, Zooplankton, Nanotoksosite, Birikim, Oksidatif stres.

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Copper and Copper Oxide Nanoparticles on the *Artemia salina* Accumulation, Elimination and Oxidative Stress

As the use of products containing nanoparticles (NPs) (<100 nm) increased, the aquatic systems and the organisms forming the food chain were at risk from the action of NPs released as a result of anthropogenic activities. In this study, nanotoxicity tests were performed by exposing *Artemia salina* which is one of the primary consumer zooplankton species living in sea water to metal based copper (Cu) and copper oxide (CuO) NPs. A total of 7 groups (Control, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm and 50 ppm) were formed in the experiment and three replicates were studied. Characterization of Cu and CuO NPs used in the study; Transmission / Transmission Electron Microscope (TEM), Dynamic Light Scattering (DLS), Zeta Potential, X-ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transformation Infrared (FT-IR) and UV-Visible Spectroscopy were performed. In organisms, the accumulation and elimination rate of NPs was determined by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) analysis. NP effects in zooplankton were visualized by phase contrast microscopy. The toxic effects of zooplankton were investigated by glutathione (GSH) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) which are among the indicators of mortality and oxidative stress. It was determined that Cu NPs caused partial increases in GSH levels at 24th, 48th and 72th hours of the study. In the *A. salina* organism exposed to Cu (60-80 nm) NP, the TBARS value increased in parallel with the increasing concentration ratios and the highest increase was observed at the 24th hour of the 5 ppm group. The results showed that there were differences in the accumulation and elimination rates of NPs, although the NPs showed different effects on organisms. The accumulation rates in Cu NPs showed an increase at 0,2 and 1 ppm concentrations at 48 hours and a decrease trend at 72 hours, and at all other concentrations there was an increase trend in parallel with the increase in time. In CuO (40 nm) NPs, except for the concentration of 10 ppm, there was a decrease in the 48th hour and an increase in 72 hours, and the difference between the time averages in 10 ppm concentration was not significant ($p > 0.05$). LC50 values of Cu (60-80 nm) NPs were found as 52.37 mg / L and CuO (40nm) NPs were found LC50 value 55.39 mg / L. It was observed that the metal ion releases of NPs differed in each NP. It was observed that the surfaces of zooplanktons exposed to NPs were wrapped with NPs.

As a result of multidimensional analyzes, it is seen that Cu and CuO NPs accumulate in organism and they have toxic effects in experimental organism and they cause oxidative stress with parallelism. It has been determined that this nano-sized material can be a big problem for the environment with increasing usage areas. Accordingly, NPs taken by organisms in the food chain may pose a danger to higher consumer organisms when they accumulate in the tissue. A control mechanism for the use and transmission of these particles should be established and further studies on their effects should be carried out.

Keywords: Nanoparticle, Cu, CuO, Characterization, Zooplankton, Nanotoxicity, Accumulation, Oxidative stress.

TEŞEKKÜRLER

Bu tezin tüm bölümlerinde emeği geçen Danışmanım Sayın Doç. Dr. Durali DANABAŞ'a, İkinci Danışmanlığımı üstlenen Sayın Doç. Dr. Mehmet ATEŞ'e bilgi paylaşımları ve değerli vakitlerini ayırdıkları için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi iletirim. Çalışmayı maddi yönden destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca manevi destekleri ve yardımları için değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Osman SERDAR, Arş. Gör. Dr. Ayşegül PALA ve Arş. Gör. Dr. Abdullatif ÖLÇÜLÜ'ye, hayatımın her döneminde olduğu gibi tez süresince de tüm desteğini her an yanımda hissettiğim başta babam Mehmet ÇİÇEK olmak üzere sevgili annem Zöhre ÇİÇEK'e ve manevi desteği ile yanımda olan sevgili eşim Okay ÇİMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Işıl Canan ÇİÇEK ÇİMEN
TUNCELİ - 2019

ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜRLER	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE METOT	8
2.1. Materyal	8
2.1.1. Kimyasallar ve Nanopartiküller	8
2.2. Metot	9
2.2.1. Nanopartikül Süspansiyonlarının Hazırlanması	9
2.2.2. Nanomalzemelerin Karakterizasyonu	10
2.2.2.1. Transmisyon Elektron Mikroskobu Analizi	11
2.2.2.2. Dinamik Işık Saçılımı Analizi	11
2.2.2.3. Zeta Potansiyeli Analizi	11
2.2.2.4. X-Işını Kırınım Spektroskopisi Analizi	12
2.2.2.5. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi	12
2.2.2.6. Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi Analizi	13
2.2.2.7. UV-Vis Absorbans Değerlerinin İstatistiksel Olarak Belirlenmesi	13
2.2.3. Toksisite Biyodeneş Düzenekleri	13
2.2.4. Faz Kontrast Mikroskopik Analizi	15
2.2.5. Zooplankton Sayımı	15
2.2.6. Nanopartiküllerin LC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	16
2.2.7. Kimyasal Analizler	16
2.2.8. Metal İyon Analizleri	18
2.2.9.1. Biyokimyasal Analizler	19
2.2.9.1. Glutasyon Analizi	19
2.2.9.2. Tiyoobarbitrik Asitle Tepkimeye Giren Maddelerin Analizi	20
2.2.10. İstatistiksel Analiz	21
3. BULGULAR	22
3.1. Nanomalzemelerin Karakterizasyon Sonuçları	22
3.1.1. Transmisyon Elektron Mikroskobu Analiz Sonuçları	22
3.1.2. Dinamik Işık Saçılımı Analiz Sonuçları	24
3.1.3. Zeta Potansiyeli Analiz Sonuçları	25
3.1.4. X-Işını Kırınım Analiz Sonuçları	27
3.1.5. Taramalı Elektron Mikroskobu Analiz Sonuçları	28
3.1.6. Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi Analiz Sonuçları	30
3.2. UV-Vis Absorbans Değerlerini Deneşel Tasarım Sonuçları	32
3.3. Toksisite Analiz Sonuçları	35
3.3.1. Faz Kontrast Mikroskopik Analiz Sonuçları	35
3.3.2. Toksisite ve Yaşama Oranları Sonuçları	37
3.4. Kimyasal Analiz Sonuçları	39
3.4.1. <i>Artemia salina</i> Bireylerinde Birikim ve Eliminasyon Değerleri	39
3.4.2. Metal İyon Salınımı Analiz Sonuçları	44

3.5.	Biyokimyasal Analiz Sonuçları	49
3.5.1.	GSH Analizine Ait Sonuçlar	49
3.5.2.	Tiyobarbütirik Reaktif Maddeler Analiz Sonuçları.....	53
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	59
5.	ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR.....		66
ÖZGEÇMİŞ		78



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. a) <i>A. salina</i> organizma yumurtaların inkübasyonu b-c) Yumurtadan yeni çıkmış larvalar (orijinal).....	9
Şekil 2.2. Biyodeneyde kullanılan metal ve metal oksit NP'lerin stok solüsyonların hazırlanma basamakları (Orijinal).....	10
Şekil 2.3. Biyodeneyde kullanılan Cu ve CuO NP'lerin stok solüsyonları (Orijinal).....	10
Şekil 2.4. Cu ve CuO NP'lere maruz bırakılan <i>A. salina</i> biyodeney düzeneği (orijinal).....	15
Şekil 2.5. Zooplanktonların sayılması.....	16
Şekil 2.6. a) Çeker ocak altında örneklerin asit içinde çözündürülmesi, b) Mikrodalga fırınında yakma işlemlerin yapılması.....	18
Şekil 2.7. Analiz kalibrasyon standart grafiği.....	21
Şekil 3.1. Biyodeneyde kullanılan Cu (60-80 nm) NP'lerinin TEM görüntüleri.....	23
Şekil 3.2. Biyodeneyde kullanılan CuO (40 nm) NP'lerinin TEM görüntüleri.....	23
Şekil 3.3. Cu (60-80 nm) NP'lerinin dinamik ışık saçılımı analiz sonuçları.....	24
Şekil 3.4. CuO (40 nm) NP'lerinin dinamik ışık saçılımı analiz sonuçları.....	25
Şekil 3.5. Cu (60-80nm) NP'lerinin zeta potansiyeli analiz sonuçları.....	26
Şekil 3.6. CuO (40nm) NP'lerinin zeta potansiyeli analiz sonuçları.....	26
Şekil 3.7. Cu (60-80nm) NP'lerinin XRD sonuçları.....	28
Şekil 3.8. CuO (40nm) NP'lerinin XRD sonuçları.....	28
Şekil 3.9. Cu (60-80 nm) NP'lerinin SEM görüntüleri.....	29
Şekil 3.10. CuO (40 nm) NP'lerinin SEM görüntüleri.....	29
Şekil 3.11. Cu (60-80 nm)NP'lerinin FT-IR sonuçları.....	31
Şekil 3.12. CuO (40 nm) NP'lerinin FT-IR sonuçları.....	31
Şekil 3.13. Cu NP'ler (60-80 nm) için istatistiksel verilerin grafikleri.....	34
Şekil 3.14. CuO NP'ler (40 nm) için istatistiksel verilerin grafikleri.....	35
Şekil 3.15. Kontrol grubu ile Cu NP'e (50 µg/mL, 72 saat) maruz bırakılan <i>A. salina</i>	36
Şekil 3.16. Kontrol grubu ile CuO NP'e (50 µg/mL, 72 saat) maruz bırakılan <i>A. salina</i>	36
Şekil 3.17. Cu (60-80 nm) NP'lerine maruz bırakılan <i>A. salina</i> 'nın yaşama oranları.....	38
Şekil 3.18. CuO (40 nm) NP'lerine maruz bırakılan <i>A. salina</i> 'nın yaşama oranları.....	39

Tablo 1.1. <i>Artemia salina</i> üzerinde çeşitli nanopartiküllerin etkileri.....	7
Tablo 2.1. Cu ve CuO nanopartiküllere maruz bırakılan organizmaların biyodeneysel tasarımı	14
Tablo 3.1. Sulu ortamdaki Cu ve CuO NP'lerin boyut dağılımı, Pdl ve yüzey yükü değerleri	24
Tablo 3.2. Cu ve CuO NP'lerin spesifik dalga boyu ve FT-IR spektrumlarının geçirgenlik değerleri.....	30
Tablo 3.3. Absorbans ölçülmesinde kullanılan bağımsız değişkenlerin seviye ve aralıkları...	32
Tablo 3.4. İki Bağımsız Değişkenle BBD (Box Behnken Design) modeline göre oluşturulan deney tasarımı.....	32
Tablo 3.5. Cu ve CuO NP'lerin ortalama öldürücü konsantrasyon (LC ₅₀) değerleri.....	37
Tablo 3.6. <i>A. salina</i> bireylerinde Cu NP'lerin (60-80 nm) birikim ve eliminasyon değerleri (µg/g).....	42
Tablo 3.7. <i>A. salina</i> bireylerinde CuO NP'lerin (40 nm) birikim ve eliminasyon değerleri (µg/g).....	44
Tablo 3.8. Cu (60-80 nm) NP'ün ortama verdiği Cu iyon miktarı (µg/L)	48
Tablo 3.9. CuO (40 nm) NP'ün ortama verdiği Cu iyon miktarı (µg/L)	48
Tablo 3.10. Cu (60-80 nm) NP'lere maruz bırakılan <i>A. salina</i> bireylerinde GSH seviyeleri değişiminin iki yönlü varyans analizi ile değerlendirilmesi (µmol/g protein, Two-way ANOVA / Tukey alt test).....	51
Tablo 3.11. CuO (40 nm) NP'lere maruz bırakılan <i>A. salina</i> bireylerinde GSH seviyeleri değişiminin iki yönlü varyans analizi ile değerlendirilmesi (µmol/g protein, Two-way ANOVA / Tukey alt test).....	53
Tablo 3.12. Cu (60-80 nm) NP'lere maruz bırakılan <i>A. salina</i> bireylerinde TBARS seviyeleri değişiminin iki yönlü varyans analizi ile değerlendirilmesi (nmol/mg protein, Two-way ANOVA / Tukey alt test)	55
Tablo 3.13. CuO (40 nm) NP'lere maruz bırakılan <i>A. salina</i> bireylerinde TBARS seviyeleri değişiminin iki yönlü varyans analizi ile değerlendirilmesi (nmol/mg protein, Two-way ANOVA / Tukey alt test)	58

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

nm	: Nanometre
rpm	:Dakikadaki devir sayısı
α	:Alfa
λ	:Gama
ζ	:Zeta
Ω	:Omega
m/v	:Kütle/Hacim
lux	:Işık birimi
A°	:Ångström
NP	:Nanopartikül
UV-Vis	:Ultraviyole görünür spektrofotometresi
TEM	:Transmisyon elektron mikroskobu
SEM	:Taramalı elektron mikroskobu
XRD	:X-ışını kırınımı
FT-IR	:Fourier dönüşüm kızılötesi
DLS	:Dinamik ışık saçıcısı
MR	:Manyetik rezonans görüntüleme
EDX	:Enerji saçınımlı x-ışını spektroskopisi
ICP-MS	:Endüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi
DORM-2	:Spiny dogfish (<i>Squalus acanthias</i>) kası
TORT-2	:American lobster (<i>Homarus americanus</i>) hepatopankreası
EPA	:20:5 ω -3, Eikosapentanoik asit
OECD	:Ekonomik işbirliği ve kalkınma örgütü
TBARS	:Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
TBA	:Tiyobarbitürik asidi
NaBH₄	:Sodyum borohidrat
GSH	:Glutatyon
MDA	:Malondialdehit
DTNB	:5-5'-Ditiyo-bis(2-Nitrobenzoik asit)
KBr	:Potasyum bromür
NADPH	:Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
BHT	:Butil hidroksi toluen
TCA	:Trikloroasetik asit
Pb(Ac)₂•3H₂O	: Kurşun asetat trihidrat
EDTA	:Etilendiamin tetraasetik asit
KH₂PO₄	: Potasyum fosfat
LC₅₀	: Ortalama öldürücü konsantrasyon
DMSO	:Dimetilsulfoksit
TGA	:Tiyoglikolik asit
PdI	: Polidispersite indisi

1. GİRİŞ

Nano, metrik sistemin içinde bir ölçü birimi olarak kullanılan, bir metrenin milyarda biri veya bir milimetrenin milyonda biridir. Nanoölçek günümüzde 1 ila 100 nanometrelik uzaklığı kapsayan aralık olarak kabul edilir. Nanoteknolojideki yenilikler, hâlihazırda tüketici ürünlerde kullanılan çok geniş bir nanopartikül (NP) dizisinin üretilmesine olanak sağlamaktadır. Çok küçük olmaları sayesinde, NP ve kuantum noktacıkları muhteşem optik, manyetik ve kimyasal özellikler sergilerler (Huber, 2005). Günümüzde nanomalzeme bilimi; tıpta tanı ve tedavi amacıyla araç ve gereçlerin üretimi, tasarımı ve iletişim ile ilgilenen mühendislik çalışmalarında, elektronik ve eğlence sektörünün yanı sıra enerji üretimi ve saklanması, doğa ve insan sağlığı korunması için yapılan hijyen uygulamaları çalışmalarında, nanoölçekteki malzemelerin kullanımı en son elde edilen özelliklerle beraber, uygulama bilimlerinde en hızlı ilerleme görülen endüstri alanıdır (Colvin, 2003). Ayrıca, askeri endüstride, giyim, kumaş ve imalat sektörlerinde, motorlu taşıtlarda, konut ve alt yapı faaliyetlerinde, elektrik-elektronik sektörlerinde ve ayrıca büyük tıbbi gelişmelerin yaşandığı ilaç ve sağlık alanlarında NP'ler önemli derece de yer edinmiştir. NP'ler; daha kuvvetli ve sağlam aynı zamanda yoğunluğu az olan ürünleri oluşturmak amacıyla, tenis racketlerinin kenarlıklarında, başı darbelerden korumak için sertleştirilmiş maddelerden yapılmış motosiklet başlıklarında ve dokuma malzemelerinde, nanoölçek nitelikte katılan maddeler ile buruşmaları önleyici, lekelenmeye ve bakteri çoğalmalarına karşı dayanabilen malzemelerin üretilmesinde kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra bilgisayar, gözlük ve fotoğraf makinesi yüzeylerinde, pencerelerde ve yapıların bölümlerinde yer alan nano boyuttaki filmler (Pitkethly, 2004), kullanıldıkları malzemelere, anti reflektif nitelikler kazandırmaktadır. Ayrıca fotokatalist nano cam kaplamalar, UV ışınlarını absorbe eder, elektriklenmeye engel olup, küf ve yosun oluşumunu engelleyici özellik göstermektedir (URL-1, 2019). Nanomalzemelerin büyüleyen niteliklerine karşın, insan hayatı ve çevre ile ilgili olumsuz sonuçları hakkında sınırlı bilgi mevcuttur. Mühendislik çalışmalarıyla meydana getirilen nanomalzemeler ile ilgili problemler NP'lerin kullanıldığı ürünlerin insan hayatında yer edinmesiyle ortaya çıkmıştır (Dagani, 2003; Dreher, 2004; Hoet ve ark., 2004).

Balıkçılık ve su ürünleri yetiştiriciliği endüstrisinde NP'ler; yem endüstrisi, balık hastalığı kontrolü gibi hayvan sağlığı hizmetlerinde doğrudan kullanılırken, su yönetimi, atık su arıtımı, balık havuzlarının sterilizasyonu, hasat edilmiş balıklarda etiketleme gibi ticari

amaçlı ambalajlama işlemlerinde ve yem endüstrisi ile balık hastalığı kontrolü gibi hayvan sağlığı hizmetlerini içeren uygulamalar NP'lerin su ürünlerinde dolaylı kullanım alanlarını oluşturmaktadır (Khosravi-Katuli ve ark., 2017).

NP'lerin toksikolojik etkileri, partikül özellikleri (örneğin, çap, biçim, yüzey yükü ve kimyası), konsantrasyon, maruz kalma süresi, NP'lerin doğası, ortam yapısı, parçacığın uygulama şekli ve hedef türlerin bağışıklık sistemi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır ve ayrıca, su organizmalarının farklı ortamlarda (örneğin, tatlısu ve tuzlu su veya tropikal ve ılıman bölgeler) üretilmesi nedeniyle, nano bazlı ürünlerden çıkan etkiler çok farklı görülebilir (Khosravi-Katuli ve ark., 2017). Nanomalzemelerin kullanımında güvenilirliğine dair yöneltilen soruların iki önemli etkeni vardır. Bunların ilki nanoölçekli malzemelerin çok geniş bir yelpazede olması ve neredeyse mikroölçekteki tüm nanopartiküllerden üretilmesidir. Nano boyuttaki malzemelerin yaygın kullanımı göz önüne alındığında, ortam ve insan sağlığı özen gösterilmesi gereken alanlardır. İkinci ise, nanomalzemelerin, partikül yapısının sağladığı kolaylık sayesinde canlı hücresinin içine bile girebilmesidir. Bununla birlikte, parçacık büyüklüğü elde edilen ürünün fiziko-kimyasal ve toksikolojik özelliklerinin belirlenmesinde güçlü bir yere sahiptir. Daha büyük bir ölçekte zararsız özellik gösteren bir ürün nano boyutta reaktif ve toksik olabilir. Son yıllarda, elektronik, optik, tekstil, tıbbi cihazlar, ilaç taşıyıcı sistemler, kimyasal sensörler, biyosensörler ve çevresel iyileştirme çalışmaları dahil olmak üzere birçok alanda nanoteknoloji uygulamalarının hızlı büyümesi, NP'lerin çevreye salınmasını arttırmıştır (Bondarenko ve ark., 2013). NP salınımındaki bu hızlı artışa, çevre güvenliği konusunda doğru araştırmalar eşlik etmemiştir (Corsi ve ark., 2014). Sadece NP'lerin çevre üzerindeki toksik etkileri konusunda kaygılar dile getirilmiştir (Khosravi- Katuli ve ark., 2017). Mesela titanyum oksit NP'leri ve karbon nanotüpleri gibi büyük parçaların metal (normal olağan) formlarına göre nispeten daha zararsız olduğu görülmüştür. Ancak bu NP'lerin (<100 nm), solunum yolları iltihabı, akciğer tahribatı ve hastalıkları şeklinde ortaya çıkan akciğer zehirlenmesine neden oldukları bulunmuştur (Lee ve ark., 1985; Bermudez ve ark., 2002; Warheit ve ark., 2004; Wiench ve ark., 2009; Zhu ve ark., 2010). Darbeye karşı oldukça dayanıklı, aşırı derecede sert ve oldukça kararlı özellik gösteren karbonun yuvarlak bir biçimi olan buck kürelerinin, balıklarda geniş çaplı beyin hasarına sebep olduğu bildirilmiştir (Hood, 2004; Sampson, 2004) ve yine buck kürelerinin balıkların karaciğer dokularında gen ekspresyonunda varyasyonlara neden olduğu görülmüştür (Oberdöster, 2004).

Nano boyuttaki parçacıkların kimyasal kompozisyonlarına göre sınıflandırma yapılabilir. Nano yapıların en önemlileri karbon temelli nano yapılar, metalik temelli nano yapılar ve yarı-iletken nano yapılardır. Her bir NP sınıfının belli uygulamalar için yararlı olduğu düşünülen çok farklı özellikleri vardır. Metal ve oksit NP'ler, katalizör olarak potansiyel uygulamalarda (Jeong ve ark., 2015), sensör olarak (Ma ve ark., 2015), elektronikte (Theodorakos ve ark., 2015) ve boyalarda (Fiorentino ve ark., 2015) kullanılmaktadır.

Nano boyutlarda karşımıza çıkan mühendislik ürünleri, nanoteknoloji çalışmalarıyla elde edilmektedir. Neredeyse her türlü materyal farklı mühendislik teknikleri ile değerlendirilerek nano boyutta ürünler ortaya çıkarılmaktadır. Malzemelerin ayırt edici, belirleyici nitelikleri, yapısına, kullanıldığı prosese bağlı olarak farklılıklar gösterebilir. Artan teknolojik gelişmelerin ışığında farklı protokollerle üretilen nanomalzemelerin üretiminde görülen hızlı artış, bu malzemelerin temel ilkeler doğrultusunda sınıflandırılması gerektiğini göstermektedir. Nanomateryaller nanoölçekte kendine özgü ayırt edici niteliklerden faydalanmak için bilhassa üretilmektedir. Yoğun NP üretiminin çevresel tesirinin diğer değişkenlerle ilişkisi bilinmelidir. Mühendislik çalışmalarıyla veya kendiliğinden doğada bulunan NP'ler; yüzey suyu, yeraltı suyu, okyanuslar, buzul ve atmosferik sular gibi tüm akuatik ortamlarda görülebilir (Sondi ve Salopek-Sondi, 2004).

Bakır (Cu), insanlar ve hayvanlar için temel bir mikro besin maddesidir. Sitokrom c oksidaz, ürikaz, tirozinaz, süperoksit dismutaz, amin oksidaz, lisil oksidaz ve seruloplazmin gibi birçok oksidasyon azaltıcı enzim sisteminin temel bir bileşenidir (Muralisankar ve ark., 2016). Bakır, melanin pigment oluşumu için gerekli demir metabolizması ile yakından ilgilidir ve aynı zamanda normal bağ dokusu metabolizması için gereklidir ve merkezi sinir sistemi içinde fonksiyonları vardır (Turnlund, 1994; Watanabe ve ark., 1997; Lall, 2002). Bunun yanı sıra Cu, suda yaşayan hayvanların biyolojik, fizyolojik ve immün yanıtlarında zorunlu bir göreve sahiptir. Kantitatif Cu gereksinimi birkaç balıkta ve kabuklularda bildirilmiştir (Lorentzen ve ark., 1998; Lee ve Shiau, 2002; Wang ve ark., 2009; Shao ve ark., 2012; Sun ve ark., 2013). Bununla birlikte, yüksek Cu seviyesi, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu nedeniyle hücrel oksidatif stresi arttırdığı için balıklar ve kabuklular için zehirli olabilir (Clearwater ve ark., 2002). Daha yüksek Cu konsantrasyonlarının balık ve kabuklularda hayatta kalmayı, büyüme ve bağışıklığı baskılayabileceği bildirilmiştir (Lee ve Shiau, 2002; Shao ve ark., 2012; Sun ve ark., 2013). Çevreye salınan Cu ve CuO NP'lerin potansiyel bir risk olduğunu ve sorunun kapsamlı bir şekilde araştırılması gerektiğini

göstermektedir (Rotini ve ark., 2018). Yine de, CuO NP'lerinin, özellikle denizel organizmalarda ekotoksitesitesi yeterli oranda çalışılmamıştır (Park ve ark., 2014; Rossetto ve ark., 2014; Wu ve ark., 2015). Etki / lethal konsantrasyonları E(L)C₅₀ değerlerinin eşiklerini hesaplamak (Ray ve ark., 2009) ve NP'lerin potansiyel çevresel tehlikelerini değerlendirmek çok önemli olmasına rağmen, etkili / ölümlü konsantrasyonları (E(L)C) tanımlamak için (Abdel-Khalek ve ark., 2015; Rotini ve ark., 2016; Torres-Duarte ve ark., 2016) az sayıda çalışma yapılmıştır. Aynı zamanda Cu-NP'leri, fungusid, yosun öldürücü ve herbisitlerin temel bileşenlerinden biri olarak kullanılır, ancak hücresel düzeyde genotoksisite ve oksidatif DNA hasarına neden olabilirler (Song ve ark., 2012). Bakır NP'ler plazma zarını geçme, hücre içi organellerle etkileşerek oksidatif strese neden olma özelliğine sahiptir (Gomez ve ark., 1998; Fahmy ve Cormier, 2009; Wang ve ark., 2011; Melegari ve ark., 2013), karaciğer ve balık solungaçları gibi dokularda birikebilir (Griffitt ve ark., 2007; Wang ve ark., 2013). Bu durumda, solungaç işlevinin kaybı, iyonik düzenlemeye ve gaz alışverişinde rahatsızlıklara neden olabilir (Wood ve McDonald, 1982; Laurén ve McDonald, 1985); hem asit hem de Cu kombinasyonlarının hematolojik rahatsızlıklar ürettiği bildirilmiştir (Nussey ve ark., 2002). Ayrıca Cu'nın, iç organlara oksidatif stres yoluyla ve / veya solungaç yaralanması ile ilişkili ikincil hipoksiye bağlı olarak toksisiteye neden olduğu bilinmektedir (Hoyle ve ark., 2007; Eyckmans ve ark., 2011; Shaw ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarda balık karaciğerinde, Cu-NP'lerin nekrozu indüklediği ve solungaçlarda sinüsoidal boşlukları değiştirdiği gösterilmiştir (Griffitt ve ark., 2007; Al-Bairuty ve ark., 2013). Su ortamındaki maruziyetlerde çözünmüş Cu için hedef organlar öncelikli olarak solungaç ve Cu metabolizmasında merkezi bir rolü olan karaciğerdir (Grosell ve ark., 1996, 1997; Grosell, 2012; Shaw ve ark., 2012). Bununla birlikte, balıklarda Cu toksisitesi; alkalinite, sertlik, çözünmüş organik madde ve pH gibi parametrelerden etkilenir (Erickson ve ark., 1996). Çözünmüş Cu balıkların solungaçlarına zarar verebilir (Figueiredo-Fernandes ve ark., 2007). Al-Bairuty ve ark., (2016) gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ile yaptıkları çalışmalarında su pH'sı düşürüldüğünde, Cu birikiminin ve ilişkili ölümcül tepkilerin etkilendiğini bulmuşlardır.

Farklı uygulamalar için metal NP'lerin artan üretimi ve kullanımı sağlık üzerinde olumsuz etkilere yol açar (Galdiero ve ark., 2011). Toksikolojik testlerde, canlıların birbirleriyle ve çevreleriyle olan ilişkileri göz önüne alınmalı, güncel ve anlamlı çıktılarda elde edilmesi için uygun test tipi ile beraber uygun test organizmasının da tercih edilmesi önemlidir (Rand, 1995). Biyodeney veya toksisite araştırmalarında kullanılan organizmalar, çalışmada önemli bir yere sahiptir. Kimyasal maddelerin büyük bir bölümü, direkt ya da

dolaylı yollardan tatlısu veya deniz sistemlerine ulaşmaktadır. Olası toksik etkiler sebebiyle her iki ekolojik sistemde de bulunan organizmalar üzerinde muhtemel toksikolojik değerlendirilmelerin yapılması önemlidir.

Zooplanktonik bir organizma olan *Artemia salina*, deniz ortamındaki ekotoksikoloji çalışmalarında kültür kolaylığı, hazır bulunabilirliği, düşük maliyetli oluşu, beraber olumsuz koşullara uyum sağlaması (Soltanian, 2007) nedeniyle biyodeneysel araştırmalar için önemli bir test organizması olarak kullanılmaktadır (Madhav ve ark., 2017). Deneysel araştırmalarda bu organizmaların kullanılmasının asıl amacı; laboratuvar koşullarına olan uygunluğu, kontrolünün kolaylığı, elde edilen verilerin güvenilirliği ve ekonomik olarak temin edilmesi /üretilmesidir. Önemli zooplanktonik organizma olan *A. salina*, tuzlu göl sularında ve tuz göllerinde yaşayan bir tür eklembacaklı olup, geniş tuzluluk aralığına (‰1-200 ppt) dayanıklı bir organizmadır. *A. salina* doğal ortamlarında 2 cm boyutlarına kadar büyüyebilirler (Ateş ve ark., 2013a). Büyüme sırasında *A. salina* birkaç kabuk değişimi geçirir ve yetişkin aşamasına 12-15 günde ulaşır. *Artemia* cinsi hem üreme hem de parthenogenic türlere sahiptir (Browne, 1980). Olumsuz koşullar altında birkaç sene sonra bile tuzlu suda yeniden su ile yıkanarak uykuda bekletilebilen kistlerden yavrular üretilir (Lavens ve Sorgeloos, 2000). *A. salina*, potansiyel bir besin kaynağı olarak kullanılmaktadır (Léger ve ark., 1986) ve OECD (Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü) tarafından yavru balıkların beslenmesinde kullanımı önerilmektedir (OECD-210, 1992). Birincil tüketici organizmalardan olan *A. salina*'nın bir üst tüketici grupta yer alan balık ve kabuklular tarafından, beslenimsel (trofik) transfer yoluyla geçişi olabilir. Aynı şekilde *A. salina*'da olası NP maruziyeti ve birikimi besin zincirinde ekolojik dengesizliğe neden olabilir.

Artemia salina'da NP'lerin toksisitesini ve etkisini incelemek için yapılan literatür çalışması Madhav ve ark. (2017) çalışmalarından uyarlanarak Tablo 1.1'de verilmiştir.

Yakın zamanda teknolojinin hızlı gelişimine paralel olarak, nanomalzemelerin üretimi farklı birçok yöntem ile gerçekleştirilerek çok geniş alanlarda kullanılmaya devam etmektedir. Gelişmiş bazı ülkeler, bu malzemelerin sucul ekosistem üzerinde olası toksikolojik etkilerini göz önünde bulundurarak bu yöndeki bilimsel araştırmaları desteklemektedir. Ancak bu yeni üretim teknikleriyle üretilen nanomalzemelerin toksikolojik yönleri konusunda yetersiz bilgi mevcuttur.

Su ekosistemleri, doğrudan ve dolaylı yollarla deniz ortamına ulaşan NP'lerin temel alıcı ortamlarıdır (Rotini ve ark., 2018). Tatlısu türleri üzerinde kapsamlı araştırmalar yapılmış olup, NP'lerin deniz hayatı üzerindeki ekotoksikolojik etkilerini ölçmek için az

sayıda çalışma ve sınırlı miktarda veri mevcut olduğu bildirilmiştir (Baker ve ark., 2014; Minetto ve ark., 2014; Gallo ve ark., 2016; Minetto ve ark., 2016).

Bu tez çalışmasında, deniz suyu ortamında yaşayan birincil tüketici zooplankton türlerinden *A. salina* metal bazlı Cu ve CuO NP'lerine maruz bırakılarak, nanotoksisite testleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, kullanılan her iki NP'ün karakterizasyonu Transmisyon/Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM), Dinamik Işık Saçılımı (DLS), Zeta Potansiyeli, X-ışını Difraksiyon (XRD), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) ve UV-Görünür Spektroskopisi yöntemleriyle gerçekleştirilerek, hedef organizmadaki birikim ve eliminasyon oranlarının Endüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS) belirlenmesi, toksik etkilerinin ortaya çıkarılarak (faz kontrast mikroskobuyla), mortalite ve oksidatif stres belirteçlerinin (glutasyon (GSH) ve tiyobarbütirik asit reaktif maddeler (TBARS)) değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Tablo 1.1. *Artemia salina* üzerinde çeşitli nanopartiküllerin etkileri

Nanopartikül	Önemli Bulgular	Referans
Nano kurşun (nPb)	Ölüm yoktur, oksidatif stres oluşmuştur.	Cornejo-Garrido ve ark., (2011)
C60 ve TiO ₂	Nanoparçacık büyüklüğündeki değişimle farklı seviyelerde görülen mortalite değerleri görülmüştür.	Rajasree ve ark., (2011)
Titanyum Oksit (TiO ₂) NP'leri	Yüksek birikim görülürken, istatistiksel olarak önemli bir mortalite görülmemiştir.	Ateş ve ark., (2013a)
Çinko (Zn) ve Çinko Oksit (ZnO) NP'leri	Boyuta bağımlı toksisite ve biyoakümülyasyon ile LPO seviyesinde artış gözlenmiştir.	Ateş ve ark., (2013b)
Gümüş (Ag) NP'leri	Mortalitede artış, yumurtadan çıkma yüzdesinde düşüş, DNA hasarı, birikim ve hücre hasarı görülmüştür.	Arulvasu ve ark., (2014)
Demir (II, III) Oksit (Fe ₃ O ₄), Seryum (IV) Oksit (CeO ₂), Kalay (IV) Oksit (SnO ₂) NP'leri	Ölüm yoktur, yüzme hızında azalış, kolin esterase ve GST aktivitelerinde azalma ve katalaz aktivitesinde artış gözlenmiştir.	Gambardella ve ark., (2014)
Gümüş (Ag) ve Titanyum Oksit (TiO ₂) NP'leri	Daha yüksek alım ve eliminasyon olmuştur.	Tavana ve ark., (2014)
Bozulmamış grafen NP'leri	Akut toksisite yoktur, katalaz, lipit peroksidasyon ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinde artış görülmüştür.	Pretti ve ark., (2014)
Alfa ve Gama alüminyum NP'leri(α -Al ₂ O ₃ & γ -Al ₂ O ₃)	Boyuta göre farklı toksisite, bağırsaklarda birikim, daha yüksek MDA seviyeleri gözlemlenmiştir.	Ateş ve ark., (2015b)
Karbon Siyahı, Grafen Oksit, MWNT	Larva yüzme davranışında kısıtlama, davranışsal ve biyokimyasal değişiklikler gözlenmiştir.	Mesarič ve ark., (2015)
TiO ₂ ve AgTiO ₂ NP'leri	Mortalite ve morfolojik değişikliklerde artış görülmüş, alım ve eliminasyon oranı artmıştır.	Özkan ve ark., (2016)
Nikel Oksit (NiO) ve Kobalt Oksit NP'leri	Bağırsaklarda birikim olmuş, MDA ile oksidatif stresin yüksek olduğu gözlenmiştir.	Ateş ve ark., (2016)

2. MATERYAL VE METOT

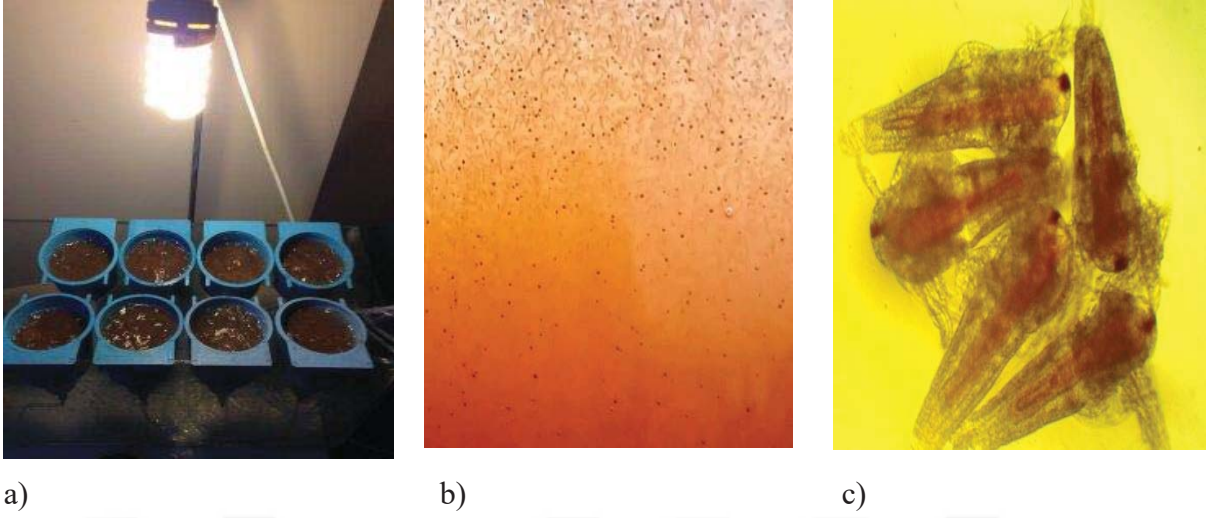
2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasallar ve Nanopartiküller

Araştırmada kullanılan kimyasal malzemeler Sigma-Aldrich firmasından, metal bazlı Cu (60-80 nm) ve CuO (40 nm) NP'leri ise SkySpring (Houston, TX, ABD) firmasından temin edilmiştir. Analitik reaktif sınıfından olan tüm kimyasallara herhangi bir arındırma veya saflaştırılma yapılmadan kullanılmıştır. Temin edilen nano boyuttaki malzemelerin ilgili karakterizasyon analizleri yapılmıştır. Her iki NP için elde edilen tüm değerler üretici firmanın beyan ettiği değerler ile karşılaştırılmıştır. Şekil ve boyut olarak veriler doğrulandıktan sonra biyodeney çalışmalarında kullanılmıştır.

2.1.2. Biyodeney Organizması *Artemia salina*

Biyodeney için deniz suyu ortamında yaşayan birincil tüketici zooplankton türlerinden olan *A. salina* ticari firmadan (SAV-KİM, Elazığ) temin edilmiştir. *A. salina* yumurtaları deniz suyunda inkübasyona bırakılarak larvaların çıkması sağlanmıştır. Bunun için laboratuvar ortamında deiyonize edilmiş su içerisine sentetik deniz tuzu olan Instant Ocean®'ın uygun miktarda çözündürülmesiyle deniz suyu (30 ‰ m/v : 1 Lt suya 30 gr sentetik deniz tuzu konularak) hazırlanmıştır. *A. salina* yumurtasının çatlatılması veya inkübasyonu özetle aşağıda belirtilen yöntemle (Ates ve ark., 2013a) göre yapılmış olup, organizmalar biyodeney için hazır hale getirilmiştir. Önceden temizlenmiş yaklaşık 1 g *A. salina* yumurtası, 1 L'lik deniz suyunda $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de, konik plastik dereceli bir kap içinde inkübasyona bırakılmıştır. *A. salina* yumurtaları bazik ortamda çıktıkları için pH seviyesi 7,6'nın üzerinde olacak şekilde ayarlanmıştır. Ortam aydınlatması floresan lamba ile 1500 lux gün ışığı olacak şekilde sağlanmıştır. Ayrıca güçlü ve sürekli bir havalandırma için akvaryum hava pompası yardımıyla kuluçka sisteminin (konik plastik) alt kısmına kadar uzanan havalandırma hortumu ile deniz suyu ortamına hava verilmiş, *A. salina* yumurtalarının su içinde sirkülasyonunun devamlılığı sağlanmıştır (Şekil 2.1.a). Bu koşullar altında, *A. salina* yumurtası 24-36 saat süre ile karıştırılmış ve daha sonra kuluçka sonucunda yeni çıkan canlı yavrular (Şekil 2.1.b-c) 30 µm Millipore selüloz filtreler aracılığıyla filtre edilmiştir.



Şekil 2.1. a) *A. salina* yumurtalarının inkübasyonu b-c) Yumurtadan yeni çıkmış larvalar (orijinal)

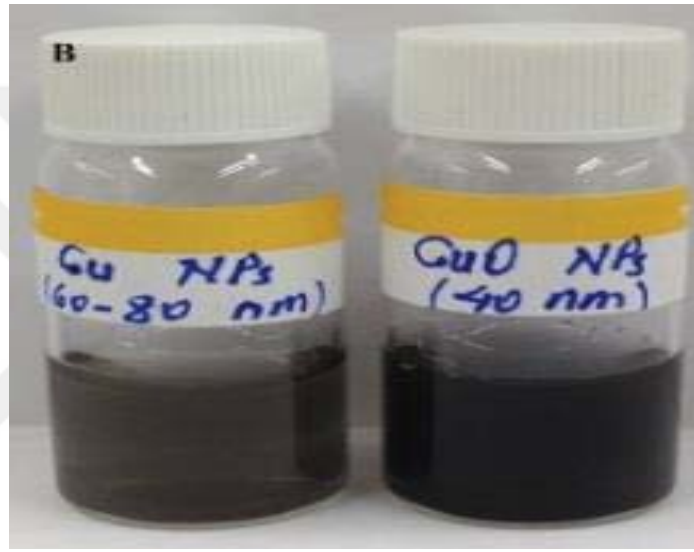
2.2. Metot

2.2.1. Nanopartikül Süspansiyonlarının Hazırlanması

Cu ve CuO NP'lerinin %10'luk (m/v) stok süspansiyonları, (18,0 MΩ) özelliğinde ultra saf su içinde çözdürülerek elde edilmiştir. Her bir stok çözelti, 5 dakika vortekslendikten sonra, en yüksek NP dağılımını sağlamak için, ortalama 15-20 dakika olacak şekilde ultrasonik banyoda sonifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2.). Biyodeneyde kullanılan Cu ve CuO NP'lerin stok solüsyonlarının görünümü Şekil 2.3.'de verilmiştir. Her bir NP'ün stok süspansiyonundan, deneme dizaynında belirtilen konsantrasyon oranları dikkate alınarak, otomatik pipet yardımıyla uygun hacimler alınmış ve zaman kaybetmeden tüm deneme gruplarındaki *Artemia salina*'ların NP'lere maruz bırakılma işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.2. Biyodeneyde kullanılan metal ve metal oksit NP'lerinin stok solüsyonlarının hazırlanma basamakları (Orijinal)



Şekil 2.3. Biyodeneyde kullanılan Cu ve CuO NP'lerinin stok solüsyonları (Orijinal)

2.2.2. Nanomalzemelerin Karakterizasyonu

Nano yapılı malzemelerin nanotoksosite etkileri üzerinde, kullanılan malzemelerin parçacık numarası, yükleri, boyutları, boyut dağılımları, yüzey alanları, yapıları ve şekilleri (Madden ve Hochella, 2005; Pal ve ark., 2007) ile kümeleşme durumları (Chau ve ark., 2007) ve ayrıca konsantrasyon oranı gibi birçok faktör önemli etkiye sahiptir. İn-vivo veya in-vitro koşullar altında tüm nanotoksikolojik araştırmalarda bu faktörleri belirlemek gerekir. Nano malzemelerle yapılan tüm çalışmalarda bu ayırt edici özellikleri saptamak için; TEM, DLS, Zeta Potansiyeli, XRD, SEM, FT-IR ve UV-Görünür Spektroskopisi analizleri yapılmalıdır.

2.2.2.1. Transmisyon Elektron Mikroskobu Analizi

Transmisyon (Geçirimli) Elektron Mikroskobu (TEM), milyon kat büyütme özelliği sayesinde kullanılan malzemenin kristal yapısı ve morfolojisi hakkında bilgi verdiği için, bu çalışma deneyinde kullanılan nano malzemelerin parçacık boyut ve şekilleri TEM ile 40-100 kV hızlanan gerilim altında 50-106 büyütme ile 0,2 nm çözünürlük sağlayan TEM enstrümanı (JOEL Marka, JEM-1011Model) ile ayırt edici özellikleri ortaya konulmuştur. NP'lerin TEM görüntülerini elde etmek için, hazırlanan NP koloidal çözeltisinin bir damlası (8-10 μ L) 50 Å kalınlığındaki, 3 mm çapındaki karbon-kaplanmış bakır ızgara üzerine damlatılmış ve kuruması için oda sıcaklığında bir gün muhafaza edilmiştir. Her bir nanopartikülün morfolojik yapısını, çapını ve boyut dağılımını gösteren resimler TEM cihazından elde edilmiştir.

2.2.2.2. Dinamik Işık Saçılımı Analizi

Kolloidal çözeltiler ve NP'leri ve karakterize etmek için önemli bir araç olan DLS, çözeltideki parçacığın büyüklüğü hakkında bilgi vererek, akuatik ortamdaki NP'lerin ayırt edilmesini sağlar. Bu nedenle her bir NP'ün sulu ortamdaki (solüsyon/medium) gerçek boyut dağılımı DLS tekniğiyle elde edilmiştir. Nanopartiküllerin gerçek boyut dağılımları, saf su içindeki stok süspansiyonlarından yapılmıştır. Stok süspansiyon konsantrasyonlarının çok yüksek olması halinde, numune seyreltilerek cihazın (Malvern Marka, Zetasizer Model) saniyede sayım yapabileceği düşük konsantrasyonlara (<10 ppm) ayarlanmıştır. Sonikasyon işlemi süspansiyonlardaki kümeleşimlerin parçalanması için kısa süreli olarak yapılmış ve DLS analizleri için 1,5 mL'lik temiz kare küvete konulmuştur (Brar ve Verma, 2012). Doğru sonuçların elde edilmesi için hazırlanan her NP için konsantrasyondan beş DLS analizi yapılmıştır.

2.2.2.3. Zeta Potansiyeli Analizi

Zeta potansiyeli, parçacık ile parçacığın içinde bulunduğu sıvı arasında oluşur. Parçacıklar arasındaki çekme ve itme kuvveti parçacığın zeta potansiyel değerine bağlıdır. Elektrokinetik potansiyeli olarak da bilinen zeta potansiyeli, NP yüzeyindeki “etkili” elektrik yükünün ölçüsüdür (+/- ζ mV) ve kolloidal NP'lerin yük kararlılığının miktarını belirtir. Karakterizasyon analizlerinde kullanılmak üzere her nanopartikül için hazırlanan stok

solüsyonlarından, şırınga ile 1 mL olacak şekilde numune alınmıştır ve örnekler temiz elektrotlu zeta potansiyel küvetine konulmuştur, her partikülün zeta potansiyeli zetasizer (Malvern Marka, Nano ZS Model) cihazında ölçülerek değerleri tespit edilmiştir.

2.2.2.4. X-Işını Kırınım Spektroskopisi Analizi

X-Işını Kırınım spektroskopisi veya X-Işını Difraksiyon spektroskopisi, X-ışınlarının emisyonu, absorpsiyonu ve difraksiyonuna (saçılması) dayanır. X-ışınları, yaklaşık 0.02 Å ile 100 Å ($1\text{Å} = 10^{-10}\text{m}$) arasında dalga boyuna sahip elektromagnetik dalgalar olup, gözle görülemezler. Bu analiz yöntemi, çok kısa dalga boyuna sahip elektro manyetik dalgalardan meydana gelen X-ışınları demetinin analiz edilecek numune üzerine gönderilmesi ve sonrasında örnekteki kristallerin atomlarına çarptırılarak yansıtılmasına dayanır. Her bir kristal faz için kırınım profillerinin bir nevi parmak izi gibi o kristali tanımlaması bu analiz metodunu önemli kılmaktadır.

Nanopartiküllerin toz formları desikatör içinde ve ışık görmeyecek şekilde muhafaza edilmiştir. NP'lerin kristal yapıları, X-ışını toz difraksiyonu ile (Bruker Marka, D8 QUEST Model) karakterize edilmiş ve Seramik X-ışını tüpü ile 1,54 Å° dalga boyunda üretilen 2,2 kW bakır anodu radyasyonu ile taranmıştır (Sapsford ve ark., 2011). Her bir NP'den yaklaşık 250 mg örnek alınmış, tarama için numune tutucu yüzeyine konularak, analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçları ile her bir nanopartikül için karakteristik özellik taşıyan kristal saçılım desenleri belirlenmiş ve kristalit boyutları, Scherrer formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

2.2.2.5. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), katı bir yüzeyin yüksek vakum altında çok ince bir tabakasını incelemek için odaklanmış bir elektron demeti ile numune yüzeyini tarayarak yüksek çözünürlükte görüntü elde eden bir elektron mikroskobu türüdür. NP'lerin morfolojisi 25 kV'de analiz enstrümanı (Madell Marka, KYKY-EM3200 Model) ile belirlenerek elde edilen görüntülerden tanecik boyutu, taneciklerin yerleşimi hakkında detaylı bilgiler elde edilmiştir.

2.2.2.6. Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi Analizi

Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometre (FT-IR) kızılötesi ışığın dipol momente sahip madde ile etkileşmesi sonucu, yapısı içerisindeki bağların titreşim hareketi oluşturması prensibine dayanır ve kızılötesi radyasyonun absorpsiyonu ile kimyasal bağların gerilme büzüme, bükülme gibi titreşimlerinin ölçülmesini sağlamış olur. FT-IR spektrometresi (Thermo Scientific Marka, Nicolet 6700 Model) ile her iki NP'den ortalama (2-4 mg) örnek alınarak, moleküllerin fonksiyonel gruplarının titreşimlerinden kaynaklanan yapısal, kompozisyonel ve fonksiyonel bilgilerinin elde edilmesini sağlamıştır. Bu karakterizasyon analizi, molekül veya bileşik yapısında bulunan bağlar hakkında, tanımlayıcı bilgiler vermektedir. Kızılötesi Spektroskopisi temel olarak kızılötesi ışığın, incelenen madde tarafından soğurulmasına dayanır. Her bir titreşim hareketi belli bir enerjide soğurulduğu için, enerji zamanın bir fonksiyonu olarak ele alınarak işlenmektedir. Analiz sonucunda elde edilen verilerle, dalga boyuna karşı grafik edilerek spektrumlar oluşturulmuştur.

2.2.2.7. UV-Vis Absorbans Değerlerinin İstatistiksel Olarak Belirlenmesi

Ultraviyole ve görünür ışık (UV-Vis) spektroskopisi, bir (sönümlenme olarak bilinen ve emilen ve yayılan ışığın toplamı olarak tanımlanan miktar) numune tarafından emilen ve yayılan ışığı ölçmek için kullanılan bir metottur. Karakterizasyon analizinde önemli yer tutan bu spektroskopi yönteminde UV-Vis spektroskopi cihazı (Optima Marka, SP-3000 Nano Model) kullanılarak her bir NP'ün 300-800 nm dalga boyunda absorpsiyon değerleri elde edilmiştir.

2.2.3. Toksisite Biyodeneý Düzenegi

Genellikle hareketi yavaşlatma, durdurma ya da sınırlandırmayı ifade eden immobilizasyon toksisite testleri, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı [OECD bölüm 202 (zooplankton)] tarafından test talimatları (OECD, 2004) dikkate alınarak her bir NP için yapılmıştır. Nanopartiküllerin uygulanmadığı, deney organizmasının optimum yaşama ortamının sağlandığı kontrol grubu oluşturulmuştur. Tüm toksikolojik çalışmalarda olduğu gibi NP uygulama çalışmamızda da belirlenen uygulama konsantrasyonları, çevreye salınım oranları göz önüne alınarak düşük oranlarda belirlenmiştir. *Artemia salina* üzerinde NP'lerin

etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar (Ateş ve ark., 2013b; Ateş ve ark., 2015b; Mesarič ve ark., 2015) göz önünde bulundurularak ve çeşitli proseslerle üretilen nanomalzemelerin, sucul çevredeki akıbeti ve hareket mekanizmasını anlamak için yapılan araştırmaların sonuçları da göz önüne alınarak, uygulama konsantrasyonları oluşturulmuştur. Zooplankton için kullanılan uygulama tertibi Tablo 2.1.'de gösterilmektedir. Deney başlangıcında her bir plastik kap içerisine, 500 mL'ye 15.000 birey konularak, kontrol ve diğer tüm grupların 3 tekerrürlü olduğu göz önünde bulundurulduğunda başlangıçta toplam birey sayısının ~315.000 olduğu görülmektedir.

Tablo 2.1. Cu ve CuO nanopartiküllere maruz bırakılan organizmaların biyodeneysel tasarımı

Gruplar	Kontrol	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
NP* (ppm)	0	0.2	1	5	10	25	50
<i>A. salina</i> **	15.000	15.000	15.000	15.000	15.000	15.000	15.000
Tekerrür	3	3	3	3	3	3	3

* Cu ve CuO NP'lerine ait konsantrasyonun mg/L (ppm) oranını göstermektedir.

**Toplam iç hacim 500 mL olan plastik kap içinde, deney başlangıcında her bir grupta ortalama 1 mL'de 30-35 adet *A. salina* konularak başlanmıştır

Zooplankton deney çalışmaları taksimatlandırılmış konik yapılı plastik kaplarda (0,75 L iç hacim) yapılmıştır. Kabın her 500 mL hacim seviyesi işaretlenmiş ve ayrı ayrı tuzlu suyla doldurduktan sonra ortama Tablo 2.1.'de belirlenmiş NP süspansiyonları ilave edilmiştir (Heinlaan ve ark., 2008; Zhu ve ark., 2010). Havalandırma konik kapların dibine uzanan bir hatla sağlanmıştır (Şekil 2.4). Ortam aydınlatılmasında 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ışık rejimi kullanılmıştır. Ortam sıcaklığında $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 'lık olacak şekilde termostatlı klimalarla sağlanmıştır. Deneme ortamının oksijen değeri (6,9 mg/L), pH değeri ise 7,9-8,3 aralığında ölçülmüştür. Çeşitli fiziksel yöntemler, analitik, spektrometrik analizler ve ayrıca biyokimyasal ölçümlerle araştırmanın dataları elde edilmiştir. Cu ve CuO NP'lere maruz bırakılan *A. salina*'da toksikolojik çalışmanın sağlıklı yürütülebilmesi için, tüm gruplardaki ölü bireyler deneme süresince her gün uygun sayılarak, kayıt edilmiştir.



Şekil 2.4. Cu ve CuO NP'lere maruz bırakılan *A. salina* biyodeneý düzeneđi (orijinal)

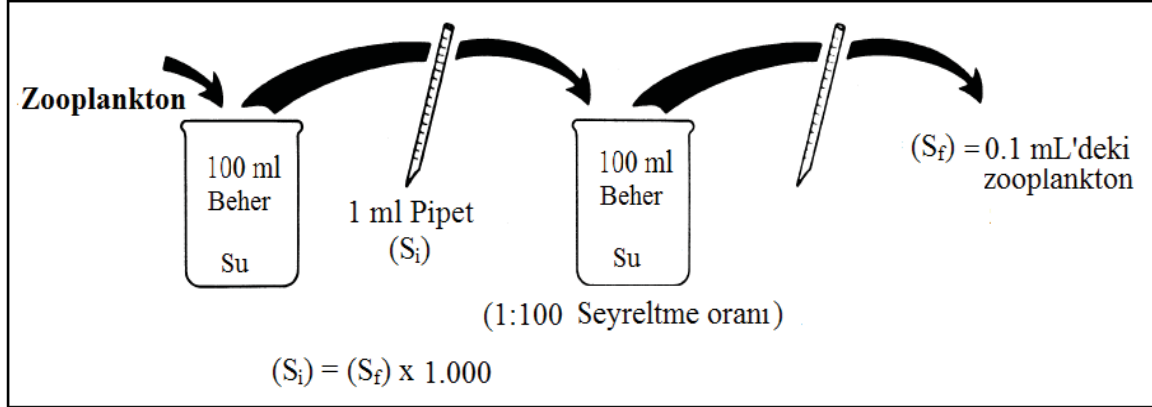
2.2.4.Faz Kontrast Mikroskopik Analizi

NP uygulamasının zaman ve konsantrasyona bağlı olarak, organizmalar üzerinde deformasyon, NP birikimi gibi sonuçlarını görebilmek için faz kontrast mikroskobu (Olympus Marka, BX53+SC50 Model) ile görüntüler alınmıştır.

2.2.5. Zooplankton Sayımı

Zooplankton grubunda olan *A. salina*'nın yumurtasından (kuluçkadan) yavru çıkma oranı değişkenlik gösterir; bu nedenle deney öncesi kuluçkadan çıkan *A. salina* 'nın yavruları sayısının hassas bir biçimde özenli sayılması gerekir. Bu nedenle zooplanktonlarda seyreltme metodu ile tüm gruptaki toplam birey sayısı yaklaşık olarak bulunmuştur. Sayma stratejisi Şekil 2.5.'te belirtilen prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Özetle, kuluçkadan çıkmış zooplankton içeren 100 mL'lik bir çözelti temiz bir cam behere konulmuştur. Sürekli karıştırmayla bu stoğun 1,0 mL'si 100 mL'ye aktarılmış ve su ile 100 mL'ye seyreltilmiştir. Daha sonra bu seyreltik çözeltiden 0,1 mL pipet ile ortamdan örnek alınmış ve ışık altında sayılmıştır (Şekil 2.5.). Zooplanktonların sayısı bu hacimde görsel olarak belirlenmiştir.

Deneme dizaynında belirtilen *A. salina* sayısı sağlandıktan sonra organizmalar, Tablo 2.1.'de gösterilen konsantrasyon oranlarına tabi tutulmuştur.



Şekil 2.5. Zooplanktonların sayılması

(Zooplankton stoğunun sayımı için ardışık seyreltilmesi [S_i = Larvalarının başlangıç stoğundaki sayısı; S_f = Larvalarının son sayım çözeltisindeki (0.1 mL) sayısı. Larvalarının toplam sayısı; $S_i = S_f \times 1,000$])

2.2.6. Nanopartiküllerin LC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Araştırmada kullanılan Cu ve CuO NP'lerin LC₅₀ değerlerinin belirlenmesi için NP'lere maruz bırakılan organizma ortamından; başlangıç (0. saat), 24., 48. ve 72. saat zaman dilimlerinde 1,0 mL'si 10 mL'ye aktarılmış ve deniz suyu ile 10 mL'ye seyreltilmiştir. Daha sonra, bu seyreltik çözeltiden 0,1 mL karıştırılırken alınmış ve ışık altında organizmaların sayısı bu hacimde görsel olarak belirlenmiştir. Her bir tekrür için üç paralel olacak şekilde sayım yapılmış ve sayıların ortalaması alınmıştır. Bu işlem her bir NP için yapılmış, 72 saatlik deney sonucunda öldürücü konsantrasyonu bulmak amacıyla her konsantrasyon için ölen bireylerin sayıları ve ölüm yüzdeleri saptanarak bilgisayar programı yardımıyla probit değerlere dönüştürülmüştür.

2.2.7. Kimyasal Analizler

Artemia salina'da olası NP birikim ve eliminasyonun belirlenmesi için deney süresinin belirli zaman dilimlerinde ve deneyin sonunda [24. saat; 48. saat; 72. saat ve eliminasyon (ilave 24 saat)] organizmadan numuneler alınarak kimyasal analizler yapılmıştır. Organizmalarda NP'lere bağlı olarak birikim ve eliminasyon oranının belirlenmesi için ICP-MS cihazında (Varian Marka, 820-MS Model) analizi yapılmıştır.

Bu kapsamda *A. salina*'da birikim ve eliminasyon oranlarını saptamak için, örnekleme saatlerinde tüm gruplardan alınan numuneler, bir vakum pompasına uygun şekilde bağlı olan filtre sisteminden (0,47 mm gözenekli Whatman filtre kâğıdından) geçirildi. Süzme kâğıdı üzerindeki örnekler, içinde saf su olan piset yardımıyla birkaç kez yıkandıktan sonra plastik bir spatula ile filtre kâğıdı üzerinden alındı ve hassas terazide tartıldılar. Burada her bir tekerrür için alınan örnek miktarının 100-150 mg olmasına dikkat edildi. Grup ve saat bilgilerinin üzerinde yazılı olduğu ependorf tüplere konulan örnekler, kimyasal analiz süresine kadar 4 °C muhafaza edildi. Digest (çözdürme) işleminde ise tüplerdeki numunelerin üzerine otomatik pipet yardımı 0,5 mL saf nitrik asit (HNO_3) ekleyip, tüp çeperinde örnek kalmamasına dikkat edildi. Ependorf tüplerde çözünen örnekler yüksek sıcaklığa dayanıklı teflon tüplere aktarıldı (Şekil 2.6.a). Çözdürme işlemi çeker ocak altında yapılmalıdır. Son olarak teflon tüplerdeki asit miktarı 2 mL'ye tamamlanmış ve tüplerin ağızları dikkatlice kapatıldıktan sonra örnekler mikro dalga fırında uygun protokol ile yakma işlemi yapılmıştır (Şekil 2.6.b). Çözündürme işleminden sonra örnekler soğutmaya bırakılıp, çeker ocak altında 15 mL'lik falkon tüplere aktarılmıştır. Teflon tüpler ultra saf su ile yıkanarak 15 mL'ye tamamlanmıştır. Bu seyreltmeler sonuncunda ortamdaki nitrik asit oranı %5'e ayarlanmıştır. Elde edilen örneklerden ependorf tüplere 2 mL aktarılmıştır. Her iki NP örnekleri için aynı prosedür izlenmiştir. Ayrıca tüm örneklerin tamamen çözünmesi görsel olarak da kontrol edilmiştir. Örneklerdeki metal birikim değerleri ICP-MS cihazı ile tespit edilmiştir.

Organizmalardaki birikim ve eliminasyon metal analizleri için Spiny Dogfish (*Squalus acanthias*) kası (DORM-2) ile American lobster (*Homarus americanus*) hepatopankreası (TORT-2), ICP-MS kalibrasyonunda sertifikalı referans materyali olarak kullanılmıştır. Referans materyal olarak kullanılan DORM-2 ve TORT-2 malzemeleri Kanada Ulusal Araştırma Birimi'nden temin edilmiştir. Sertifikalı değerler için ölçülen ilgili metalleri genellikle değerler %90-115 arasında bulunmuştur. Ayrıca ICP-MS analizinde kullanılan stok metal standart çözeltileri ise (100 µg/mL) SCP Science (Champlain, NY, ABD) firmasından temin edilmiştir. ICP-MS ölçümleri için kalibrasyon standartları 0-100 µg/L aralığında olacak şekilde %5'lik HNO_3 içindeki her bir metal standart çözeltisinden hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerin, metal içeriğinin belirlenmesi için, ICP-MS kullanılarak analizler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda, kullanılan asidin seyreltme oranı ile kullanılan yaş organizma ağırlık oranları dikkate alınarak toplam metal içeriğin hesaplanması, kuru ağırlık (µg/g) olarak ifade edilmiştir.



Şekil 2.6. a) Çeker ocak altında örneklerin asit içinde çözdürülmesi, b) Mikrodalga fırınında yakma işlemlerin yapılması

2.2.8. Metal İyon Analizleri

Metal ve metal oksit NP'lerin bulunduğu ortama iyon salınımları toksisite açısından önem arz etmektedir. Metal bazlı NP'lerin toksisite oranlarını genelde ortama verdiği iyon miktarı belirler. Toksik olmayan bazı NP'ler ortama verdiği iyon miktarından dolayı organizma için zararlı olur ve organizmanın ölüm oranındaki artış ortamda bulunan iyon salınımlarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca tüm nano malzemelerin akuatik ortamda çözünmeleri farklılık göstermektedir. Araştırmada kullanılan Cu ve CuO NP'lerin ortamda çözünmelerini ve iyon (Cu^+) miktarlarını belirlemek için deney ortamından (NP'lere maruz bırakılan organizmaların bulunduğu ortamdan) su örneği alınarak ICP-MS cihazı ile iyon analizi yapılmıştır. Alınan su örneği (2 mL) herhangi bir partikül veya organizmanın olmaması için 0,45 μm gözenekli MILLEX-HP filtreden geçirilmiştir. Daha sonra alınan örnek 2 ml'lik ependorf tüp içinde 30 dakika 12K rpm'de mikrosantrifüjde santrifüj edilmiştir. Supernatant ortamından 0,1 mL alınıp 1 mL'ye tamamlanmış (ortamın tuzluluk ortamını azaltmak için) ve ICP-MS cihazı ile metal analizleri yapılmıştır.

2.2.9.1. Biyokimyasal Analizler

Artemia salina organizmalardaki oksidatif stresin belirlenmesi için glutatyon (GSH) ve Tiyobarbütirik asit reaktif maddeler (TBARS) analiz yöntemleri kullanılmıştır.

2.2.9.1. Glutatyon Analizi

Glutatyon (GSH), kendisi oksidize olmuş eski halinden geriye döndüren enzim olan GSH redüktaz yapısal olarak aktif olduğundan ve oksidatif stresle uyarılabilir olduğundan hemen hemen sadece indirgenmiş biçimiyle bulunur. Hücrelerdeki indirgenmiş GSH'ın oksidize GSH'a oranı bilimsel olarak hücrel toksisitenin bir ölçüsü gibi kullanılır (Oberdöster, 2004). Toplam GSH miktarı, 5-5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik asit) (DTNB), Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve GR varlığında enzimatik döngü prosedürü ile ölçülmektedir. GSH analizinde ilk olarak buffer hazırlanır. Bufferda; 100 mM potasyum fosfat [KH_2PO_4], 5 mM potasyum EDTA ve 2,0 M potasyum hidroksit (KOH) ile pH 7,5'e ayarlanır. Daha sonra ayrı kaplarda 2U/ml GSH redüktaz 10 mM DTNB ve 3,63mM NADPH -2ml buffer içerisinde hazırlanır.

Deneyin uygulanışı; GSH analizi mikroparka okuyucuda (Thermo Scientific Marka, Multiskan FC Microplate Photometer Model) 412 nm dalga boyunda yapılmıştır. Plakanın tüm kuyucuklarına ilk olarak 20 µl DNTB konulmuş, sonra ilk kuyucuklara 40'ar µl kör örnek ve standartlar (B,C,D,E,F 1-3) konulmuştur. Geriye kalan 78 kuyucuğa ise 26 zooplankton örneğinden (26x3) 40'ar µl eklenmiştir. Daha sonra tüm kuyucukların üzerine 20 µl GSH redüktaz ve 260 µl analiz bufferından ilave edilmiştir. Tüm kimyasallar dengelendikten sonra 8 kanallı (Brand Marka, Transferpette® 8, 20-200µl Model) multipipetle reaksiyonu başlatan 20 µl NADPH ilave edilmiştir. Kinetik enzimin başlangıç ve bitiş aşamalarını gözlemleyebilmek için 10 dk boyunca her 10 sn'de bir okuma alınmıştır. Analiz sonuçları reaksiyonun durduğu noktadaki absorbanstan başladığı noktadaki absorbansın çıkarılması ile elde edilmiştir. Aynı örneklerden Bradford protein analizi (Bradford, 1976) de yapılarak sonuçlar protein içerisindeki GSH olarak verilmiştir.

2.2.9.2. Tiyoarbutirik Asitle Tepkimeye Giren Maddelerin Analizi

Bu yöntemin prensibi, oksidatif stres belirteçlerinden olan tiyoarbutirik reaktif maddeler (TBARS) testinde kullanılan kimyasalların reaksiyona girerek kırmızı renkli pigment oluşturmaya esasına dayanmaktadır. Oluşan kırmızı-pembemsi renkteki pigment spektrofotometrede 532-535 nm’de ölçülmektedir. Deney ayıracı aşağıda verilmiştir;

Ayırak 1: Fosfat bufferı hazırlamak için 7,8005 g sodyum dihidrojen ortofosfat 400 ml saf su içerisinde çözündürülmüştür. Üzerine bir kaç damla sodyum hidroksit ilave edilerek pH 7,5’e ayarlanmıştır. pH 7,5 olduktan sonra üzeri 500 ml olacak kadar saf su ile tamamlanmıştır.

Ayırak 2: 5 gr Trikloroasetik asit (TCA) katı çözeltisi üzeri 10 ml olacak kadar saf su ilave edilerek ayrı bir kaba alınmıştır.

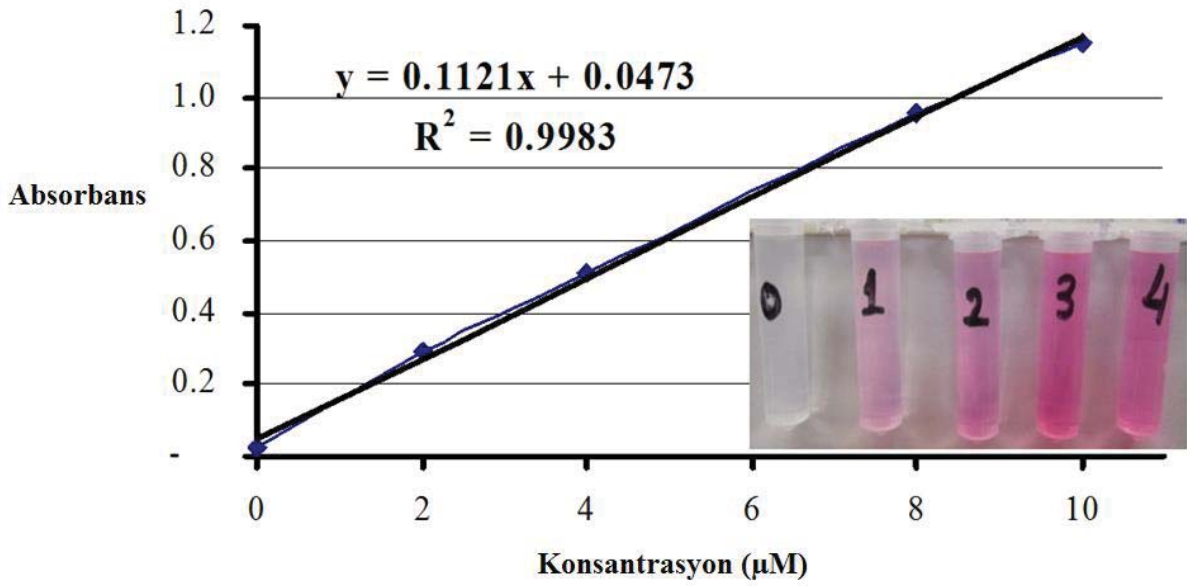
Ayırak 3: 0,09 gr NaOH üzeri 30 ml olacak kadar saf su ilave edilerek ayrı bir behere alınmıştır.

Ayırak 4: 0,13 gr TBA üzerini 10 ml olacak kadar NaOH içerisinde çözündürülerek ayrı bir behere alınmıştır.

Ayırak 5: 2,2 gr Butil hidroksi toluen (BHT) 10 ml etanol içerisinde çözündürülerek ayrı bir behere alınmıştır.

Deneyin Uygulanışı: TBARS analizi mikroparka okuyucu (Thermo Scientific Marka, Multiskan FC Microplate Photometer Model) kullanılarak yapılmıştır. Tüm çözeltiler hazırlandıktan sonra mikroparka içerisinde ilk önce her bir kuyucuğa 140 µl fosfat buffer koyulmuştur. Üzerine 50 µl TCA ilave edilmiştir. Bunların üzerine her bir standart ve örnekten 200 µl 3 tekrarlı olmak üzere hücrelere koyulmuştur.

Daha sonra 75 µl TBA ilave edildikten sonra mikroparkanın üzeri kapatılarak 60 °C’de 1 saat etüvde inkübe edilmiştir. Sonra mikroparka okuyucusunda 530 nm dalga boyunda okunmuştur. Sonuçlar aynı dokulardan Bradford protein analizi de yapılarak değerlendirilmiştir. Analiz kalibrasyon standart grafiği Şekil 2.7.’de verilmiştir.



Şekil 2.7. Analiz kalibrasyon standart grafiği

2.2.10. İstatiksel Analiz

Bütün deneyler bağımsız olarak üçer kez yinelenmiştir ve veriler standart sapmalı ortalamalar olarak kaydedilmiştir. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları bulmak için Tukey'in çoklu karşılaştırmaları ile değişkenlerin tek yönlü analizi (ANOVA SPSS/24.0 software) kullanılmıştır. Grupların paralel mukayesesi için Student's t-test kullanılmıştır. Bütün veri analizlerinde p-değeri, 0,05 olarak alınmıştır.

Ortalama parçacık çapı ve boyut dağılımı ImageJ yazılım programı kullanılarak tespit edilmiştir.

Kristal oluşumu difraksiyon deseninden belirlenmiş ve kristalit boyutu Scherrer formülü ile hesaplanmıştır.

Denemelerde; Cu (60-80 nm), CuO (40 nm), boyutlarındaki NP'lerin ortama etkisini bulmak amacıyla UV-Vis absorbans değerleri istatistiksel deney tasarım programlarından olan Design Expert v.10. kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Faz kontrast görüntüler özel lam içindeki canlı organizmalardan Micron Görüntüleme yazılım programı ile (Micron Imaging software) elde edilmiştir.

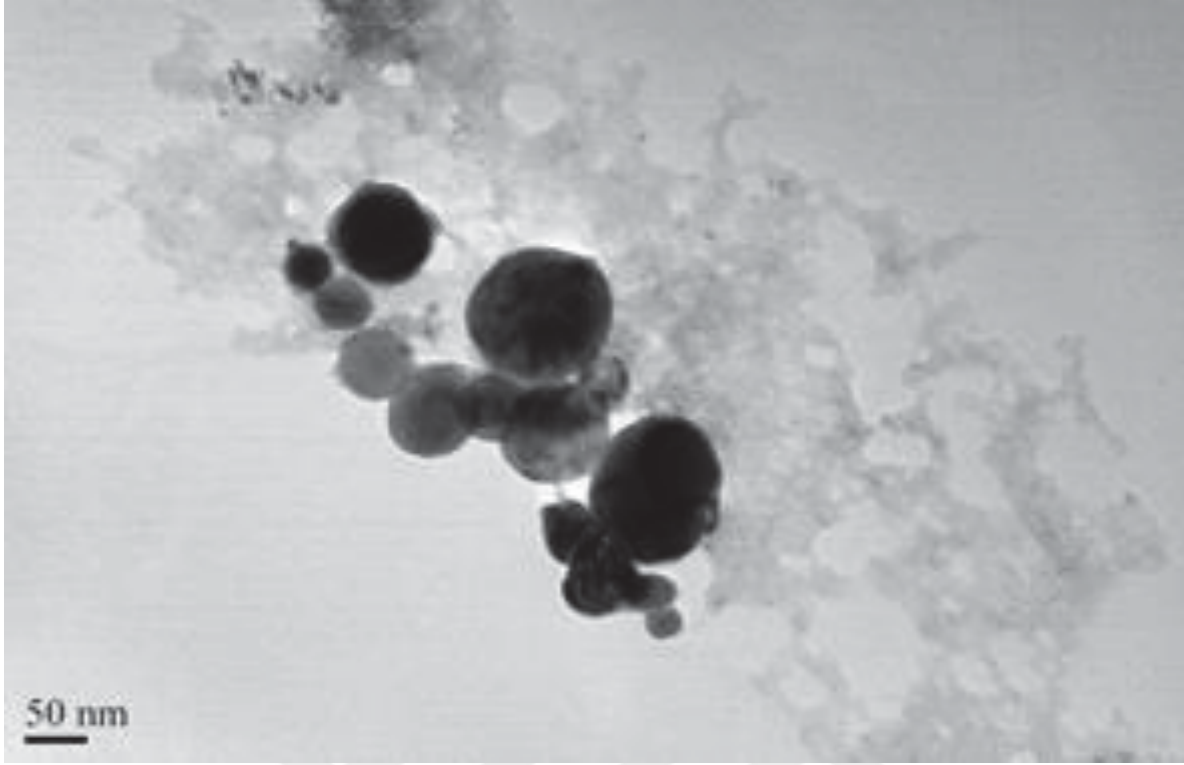
3. BULGULAR

3.1. Nanomalzemelerin Karakterizasyon Sonuçları

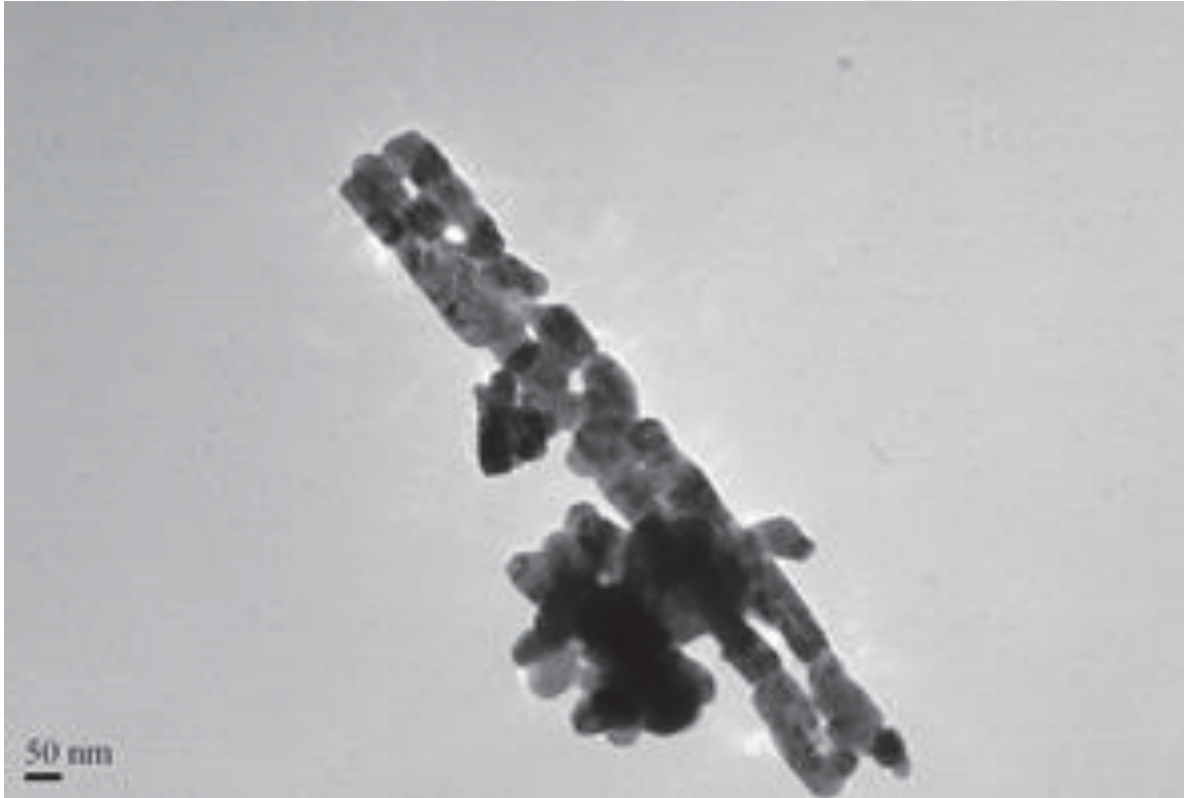
Nano toksisite biyodeney çalışmamızda kullandığımız Cu ve CuO NP'lerin karakterizasyonu için gerçekleştirilmiş olan TEM, DLS, Zeta Potansiyeli, XRD, SEM, FT-IR ve UV-görünüm spektroskopisi analiz sonuçları aşağıda değerlendirilmiştir.

3.1.1. Transmisyon Elektron Mikroskobu Analiz Sonuçları

Cu ve CuO NP'lerden elde edilen TEM görüntüleri Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de verilmiştir. Her metal grubu ayrı bir karakteristik özellik göstermesine rağmen metal ve metal oksit NP'lerinin koloidal (akuatik ortamda) yapıda agregat (kümeleşme) yapmaya meyilli olduğu görülmüştür. Ayrıca metal ve metal oksit NP'lerin şekilsel yapısı incelendiğinde yuvarlak veya küresel bir yapı sergiledikleri görülmektedir. Tüm NP'lerde olmamakla birlikte nanorod dediğimiz farklı ebatlarda çubuksu yapılarında olduğu görülmektedir.



Şekil 3.1. Biyodenedeyde kullanılan Cu (60-80 nm) NP'lerinin TEM görüntüleri



Şekil 3.2. Biyodenedeyde kullanılan CuO (40 nm) NP'lerinin TEM görüntüleri

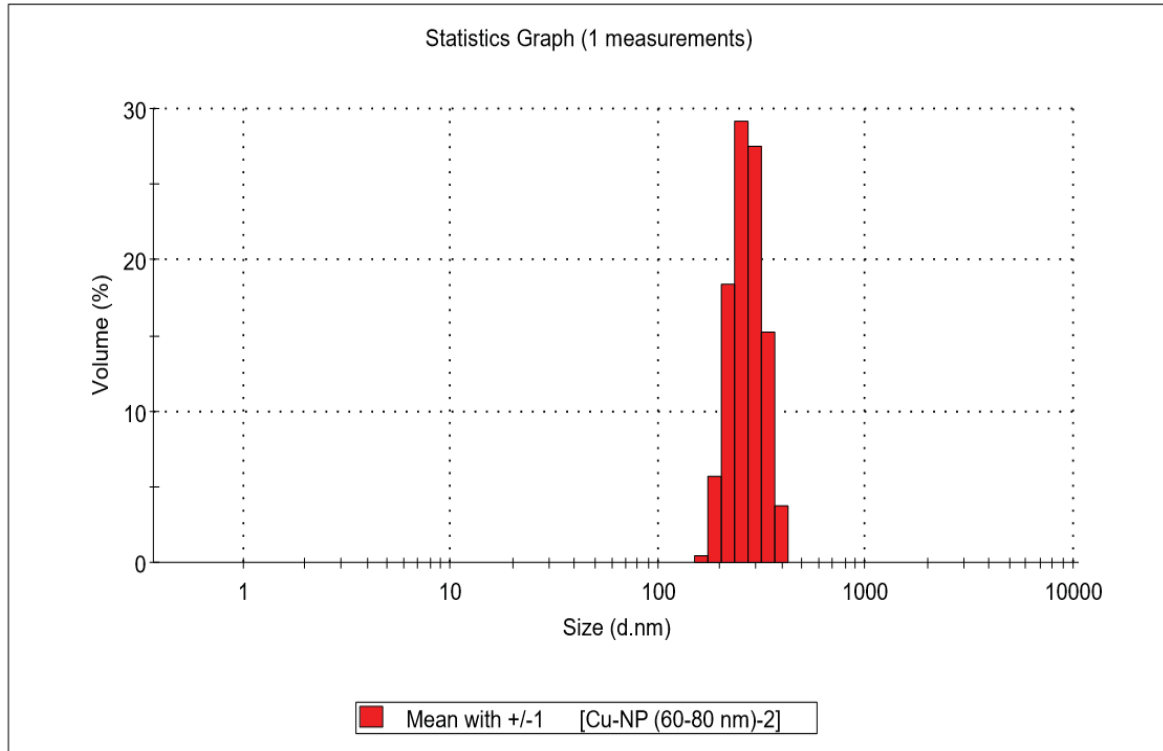
3.1.2. Dinamik Işık Saçılımı Analiz Sonuçları

Cu ve CuO NP'ler için elde edilmiş DLS sonuçları Şekil 3.3. ve Şekil 3.4.'te, ortalama parçacık boyut değerleri ise Tablo 3.1.'de verilmiştir. DLS sonuçları incelendiğinde her bir NP'de gerçek boyutlarının 10-100 katı arasında büyüme olduğu görülmektedir. DLS grafikleri incelendiğinde metal bazlı Cu ve CuO NP'ler homojen aralıklarda dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

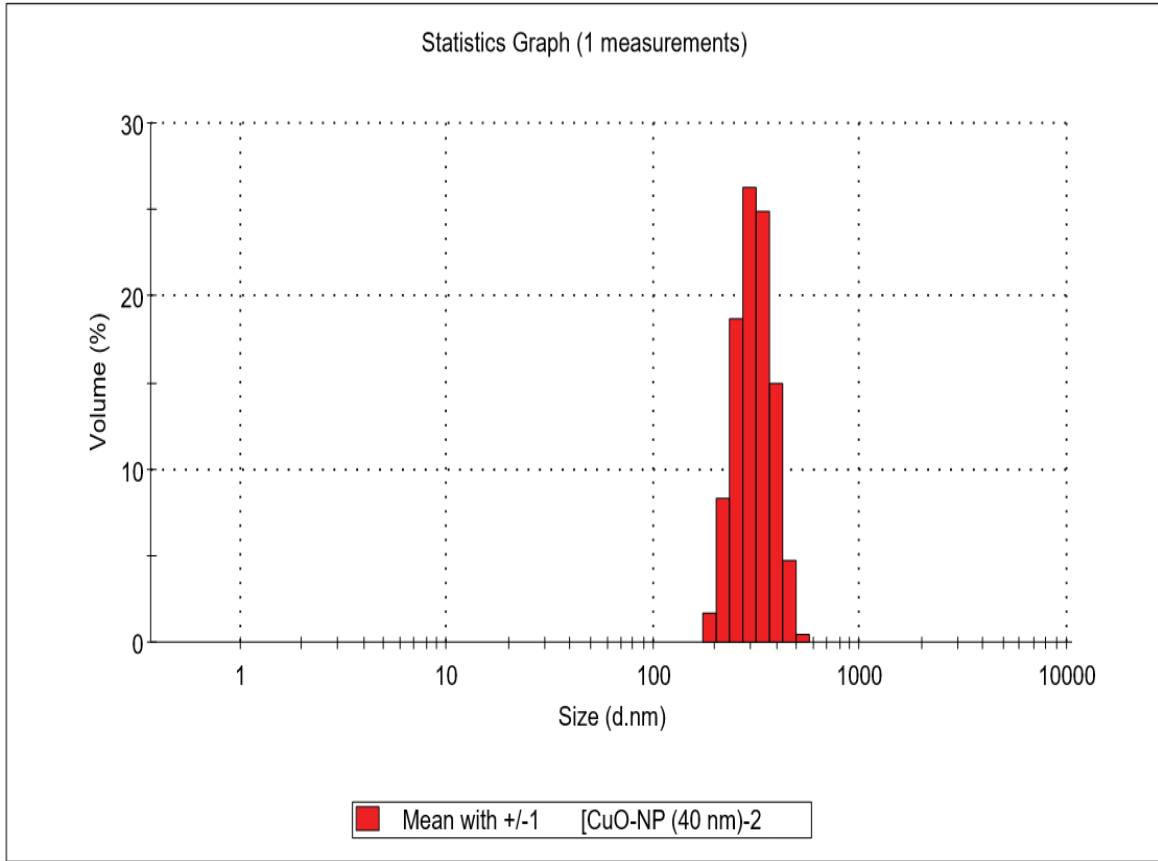
Tablo 3.1. Sulu ortamdaki Cu ve CuONP'lerin boyut dağılımı, PdI ve yüzey yükü değerleri

Nanopartiküller	DLS Boyut [Z-Average (d.nm)]	PdI*	Zeta Potansiyeli (mV)
Cu-NP'leri (60-80 nm)	435,1	0,519	+7,2
CuO-NP'leri (40 nm)	404,1	0,418	+17,1

*: Polidispersite indisi: Ağırlıkça Ortalama Molekül Ağırlığı'nın, Sayıca Ortalama Molekül Ağırlığı'na oranı, o malzemenin karışımının polidispersitesi (saçınımı) veya polidispersite indisi (saçınım indisi) olarak tanımlanır.



Şekil 3.3. Cu (60-80 nm) NP'lerinin dinamik ışık saçılımı analiz sonuçları

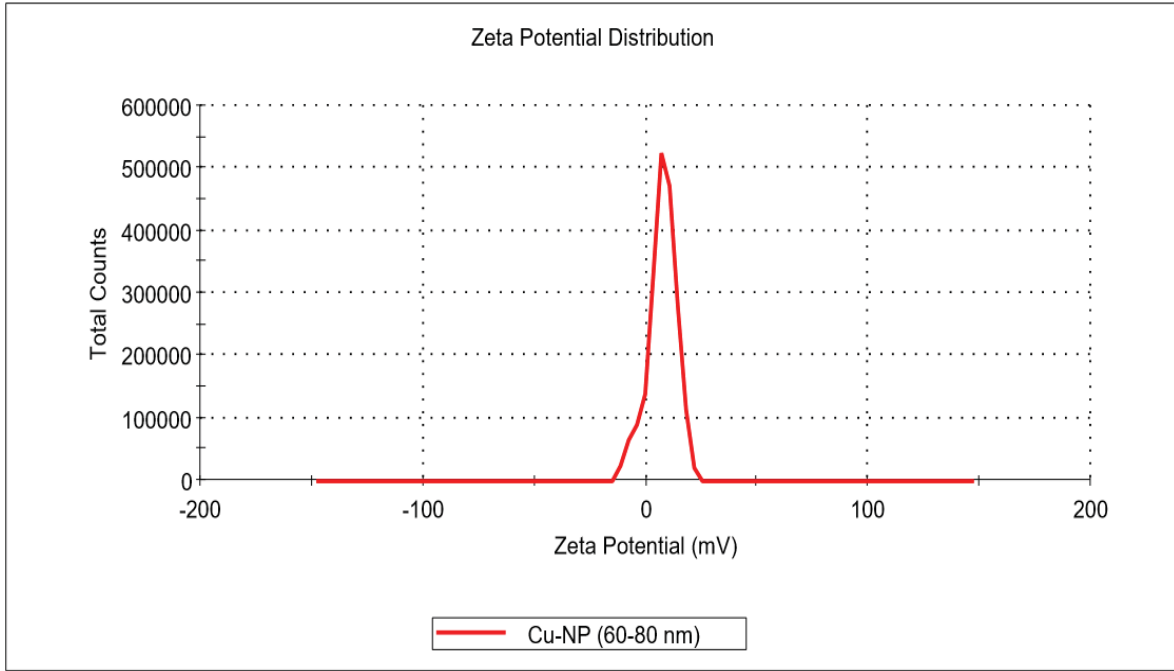


Şekil 3.4. CuO (40 nm) NP'lerinin dinamik ışık saçılımı analiz sonuçları

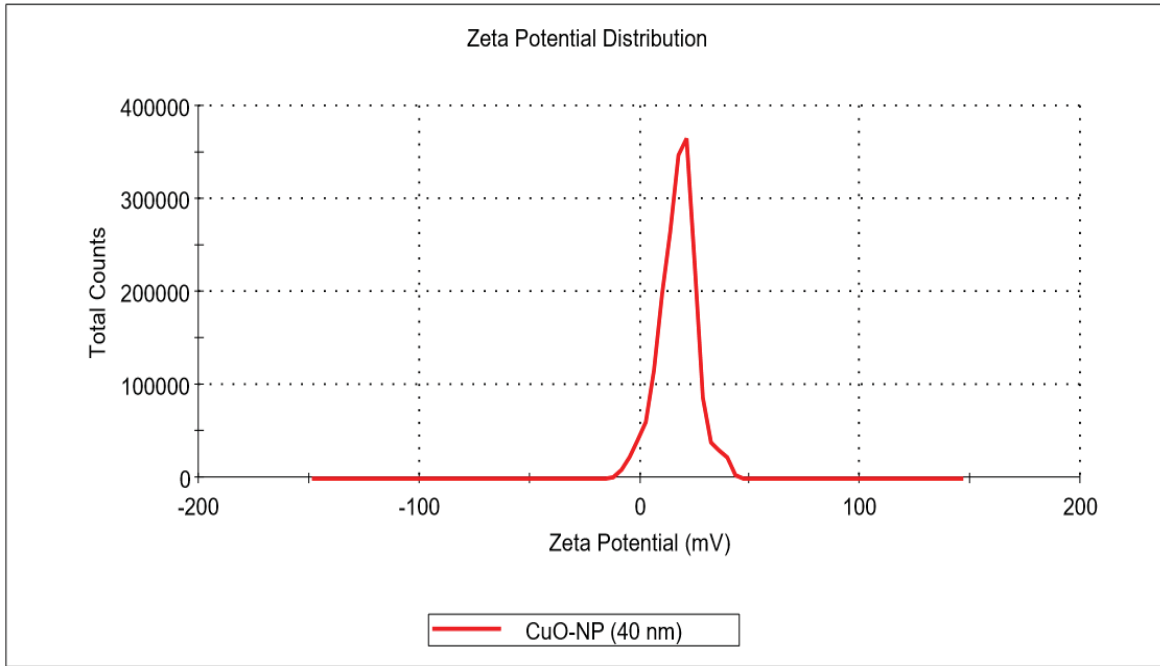
3.1.3. Zeta Potansiyeli Analiz Sonuçları

Cu ve CuO NP'lerin zeta potansiyel analizi sonucunda elde edilen (+/-) yüzey yükü ve değerleri (mV) Tablo 3.1.'de, Zeta potansiyel grafikleri ise Şekil 3.5. ve Şekil 3.6.'da verilmiştir. Zeta potansiyel sonuçları incelendiğinde NP'ler pozitif (+) yüzey yükü göstermektedir.

Buna göre çalışmada kullandığımız metal ve metal oksit bazlı NP'ler 7,2 ile 17,1 mV özellik gösterdikleri için minimal düzeyde kararlı olmakla birlikte, araştırmada kullandığımız her iki NP'de kümeleşme veya bir araya gelme eğilimi birinci derecede özellik sergilememişlerdir. Bu kapsamda kullandığımız bu her iki NP'lerin kümeleşme veya birleşme özellikleri minimal düzeyde olmuş olduğu bu NP'lerin polidispersite indisi değerleri genellikle 0,418 ile 0,519 arasında olmuştur.



Şekil 3.5. Cu (60-80nm) NP'lerinin zeta potansiyeli analiz sonuçları

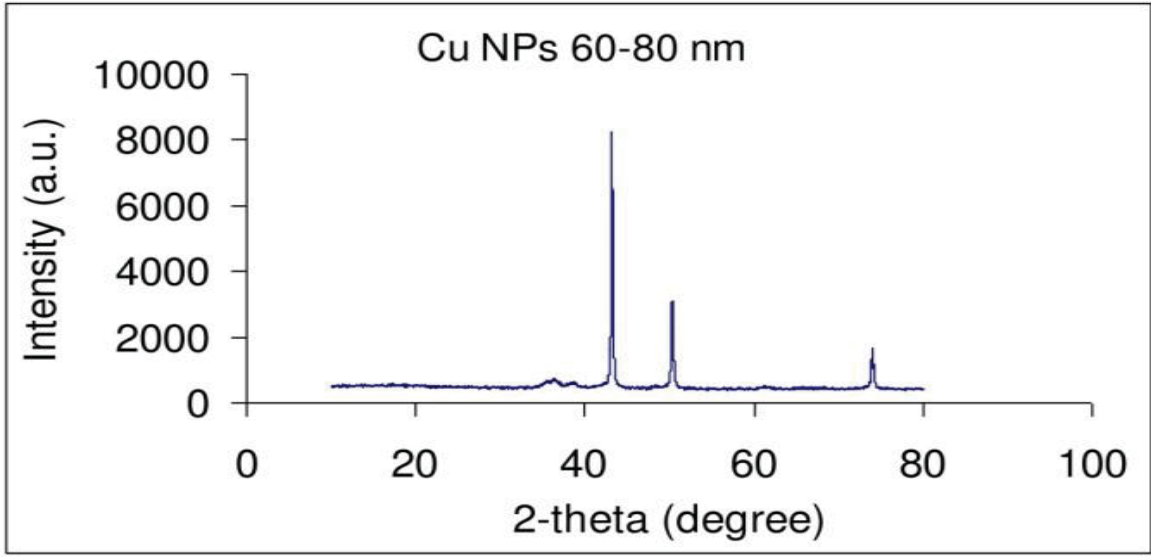


Şekil 3.6. CuO (40nm) NP'lerinin zeta potansiyeli analiz sonuçları

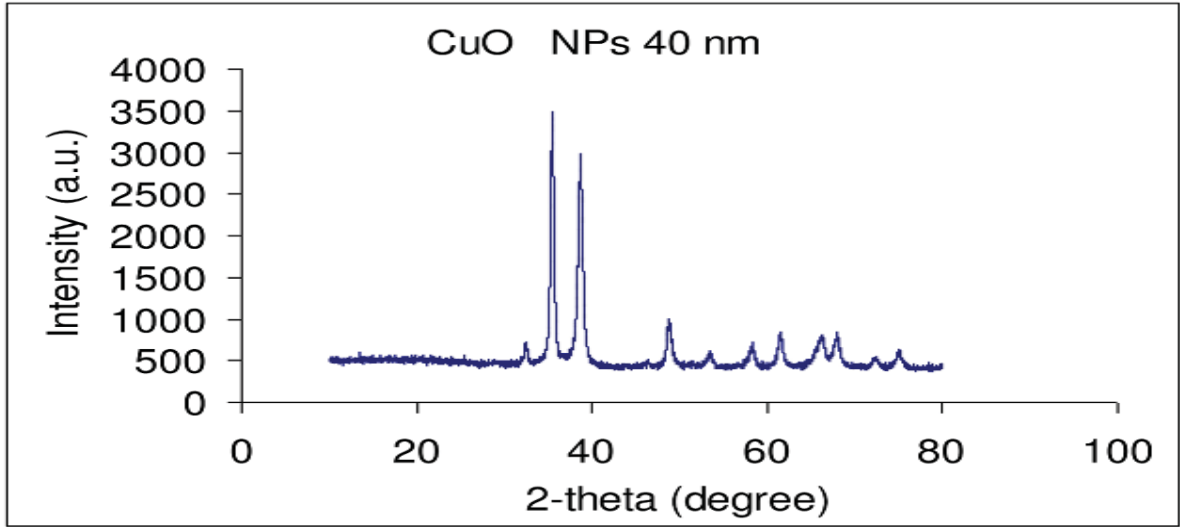
3.1.4. X-Işını Kırınım Analiz Sonuçları

Cu ve CuO NP'lerin XRD analizleri yapılmış ve sonuçları Şekil 3.7. ve Şekil 3.8.'de verilmiştir. Buna göre Bakır grubu NP'lerin XRD sonuçları incelendiğinde; Cu ve CuO NP'lerin 2θ 'deki tepe pozisyonları literatürde rapor edilen değerlerle ve standart spektrumlarla uyumludur. Kırınımın keskin tepe noktaları, örneklerin yüksek kristalliliğini gösterir ve hesaplanan kristalit boyutları üretici verileri ile uyum içindedir.

CuO NP'in (40 nm) X ışını spektrumu Şekil 3.8.'de gösterilmiştir. Bu iki ana kırılım doruk noktası içerir (2θ) bunlar, $35,71^\circ$ ve $38,92^\circ$ değerli yüksek yoğunluklu ve 5 doruk noktalı bir seri olan $48,96^\circ$, $58,56^\circ$, $61,74^\circ$, $66,44^\circ$ ve $68,13^\circ$ düşük doruk noktasına sahip olanlardır. Bu doruk noktalarının konumları ICDD (Uluslararası Kırınım Veri Merkezi) kart no 801916 tarafından raporlanan standart verilerle de uyumlu olarak belirlenmiştir. Kırınım spektrumunun keskin doruk noktaları, CuO numunesinin yüksek kristallik derecesini gösterir. Scherrer formülünü ve ana kırınım doruk noktalarına karşılık gelen verileri kullanarak kristalitin ortalama boyutu $38,54\text{ nm}$ olarak hesaplanmıştır. Cu NP'lerin (60-80 nm) XRD deseni için (2θ) $36,5^\circ$, $43,35^\circ$ ve $50,52^\circ$ 'de ana doruk noktaları ve $74,27^\circ$ derece değerinde düşük bir doruk noktası kaydedilmiştir (Şekil 3.7.). Standart kırınım kart dosyası no. 04-0836'deki (JCPDS) doruk noktalarına karşılık gelir. Kristallerin ortalama boyutu $69,21\text{ nm}$ olan numunenin yüksek kristallliği nedeniyle doruk noktaları keskindir. XRD sonuçları hem CuO hem de Cu NP'leri için nano boyutlu kristalleri ortaya çıkaran SEM görüntüleri tarafından desteklenmektedir, Şekil 3.9. ve Şekil 3.10. Bunların kristalleri CuO NP'lerde nano çiçekler olarak ve Cu NP'lerde ise top şeklinde kümeler oluşturmuştur.



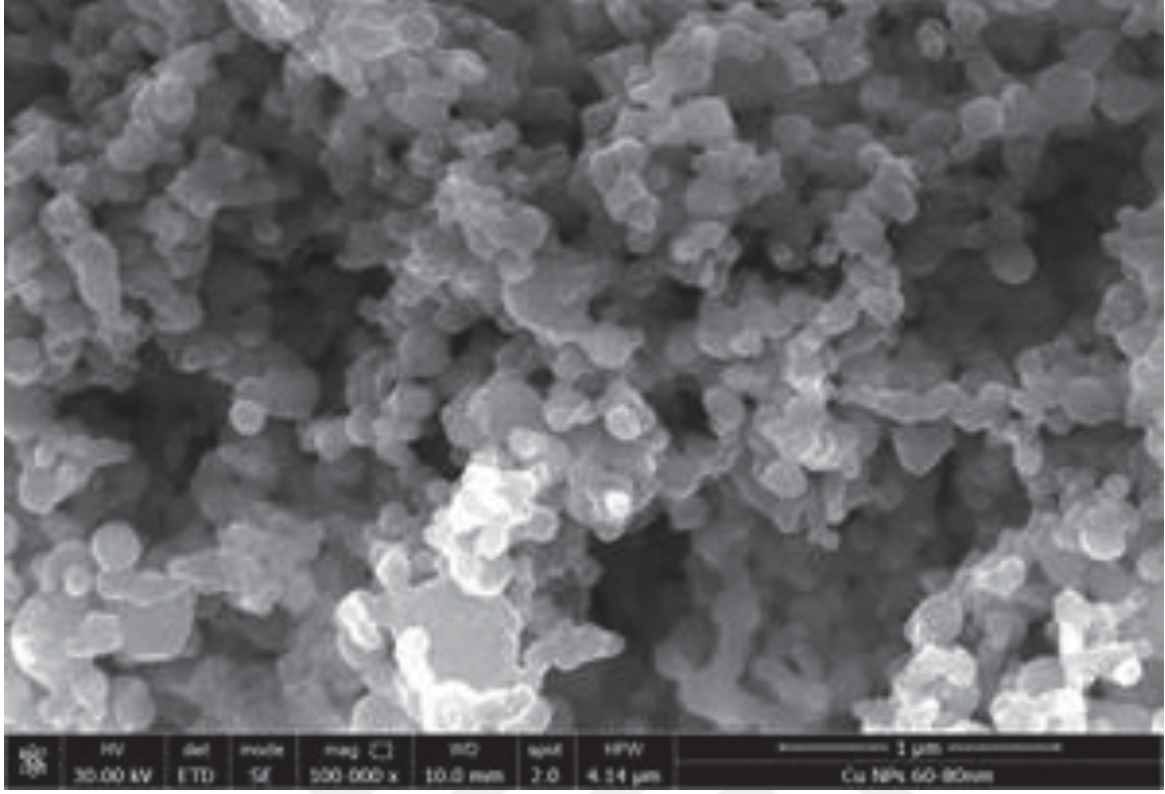
Şekil 3.7. Cu (60-80nm) NP'lerinin XRD sonuçları



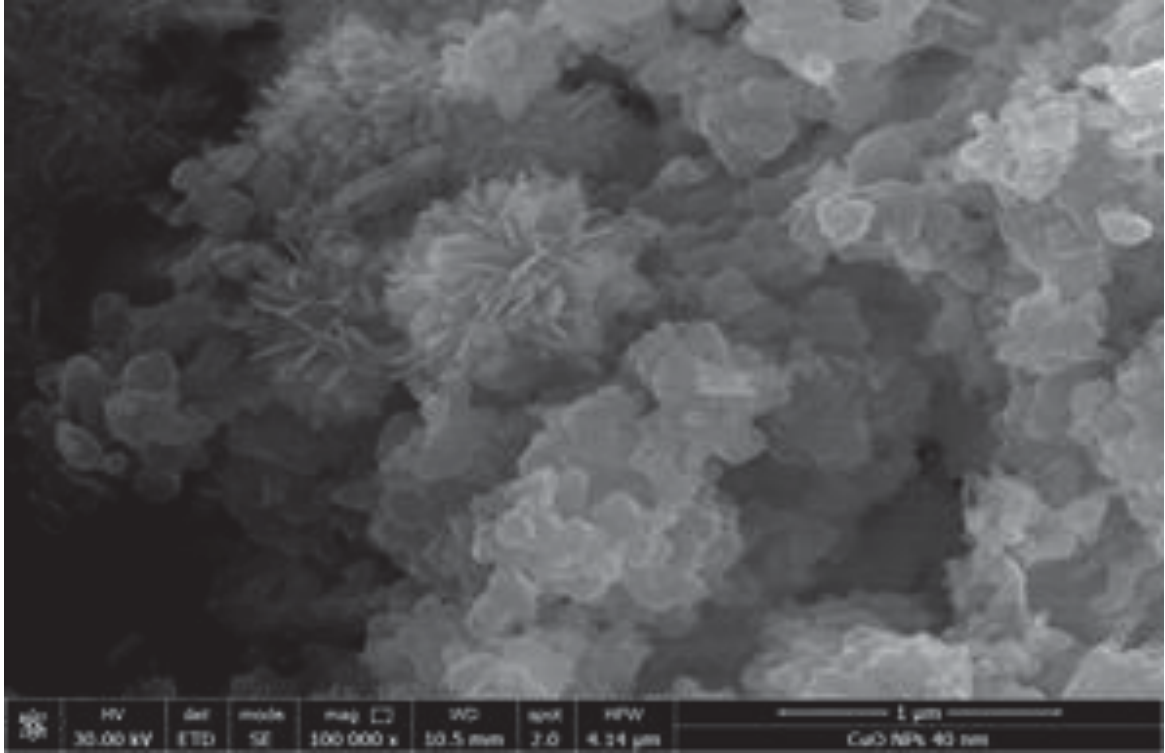
Şekil 3.8. CuO (40nm) NP'lerinin XRD sonuçları

3.1.5. Taramalı Elektron Mikroskobu Analiz Sonuçları

Cu ve CuO NP'lerin morfolojisi SEM'de analiz edilmiş ve sonuçlar Şekil 3.9. ve Şekil 3.10.'daverilmiştir. Buna göre bakır grubu SEM sonuçları incelendiğinde; bakır grubu XRD sonuçları SEM görüntüleri ile desteklenmiştir ki bu da Cu ve CuO NP'leri için nano boyuttaki kristalleri ortaya koymaktadır. Onların kristalleri CuO için nano çiçekler şeklinde ve Cu NP'leri için de toplar şeklinde kümeler oluşturmuşlardır.



Şekil 3.9. Cu (60-80 nm) NP'lerinin SEM görüntüleri



Şekil 3. 10. CuO (40 nm) NP'lerinin SEM görüntüleri

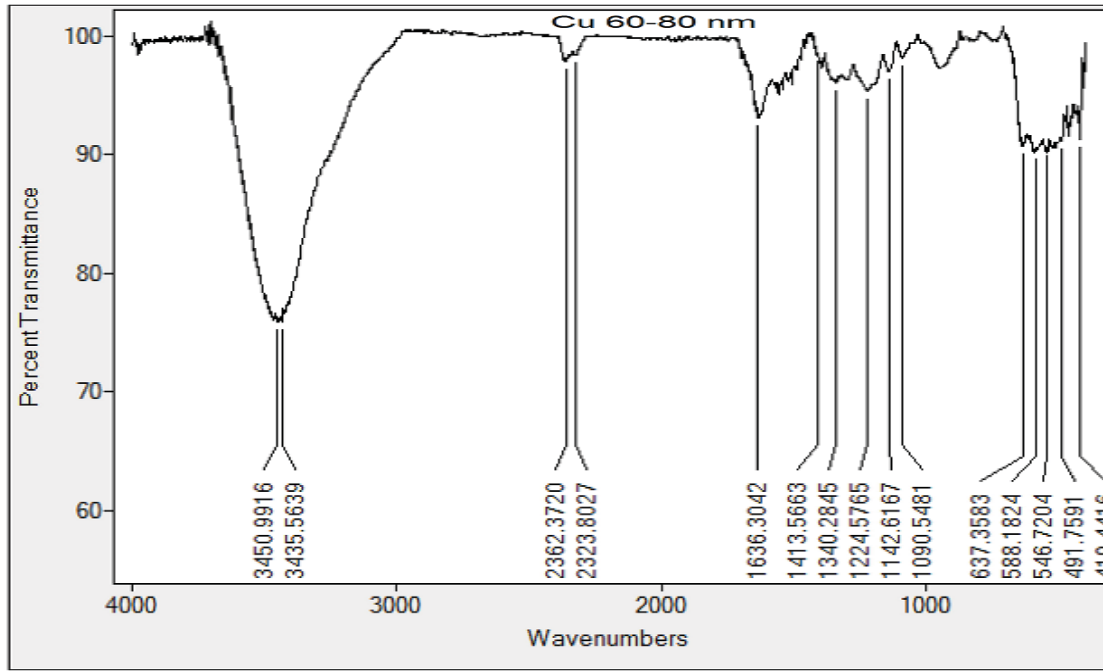
3.1.6. Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi Analiz Sonuçları

Bakır grubu NP'lerin FT-IR analizleri yapılmış ve sonuçları Tablo 3.2. ve Şekil 3.11. ve Şekil 3.12.'de verilmiştir. FT-IR sonuçları incelendiğinde, Cu (60-80 nm) ve CuO (40 nm) NP'lerin infrared spektrumları adsorbe edilen su nedeniyle benzer bandlar gösterir ve tepe noktaları az miktardadır ki bu da atmosferdeki karbondioksit ile ilgilidir; ayrıca, $\sim 650-400 \text{ cm}^{-1}$ aralığındaki bakır oksit için belirgin ve keskin bant Cu-O bağına atanır ve $\sim 700-400 \text{ cm}^{-1}$ aralığındaki küçük çoklu tepe noktaları Cu NP'lerinin saflığını gösterir. Her iki spektrum, adsorbe su nedeniyle O-H grubuna verilen $3446,1, 1633,4 \text{ cm}^{-1}$ ve $3450,9, 1636,3 \text{ cm}^{-1}$ 'deki benzer bantları göstermektedir. $2359,4$ ve $2333,4 \text{ cm}^{-1}$ ile $2362,3$ ve $2323,8 \text{ cm}^{-1}$ 'deki düşük doruk noktaları atmosferdeki çok düşük miktardaki karbondioksit ile alakalıdır ve her iki kuşağın ve karbondioksitin $1413,5 \text{ cm}^{-1}$ değerindeki diğer doruk noktaları bikarbonattandır. Cu-O bağına özgü bakır oksit için $546,7 \text{ cm}^{-1}$ maksimuma sahip ve diğer maksimumları $583,3, 496,3$ ve $451,2 \text{ cm}^{-1}$ olan $\sim 650-400 \text{ cm}^{-1}$ aralığında ayrı ve keskin bir kuşak vardır. Bakır NP'i için $700-400 \text{ cm}^{-1}$ aralığında $636,3, 588,1, 546,7, 491,7$ ve $418,4 \text{ cm}^{-1}$ çeşitli düşük doruk noktalarına sahip, literatüre göre Cu NP'den kaynaklanan bir kuşak kaydedilmiştir, CuO için kaydedilen keskin kuşak ve Cu NP'ler için ince yapıya sahip kuşak yüksek saflık ve kristallik göstermektedirler.

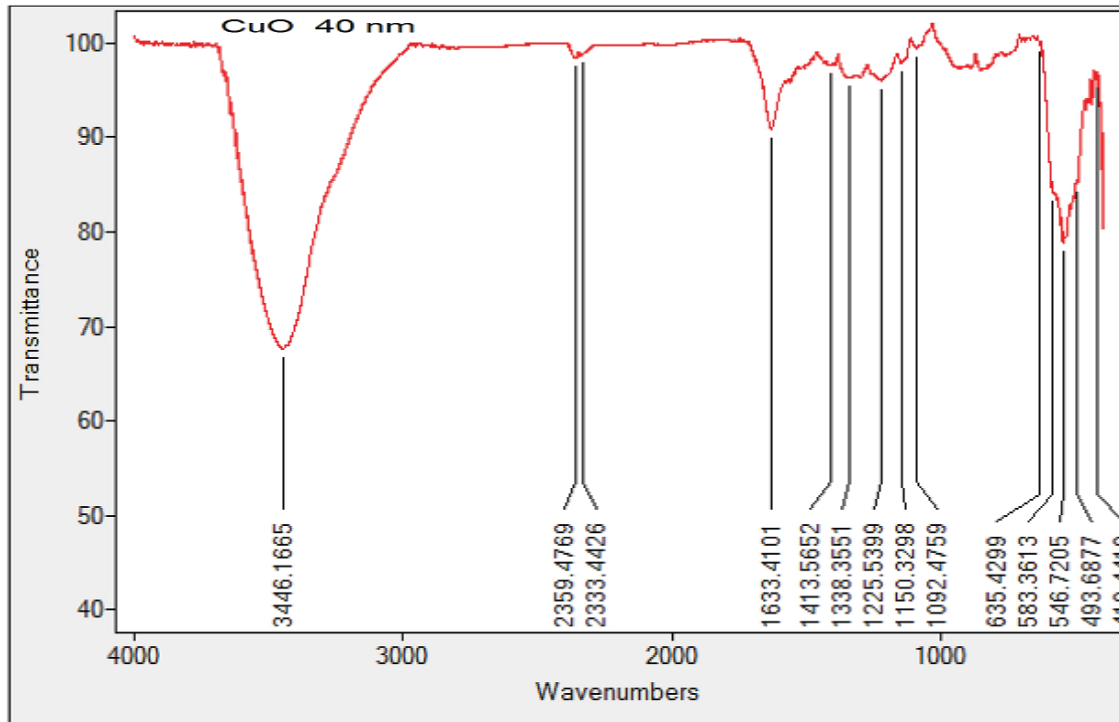
Tablo 3.2. Cu ve CuO NP'lerin spesifik dalga boyu ve FT-IR spektrumlarının geçirgenlik değerleri

No	CuO (40 nm)		Cu (60-80 nm)	
	D*(cm^{-1})	G*(%)	D*(cm^{-1})	G*(%)
1	344.1	75.8	3450.9	67.5
2	2359.4	98.4	3435.5	68.2
3	2333.4	97.8	2362.3	96.5
4	1633.4	93.1	2323.8	97.1
5	1413.5	97.5	1636.3	93.1
6	1338.3	96.1	1413.5	98.7
7	1225.5	95.4	1340.2	96.3
8	1150.3	98.3	1224.5	95.4
9	1092.4	99.4	946.0	97.4
10	635.4	90.7	673.3	90.7
11	583.3	84.1	588.1	84.2
12	546.7	78.9	546.7	78.9
13	493.6	91.5	491.7	91.1
14	451.2	93.6	419.4	96.1

*D: Dalga boyu (cm^{-1}); *G: Geçirgenlik (%)



Şekil 3.11. Cu (60-80 nm) NP'lerinin FT-IR sonuçları



Şekil 3.12. CuO (40 nm) NP'lerinin FT-IR sonuçları

3.2. UV-Vis Absorbans Değerlerini Deneysel Tasarım Sonuçları

Cu ve CuO NP'lerine ait UV-Vis absorbans değerlerini gösteren istatistiksel deneysel tasarım sonuçları polinomal denklem yöntemleri yapılarak incelenmiştir. Bu kapsamda Tablo 3.3 ve 3.4'e göre yapılan deney tasarımı sonucunda elde edilen verilerle, en küçük kareler yöntemi ile regresyon işlemi yapılmıştır. Üç değişken üç seviyeli bu tasarımın sonucunda elde edilen polinomal denkleme göre, aşağıdaki (1,2) eşitlik bize cevap yüzey grafiklerinin elde edilmesini sağlamıştır.

$$y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \dots\dots\dots(1)$$

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \dots\dots(2)$$

Tablo 3.3. Absorbans ölçülmesinde kullanılan bağımsız değişkenlerin seviye ve aralıkları.

Değişkenler	Değişken kodları	Seviyeler		
		-1	0	+1
NP'lerin konsantrasyonu(mg/L)	X1	1	10	50
Etkileştirme süresi (Saat)	X2	24	36	48

Tablo 3.4. İki Bağımsız Değişkenle BBD (Box Behnken Design) modeline göre oluşturulan deney tasarımı.

Deney sayısı	X1: konsantrasyon (ppm)	X2: Süre (saat)	Cu NP'leri (60-80 nm)	CuO NP'leri (40 nm)
1		48.00	0.169	0.168
2	10.00	24.00	0.424	0.117
3	10.00	48.00	0.171	0.166
4	50.00	48.00	0.138	0.343
5	1.00	48.00	0	0
6	10.00	48.00	0.174	0.166
7	10.00	72.00	0.206	0.085
8	50.00	72.00	0.111	0.147
9	10.00	48.00	0.175	0.165
10	1.00	24.00	0	0.047
11	50.00	24.00	0.25	0.383
12	10.00	48.00	0.17225	0.16625
13	1.00	72.00	0	0

İkinci dereceden polinomal eşitlik esas alınarak absorbas değerlerinin farkının bulunmasında; NP konsantrasyonu (ppm) ve etkileştirme süresinin istatistiksel analizi yapılmış ve uygulanan modelin %95 güven aralığı içerisindeki ANOVA analizi incelenmiş ve model ile deneysel bulguların uyumuna bakılmıştır.

Yapılan istatistik değerlendirmede seçilen modelin uygunluğu her bir NP ismi verilerek tablolar şeklinde gösterilmiştir. Buna göre quadratik model, bu denemelerin tamamı için kullanılmış ve elde edilen verilerin Anova sonuçları tablolarda gösterilmiştir.

Cu (60-80 nm) NP'leri için verilen istatistiksel tablo sonuçlarına göre; uygun görülen Quadratik model için Korelasyon katsayısı (R^2) değeri sırasıyla; Çoklu R^2 =%92,96, R^2 =%86,42 ve ayarlı R^2 =%76,71 olarak belirlenmiştir. (R^2) değerinin %86,42 olarak belirlenmesi, gözlenen değerlerle öngörülen değerler arasında bir uyumluluk olduğunu ve uygulanan modelin güven aralığı içerisinde yer aldığını göstermektedir. Çoklu R değerinin %92,96 olması, regresyonun istatistiksel olarak önemli olduğunu ve toplam değişkenlerin sadece % 7,04'lık bir kısmının bu modelle açıklanamayacağını belirtmektedir. Modelin istatistiksel değerini belirlemek için ANOVA testi içerisindeki “Anlamlılık F” değerine bakılmıştır. Anlamlılık F değerinin 0,05'den küçük olması (0,0061) ve model F değerinin 8,91 olarak elde edilmesi, %95 güven aralığında modelin istatistiksel olarak değerli olduğunun göstergesidir (Şekil 3.13.).

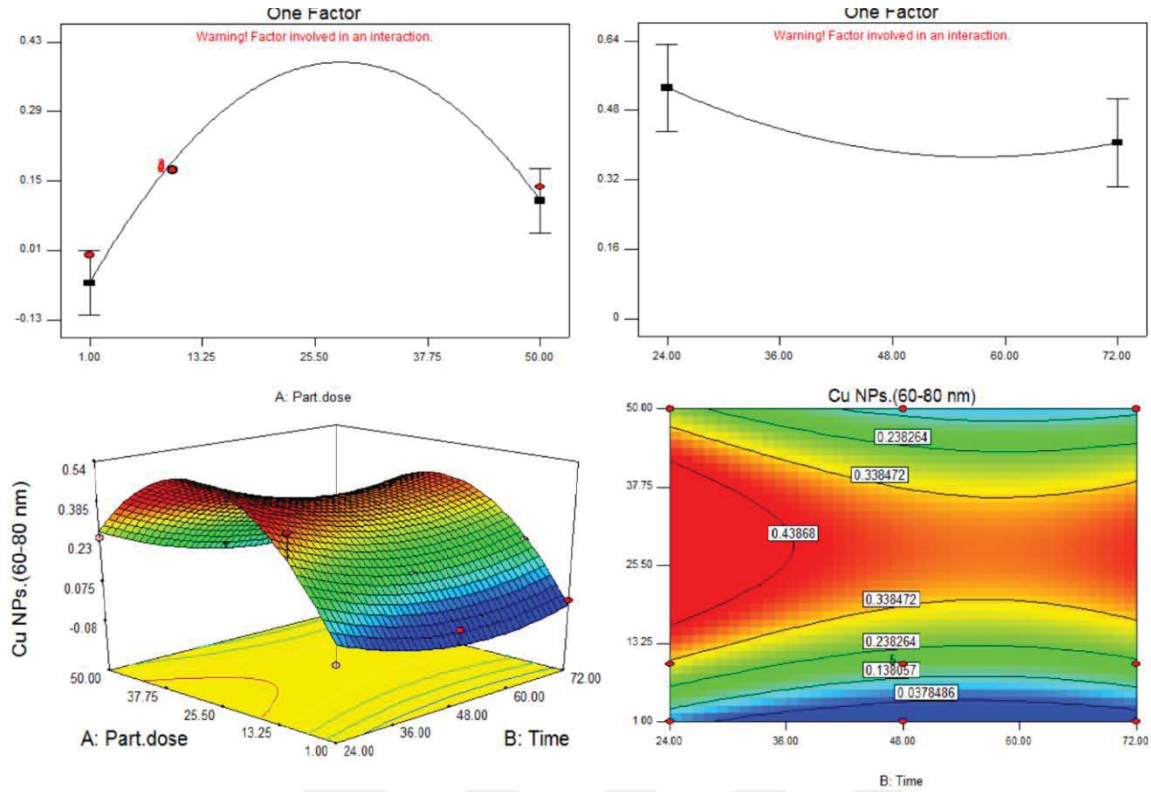
Matematiksel modellemede ise;

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \dots \dots \dots (3)$$

$$\text{Abs.} = 0.38 + 0.083 X_1 - 0.063 X_2 - 0.017 X_{12} - 0.36 X_1^2 + 0.084 X_2^2 \dots \dots \dots (4),$$

olarak bulunmuştur.

Yapılan değerlendirme sonucunda, Cu(60-80 nm) için seçilen parametrelerden adsorbans konsantrasyonunun absorbans değerini arttırıcı yönde, sürenin ise azaltıcı yönde etkilediği sonucuna varılmıştır. Katsayıların mutlak değerlerine bakıldığında etkiye sırası konsatrasyon ve süre şeklindedir.



Şekil 3.13. Cu NP’ler (60-80 nm) için istatistiksel verilerin grafikleri

CuO (40 nm) NP’leri için verilen istatistiksel tablo sonuçlarına göre; CuO NP için uygun görülen quadratik model için Korelasyon katsayısı (R^2) değeri sırasıyla; Çoklu R =%98,31, R^2 =%96,64 ve ayarlı R^2 =%94,25 olarak belirlenmiştir. (R^2) değerinin %96,64 olarak belirlenmesi, gözlenen değerlerle öngörülen değerler arasında yüksek bir uyumluluk olduğunu ve uygulanan modelin güven aralığı içerisinde yer aldığını göstermektedir. Çoklu R değerinin %98,31 olması, regresyonun istatistiksel olarak önemli olduğunu ve toplam değişkenlerin sadece %1,69’lık bir kısmının bu modelle açıklanamayacağını belirtmektedir. Modelin istatistiksel değerini belirlemek için ANOVA testi içerisindeki “Anlamlılık F” değerine bakılmıştır. Anlamlılık F değerinin 0,05’den küçük olması (<0,0001) ve model F değerinin 40,31 olarak elde edilmesi, %95 güven aralığında modelin istatistiksel olarak değerli olduğunun göstergesidir (Şekil 3.14.).

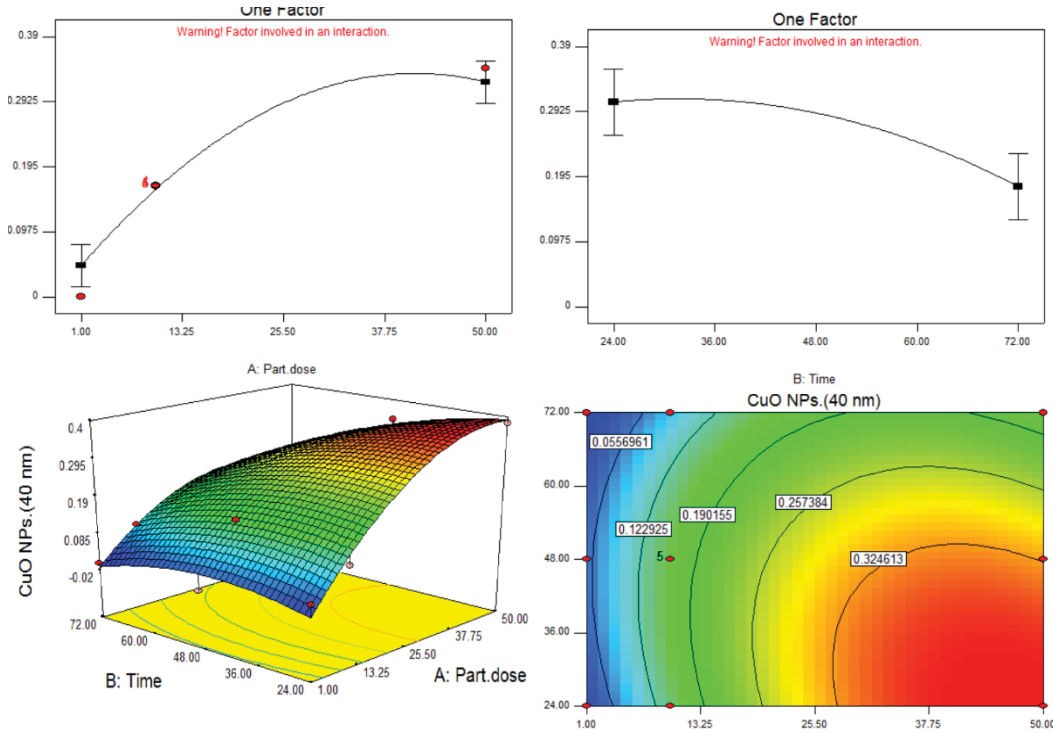
Matematiksel modellemede ise;

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \dots \dots \dots (3)$$

$$\text{Abs.} = 0.15 + 0.11 X_1 + 0.023 X_2 + 0.012 X_{12} + 0.0094 X_1^2 + 0.00607 X_2^2 \dots \dots \dots (4),$$

olarak bulunmuştur.

Yapılan değerlendirme sonucunda, CuO (40 nm) için seçilen parametrelerden adsorbans konsantrasyonunun ve sürenin adsorbans değerini artırıcı yönde etkilediği sonucuna varılmıştır. Katsayıların mutlak değerlerine bakıldığında etkiye sırası konsantrasyon ve süre şeklindedir.



Şekil 3.14. CuO NP'ler (40 nm) için istatistiksel verilerin grafikleri

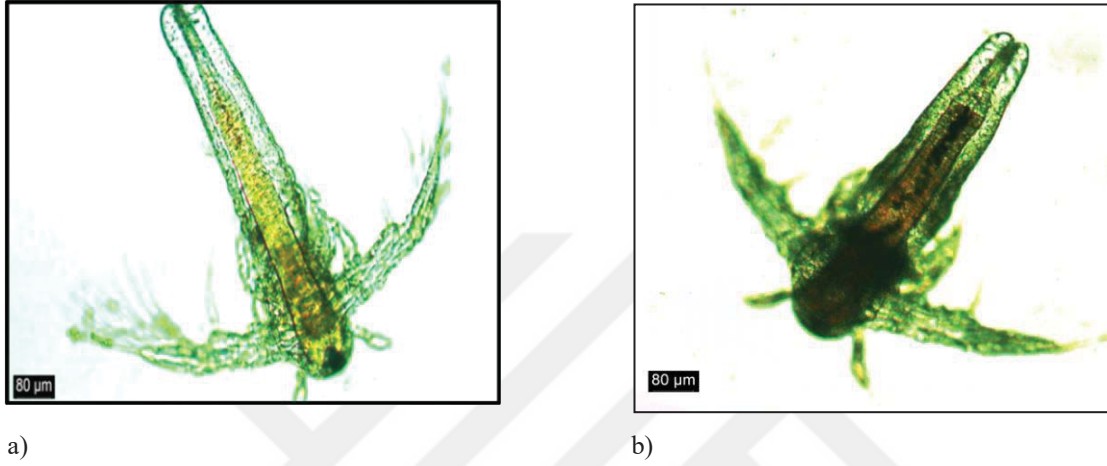
Tüm istatistiksel veriler göz önüne alındığında; 24-30 saat arası sürede maksimum etkinin gözlemlendiği ve 25 ppm adsorbans konsantrasyonunun daha etkin olduğu sonucuna varılmıştır. Tüm NP'lerde 24 saatin altındaki ve 36 saatin üstündeki sürelerde adsorbans değeri düşmüştür. Yine aynı şekilde adsorbans konsantrasyonunun az olduğu ve çok yüksek olduğu durumlarda da etki azalmıştır. Tüm bu veriler ele alındığında, NP türüne ve boyutuna göre etkinin değiştiği, değişimin anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır.

3.3. Toksisite Analiz Sonuçları

3.3.1. Faz Kontrast Mikroskopik Analiz Sonuçları

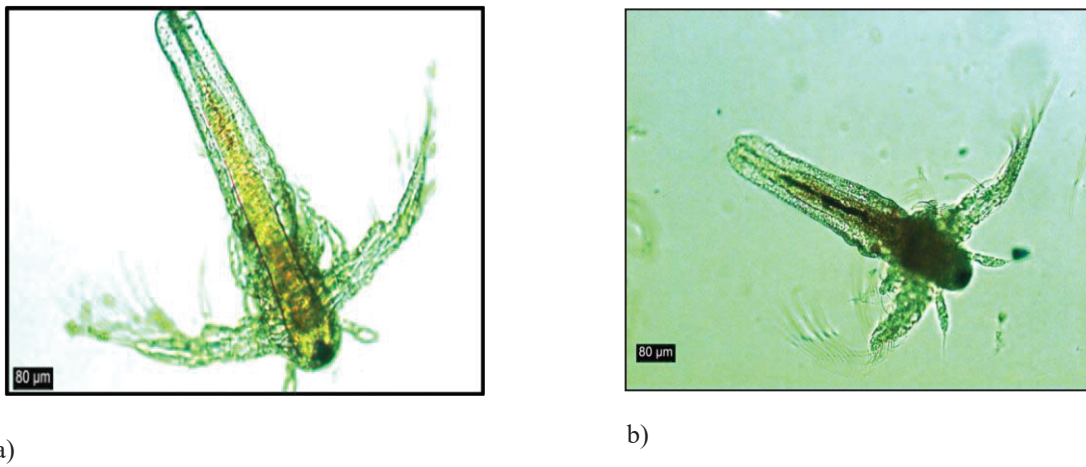
Herhangi bir uygulamaya tabi tutulmayan kontrol grubu ile Cu ve CuO NP'lerin uygulanan *A.salina*'ların faz kontrast resimleri ayrı ayrı alınmıştır. Biyodeneyde NP'lere

maruz bırakılan *A. salina*'ın faz kontrast resimlerinde genellikle benzer görüntü elde edilmiştir. Bu nedenle sadece bir gruba ait (50 µg/mL, 72 saat) faz kontrast görüntüsü ve kontrol grubun görüntüleri Şekil 3.15.'de verilmiştir. Faz kontrast mikroskopik sonuçları incelendiğinde; *A. salina* organizmalarının ortamda bulunan NP'leri aldıkları açıkça görülmektedir.



Şekil 3.15. Kontrol grubu (a) ile Cu NP'e (b) (50 µg/mL, 72 saat) maruz bırakılan *A. salina*

Herhangi bir uygulamaya tabi tutulmayan kontrol grubu ile CuO NP'lerine maruz bırakılan *A. salina*'ın faz kontrast resimlerinde benzer görüntü elde edilmiştir. Bu nedenle sadece bir gruba ait (50 µg/mL, 72 saat) faz kontrast görüntüsü ve kontrol grubunun görüntüleri Şekil 3.16.'da verilmiştir.



Şekil 3.16. Kontrol grubu (a) ile CuO NP'e (b) (50 µg/mL, 72 saat) maruz bırakılan *A. salina*

3.3.2. Toksisite ve Yaşama Oranları Sonuçları

Cu ve CuO NP'lerinin *A. salina* bireylerindeki toksisite oranlarının belirlenmesi için LC₅₀ değeri hesaplanmıştır. Analizleri yapılan NP'lerin *A. salina*'da probit değeri ve tahmini regresyon eğrileri çoklu ortam kullanılarak bilgisayar ortamında hazırlanmıştır. Her bir NP için hazırlanan konsantrasyon etki değerleri eğrisini gösteren şekiller ile toksisite güven aralığını ve LC₅₀ değerini gösteren tablolar incelendiğinde her bir NP'ün letal konsantrasyonun farklı olduğu görülmüştür. *A. salina* bireyleri üzerine Cu (60-80 nm) NP'lerin LC₅₀ değeri 52,37 mg/L; CuO (40 nm) NP'lerin LC₅₀ değeri 55,39 mg/L (Tablo 3.5.) olarak bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde Cu ve CuO NP'lerinin farklı toksik etki gösterdiği bununla birlikte Cu NP'lerinin CuO NP'lerinden daha toksik olduğu görülmektedir.

Tablo 3.5. Cu ve CuO NP'lerin ortalama öldürücü konsantrasyon (LC₅₀) değerleri

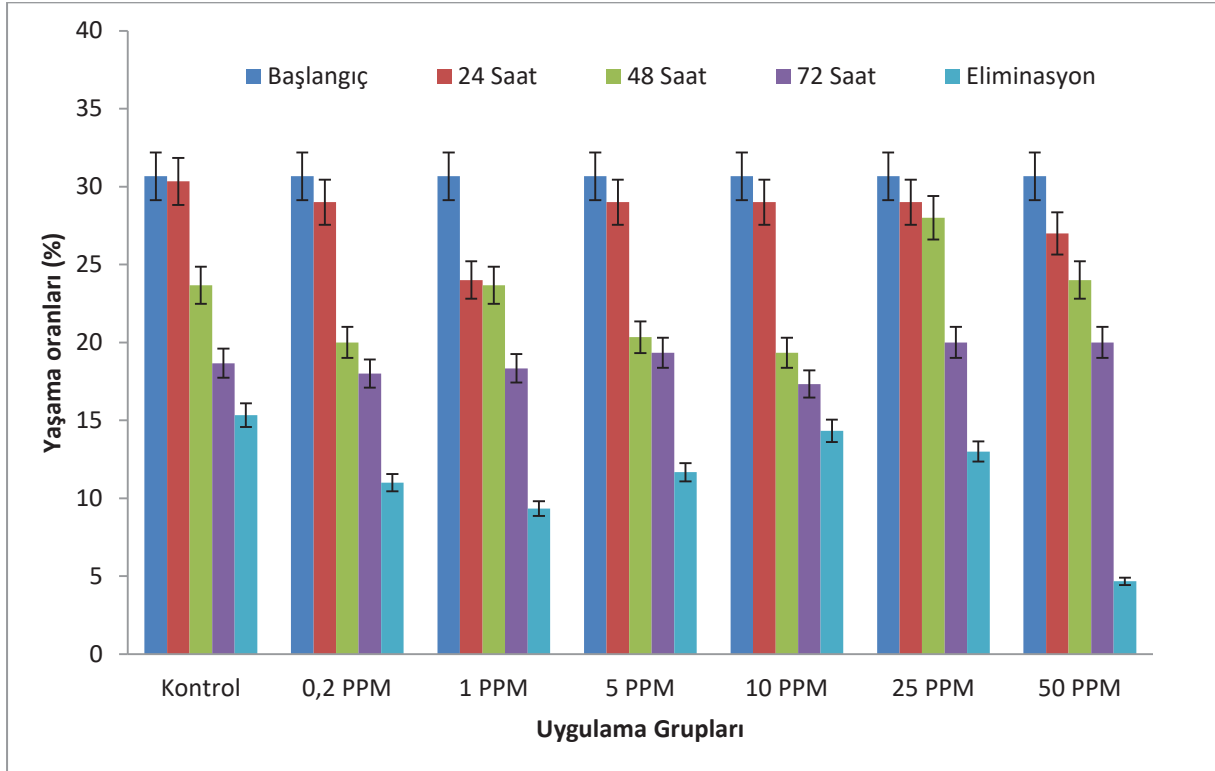
Nanopartikül	Konsantrasyon (mgL ⁻¹)	Min. (mgL ⁻¹)*	Maks.(mgL ⁻¹)*
Cu (60-80 nm)	52.370	32.807	104.471
CuO (40 nm)	55.393	32.584	121.777

* NP'lerin organizmalar üzerinde 72 saat toksisitesi ve % 95 güven aralığını gösteren değerler (min. ve maks. değerler)

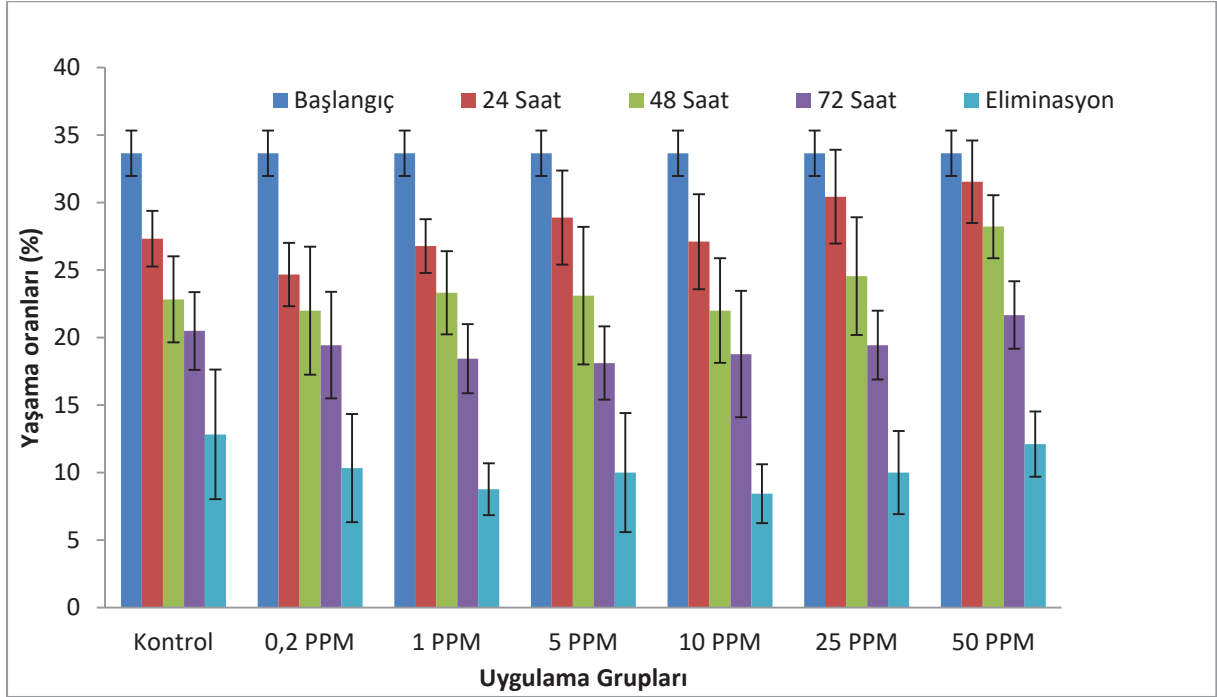
Cu ve CuO NP NP'lerine maruz bırakılan *A. salina*'nın uygulama konsantrasyonlarına göre yaşama oranları Şekil 3.17. ve Şekil 3.18.'de gösterilmiştir. Cu NP'lerine maruz bırakılan *A. salina* bireylerinde, 72. saat yaşama oranları incelendiğinde 10 ppm konsantrasyonunda, % 43,47 oranında bir azalış görülmüş ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında, bu saat için en yüksek azalış yüzdesi olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.17.). Uygulama grupları zamana bağlı olarak incelediğinde tüm gruplarda geçen süreye paralel olarak yaşama yüzdelerinde azalış eğilimi görülmüştür. Eliminasyon sürecinde ise yaşama oranındaki en yüksek azalış yüzdesi % 84,78 ile 50 ppm grubunda gözlenmiştir.

CuO NP'lerine maruz bırakılan *A. salina* bireylerinin 72. saat için yaşama oranları incelendiğinde, 5 ppm konsantrasyonunda, % 46,20 oranında bir azalış görülmüş ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında en yüksek azalış yüzdesi olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.18.). Uygulama gruplarının zamana bağlı olarak değişimi, her grup ayrı ayrı incelediğinde tüm

gruplarda geçen süreye paralel olarak yaşama yüzdelerinde azalış eğilimi görülmüştür. 72. saatte, gruplar arasında görülen farklılıklar önemli olarak bulunmuştur. Eliminasyon sürecinde ise yaşama oranındaki en yüksek azalış yüzdesi % 74,91 ile 10 ppm grubunda gözlenmiştir (Şekil 3.18.). Ayrıca 1 ppm grubunda, yaşama oranında % 73,92 azalış, 5 ppm ve 25 ppm gruplarında ise % 70,29 olarak elde edilmiştir.



Şekil 3.17. Cu (60-80 nm) NP'lerine maruz bırakılan *A. salina*'nın yaşama oranları



Şekil 3.18. CuO (40 nm) NP'lerine maruz bırakılan *A. salina*'nın yaşama oranları

3.4. Kimyasal Analiz Sonuçları

Birincil tüketici organizmaların beslenme alışkanlıklarından dolayı, yaşadıkları veya bulundukları ortamdaki her türlü faydalı veya zararlı parçacıkların suyu süzerek almaları kaçınılmazdır. Bu özellik beslenme alışkanlıklarından dolayı gelmekte ve bu tür zooplanktonik organizmalar bünyelerinde birikim oluşmaktadır. Ancak her organizma farklılık göstermekle birlikte özellikle NP'lerin birikim ve eliminasyon oranları aynı değildir. Bu kapsamda metal ve metal oksit NP'lere maruz bırakılan zooplanktonik organizmalardaki birikim ve eliminasyon oranları ICP-MS ile analiz edilmiş ve sonuçlar Tablo 3.6. ve Tablo 3.7.'de verilmiştir.

3.4.1. *Artemia salina* Bireylerinde Birikim ve Eliminasyon Değerleri

Deneyde, belirtilen prosedüre uygun olarak her bir NP'e maruz bırakılan deneme gruplarından belirtilen zaman dilimlerinde (24., 48. ve 72. saatler ve eliminasyon) alınan örneklerde, ICP-MS cihazı ile ilgili metal analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda *A. salina* bireylerinde birikim ve eliminasyon değerleri her bir NP için Tablo 3.6. ve Tablo 3.7.'de verilmiştir.

Cu NP konsantrasyonlarının *A. salina* bireyleri üzerinde birikim değerleri süre açısından incelendiğinde, Kontrol grubu, 24., 48., 72. saat ve eliminasyon birikim değerlerinin sırasıyla $3,17 \pm 0,58$, $2,75 \pm 0,29$, $3,52 \pm 1,07$, $2,5 \pm 1,14$ olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.6.). Kontrol grubunun zamana karşı ortalamaları arasındaki farkların istatistiksel açıdan önemli olmadığı bulunmuştur ($p > 0,05$).

0,2 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48., 72. saat ve eliminasyon birikim değerlerinin sırasıyla $7,42 \pm 2,35$, $16,7 \pm 1,16$, $15,8 \pm 0,98$, $16,4 \pm 2,57$ olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.6.). Bu konsantrasyonda 24. saat dışındaki zamanlarda ortalamalar arasındaki farkların istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$).

1 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48., 72. saat ve eliminasyon birikim değerlerinin sırasıyla $18,8 \pm 5,27$, $55,5 \pm 1,78$, $33,6 \pm 6,7$, $48,8 \pm 5,59$ olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.6.). Eliminasyon ve 48. saatte birikim değerinin en yüksek olduğu ve istatistiksel açıdan ortalamalar arasındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur. Diğer zaman dilimlerinde ise birikim değerlerinin 72. saatte, 24. saatten daha fazla olduğu ve istatistiksel açıdan farkın önemli olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

5 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48., 72. saat ve eliminasyon, birikim değerlerinin sırasıyla $58,3 \pm 10,0$, 117 ± 11 , 194 ± 33 , $167 \pm 25,39$ olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.6.). Birikim değerinin eliminasyon ve 72. saatte en yüksek olduğu bunu 48. saatin takip ettiği ve en düşük birikimin 24. saatte görüldüğü belirlenmiştir ve istatistiksel açıdan zaman ortalamaları arasındaki farkların önemli olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$).

10 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48., 72. saat ve eliminasyon, birikim değerlerinin sırasıyla $91,9 \pm 4,94$, 155 ± 14 , 363 ± 54 , $211 \pm 9,79$ olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.6.). Birikim değeri en yüksek 72. saatte görülmüş, bunu sırasıyla eliminasyon, 48. saat ve 24. Saat değerleri takip etmiştir. Tüm gruplarda birikim değerleri arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$).

25 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48., 72. saat ve eliminasyon, birikim değerleri sırasıyla 138 ± 22 , $186 \pm 2,0$, $268 \pm 8,0$, $325 \pm 11,0$ olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.6.). Eliminasyon sürecinde birikim değerinin 24., 48. ve 72. saatteki birikim değerlerinden yüksek olduğu ve aradaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$).

50 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48., 72. saat ve eliminasyon birikim değerlerinin sırasıyla $786 \pm 50,0$, $898 \pm 48,0$, $990 \pm 15,0$, $670 \pm 9,0$ olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.6.). Birikim değerinin 72. saatte en yüksek olduğu, diğer zamanlarının birikim değeri yönünden

48. saat, 24. saat ve eliminasyon olarak değiştiği g r lm şt r. Zaman ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

Cu NP konsantrasyonlarının *A. salina* bireyleri üzerinde birikim değerleri artan konsantrasyon açısından incelendiğinde;

24. saatteki kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarına ait birikim değerlerinin sırasıyla $3,17\pm0,58$, $7,42\pm2,35$, $18,8\pm5,27$, $58,3\pm10,0$, $91,9\pm4,94$, 138 ± 22 ve $786\pm50,0$ ($\mu\text{g/g}$) olduğu belirlenmiştir. 24. saatte en yüksek birikimin 50 ppm grubunda olduğu belirlenmiş ve fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

48. saatteki kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarına ait birikim değerlerinin sırasıyla $2,75\pm0,29$, $16,7\pm1,16$, $55,5\pm1,78$, 117 ± 11 , 155 ± 14 , $186\pm2,0$, $898\pm48,0$, ($\mu\text{g/g}$) olduğu belirlenmiştir. 48. saatte en yüksek birikim 50 ppm grubunda olduğu belirlenmiş ve fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

72. saatteki kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarına ait birikim değerleri sırasıyla $3,52\pm1,07$, $15,8\pm0,98$, $33,6\pm6,7$, 194 ± 33 , 363 ± 54 , $268\pm8,0$, $990\pm15,0$ ($\mu\text{g/g}$) olarak belirlenmiştir. 72. saatte en yüksek birikim 50 ppm grubunda olduğu belirlenmiş, diğer guruplarda konsantrasyon artışıyla orantılı olarak birikim oranı artmıştır ve fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Eliminasyon saatinde, kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarına ait birikim değerleri sırasıyla $2,5\pm1,14$, $16,4\pm2,57$, $48,8\pm5,59$, $167\pm25,39$, $211\pm9,79$, $325\pm11,0$, $670\pm9,0$ ($\mu\text{g/g}$) olarak belirlenmiştir. Eliminasyonda en yüksek birikimin 50 ppm grubunda olduğu belirlenmiş, diğer guruplarda konsantrasyon artışıyla orantılı olarak birikim oranı artmış ve fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 3.6. *A. salina* bireylerinde Cu NP’lerin (60-80 nm) birikim ve eliminasyon değerleri (µg/g)

Gruplar	24 saat	48 saat	72 saat	Eliminasyon
Kontrol	3,17±0,58 ^{Ag}	2,75±0,29 ^{Ag}	3,52±1,07 ^{Ag}	2,5±1,14 ^{Ag}
0,2 ppm	7,42±2,35 ^{Bf}	16,7±1,16 ^{Af}	15,8±0,98 ^{Af}	16,4±2,57 ^{Af}
1 ppm	18,8±5,27 ^{Ce}	55,5±1,78 ^{Ae}	33,6±6,7 ^{Be}	48,8±5,59 ^{Ae}
5 ppm	58,3±10,0 ^{Cd}	117±11 ^{Bd}	194±33 ^{Ad}	167±25,39 ^{Ad}
10 pmm	91,9±4,94 ^{Dc}	155±14 ^{Cc}	363±54 ^{Ab}	211±9,79 ^{Bc}
25 ppm	138±22 ^{Db}	186±2,0 ^{Cb}	268±8,0 ^{Bc}	325±11,0 ^{Ab}
50 ppm	786±50,0 ^{Ca}	898±48,0 ^{Ba}	990±15,0 ^{Aa}	670±9,0 ^{Da}

A, B, C ve D: Aynı konsantrasyonlarda (aynı satırda) farklı büyük harflerle gösterilen zaman ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($p>0,05$).

a-g: Aynı zamanda (aynı sütunda) farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($p>0,05$).

CuO (40 nm) NP’lerine maruz bırakılan *A. salina* bireylerinde Cu birikimi ve eliminasyon sonuçları incelendiğinde; her uygulama saatinde ve eliminasyonda konsantrasyon artışına paralel olarak birikim ve eliminasyonun gerçekleştiği belirlenmiştir.

CuO NP konsantrasyonlarının *A. salina* bireyleri üzerinde birikim değerleri süre açısından incelendiğinde;

Kontrol grubunda, 24., 48., 72. saat ve eliminasyon birikim değerleri sırasıyla 2,26±0,60, 3,45±1,03, 3,30±1,19, 2,94±0,31 olarak tespit edilmiştir (Tablo 3.7.). Kontrol grubunun zamana karşı ortalamaları arasındaki farkların istatistiksel açıdan önemli olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$).

0,2 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48., 72. saat ve eliminasyon birikim değerlerinin sırasıyla 4,20±1,18, 2,28±0,54, 2,90±0,12, 5,84±3,44 olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.7.). Bu konsantrasyonda 24. saat ve 72. saatte en yüksek birikim görülmüş ve bu grupları sırasıyla 48.saat ve eliminasyon grubu takip etmiştir. Zaman ortalamaları arasındaki bu farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

1 ppm konsantrasyon grubu, 24., 48., 72. saat ve eliminasyon birikim değerleri sırasıyla 98,3±4,76, 69,1±3,0, 86,1±12, 49,9±6,45 olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.7.). Bu konsantrasyonda 24. saat ve 72. saatte en yüksek birikim görülmüş ve bu gurupları sırasıyla

48. saat ve eliminasyon grubu takip etmiştir. Zaman ortalamaları arasındaki bu farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

5 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48., 72. saat ve eliminasyon birikim değerlerinin sırasıyla 249 ± 32 , 191 ± 30 , 206 ± 26 , $94,1\pm3,77$ olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.7.). Bu konsantrasyonda 24., 48. ve 72. saatte en yüksek birikim görülmüş, zaman ortalamaları arasındaki bu farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

10 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48., 72. saat ve eliminasyon birikim değerlerinin sırasıyla 455 ± 54 , 381 ± 82 , 356 ± 75 , 237 ± 42 olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.7.). Bu konsantrasyonda 24., 48. ve 72. saatte en yüksek birikim görülmüş, zaman ortalamaları arasındaki bu farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

25 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48., 72. saat ve eliminasyon birikim değerlerinin sırasıyla 1127 ± 92 , 676 ± 47 , 612 ± 57 , 280 ± 24 olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.7.). Bu grupta en yüksek birikim değeri 24. saatte görülmüş, farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

50 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48., 72. saat ve eliminasyon birikim değerlerinin sırasıyla 1182 ± 124 , 999 ± 95 , 861 ± 136 , 498 ± 123 olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.7.). Bu grupta en yüksek birikim değeri 24. saatte görülmüş, farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

CuO NP konsantrasyonlarının *A. salina* bireyleri üzerinde birikim değerleri artan konsantrasyon açısından incelendiğinde;

24. saatteki kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarına ait birikim değerleri sırasıyla $2,26\pm0,60$, $4,20\pm1,18$, $98,3\pm4,76$, 249 ± 32 , 455 ± 54 , 1127 ± 92 , 1182 ± 124 ($\mu\text{g/g}$) olduğu belirlenmiştir. 24. saatte en yüksek birikimin 25 ppm ve 50 ppm gruplarında olduğu görülmüş ve farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

48. saatteki kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarına ait birikim değerleri sırasıyla $3,45\pm1,03$, $2,28\pm0,54$, $69,1\pm3,0$, 191 ± 30 , 381 ± 82 , 676 ± 47 , 999 ± 95 ($\mu\text{g/g}$) olarak belirlenmiştir. 48. saatte en yüksek birikimin 50 ppm grubunda olduğu görülmüş ve farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

72. saatteki kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarına ait birikim değerleri sırasıyla $3,30\pm1,19$, $2,90\pm0,12$, $86,1\pm12$, 206 ± 26 ,

356±75, 612±57, 861±136 (µg/g) olarak belirlenmiştir. 72. saatte en yüksek birikimin 50 ppm grubunda olduğu görülmüş ve farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

Eliminasyon sürecinde, kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarına ait birikim değerleri sırasıyla 2,94±0,31, 5,84±3,44, 49,9±6,45, 94,1±3,77, 237±42, 280±24, 498±123 (µg/g) olarak belirlenmiştir. Eliminasyon saatlerinde en yüksek birikimin 50 ppm grubunda olduğu görülmüş ve farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 3.7. *A. salina* bireylerinde CuO NP'lerin (40 nm) birikim ve eliminasyon değerleri (µg/g).

Gruplar	24 saat	48 saat	72 saat	Eliminasyon
Kontrol	2,26±0,60 ^{Af}	3,45±1,03 ^{Af}	3,30±1,19 ^{Af}	2,94±0,31 ^{Ae}
0,2 ppm	4,20±1,18 ^{ABc}	2,28±0,54 ^{Ce}	2,90±0,12 ^{BCe}	5,84±3,44 ^{ABCD}
1 ppm	98,3±4,76 ^{Ad}	69,1±3,0 ^{Be}	86,1±12 ^{Ae}	49,9±6,45 ^{Cd}
5 ppm	249±32 ^{Ac}	191±30 ^{Ad}	206±26 ^{Ad}	94,1±3,77 ^{Bc}
10 pmm	455±54 ^{Ab}	381±82 ^{Ac}	356±75 ^{Ac}	237±42 ^{Bb}
25 ppm	1127±92 ^{Aa}	676±47 ^{Bb}	612±57 ^{Bb}	280±24 ^{Cb}
50 ppm	1182±124 ^{Aa}	999±95 ^{ABa}	861±136 ^{Ba}	498±123 ^{Ca}

A, B ve C: Aynı konsantrasyonlarda (aynı satırda) farklı büyük harflerle gösterilen zaman ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$).

a- f: Aynı zamanda (aynı sütunda) farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$).

3.4.2. Metal İyon Salınımı Analiz Sonuçları

Biyodeneyde kullandığımız *A. salina* organizmalarının bulundukları ortamdan su örnekleri alınarak Cu ve CuO NP'lerin her iki ortamdaki iyon salınımları incelenmiştir. Bu kapsamda deniz suyunun (*A. salina* organizmaların bulunduğu ortam) bulunduğu ortamlarda NP'lerin çözünmelerine bağlı olarak ortama (medium) saldıkları metal iyon analizleri ICP-MS ile yapılmış ve sonuçlar ppb (µg/L) olarak Tablo 3.8. ve Tablo 3.9.'da verilmiştir.

Cu NP konsantrasyonlarının ortamdaki iyon salınımları süre açısından incelendiğinde;

Kontrol grubunda, 24., 48. ve 72. saatte ortamdaki iyon değerleri sırasıyla 116±0,6, 133±0,6 ve 129±0,6 µg/L olarak tespit edilmiştir (Tablo 3.8.). Kontrol grubunun zamana karşı

ortalamları arasındaki farkların istatistiksel açıdan önemli olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Metal veya NP'lerin sıvı içerisindeki iyon salınım oranları zamana bağlı olarak değişiklik göstermesinin bu istatistiksel farkın oluşmasına neden olduğu düşünülmüştür.

0,2 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48. ve 72. saatte ortamdaki iyon değerleri sırasıyla $55,3\pm0,6$, $203\pm0,6$ ve $263\pm0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu gruptaki iyon değişiminin geçen süre bakımından anlamlı olduğu görülmüş ve en yüksek iyon salınımı 72. saatte görülmüştür ($p<0,05$).

Ortamdaki iyon salınım değerleri, 1 ppm konsantrasyon grubunda; 24., 48. ve 72. saatte sırasıyla $221\pm0,6$, $278\pm0,6$ ve $254\pm0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu gruptaki iyon değişiminin geçen süre bakımından anlamlı olduğu ve en yüksek iyon salınımının 48. saatte gerçekleştiği görülmüştür ($p<0,05$).

5 ppm konsantrasyon grubunun, 24., 48. ve 72. saatte ortamdaki iyon salınım değerleri sırasıyla $1155\pm0,6$, $1001\pm0,6$ ve $1101\pm0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu gruptaki iyon değişiminin geçen süre bakımından anlamlı ve en yüksek iyon salınımının 24. saatte görüldüğü bulunmuştur ($p<0,05$).

Ortamdaki iyon salınım değerleri, 10 ppm konsantrasyon grubunda; 24., 48. ve 72. saatte sırasıyla $1139\pm0,6$, $1138\pm0,6$ ve $1045\pm0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu gruptaki iyon değişimi en yüksek 24. saatte görülmüş ve bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). 48. ve 72. saatlerde benzer iyon salınımı değişimi görülmüştür.

25 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48. ve 72. saatte ortamdaki iyon değerleri sırasıyla $1294\pm0,3$, $1670\pm0,6$ ve $1087\pm0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu gruptaki iyon değişiminin en yüksek 48. saatte olduğu ve bu değer geçiren süre bakımından istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

50 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48. ve 72. saatte ortamdaki iyon değerleri sırasıyla $1532\pm0,6$, $2564\pm0,6$ ve $2385\pm0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu gruptaki iyon değişiminin en yüksek 48. saatte olduğu ve bu değer geçiren süre bakımından istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Cu NP konsantrasyonlarının ortama bıraktıkları iyon değerleri artan konsantrasyon açısından incelendiğinde;

24. saatteki kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarına ait ortamdaki iyon değerleri sırasıyla $116\pm0,6$, $55,3\pm0,6$, $221\pm0,6$, $1155\pm0,6$, $1139\pm0,6$, $1294\pm0,3$ ve $1532\pm0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu saatteki iyon

değişimi konsantrasyon oranındaki artış ile beraber artış göstermiş ve gruplar arasındaki değişimin istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

48. saatteki kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarına ait ortamdaki iyon değerleri sırasıyla $133\pm0,6$, $203\pm0,6$, $278\pm0,6$, $1001\pm0,6$, $1138\pm0,6$, $1670\pm0,3$ ve $2564\pm0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu saatteki iyon salınımı konsantrasyondaki artışla artmış, gruplar arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu ve bununla birlikte bu saatteki en yüksek iyon salınımının 50 ppm konsantrasyon grubunda olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

72. saatteki kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarına ait ortamdaki iyon değerleri sırasıyla $129\pm0,6$, $263\pm0,6$, $254\pm0,6$, $1101\pm0,6$, $1045\pm0,6$, $1087\pm0,3$ ve $2385\pm0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu saatteki iyon salınımı konsantrasyondaki artışla artmış, gruplar arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu ve bununla birlikte bu saatteki en yüksek iyon salınımının 50 ppm konsantrasyon grubunda olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

CuO NP konsantrasyonlarının ortamdaki iyon salınımları süre açısından incelendiğinde;

Kontrol grubunda, 24., 48. ve 72. saatte ortamdaki iyon değerleri sırasıyla $20,9\pm0,6$, $32,4\pm0,6$ ve $43,7\pm0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak tespit edilmiştir (Tablo 3.9.). Kontrol grubunun zamana karşı ortalamaları arasındaki farkların istatistiksel açıdan önemli olduğu ve en yüksek iyon salınımı değerinin 72. Saatte gerçekleştiği görülmüştür ($p<0,05$).

0,2 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48. ve 72. saatte ortamdaki iyon değerleri sırasıyla $24,9\pm0,6$, $28,7\pm0,6$ ve $43,7\pm0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu grubunun zamana karşı ortalamaları arasındaki farkların istatistiksel açıdan önemli olduğu ve en yüksek iyon salınımı değerinin 72. saatte olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

1 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48. ve 72. saatte ortamdaki iyon salınımı değerleri sırasıyla $31,9\pm0,6$, $37,7\pm0,6$ ve $52,4\pm0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu gruptaki iyon salınımının geçen süre bakımından anlamlı olduğu, bu farkların istatistiksel açıdan önemli olduğu ve en yüksek iyon salınım değeri 72. saatte görülmüştür ($p<0,05$).

5 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48. ve 72. saatte ortamdaki iyon değerleri sırasıyla $40,0\pm0,6$, $54,1\pm0,6$ ve $55,9\pm0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu gruptaki iyon salınım değerlerinin geçen süre bakımından anlamlı olduğu görülmüş ve en yüksek iyon salınım değerleri 48. ve 72. saatlerde benzer olarak bulunmuştur ($p<0,05$).

10 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48. ve 72. saatte ortamdaki iyon değerleri sırasıyla $63,0 \pm 0,6$, $69,5 \pm 0,6$ ve $80,8 \pm 0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu grubunun zamana karşı ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu ve en yüksek iyon salınımı değerinin 72. saatte olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

25 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48. ve 72. saatte ortamdaki iyon değerleri sırasıyla $96,8 \pm 0,6$, $106 \pm 0,6$ ve $156 \pm 0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu grubunun zamana karşı ortalamaları arasındaki farkların istatistiksel açıdan önemli olduğu ve en yüksek iyon salınımı değerinin 72. saatte olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

50 ppm konsantrasyon grubunda, 24., 48. ve 72. saatte ortamdaki iyon değerleri sırasıyla $119 \pm 0,6$, $161 \pm 0,6$ ve $163 \pm 0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu grubunun zamana karşı ortalamaları arasındaki farkların istatistiksel açıdan önemli olduğu ve en yüksek iyon salınımı değerinin 72. saatte olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

CuO NP konsantrasyonlarının ortama bıraktıkları iyon değerleri artan konsantrasyon açısından incelendiğinde;

24. saatteki kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarına ait ortamdaki iyon değerleri sırasıyla $20,9 \pm 0,6$, $24,9 \pm 0,6$, $31,9 \pm 0,6$, $40,0 \pm 0,6$, $63,0 \pm 0,6$, $96,8 \pm 0,3$ ve $119 \pm 0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu saatteki iyon salınımının konsantrasyondaki artışla beraber artış gösterdiği ve gruplar arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte bu saatteki en yüksek iyon salınımının 50 ppm konsantrasyon grubunda olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

48. saatteki kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarına ait ortamdaki iyon değerleri sırasıyla $32,4 \pm 0,6$, $28,7 \pm 0,6$, $37,7 \pm 0,6$, $54,1 \pm 0,6$, $69,5 \pm 0,6$, $106 \pm 0,3$ ve $161 \pm 0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu saatteki iyon salınımının konsantrasyondaki artışla beraber artış gösterdiği ve gruplar arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte bu saatteki en yüksek iyon salınımının 50 ppm konsantrasyon grubunda olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

72. saatteki kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarına ait ortamdaki iyon değerleri sırasıyla $43,7 \pm 0,6$, $43,7 \pm 0,6$, $52,4 \pm 0,6$, $55,9 \pm 0,6$, $80,8 \pm 0,6$, $156 \pm 0,3$ ve $163 \pm 0,6$ $\mu\text{g/L}$ olarak bulunmuştur. Bu saatteki iyon salınımının konsantrasyondaki artışla beraber artış gösterdiği ve gruplar arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte bu saatteki en yüksek iyon salınımının 50 ppm konsantrasyon grubunda olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

Bakır (60-80 nm) ve CuO (40 nm) NP'lerinin ortama verdiği Cu iyon miktarları değerlendirildiği zaman; her uygulama saatinde genel olarak ortama salınan iyon miktarları konsantrasyon artışına paralel olarak bariz şekilde artmıştır. Her grup içerisinde, uygulama süresiyle birlikte iyon salınımının arttığı belirlenmiştir. Düşük ve yüksek konsantrasyonlar arasında büyük salınım farklarının olduğu tespit edilmiştir. NP'ler arasındaki salınım miktarları karşılaştırıldığı zaman en yüksek değerler genellikle 72. saatte elde edilmiş, NP'ler arasındaki en yüksek değerler ise metal formu olan Cu (60-80nm) NP'den elde edilmiştir. Bakıroksit formunun uygulandığı gruplar ise en düşük salınım miktarı göstermiştir.

Tablo 3.8. Cu (60-80 nm) NP'ünün ortama verdiği Cu iyon miktarı (µg/L)

Gruplar	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	116±0,6 ^{Ab}	133±0,6 ^{Ca}	129±0,6 ^{Ba}
0,2 ppm	55,3±0,6 ^{Aa}	203±0,6 ^{Bb}	263±0,6 ^{Cc}
1 ppm	221±0,6 ^{Ac}	278±0,6 ^{Cc}	254±0,6 ^{Bb}
5 ppm	1155±0,6 ^{Ce}	1001±0,6 ^{Ad}	1101±0,6 ^{Bf}
10 pmm	1139±0,6 ^{Ad}	1138±0,6 ^{Ac}	1045±0,6 ^{Bd}
25 ppm	1294±0,3 ^{Bf}	1670±0,6 ^{Cf}	1087±0,6 ^{Ac}
50 ppm	1532±0,6 ^{Ag}	2564±0,6 ^{Cg}	2385±0,6 ^{Bg}

A, B ve C: Aynı konsantrasyonlarda (aynı satırda) farklı büyük harflerle gösterilen zaman ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$).

a-g: Aynı zamanda (aynı sütunda) farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$).

Tablo 3.9. CuO (40 nm) NP'ünün ortama verdiği Cu iyon miktarı (µg/L)

Gruplar	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	20,9±0,6 ^{Aa}	32,4±0,6 ^{Bb}	43,7±0,6 ^{Ca}
0,2 ppm	24,9±0,6 ^{Ab}	28,7±0,6 ^{Ba}	43,7±0,6 ^{Ca}
1 ppm	31,9±0,6 ^{Ac}	37,7±0,6 ^{Bc}	52,4±0,6 ^{Cb}
5 ppm	40,0±0,6 ^{Ad}	54,1±0,6 ^{Bd}	55,9±0,6 ^{Bc}
10 pmm	63,0±0,6 ^{Ac}	69,5±0,6 ^{Be}	80,8±0,6 ^{Cd}
25 ppm	96,8±0,6 ^{Af}	106±0,6 ^{Bf}	156±0,6 ^{Ce}
50 ppm	119±0,6 ^{Ag}	161±0,6 ^{Bg}	163±0,6 ^{Cf}

A, B ve C: Aynı konsantrasyonlarda (aynı satırda) farklı büyük harflerle gösterilen zaman ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$).

a-g: Aynı zamanda (aynı sütunda) farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$).

3.5. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Biyodeney çalışmasında kullanılan zooplanktonik organizmalardaki oksidatif stresin göstergesi olarak GSH ve TBARS biyomarkırları değerlendirilmiş olup sonuçları aşağıda ayrı ayrı olarak verilmiştir (Tablo 3.10. ve Tablo 3.11.).

3.5.1. GSH Analizine Ait Sonuçlar

Cu (60-80 nm) NP'lere maruz bırakılan *A. salina* bireylerinde GSH seviyeleri Tablo 3.10'da verilmiştir. Çalışmanın 24, 48. ve 72. saatlerinde Cu NP'lerin GSH seviyelerinde kısmi artışlara neden olduğu belirlenmiştir. GSH değerleri artan konsantrasyon açısından incelendiğinde;

24. saatte kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarındaki GSH değerleri sırasıyla; $2,06\pm0,16$, $2,71\pm0,17$, $3,21\pm0,07$, $2,58\pm0,09$, $2,97\pm0,13$, $3,48\pm0,21$, $4,19\pm0,33$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Bu saatteki GSH düzeyindeki değişimler tüm gruplarda farklı olarak (5 ppm ve 10 ppm grupları benzer değişimi göstermiştir) bulunmuş, en yüksek GSH düzeyi 50 ppm grubunda gözlenmiş ve gruplar arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Çalışmanın 48. saatinde, GSH düzeyleri, kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarında sırasıyla; $2,41\pm0,17$, $3,08\pm0,28$, $3,49\pm0,08$, $3,13\pm0,22$, $2,69\pm0,25$, $3,25\pm0,31$, $3,34\pm0,11$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. En yüksek GSH değişimi 1 ppm grubunda gözlenmiş, bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Bununla beraber 5 ppm ve 0,2 ppm konsantrasyonlarında GSH düzeyindeki değişiklikler benzer olarak bulunmuştur.

72. saatte kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarındaki GSH değerleri sırasıyla; $3,17\pm0,25$, $4,55\pm0,15$, $3,59\pm0,26$, $3,76\pm0,74$, $2,73\pm0,20$, $3,79\pm0,21$ ve $3,96\pm0,139$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Bu saatte GSH düzeyindeki en yüksek değişim 0,2 ppm grubunda görülmüş ve bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Bu grubu 25 ppm ve 50 ppm gruplarında görülen yüksek GSH değerleri takip etmiştir.

Eliminasyon saatinde GSH düzeyindeki değişiklik $3,26\pm0,30$, $4,83\pm0,45$, $3,20\pm0,45$, $4,04\pm0,68$, $3,01\pm0,31$, $4,33\pm0,66$ ve $3,58\pm0,34$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak sırasıyla kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarında görölmüştür. Eliminasyon sürecinde 0,2 ppm ve 25 ppm grupları benzer ve en yüksek değişimin olduğu gruplar olarak görölmüş ve bu değerler istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Bakır NP’de GSH düzeyi süre açısından her grup kendi içerisinde değerlendirildiğinde;

Kontrol grubunda; 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $2,06\pm0,16$, $2,41\pm0,17$, $3,17\pm0,25$ ve $3,26\pm0,30$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda 24. saatteki değişiklik istatistiksel olarak önemli görölmemiştir ($p>0,05$). Bununla beraber en yüksek ve anlamlı değişim değerleri 72. saat ve eliminasyon süresinde benzer olarak görölmüştür ($p<0,05$).

0,2 ppm grubunda; 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $2,71\pm0,17$, $3,08\pm0,28$, $4,55\pm0,15$, $4,83\pm0,45$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Bu grupta GSH düzeyindeki en yüksek ve anlamlı değişiklik 72. saat ve eliminasyonda benzer olarak görölmüştür ($p<0,05$).

1 ppm grubunda; GSH düzeyi 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $3,21\pm0,07$, $3,49\pm0,08$, $3,59\pm0,26$, $3,20\pm0,45$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Bu grupta, GSH düzeyinin süre açısından benzer değişiklik gösterdiği, bu değerlerin istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$).

GSH düzeyi 5 ppm grubunda; 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $2,58\pm0,09$, $3,13\pm0,22$, $3,76\pm0,74$ ve $4,04\pm0,68$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Bu grupta, GSH düzeyindeki en önemli değişiklik eliminasyon sürecinde görölmüştür. 72. saatteki değişim eliminasyon ve 48. saatteki GSH düzeyleri ile benzerlik göstermiştir.

10 ppm grubunda; GSH düzeyi 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $2,97\pm0,13$, $2,69\pm0,25$, $2,73\pm0,20$ ve $3,01\pm0,31$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Bu gruptaki GSH düzeyindeki değişiklik süre açısından benzer olarak bulunmuş ve bu benzerliğin istatistiksel olarak önemli olmadığı görölmüştür ($p>0,05$).

GSH düzeyi 25 ppm grubunda; 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $3,48\pm0,21$, $3,25\pm0,31$, $3,79\pm0,21$ ve $4,33\pm0,66$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Bu grupta, GSH düzeyindeki en önemli değişiklik eliminasyon sürecinde görölmüştür. Bununla beraber 24. ve 48. saatlerdeki GSH düzeylerindeki değişimler benzerken, 72. saatteki GSH değeri, diğer tüm zamanlarla benzer değişim değeri göstermiştir.

Son olarak 50 ppm grubunun GSH düzeyi 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $4,19 \pm 0,33$, $3,34 \pm 0,11$, $3,96 \pm 0,139$, ve $3,58 \pm 0,34$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Bu grupta en yüksek GSH düzeyi 24. saatte görülmüş ve 72 saatteki değer 24. saat ile benzer bulunmuştur. En düşük GSH değeri 48. saatte görülürken, eliminasyondaki değişim değeri diğer tüm zamanlarla istatistiksel yönden benzerlik göstermiştir.

Tablo 3.10. Cu (60-80 nm) NP'lere maruz bırakılan *A. salina* bireylerinde GSH seviyelerindeki değişiminin iki yönlü varyans analizi ile değerlendirilmesi ($\mu\text{mol/g}$ protein, Two-way ANOVA / Tukey alt test)

Gruplar	24 saat	48 saat	72 saat	Eliminasyon
Kontrol	$2,06 \pm 0,16^{\text{Ce}}$	$2,41 \pm 0,17^{\text{Bc}}$	$3,17 \pm 0,25^{\text{Acd}}$	$3,26 \pm 0,30^{\text{Ad}}$
0,2 mg/L	$2,71 \pm 0,17^{\text{Bd}}$	$3,08 \pm 0,28^{\text{Bb}}$	$4,55 \pm 0,15^{\text{Aa}}$	$4,83 \pm 0,45^{\text{Aa}}$
1 mg/L	$3,21 \pm 0,07^{\text{Ac}}$	$3,49 \pm 0,08^{\text{Aa}}$	$3,59 \pm 0,26^{\text{Abc}}$	$3,20 \pm 0,45^{\text{Acd}}$
5 mg/L	$2,58 \pm 0,09^{\text{Cd}}$	$3,13 \pm 0,22^{\text{Bb}}$	$3,76 \pm 0,74^{\text{ABabc}}$	$4,04 \pm 0,68^{\text{Aabc}}$
10 mg/L	$2,97 \pm 0,13^{\text{Ad}}$	$2,69 \pm 0,25^{\text{Abc}}$	$2,73 \pm 0,20^{\text{Ad}}$	$3,01 \pm 0,31^{\text{Ad}}$
25 mg/L	$3,48 \pm 0,21^{\text{Bb}}$	$3,25 \pm 0,31^{\text{Bab}}$	$3,79 \pm 0,21^{\text{ABb}}$	$4,33 \pm 0,66^{\text{Aa}}$
50 mg/L	$4,19 \pm 0,33^{\text{Aa}}$	$3,34 \pm 0,11^{\text{Bab}}$	$3,96 \pm 0,139^{\text{Ab}}$	$3,58 \pm 0,34^{\text{ABbcd}}$

A, B ve C: Aynı konsantrasyonlarda (aynı satırda) farklı büyük harflerle gösterilen zaman ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($p < 0,05$)

a-e: Aynı zamanda (aynı sütunda) farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($p < 0,05$)

CuO (40 nm) NP'lere maruz bırakılan *A. salina* bireylerinde GSH düzeyleri Tablo 3.11'de verilmiştir. Çalışmanın 24, 48. ve 72. saatlerinde CuO NP'nün *A. salina* bireylerinde GSH değerleri artan konsantrasyon açısından incelendiğinde;

24. saatte kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarındaki GSH değerleri sırasıyla, $1,99 \pm 0,13$, $2,95 \pm 0,14$, $3,18 \pm 0,37$, $2,85 \pm 0,20$, $2,67 \pm 0,16$, $2,76 \pm 0,11$ ve $2,73 \pm 0,18$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Bu saatteki GSH düzeyindeki değişimler kontrol grubu hariç diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak benzer bulunmuştur. En düşük değişim kontrol grubunda görülmüştür.

Çalışmanın 48. saatte GSH düzeyleri; kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarında sırasıyla, $1,73 \pm 0,19$, $2,52 \pm 0,05$, $2,66 \pm 0,12$, $2,52 \pm 0,13$, $2,38 \pm 0,31$, $2,92 \pm 0,14$ ve $3,02 \pm 0,35$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Bu saatteki GSH düzeylerindeki değişim 24. saatteki gibi yani kontrol dışındaki tüm gruplarda benzer olarak bulunmuş, kontrol en düşük GSH düzeyini göstermiştir.

72. saatte kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarındaki GSH değerleri sırasıyla, $2,54 \pm 0,12$, $2,38 \pm 0,06$, $1,58 \pm 0,07$, $1,39 \pm 0,06$, $1,34 \pm 0,09$, $1,48 \pm 0,04$ ve $1,33 \pm 0,19$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Bu saatte GSH düzeyindeki en yüksek değişim kontrol ve 0,2 ppm grubunda görülmüştür. En düşük değişim 10 ppm grubunda görülmüştür.

Eliminasyonda GSH değerleri, $2,18 \pm 0,06$, $2,41 \pm 0,39$, $2,06 \pm 0,36$, $1,79 \pm 0,30$, $1,60 \pm 0,10$, $1,39 \pm 0,17$ ve $1,59 \pm 0,15$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak sırasıyla kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarında görülmüştür. Eliminasyon sürecinde en yüksek GSH, 0,2 ppm grubunda görülmüş ve kontrol, 1 ppm ve 5 ppm grupları sırasıyla bu grubu takip etmiştir. Bununla birlikte eliminasyondaki en düşük GSH değeri 25 ppm grubunda görülmüştür.

Bakıroksit NP'ünde GSH düzeyi, geçen süre açısından her grup kendi içerisinde değerlendirildiğinde;

Kontrol grubunda 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $1,99 \pm 0,13$, $1,73 \pm 0,19$, $2,54 \pm 0,12$ ve $2,18 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda 72. saatteki GSH değeri diğer zaman ortalamalarına göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

0,2 ppm grubunda 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $2,5 \pm 0,14$, $2,52 \pm 0,05$, $2,38 \pm 0,06$ ve $2,41 \pm 0,39$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Bu grupta GSH düzeyindeki en yüksek ve anlamlı değişiklik 24. saatte görülmüştür ($p < 0,05$). Diğer zamanlardaki değerler benzer olarak bulunmuştur.

1 ppm grubunda GSH düzeyi 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $3,18 \pm 0,37$, $2,66 \pm 0,12$, $1,58 \pm 0,07$ ve $2,06 \pm 0,36$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Bu grupta, GSH düzeyinde en yüksek değişiklik 24. saatte ($p < 0,05$) ve en düşük GSH değeri 72. saatte görülmüştür.

GSH düzeyi 5 ppm grubunda 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $2,85 \pm 0,20$, $2,52 \pm 0,13$, $1,39 \pm 0,06$ ve $1,79 \pm 0,30$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Bu grupta, 24. ve 48. saatlerdeki GSH düzeyleri, en yüksek değerleri göstermiştir ($p < 0,05$).

10 ppm grubunda GSH düzeyi 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $2,67 \pm 0,16$, $2,38 \pm 0,31$, $1,34 \pm 0,09$ ve $1,60 \pm 0,10$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur. Bu gruptaki en yüksek GSH düzeyleri 24. ve 48. saatlerde bulunmuştur ($p < 0,05$).

GSH düzeyi 25 ppm grubunda 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $2,76 \pm 0,11$, $2,92 \pm 0,14$, $1,48 \pm 0,04$ ve $1,39 \pm 0,17$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur.

50 ppm grubunun GSH düzeyi ise, 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $2,73 \pm 0,18$, $3,02 \pm 0,35$, $1,33 \pm 0,19$ ve $1,59 \pm 0,15$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur.

Tablo 3.11. CuO (40 nm) NP'lere maruz bırakılan *A. salina* bireylerinde GSH seviyelerindeki değişiminin iki yönlü varyans analizi ile değerlendirilmesi ($\mu\text{mol/g}$ protein, Two-way ANOVA / Tukey alt test)

Gruplar	24 saat	48 saat	72 saat	Eliminasyon
Kontrol	$1,99 \pm 0,13^{\text{BCb}}$	$1,73 \pm 0,19^{\text{Cb}}$	$2,54 \pm 0,12^{\text{Aa}}$	$2,18 \pm 0,06^{\text{Ba}}$
0,2 ppm	$2,95 \pm 0,14^{\text{Aa}}$	$2,52 \pm 0,05^{\text{Ba}}$	$2,38 \pm 0,06^{\text{Ba}}$	$2,41 \pm 0,39^{\text{Ba}}$
1 ppm	$3,18 \pm 0,37^{\text{Aa}}$	$2,66 \pm 0,12^{\text{Ba}}$	$1,58 \pm 0,07^{\text{Db}}$	$2,06 \pm 0,36^{\text{Cab}}$
5 ppm	$2,85 \pm 0,20^{\text{Aa}}$	$2,52 \pm 0,13^{\text{Aa}}$	$1,39 \pm 0,06^{\text{Ccd}}$	$1,79 \pm 0,30^{\text{Babc}}$
10 ppm	$2,67 \pm 0,16^{\text{Aa}}$	$2,38 \pm 0,31^{\text{Aa}}$	$1,34 \pm 0,09^{\text{Cd}}$	$1,60 \pm 0,10^{\text{Bbc}}$
25 ppm	$2,76 \pm 0,11^{\text{Aa}}$	$2,92 \pm 0,14^{\text{Aa}}$	$1,48 \pm 0,04^{\text{Bbc}}$	$1,39 \pm 0,17^{\text{Bc}}$
50 ppm	$2,73 \pm 0,18^{\text{Aa}}$	$3,02 \pm 0,35^{\text{Aa}}$	$1,33 \pm 0,19^{\text{Bb}}$	$1,59 \pm 0,15^{\text{Bbc}}$

A, B, C ve D: Aynı konsantrasyonlarda (aynı satırda) farklı büyük harflerle gösterilen zaman ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($p < 0,05$)

a,b,c ve d: Aynı zamanda (aynı sütunda) farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($p < 0,05$)

3.5.2. Tiyoarbutirik Reaktif Maddeler Analiz Sonuçları

Bakır (60-80 nm) NP'line maruz bırakılan *A. salina* bireylerinde TBARS bulguları Tablo 3.12.'de verilmiştir. Çalışmada, *A. salina* 'ya uygulanan tüm Cu NP konsantrasyonlarında ve uygulama süreleri ile eliminasyon döneminde TBARS seviyelerinde bir artışın olduğu belirlenmiştir. Çalışmadaki TBARS düzeyleri, 24., 48., 72. saatler ve eliminasyon süresince artan konsantrasyon açısından incelendiğinde;

24. saatteki kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarındaki TBARS değerleri sırasıyla; $3,10 \pm 0,26$, $4,38 \pm 0,93$, $4,16 \pm 0,76$, $5,63 \pm 0,76$, $4,36 \pm 0,85$, $5,17 \pm 0,18$, $4,94 \pm 0,15$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Bu saatteki TBARS düzeyindeki en yüksek değişim 25 ppm grubunda olmuştur. Bununla birlikte kontrol dışındaki diğer tüm gruplar bu gruba benzer değişimi göstermiş olup bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

Çalışmanın 48. saatteki, TBARS düzeyleri kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarında sırasıyla $3,42 \pm 0,41$, $2,89 \pm 0,19$, $4,01 \pm 0,37$,

5,25±1,18, 2,67±0,24, 4,66±0,94, 4,73±0,82 nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Bu saatteki en düşük TBARS değeri 10 ppm'de görülmüştür ($p<0,05$).

72. saatteki kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarındaki TBARS değerleri sırasıyla 3,11±0,22, 3,43±0,10, 5,00±1,10, 3,97±0,19, 4,26±0,14, 3,19±0,07 ve 5,15±1,35 nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Bu saatte TBARS düzeyindeki en yüksek değişim 50 ppm grubunda görülmüş ve sırasıyla 1 ppm, 10 ppm ve 5 ppm konsantrasyonlarındaki farklılık 50 ppm grubuyla benzerlik göstermiş ve bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer gruplarda ise TBARS düzeyleri düşüş göstermiştir.

Eliminasyon saatinde TBARS düzeyindeki değişiklik 2,26±0,34, 4,26±1,09, 3,36±0,24, 5,16±0,70, 4,88±0,49, 3,76±0,06 ve 4,62±0,61 nmol/mg protein olarak sırasıyla kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarında görülmüştür. Eliminasyon sürecinde 5 ppm, 10 ppm ve 50 ppm gruplarında benzer ve en yüksek değişim görülmüş ve bu değişim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). En düşük TBARS düzeyi kontrol grubunda görülmüş ve bu fark önemli bulunmamıştır.

Bakır NP uygulanan gruplarda TBARS düzeyi süre açısından her grup kendi içerisinde değerlendirildiğinde;

Kontrol grubunda 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda TBARS düzeyi sırasıyla, 3,10±0,26, 3,42±0,41, 3,11±0,22 ve 2,26±0,34 nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda en düşük değer eliminasyon süresinde görülmüş ve diğer zaman ortalamaları arasındaki farklar önemli bulunmamıştır ($p>0,05$).

0,2 ppm grubunda 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda TBARS düzeyi sırasıyla 4,38±0,93, 2,89±0,19, 3,43±0,10 ve 4,26±1,09 nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Bu gruptaki en düşük TBARS değeri 48.saatte gözlenmiş ve diğer zaman ortalamaları arasındaki farklar benzer ve yüksek olarak bulunmuştur ($p<0,05$).

TBARS düzeyi 1 ppm grubunda 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla 4,16±0,76, 4,01±0,37, 5,00±1,10 ve 3,36±0,24 nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Bu grupta en yüksek TBARS değeri 72. saatte gözlenmiş ve sırasıyla 24. saat ve 48. saatte benzer olarak yüksek TBARS düzeyleri bulunmuştur.

5 ppm grubunda 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla 5,63±0,76, 5,25±1,18, 3,97±0,19 ve 5,16±0,70 nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Bu grupta, TBARS düzeyindeki en yüksek değişiklik 24. saatte görülmüştür ve bununla birlikte 48.saat ve

eliminasyon sürecinde benzer yüksek değerler bulunmuştur. Bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

TBARS düzeyi 10 ppm grubunda 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $4,36\pm0,85$, $2,67\pm0,24$, $4,26\pm0,14$ ve $4,88\pm0,49$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Bu grupta en yüksek TBARS değerleri 48.saat hariç diğer tüm gruplarda benzer olarak görülmüştür ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

25 ppm grubunda 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda TBARS düzeyi sırasıyla $5,17\pm0,18$, $4,66\pm0,94$, $3,19\pm0,07$ ve $3,76\pm0,06$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Bu grupta, en yüksek TBARS değeri 24. saatte görülmüştür ($p<0,05$). 48. saatteki değer eliminasyon ve 24. saat ile benzerlik göstermiştir. En düşük TBARS düzeyi ise 72 saatte görülmüştür.

Son olarak 50 ppm grubunda 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda TBARS düzeyi sırasıyla $4,94\pm0,15$, $4,73\pm0,82$, $5,15\pm1,35$ ve $4,62\pm0,61$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Bu grupta zaman ortalamaları arasındaki farklar tüm saatlerde benzer olarak bulunmuş ve bu benzerliğin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Tablo 3.12. Cu (60-80 nm) NP'lere maruz bırakılan *A. salina* bireylerinde TBARS seviyelerindeki değişiminin iki yönlü varyans analizi ile değerlendirilmesi (nmol/mg protein, Two-way ANOVA / Tukey alt test)

Gruplar	24 saat	48 saat	72 saat	Eliminasyon
Kontrol	$3,10\pm0,26^{Ab}$	$3,42\pm0,41^{Aab}$	$3,11\pm0,22^{Abc}$	$2,26\pm0,34^{Bd}$
0,2 ppm	$4,38\pm0,93^{Aa}$	$2,89\pm0,19^{Bbc}$	$3,43\pm0,10^{Ab}$	$4,26\pm1,09^{Aab}$
1 ppm	$4,16\pm0,76^{ABa}$	$4,01\pm0,37^{Aa}$	$5,00\pm1,10^{Aa}$	$3,36\pm0,24^{Bc}$
5 ppm	$5,63\pm0,76^{Aa}$	$5,25\pm1,18^{ABa}$	$3,97\pm0,19^{Ba}$	$5,16\pm0,70^{Aa}$
10 ppm	$4,36\pm0,85^{Aa}$	$2,67\pm0,24^{Bc}$	$4,26\pm0,14^{Aa}$	$4,88\pm0,49^{Aa}$
25 ppm	$5,17\pm0,18^{Aa}$	$4,66\pm0,94^{ABa}$	$3,19\pm0,07^{Cc}$	$3,76\pm0,06^{Bb}$
50 ppm	$4,94\pm0,15^{Aa}$	$4,73\pm0,82^{Aa}$	$5,15\pm1,35^{Aa}$	$4,62\pm0,61^{Aa}$

A, B ve C: Aynı konsantrasyonlarda (aynı satırda) farklı büyük harflerle gösterilen zaman ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$)

a,b,c ve d: Aynı zamanda (aynı sütunda) farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$)

Bakıroksit (40 nm) NP'e maruz bırakılan *A. salina* bireylerinde TBARS bulguları Tablo 3.13.'de verilmiştir. Çalışmada CuO NP maruziyetinin 24., 48., 72. saatler ve eliminasyon süresince artan konsantrasyonlarda TBARS düzeyleri şu şekilde değişmiştir;

24. saatte kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarında TBARS değerleri sırasıyla $1,73 \pm 0,24$, $2,95 \pm 0,22$, $3,29 \pm 0,27$, $3,80 \pm 0,24$, $3,64 \pm 0,78$, $5,11 \pm 0,56$ ve $5,43 \pm 0,18$ nmol/mg protein bulunmuştur. Bu saatteki TBARS düzeyindeki en yüksek değişim sırasıyla 50 ppm ve 25 ppm gruplarında istatistiksel olarak benzer farklılık göstermiş ve farklılık konsantrasyon ortalamaları yönünden önemli olarak bulunmuştur ($p < 0,05$).

Çalışmanın 48. Saatte TBARS düzeyleri kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarında sırasıyla $2,02 \pm 0,19$, $2,27 \pm 0,12$, $3,09 \pm 0,33$, $5,45 \pm 0,89$, $4,16 \pm 0,11$, $4,77 \pm 1,07$ ve $4,66 \pm 0,08$ nmol/mg protein bulunmuştur. Bu saatte konsantrasyon ortalamaları arasında 5 ppm, 25 ppm ve 50 ppm gruplarında sırasıyla en yüksek TBARS değerleri görülmüştür, bu farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

72. saatte kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarındaki TBARS değerleri sırasıyla $1,80 \pm 0,27$, $3,91 \pm 0,11$, $4,37 \pm 0,41$, $4,40 \pm 0,25$, $4,71 \pm 0,57$, $4,76 \pm 0,44$ ve $5,41 \pm 1,20$ nmol/mg protein bulunmuştur. Bu saatte TBARS düzeyindeki en yüksek değişim 50 ppm grubunda görülmüş ($p < 0,05$), 10 ppm konsantrasyonundaki değişim hem 50 ppm grubu ile hem de kontrol dışındaki diğer tüm gruplarla benzerlik göstermiştir.

Eliminasyon saatinde TBARS düzeyindeki değişiklik $2,58 \pm 0,41$, $2,90 \pm 0,25$, $3,94 \pm 0,37$, $3,34 \pm 0,44$, $4,25 \pm 0,74$, $5,10 \pm 0,27$ ve $4,34 \pm 0,17$ nmol/mg protein olarak sırasıyla kontrol, 0,2 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm ve 50 ppm konsantrasyonlarında görülmüştür. Eliminasyon sürecinde en yüksek TBARS değişim değeri 25 ppm grubunda görülmüş ve istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). En düşük TBARS düzeyi kontrol grubunda görülmüş ve bu fark önemli bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Bakır oksit NP'ün TBARS düzeyinde yaptığı değişimi, geçen süre açısından her grup kendi içerisinde değerlendirildiğinde;

Kontrol grubunda 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda TBARS düzeyi sırasıyla, $1,73 \pm 0,24$, $2,02 \pm 0,19$, $1,80 \pm 0,27$ ve $2,58 \pm 0,41$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda en yüksek değer eliminasyon süresinde görülmüştür.

0,2 ppm grubunda 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $2,95 \pm 0,22$, $2,27 \pm 0,12$, $3,91 \pm 0,11$ ve $2,90 \pm 0,25$ nmol/mg protein bulunmuştur. Bu grupta en yüksek TBARS değeri, 72. saatte gözlenmiş ve zaman ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

TBARS düzeyi 1 ppm grubunda 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $3,29\pm0,27$, $3,09\pm0,33$, $4,37\pm0,41$ ve $3,94\pm0,37$ nmol/mg protein bulunmuştur. Bu grupta en yüksek TBARS değeri 72. saatte gözlenmiş ve eliminasyon süresindeki değerde 72. saat ile benzer yüksek değer göstermiştir.

5 ppm grubunda; 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $3,80\pm0,24$, $5,45\pm0,89$, $4,40\pm0,25$ ve $3,34\pm0,44$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Bu grupta, TBARS düzeyindeki en yüksek değişiklik değeri 48.saatte görülmüştür ve bununla birlikte 72. saatteki değişim 48. saat ile istatistiksel olarak benzerlik göstermiş ve zaman ortalamaları arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

TBARS düzeyi 10 ppm grubunda; 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $3,64\pm0,78$, $4,16\pm0,11$, $4,71\pm0,57$ ve $4,25\pm0,74$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Bu grupta en yüksek TBARS değerleri 72. saatte görülmüştür ve eliminasyon sürecinde diğer önemli yüksek değer bulunmuştur.

25 ppm grubunda; 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $5,11\pm0,56$, $4,77\pm1,07$, $4,76\pm0,44$ ve $5,10\pm0,27$ nmol/mg protein TBARS düzeyi olarak bulunmuştur. Bu grupta TBARS düzeylerindeki değişim zaman ortalamaları yönünden istatistiksel olarak benzerlik göstermiş ve bu fark önemli bulunmamıştır ($p>0,05$).

Son olarak TBARS düzeyi 50 ppm grubunda; 24., 48., 72. saat ve eliminasyonda sırasıyla $5,43\pm0,18$, $4,66\pm0,08$, $5,41\pm1,20$ ve $4,34\pm0,17$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur. Bu grupta zaman ortalamaları arasındaki en düşük değişim değeri eliminasyon sürecinde görülmüştür, diğer saatlerdeki değişimler birbirinden farklı bulunmuş fakat en yüksek değişimin görüldüğü 72. saatte, diğer gruplarla aynı zamanda istatistiksel olarak benzerlik görülmüştür.

Tablo 3.13. CuO (40 nm) NP'lere maruz bırakılan *A. salina* bireylerinde TBARS seviyelerindeki değişiminin iki yönlü varyans analizi ile değerlendirilmesi (nmol/mg protein, Two-way ANOVA / Tukey alt test)

Gruplar	24 saat	48 saat	72 saat	Eliminasyon
Kontrol	1,73±0,24 ^{Bc}	2,02±0,19 ^{ABd}	1,80±0,27 ^{Bc}	2,58±0,41 ^{Ad}
0,2 ppm	2,95±0,22 ^{Bb}	2,27±0,12 ^{Cd}	3,91±0,11 ^{Ab}	2,90±0,25 ^{Bd}
1 ppm	3,29±0,27 ^{Bb}	3,09±0,33 ^{Bc}	4,37±0,41 ^{Ab}	3,94±0,37 ^{Abc}
5 ppm	3,80±0,24 ^{Bb}	5,45±0,89 ^{Aa}	4,40±0,25 ^{Ab}	3,34±0,44 ^{Bcd}
10 ppm	3,64±0,78 ^{Bb}	4,16±0,11 ^{Bb}	4,71±0,57 ^{ABab}	4,25±0,74 ^{ABabc}
25 ppm	5,11±0,56 ^{Aa}	4,77±1,07 ^{Aab}	4,76±0,44 ^{Ab}	5,10±0,27 ^{Aa}
50 ppm	5,43±0,18 ^{Ba}	4,66±0,08 ^{Ca}	5,41±1,20 ^{ABCDa}	4,34±0,17 ^{Db}

A,B,C ve D: Aynı konsantrasyonlarda (aynı satırda) farklı büyük harflerle gösterilen zaman ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05)

a,b,c ve d: Aynı zamanda (aynı sütunda) farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05)

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

En az bir boyutlu, farklı şekil ve büyüklükte olabilen nanomalzemeler, tek elementli ya da çok elementli yapıda olabilir ve istenilen şekillerde oluşturulabilirler. Bu nanomalzemelerden olan NP'ler son derece kullanışlı olmalarından dolayı daha yoğun olarak üretilmektedirler. Yoğun olan bu üretim, doğada bulunan organizmalarda doğrudan veya dolaylı yollarla muhtemel birikim anlamına gelmektedir. Ancak NP'lerin doğal ortama olan etkileri henüz çok yeni olarak araştırılmaya başlanmış ve ilk bulgular durumun çok ciddi olabileceği yönünde güçlü sinyaller vermiştir. Üretilen nanomalzemelerin insan sağlığı ve çevre üzerindeki potansiyel etkileriyle ilgili meseleler, yeni yeni ortaya çıktığından, nanoteknolojinin çevresel ve insan sağlığı üzerindeki etkileri konusundaki bilğimiz henüz çok yetersizdir (Arslan ve ark., 2011; Primera-Pedrozo ve ark., 2012). Gerçekleştirilen pek çok çalışmada NP'lerin bazılarının yüksek toksik özellikte olduğu anlaşılmıştır (Baun ve ark., 2008; Adam ve ark., 2015; Aravantinou ve ark., 2015). Organizmaların toksik maddelere toleransı, büyük ölçüde değişkenlik gösterdiğinden toksikolojik etkiler, farklılıkların büyük bir bölümünü açıklar mahiyettedir. Dolayısıyla, aynı NP'lerin farklı organizmalar ve farklı çevreler üzerindeki etkilerini eş zamanlı olarak belirlemek için doğru toksikoloji modellerini kullanmak gereklidir. Biyolojik sistemdeki tüm organizmalar, ağız yoluyla veya deriden nüfuz etme de dahil bir çok farklı yoldan NP'lere maruz kalabilirler. NP'lerle ilgili çevresel kaygı ise besin zincirinin en altındaki birincil üretici ve tüketici organizmaların maruz kalmasıdır. Bu biyolojik sistemde besin zincirini oluşturan en önemli organizmalar birincil üretici olan fitoplankton ve birincil tüketici organizmalar ise zooplanktonlardır. Ateş ve ark, (2015a), CuO NP'leri ile yaptıkları çalışmalarında farklı vücut dokularında partiküllerin birikmesinden dolayı, *A. salina*'dan elde edilen sonuçlar ışığında sucul sistemdeki balıklara besin zincirinin aktarıldığını bildirmişlerdir. İnsanların yiyeceklerinin önemli bir kısmını oluşturan balıkların, suyla taşınan besinlerde veya beslenme yoluyla nano boyuttaki parçacıklarla kirlenmiş fitoplankton ve zooplankton türleriyle beslenmeleri ve her türlü NP'ün birincil üretici ve birincil tüketici organizmalarda birikmesi endişe verici bir durumdur.

Metal bazlı NP'lerin her biri ayrı bir karakteristik özellik göstermesine rağmen araştırmada kullandığımız metal ve metal oksit NP'lerinin koloidal yapıda genellikle kümeleşme yapmaya meyilli olduğu görülmektedir. Ayrıca bu NP'lerin morfolojik yapısı incelendiğinde büyük çoğunluğun yuvarlak veya küresel bir yapı sergiledikleri görülmektedir.

Tüm NP'lerde olmamakla birlikte nanorod dediğimiz farklı ebatlarda çubuksu yapıların da olduğu görülmektedir. NP'lerin tanımlanması için yaptığımız karakterizasyon analiz sonuçları daha önce metal NP'ler ile yapılmış çalışmalar ile benzer sonuçlar göstermektedir.

Karakterizasyon analizleri verilerine göre, metal bazlı NP'lerin koloidal sıvı içerisindeki boyutlarında birkaç kattan 100 kata kadar büyüme olduğu görülmektedir. Bu da NP'lerin genel karakteristik özellikleri olup, sulu ortamda boyutlarında büyüme olduğunu göstermiştir (Nel ve ark., 2009; Ateş ve ark.,2013a). TEM'de elde edilen görüntüler ayırt edici özellikleri ortaya koymuştur (Cuche ve ark., 2009). Parçacıkların kümeleşmeleri veya birleşmeleri için metal bazlı nanopartiküllerin polar sıvılar içerisindeki davranışlarını yüzeylerindeki elektrik yükü ile değil, zeta potansiyel değerleri ile belirlenir (Choi ve ark., 2011; Clogston ve Patri, 2011; Sapsford ve ark., 2011; Ateş, 2018), aynı yükteki parçacıklar birbirlerini iter, farklı yükteki parçacıklar ise çeker. Bu çekme ve itme kuvveti parçacığın zeta potansiyel değerine bağlıdır (Baalousha ve Lead, 2007). Nanopartiküllerin en çok karşılaşılan sıkıntıları kararlılıklarıdır, zeta potansiyelinin ölçülmesi, koloidal dispersiyonun saklama stabilitesi hakkında tahminde bulunmaya olanak vermektedir (Kavaz, 2011). Zeta potansiyel sonuçları incelendiğinde bakır NP'ler pozitif (+) yüzey yükünü göstermektedir. Zeta potansiyeli, içinde bir parçacığın dağıldığı yığın sıvısı ve NP yüzeyi ile alakalı zıt yüklü iyonları içeren sıvı tabakası arasındaki potansiyel farkın bir ölçüsüdür (Sapsford ve ark., 2011). Metal NP'lerin sıvı ortamdaki kararlılık değerleri ve yüzey yükü değerleri bakımından ise biyodeneyde kullandığımız NP'ler Cu (60-80nm) +7,2 (mV) ve CuO (40 nm) ise +17,1 (mV) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar bu NP'lerin kararlı olduklarını göstermektedir. Bakıroksit NP'ün zeta potansiyeli ile ilgili yapılan bir çalışmada, toksisite testlerinde, kararlılığın maksimize edildiği koşullar altında gerçekleştirilmesi ve hidrodinamik çap ile CuO-NP'lerden serbest Cu^{+2} salınımının en aza indirilmesi gerektiği bildirilmiştir, böylelikle test organizmalarının daha büyük agregatlar veya çözünmüş iyonlar yerine öncelikle NP'lere maruz kalmasını sağlamaya yardımcı olacağı belirtilmiştir (Son ve ark., 2015).

Bakır (60-80 nm) NP'lerin ve CuO (40 nm) NP'lerin FT-IR spektrumu ve adsorbe edilmiş sudan dolayı benzer kuşaklar göstermişlerdir. Doruk noktaları atmosferdeki düşük miktardaki karbondioksit ile ilgili olarak değerlendirilmiştir. ~650-400 cm^{-1} aralığındaki ayrı ve keskin bir kuşak Cu-O bağından dolayıdır ve Cu NP'ler için olan ~700-400 cm^{-1}

aralığındaki çeşitli düşük doruk noktalarına sahip kuşak bunların saflığını göstermektedir. Cu-O bağına özgü bakır oksit için $\sim 650-400 \text{ cm}^{-1}$ aralığında ayrı ve keskin bir kuşak değerleri önceki çalışmalarla desteklenmektedir (Ethiraj ve Kang, 2012; Srivastava ve ark., 2013; Umer ve ark., 2014). CuO ve Cu NP'lerin 2 θ 'daki doruk noktaları daha önce ICDD tarafından raporlanan, standart spektrumun doruk noktaları ile uyushmaktadır. Literatüre göre Cu NP'den kaynaklanan bir kuşak kaydedilmiştir, CuO için kaydedilen keskin kuşak ve Cu NP'ler için ince yapıya sahip kuşak yüksek saflık ve kristallik gösterirler (Soomro ve ark., 2014). Kırınımın keskin doruk noktaları, numunelerin yüksek kristallığını göstermektedir ve hesaplanan kristalit boyutları üreticinin verileri ile uyumlu olarak belirlenmiştir. Bu doruk noktalarının konumları daha önce raporlanan çalışmalarla benzerdir (Srivastava ve ark., 2013; Abboud ve ark., 2014; Shaffiey ve ark., 2014) XRD sonuçlarının SEM görüntüleriyle uyumlu olması beklenmektedir (Ethiraj ve Kang, 2012; Nithya ve ark., 2014). Çalışmamızda XRD sonuçları, nano boyuttaki kristallerin hem CuO hem de Cu NP'ler için nano çiçek ve toplar olarak gösteren SEM görüntüleriyle uyumludur.

Deneyde kullanılan canlı organizmaların NP'ler ile olan etkileşimlerini görmek için yapılan faz kontrast mikroskopik analizi sonucunda elde edilen görsellere göre; zooplanktonik olan *A. salina* organizmalarının ortamda bulunan NP'leri aldıkları ve vücut içindeki organların parçacıklarla dolu oldukları açıkça görülmektedir. Genellikle bu tür organizmalar süzerek beslendiği için sulu ortamda bulunan mikro veya makro boyuttaki tüm parçacıkları besin yoluyla vücuduna alırlar (Gophen ve Geller, 1984). Ancak vücuda alınan bu parçacıkların ne kadarının NP olduğunun veya organizmada bu NP'lerin birikim yapıp yapmadığının ise ICP-MS analizleri sonuçları ile belirlenebilir. Bu kapsamda birikim ve eliminasyon oranlarının belirlenmesi için ICP-MS ile yaptığımız analiz sonuçları ile NP konsantrasyonların artışı ile aynı paralelliği göstermektedir. NP konsantrasyonu arttıkça birikim oranında da artış olduğu görülmektedir. Bakır (60-80 nm) NP'lerine maruz bırakılan *A. salina* bireylerinde Cu birikimi ve eliminasyon sonuçları incelendiğinde; her uygulama saatinde ve eliminasyonda konsantrasyon artışına paralel olarak birikim ve eliminasyonun gerçekleştiği belirlenmiştir. Konsantrasyon oranı arttıkça birikim miktarları katlanarak bir artış göstermiştir.

Son zamanlarda, nano yapıları malzemeler ile ilgili muhtemel çevresel etkilerini açıklığa kavuşturmak için kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır. Yine de, bu çabalar kesin sonuçlar

sağlamaktan çok uzaktır. Farklı grupların bulguları önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Örneğin hem tatlı hem de tuzlu suda yaşayabilen (örihalin) Sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) balığı üzerinde yapılan bir araştırmada, aynı NP'lün nanotoksosite etkileri incelendiğinde, düşük tuzlulukta daha çok olduğu saptanmıştır (Ateş ve ark., 2014). Yukarıda da belirtildiği gibi, NP'lerin biyokimyasal ve toksikolojik etkilerini tam olarak anlamak zordur. Çünkü gözlenen etkiler nano boyuttaki malzemenin türüne, büyüklüğüne, fiziko-kimyasal özelliklerine, çevreye ve organizma çeşitliliğine bağlıdır. Deneysel araştırma çalışmamızda ise benzer sonuçlar elde edildiği gibi farklı sonuçlar da alınmıştır. Cu NP'leri (60-80 nm) CuO NP'lerinden (40 nm) daha fazla toksik olmuştur. Başka araştırma grupları tarafından yapılan çalışmalarda, balık karaciğerinde Cu-NP'lerin nekrozu indüklediği ve solungaçlarda sinüsoidal boşlukları değiştirdiği gösterilmiştir (Griffitt ve ark., 2007; Al-Bairuty ve ark., 2013). Su kaynaklı maruziyetlerde çözünmüş Cu için hedef organlar öncelikli olarak solungaç olup, karaciğer Cu metabolizmasında merkezi bir bölme olmaktadır (Grosell ve ark., 1996, 1997; Shaw ve ark., 2012). Bununla birlikte, balıklarda Cu toksisitesi; alkalinite, sertlik, çözünmüş organik madde ve pH gibi su kimyasından etkilenir (Erickson ve ark., 1996). Çözünmüş Cu balıkların solungaçlarına zarar verebilir (Figueiredo-Fernandes ve ark., 2007). Bu durumda da solungaç işlevinin kaybı, iyonik düzenlemeye ve gaz alışverişi rahatsızlıklarına neden olabilir (Wood ve McDonald, 1982; Laurén ve McDonald, 1985). Bakırın iç organlara oksidatif stres yoluyla ve/veya solungaç yaralanması ile ilişkili ikincil hipoksiye bağlı olarak balıklarda toksisiteye neden olduğu bilinmektedir (Hoyle ve ark., 2007; Eyckmans ve ark., 2011; Shaw ve ark., 2012). Al-Bairuty ve ark., (2016) gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ile yaptıkları çalışmalarında su pH'sı düşürüldüğünde Cu birikiminin ve ilişkili ölümcül tepkilerin etkilendiğini bulmuşlardır. CuO NP'lerin alt seviyedeki bentik organizmalardan sudaki besin zincirinin diğer organizmalarına kadar toksisiteye neden olduğu bildirilmiştir (Madhav ve ark., 2017). Buffet ve ark., (2011), farklı iki deniz omurgasız (S. plana ve H. diversicolor) ile yaptıkları çalışmalarında, CuO NP'nün bu canlılarda biyokimyasal ve davranışsal tepkilerinde hasara yol açtığını tespit etmişlerdir. Shi ve ark., (2011) ise sucul başka bir bitki olan *Landoltia punctata* üzerinde CuO NP'lerin etkisini Cu ile kıyaslamışlardır. 1 mg/L CuO NP varlığında bitkilerde klorofil seviyesinde önemli azalma görülmüştür. CuO NP'ye maruz bırakılan bitki yaprağındaki Cu içeriğinin, eşdeğer dozdaki Cu'ya maruz bırakılan bitki yapraklarındakine göre 4 kat daha fazla olduğu tespit edilmiş, toksik etki bu şekilde açıklanmıştır.

Metal bazlı NP'lerin bulundukları sıvı ortamında çözünmesi, kendilerini eşleştiren iyonik türleri toksik özellik gösterir. Bu nedenle, zamanla organizmalar üzerindeki potansiyel etkileri daha iyi anlamak için hem NP hem de ortama iyon salınımları göz önüne alınmalıdır. Çünkü metal veya metal oksit NP'lere bağlı iyonik salınımları sonucunda, çeşitli biyolojik süreçlerde önemli değişiklikler meydana getirir. Özellikle yaşayan hücrelerde iyonik mekanizma ve oksidatif stres izleyerek toksisiteye neden olur. Bakır (60-80 nm) ve CuO (40 nm) NP'lerinin ortama verdiği Cu iyon miktarları değerlendirildiği zaman; her uygulama saatinde genel olarak ortama salınan iyon miktarları konsantrasyon artışına paralel olarak bariz şekilde artmıştır. Her grup içerisinde, uygulama süresiyle birlikte iyon salınımının arttığı belirlenmiştir. Düşük ve yüksek konsantrasyonlar arasında büyük salınım farklarının olduğu tespit edilmiştir. NP'ler arasındaki salınım miktarları karşılaştırıldığı zaman en yüksek değerler genellikle 72. saatte elde edilmiş, NP'ler arasındaki en yüksek değerler ise metal formu olan Cu (60-80 nm) NP'den elde edilmiştir. Bakıroksit formunun uygulandığı gruplar ise en düşük salınım miktarı göstermiştir.

Oksidatif stres belirteçlerinden GSH ve TBARS testleri kullanılarak toplam lipid peroksidasyon ölçümü tespiti şeklinde incelenmiştir. GSH, ökaryotik hücrelerde bulunan hücre içindeki serbest radikalleri temizlemekle görevli önemli bir antioksidandır. Oksidatif stres halinde hücre GSH sentezlemekte ve böylelikle hücre içinde GSH seviyesi artmaktadır (Eyckmans ve ark., 2011; Melegari ve ark., 2013). Çalışmanın 24, 48 ve 72. saatlerinde Cu NP'lerin GSH seviyelerinde kısmi artışlara neden olduğu belirlenmiştir. Eliminasyon sürecinde ise kontrol grubu ile istatistiksel olarak benzerlik göstermiştir ($p < 0,05$). Diğer yandan zaman ortalamaları genellikle istatistiksel olarak benzerlik gösterirken, bazı gruplarda ve bazı zamanlarda (0,2 ppm ve 5 ppm) istatistiksel farklar vardır. Elde edilen verilere göre GSH seviyelerinde artmalar ve azalmalar olmuştur. GSH seviyesi ılımlı oksidatif stres koşullarında artış gösterip radikalleri temizlemekte, yüksek oksidatif stres koşullarında ise azalmaktadır. GSH miktarındaki azalmalar, serbest radikal oluşumunun ve lipid peroksidasyonunun uzun süreli artışına bağlı olarak hücresel antioksidan savunma sisteminin aşılması ve antioksidan enzim aktivitelerinde azalmaların görülmesiyle açıklanabilir. Bunun yanında bazı bilim adamları metal etkisinde GSH seviyelerindeki azalmaları, GSH sentez mekanizmasının bloklanmasına da bağlamaktadırlar (Griffith, 1999). Bununla birlikte CuO NP uygulamasında GSH seviyelerinde, 24 ve 48. saatlerde kısmi bir artış görülmüş, fakat 72. saat ve eliminasyon sürecinde tüm konsantrasyonlarda (0,2 ppm grubu hariç) GSH

seviyelerinde azalma görülmüştür ($p>0,05$). Gruplarda görülen bu artış ve azalış değerleri ılımlı oksidatif stres ve yüksek oksidatif stres durumlarında organizmanın verdiği tepki olarak açıklanmıştır. Benzer olarak, balıklarda, yapılan birçok çalışmada ağır metallerin GSH düzeyinde artma ve azalmalara sebep olduğu bildirilmiştir (Pena ve ark., 2000; Elia ve ark., 2003; El-Demerdash, 2004; Lima ve ark., 2006; Atlı ve Canlı, 2007; Fırat ve Kargın, 2010; Lushchak, 2011; Kaya, 2012).

TBARS lipid peroksidasyonun göstergesidir. Artan TBARS seviyeleri; serbest oksijen radikali seviyesinin yükseldiğini, bunun oksidatif strese yol açarak antioksidan enzimlerini azalttığını bunun da lipid peroksidasyon oluşumunu arttırarak membran yapısını bozduğunu göstermektedir (Fernandez ve ark., 1997; Suman ve ark., 2015). 72 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda (0,2; 1; 5; 10; 25 ve 50 ppm) ve eliminasyon süresinde, Cu (60-80 nm) NP'ne maruz bırakılan *A.salina* da artan konsantrasyona oranlarıyla TBARS değeri artmış ve en yüksek artış 5 ppm grubunun 24. saatinde gözlenmiştir. Gruplar geçen süre açısından (24., 48., 72. saat ve eliminasyon) TBARS düzeylerinde artış-azalış-artış-azalış eğilimi göstermişlerdir (5 ppm ve 10 ppm grupları 72. saatte de TBARS düzeyinde azalış eğilimi göstermişlerdir). Bakıroksit (40 nm) NP'de artan konsantrasyon oranlarıyla TBARS değeri artmıştır. En yüksek artış 5 ppm grubunun 48. saatinde görülmüştür. Gruplar geçen zaman karşısında TBARS düzeylerinde 24. saatte artış, 48. saatte azalış (10 ppm ve 25 ppm grupları bu saatte de artış göstermiştir) eğilimi göstermişlerdir. Artan TBARS seviyesi serbest oksijen seviyesinin artışı ile TBARS seviyesindeki azalış ise antioksidan savunması ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bu yönüyle TBARS seviyesindeki bu değişimler (Oberdörster, 2004; Smith ve ark., 2007) çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir. Smith ve ark., (2007), karbon nanotubün alabalık üzerine toksisitesini araştırdıkları çalışmalarında, TBARS düzeyinin özellikle solungaç, beyin ve karaciğerde kontrol grubuna oranla önemli derecede azaldığını oksidatif stres koşullarında azalan TBARS değerlerinin, diğer antioksidanların indüksiyonundan kaynaklanabileceğini, öne sürmüşlerdir. Benzer şekilde Oberdörster (2004)'de *Micropterus salmoide* üzerine C₆₀ (fulleren)'ın toksisitesini araştırdığı çalışmada solungaç ve karaciğerde TBARS değerlerinin azaldığını ve bunun nedeninin bu organların daha iyi antioksidan savunmasından kaynaklandığını ve muhtemel antioksidan enzimlerinin indüklenmesinden dolayı lipid peroksidasyonunun azalmasına yönelik bir eğilim olduğunu ileri sürmüştür.

5. ÖNERİLER

Nanotoksisite deneyinde kullandığımız Cu ve CuO NP'leri, zooplankton türü üzerinde farklı toksik etkiler oluşturmuştur. Bu da metal NP'lerin bulundukları ortamın etkisinden kaynaklanmaktadır.

Biyolojik sistemdeki organizmalar, nano boyuttaki malzemeler başta olmak üzere, ağır metaller, toksinler ya da patojenlere maruz kalmaktadır ve ayrıca zayıf antioksidan savunma sistemleri, aşırı olumsuz çevresel uyarıcılar ve günlük metabolik ürünler gibi faktörler organizmalarda oksidatif strese neden olurlar. Çalışmamızda çok yönlü yapılan analizlerin sonucunda Cu ve CuO NP'lerin organizmada birikim yapmakla birlikte, deney organizmasında toksik etkilerinin olduğu ve oksidatif stres oluşturduğu da görülmüştür. Bu etkilerin şimdilik laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda gözlenebiliyor olması, NP'lerin çevre için oluşturabilecekleri tehdidi gölgelememelidir. Doğadaki birikimin boyutu arttıkça sonuçlar daha net bir şekilde karşımızda belirecektir. Nano boyuttaki malzemeler, her geçen gün artan yoğun kullanım alanları ile beraber, muhtemel yanlış kullanılmaları da göz önüne alındığında dünya genelinde çevre için büyük tehditlerden birini oluşturmaktadır. Besin zinciri organizmaları tarafından alınan NP'ler dokuda metal olarak birikim yaptığında bir üst tüketici organizmalar için tehlike oluşturmaktadır. Bugünlerde hızlı bir şekilde tanımaya başladığımız, nano boyuttaki malzemeler konusunda, bir hataya düşmemiz, gezegende yaşayan insan dahil tüm canlıların varlığını kaçınılmaz olarak geri dönüşü olmayacak şekilde etkileme potansiyeline sahiptir.

Sucul ekosistem üzerindeki nanotoksikolojik çalışmalar göz önüne alındığında, NP'lerin kullanımı, doğaya salınımı, ekosisteme bulaşmaları konularında daha kapsamlı araştırmalar yapılmalı, deşarj ortamı olan su kaynaklarından NP'lerin uzaklaştırılmaları amacıyla arıtım mekanizmaları geliştirilmeli ve NP'lerin doğaya olası salınımları üzerinde bir kontrol mekanizmasının oluşturulması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abboud, Y., Saffaj, T., Chagraoui, A., El Bouari, A., Brouzi, K., Tanane, O., Ihssane, B., 2014. Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles (CONPs) produced using brown alga extract (*Bifurcaria bifurcata*). *Applied Nanoscience*, 4(5):571–576.
- Abdel-Khalek, A.A., Kadry, M.A., Badran, S.R., Marie, M.A.S., 2015. Comparative toxicity of copper oxide bulk and nano particles in Nile Tilapia; *Oreochromis niloticus*: Biochemical and oxidative stress. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 72:43–57.
- Adam, N., Vakurov, A., Knapen, D., Blust, R., 2015. The chronic toxicity of CuO nanoparticles and copper salt to *D. magna*. *Journal of hazardous materials*, 283:416–422.
- Al-Bairuty, G.A., Shaw, B.J., Handy, R.D., Henry, T.B., 2013. Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 126:104–115.
- Al-Bairuty, A., Boyle, D., Henry, T.B., Handy, R.D., 2016. Sublethal effects of copper sulphate compared to copper nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at low pH: physiology and metal accumulation. *Aquatic Toxicology*, 174:188–198.
- Aravantinou, A.F., Tsarpali, V., Dailianis, S., Manariotis, I.D., 2015. Effect of cultivation media on the toxicity of ZnO nanoparticles to freshwater and marine microalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114:109–116.
- Arslan, Z., Ates, M., McDuffy, W., Agachan, M.S., Farah, I.O., Yu, W.W., 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(1):192–199.
- Arulvasu, C., Jennifer, S.M., Prabhu, D., Chandhirasekar, D., 2014. Toxicity effect of silver nanoparticles in brine shrimp *Artemia*. *The Scientific World Journal*, (Article ID 256919) 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/256919>.
- Ateş, M., Daniels, J., Arslan, Z., Farah, I.O., 2013a. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185:3339–3348.
- Ateş, M., Daniels, J., Arslan, Z., Farah, I.O., Rivera, H.F., 2013b. Comparative evaluation of impact of Zn and ZnO nanoparticles on brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: effects of particle size and solubility on toxicity. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15:225–233.

- Ateş, M., Dugo, M. A., Demir, V., Arslan, Z., Tchounwou, P. B., 2014. Effect of copper oxide nanoparticles to sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) at different salinities. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 9(1):369.
- Ateş, M., Arslan, Z., Demir, V., Daniels, J., Farah, I.O., 2015a. Accumulation and toxicity of CuO and ZnO nanoparticles through waterborne and dietary exposure of goldfish (*Carassius auratus*). *Environmental Toxicology*, 30:119–128.
- Ateş, M., Demir, V., Arslan, Z., Daniels, J., Farah, I.O., Bogatu, C., 2015b. Evaluation of alpha and gamma aluminum oxide nanoparticle accumulation, toxicity, and depuration in *Artemia salina* larvae. *Environmental Toxicology*, 30:109–118.
- Ateş, M., Demir, V., Arslan, Z., Camas, M., Celik, F., 2016. Toxicity of engineered nickeloxide and cobalt oxide nanoparticles to *Artemia salina* in seawater. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227:1–8.
- Ateş, M., 2018. Nanoparçacıkların ölçme ve inceleme teknikleri. *Turkish Journal of Scientific Reviews*, 11(1):63-69.
- Ath, G., Canlı, M., 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 145:282-287.
- Baalousha, M., Lead, J.R., 2007. Characterization of natural aquatic colloids (<5nm) by flow-field flow fractionation and atomic force microscopy. *Environmental Science & Technology*, 41:1111–1117.
- Baker, T.J., Tyler, C.R., Galloway, T.S., 2014. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution*, 186:257–271.
- Baun, A., Hartmann, M.B., Grieger, K., Kusk, K.O., 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology*, 17: 387–395.
- Bermudez, E., Mangum, J. B., Asgharian, B., Wong, B. A., Reverdy, E. E., Janszen, D. B., Everitt, J. I., 2002. Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicological Sciences*, 70(1):86-97.
- Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, M., Kahru, A., 2013. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Archives of Toxicology*, 87 (7):1181–1200.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.

- Brar, S.K., Verma, M.,** 2012. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *TrAC Trends Analytical Chemistry*, 30:4–17.
- Browne, R.A.,** 1980. Competition experiments between parthenogenetic and sexual strains of the brine shrimp, *A. salina*. *Ecology*, 61:471–474.
- Buffet, P.E., Tankoua, O.F., Pan, J.F., Berhanu, D., Herrenknecht, C., Poirier, L., Triquet, C.A., Claude Amiard, J., Baptiste Bérard, J., Risso, C., Guibbolini, M., Roméo, M., Paul Reip, P., Jones, E.V., Mouneyrac,** 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere*, 84 (1):166–174.
- Chau, C.F., Wu, S.H., Yen, G.C.,** 2007. The development of regulations for food nanotechnology. *Trends in Food Science and Technology*, 18:269–280.
- Choi, J., Reipa, V., Hitchins, VM., Goering, P.L., Malinauskas, R.A.,** 2011. Physicochemical characterization and in vitro hemolysis evaluation of silver nanoparticles. *Toxicol Sciences*, 123:133–143.
- Clearwater, S.J., A.M., Farag, J.S. Meyer,** 2002. Bioavailability and toxicity of diet borne copper and zinc to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132C:269–313.
- Clogston, J.D., Patri, A.K.,** 2011. Zeta potential measurement. *Methods in Molecular Biology*, 697:63-70.
- Colvin, V. L.,** 2003. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology*, 21:1166-1170.
- Cornejo-Garrido, H., Kibanova, D., Nieto-Camacho, A., Guzmán, J., Ramírez-Apan, T., Fernández-Lomelín, P., Garduño, M.L., Cervini-Silva, J.,** 2011. Oxidative stress, cytotoxicity and cell mortality induced by nano-sized lead in aqueous suspensions. *Chemosphere*, 84:1329–1335.
- Corsi, I., Cherr, G.N., Lenihan, H.S., Labille, J., Hasselov, M., Canesi, L., Dondero, F., Frenzilli, G., Hristozov, D., Puentes, V., Libralato, G., Marcomini, A., Sabbioni, E., Matranga, V.,** 2014. Common strategies and technologies for the ecosafety assessment and design of nanomaterials entering the marine environment. *ACS Nano*, 8(10):9694–9709.
- Cuche A. Masenelli B. Ledoux G. Amans D. Dujardin C. Sonnefraud Y.,** 2009. Fluorescent oxide nanoparticles adapted to active tips for near-field optics. *Nanotechnology*, 20:015603.
- Dagani, R.,** 2003. Nanomaterials: Safe or unsafe? *Chemical & engineering news*, 81(17):30-33.

- Dreher, K.L.**, 2004. Health and environmental impact of nanotechnology: Toxicological assessment of manufactured nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 77:3-5.
- Elia, A.C., Galarini, R., Taticchi, M.I., Dorr, A.J.M., Mantilacci, L.**, 2003. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55:162-167.
- El-Demerdash, F.M.**, 2004. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18:113-121.
- Erickson, R.J., Benoit, D.A., Mattson, V.R., Leonard, E.N., Nelson, H.P.**, 1996. The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15:181-193.
- Ethiraj, A.S., Kang, D.J.**, 2012. Synthesis and characterization of CuO nanowires by a simple wet chemical method. *Nanoscale research letters*, 7(1):70.
- Eyckmans, M., Celis, N., Horemans, N., Blust, R., De Boeck, G.**, 2011. Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. *Aquatic Toxicology*, 103:112-120.
- Fahmy, B., Cormier, S.A.**, 2009. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicology In Vitro*, 23:1365-1371.
- Fernandez, J., Alvarez, J.A., Lopez J.A.**, 1997. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59:345-353.
- Firat, Ö., Kargin, F.**, 2010. Response of *Cyprinus carpio* to copper exposure: alterations in reduced glutathione, catalase and proteins electrophoretic patterns. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36:1021-1028.
- Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P., Fontainhas-Fernandes, A.**, 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 27:103-109.
- Fiorentino, B., Golanski, L., Guiot, A., Damlencourt, J.-F., Boutry, D.**, 2015. Influence of paints formulations on nanoparticles release during their life cycle. *Journal of Nanoparticle Research*, 17:1-13.
- Galdiero, S., Falanga, A., Vitiello, M., Cantisani, M., Marra, V., Galdiero, M.**, 2011. Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules*, 16:8894-8918.
- Gallo, A., Boni, R., Buttino, I., Tosti, E.**, 2016. Spermiotoxicity of nickel nanoparticles in the marine invertebrate *Ciona intestinalis* (ascidians). *Nanotoxicology*, 10 (8):1096-1104.

- Gambardella, C., Mesarič, T., Milivojević, T., Sepčić, K., Gallus, L., Carbone, S., Ferrando, S., Faimali, M., 2014.** Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae: evaluation of mortality and behavioural and biochemical responses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186:4249–4259.
- Gomez, J., Martínez, A.C., Gonzalez, A., Rebollo, A., 1998.** Dual role of Ras and rho proteins: At the cutting edge of life and death. *Immunology and Cell Biology*, 76:125-134.
- Gophen, M., Geller, W., 1984.** Filter mesh size and food particle uptake by *Daphnia*. *Oecologia*, 64(3):408-412.
- Griffith, O.W., 1999.** Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 27:922-935.
- Griffitt, R.J., Weil, R., Hyndman, K.A., Denslow, N.D., Powers, K., Taylor, D., 2007.** Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*, 41:8178-8186.
- Grosell, M., 2012.** Homeostasis and toxicology of essential metals. *Fish Physiology, Academic Press San Diego*, 31A:53-133.
- Grosell, M., Boetius, I., Hansen, H.J.M., Rosenkilde, P., 1996.** Influence of pre exposure to sublethal levels of copper on ⁶⁴Cu uptake and distribution among tissues of the european eel (*Anguilla anguilla*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114C:229–235.
- Grosell, M.H., Hogstrand, C., Wood, C.M., 1997.** Cu uptake and turnover in both Cu-acclimated and non-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 38:257–276.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.C., Kahru, A., 2008.** Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *D. magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71(7):1308-1316.
- Hoet, P.H.M., Nemmar, A., Nemery, B., 2004.** Health impact of nanomaterials. *Nature Biotechnology*, 22:19.
- Hood, E., 2004.** Fullerenes and fish brains. *Environmental Health Perspectives*, 112:A568-A569.
- Hoyle, I., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007.** Dietary copper exposure in the African walking catfish: *Clarias gariepinus*: transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, 83:62–72.
- Huber, D.L., 2005.** Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* 1:482-501.

- Jeong, Y.S., Park, J.B., Jung, H.G., Kim, J., Luo, X., Lu, J., Lee, Y.J., 2015.** Study on the catalytic activity of Noble metal nanoparticles on reduced graphene oxide for oxygen evolution reactions in lithium–air batteries. *Nano letters*, 5(7):4261-4268.
- Kavaz, D., 2011.** Nanopartiküller. *N@nobülten13, Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Bilim Dergisi*, Ankara, 12-20.
- Kaya, H., 2012.** Tilapya’da (*Oreochromis mossambicus*) kurşun toksisitesi: Oksidatif stres ve bazı fizyolojik etkiler. *Doktora Tezi*, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale, 210s.
- Khosravi-Katuli, K., Prato, E., Lofrano, G., Guida, M., Vale, G., Libralato, G., 2017.** Effects of nanoparticles in species of aquaculture interest. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(21):17326-17346.
- Lall, S.P., 2002.** The minerals, in: J.E. Halver, R.W. Hardy (Eds.), *Fish Nutrition*, Academic Press, New York, pp. 259–308.
- Laurén, D.J., McDonald, D.G., 1985.** Effects of copper on branchial ion oregulationin the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Comparative Physiology*, 155B:635–644.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., 2000.** The history, present status and prospects of the availability of *A. salina* cysts for aquaculture. *Aquaculture*, 181:397–403.
- Lee, K.P., Trochimowicz, H.J., Reinhardt, H.J., 1985.** Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 79:179-192.
- Lee, M., Shiau, S., 2002.** Dietary copper requirement of juvenile grass shrimp *Penaeus monodon* and effects on non-specific immune response. *Fish & Shellfish Immunology*, 13(4):259–270.
- Léger, P., Bengtson, D., Simpson, K., Sorgeloos, P., 1986.** The use and nutritional value of *A. salina* as a food source. *Oceanogr. Annual Review of Marine Science*, 24:521–623.
- Lima, P.L., Benassi, J.C., Pedrosa, R.C., Dal Magro, J., Oliveira, T.B., Wilhelm Filho, D., 2006.** Time-course variations of dna damage and biomarkers of oxidative stress in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to effluents from a swine industry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50:23-30.
- Lorentzen, M., Maage, A., Julshamn, K., 1998.** Supplementing copper to a fish meal based diet fed to Atlantic salmon parr affects liver copper and selenium concentrations. *Aquaculture Nutrition*, 4:67–72.

- Lushchak, V.I.**, 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101:13-30.
- Ma, N., Suematsu, K., Yuasa, M., Kida, T., Shimanoe, K.**, 2015. Effect of water vapor on Pd-loaded SnO₂ nanoparticles gas sensor. *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 7: 5863–5869.
- Madden, A.S., Hochella, J.**, 2005. A test of geochemical reactivity as a function of mineral size: Manganese oxidation by hematite nanoparticles promoted. *Geochim Cosmochim Acta*, 69: 389–398.
- Madhav, M.R., David, S.E.M., Kumar, R.S., Swathy, J.S., Bhuvaneshwari, M., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N.**, 2017. Toxicity and accumulation of Copper oxide (CuO) nanoparticles in different life stages of *A. salina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 52: 227–238.
- Melegari, S.P., Perreault, F., Costa, R.H.R., Popovic, R., Matias, W.G.**, 2013. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, 142–143:431–440.
- Mesarič, T., Gambardella, C., Milivojević, T., Faimali, M., Drobne, D., Falugi, C., Makovec, D., Jemec, A., Sepčić, K.**, 2015. High surface adsorption properties of carbon-based nanomaterials are responsible for mortality, swimming inhibition, and biochemical responses in *Artemia salina* larvae. *Aquatic Toxicology*, 163:121–129.
- Minetto, D., Libralato, G., Marcomini, A., Volpi Ghirardini, A.**, 2016. Potential effects of TiO₂ nanoparticles and TiCl₄ in saltwater to phaeodactylum tricornutum and *Artemia franciscana*. *Science of the Total Environment*, 579:1379–1386.
- Minetto, D., Libralato, G., Volpi Ghirardini, A.**, 2014. Ecotoxicity of engineered TiO₂ nanoparticles to saltwater organisms an overview. *Environment International*, 66:18–27.
- Muralisankar, T., Bhavan, P.S., Radhakrishnan, S., Seenivasan, C., Srinivasan, V.**, 2016. The effect of copper nanoparticles supplementation on freshwaterprawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 34:9–49.
- Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M.**, 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials*, 8(7):543-57.
- Nithya, K., Yuvasree, P., Neelakandeswari, N., Rajasekaran, N., Uthayarani, K., Chitra, M., Kumar, S.S.**, 2014. Preparation and characterization of copper oxide nanoparticles. *International Journal ChemTech Research*, 6(3):2220-2222.

- Nussey, G., Van Vuren, J.H.J., Du Preez, H.H., 2002. The effect of copper and zinc at neutral and acidic pH on the general haematology and osmoregulation of *Oreochromis mossambicus*. *African Journal of Aquatic Science*, 27:61–84.
- Oberdöster, E., 2004. Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile *Largemouth Bass*. *Environmental Health Perspectives*, 112: 1058-1062.
- OECD Organisation for Economic Co-operation and Development, 1992. Guideline No. 210. Fish, Early-Life Stage Toxicity Test (original Guideline, Adopted 17th July 1992). *OECD, Paris, France*.
- OECD., 2004. Guideline for testing of chemicals- *D. magna* sp. acute immobilisation test. 202 of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, 143:431-440.
- Özkan, Y., Altınok, I., İlhan, H., Sokmen, M., 2016. Determination of TiO₂ and AgTiO₂ nanoparticles in *Artemia salina*: toxicity, morphological changes, uptake and depuration. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96:36–42.
- Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M., 2007. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:1712–1720.
- Park, J., Kim, S., Yoo, J., Lee, J.S., Park, J.W., Jung, J., 2014. Effect of salinity on acute copper and zinc toxicity to *Tigriopus japonicus*: the difference between metal ions and nanoparticles. *Marine Pollution Bulletin*, 85 (2):526–531.
- Pena S., Pena J.B., Rios C., Sancho E., Fernandez C. ve Ferrando M.D., 2000. Role of Glutathione in Thiobencarb Resistance in the European Eel *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46:51-56.
- Pitkethly, M.J., 2004. Nanomaterials – the driving force. *Materials Today*, 7 (12):20-29.
- Pretti, C., Oliva, M., Di Pietro, R., Monni, G., Cevasco, G., Chiellini, F., Pomelli, C., Chiappe, C., 2014. Ecotoxicity of pristine graphene to marine organisms. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 101:138–145.
- Primera-Pedrozo, O.M., Arslan, Z., Rasulev, B., Leszczynski, J., 2012. Room temperature synthesis of PbSe quantum dots in aqueous solution: Stabilization by interaction with ligands. *Nanoscale*, 4:1312-1320.
- Rajasree, S.R., Kumar, V.G., Abraham, L.S., Manoharan, N., 2011. Assessment on the toxicity of engineered nanoparticles on the life stages of marine aquatic invertebrate *Artemia salina*. *International Journal of Nanoscience*, 10:1153–1159.

- Rand, G.M. (Ed.)**, 1995. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. Taylor & Francis, London, 1995, reprinted 2003.
- Ray, P.C., Yu, H., Fu, P.P.**, 2009. Toxicity and environmental risks of nanomaterials challenges and future needs. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, 27 (1): 1–35.
- Rossetto, A.L., Melegari, S.P., Ouriques, L.C., Matias, W.G.**, 2014. Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Science of the Total Environment*, 490:807–814.
- Rotini A., Gallo, A., Parlapiano, I., Berducci, M.T., Boni, R., Tosti, E., Prato, E., Maggi, C., Cicero, A.M., Migliore, L., Manfra, L.**, 2018. Insights into the CuO nanoparticle ecotoxicity with suitable marine model species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147:852–860.
- Rotini, A., Tornambè, A., Manfra, L., Cicero, A.M., Bellucci, S., Bistarelli, S., Cataldo, A., Benvenuto, G., Iamunno, F., Graziano, R., Migliore, L.**, 2016. The marine bacterium *Vibrio anguillarum* for the ecotoxicological assessment of nanomaterials. A first trial with copper oxide nanoparticles. In: *Proceedings of the 7th Biannual ECOTOXICOLOGY MEETING (BECOME 2016)*. Livorno, November 22-24.
- Sampson, M.T.**, 2004. Type of buckyball shown to cause brain damage in fish. Nanotechnology-Toxicological Issues and Environmental Safety and Environmental Safety, 155-166, Springer, Dordrecht.
- Sapsford, K.E., Tyner, K.M., Dair, B.J., Deschamps, J.R., Medintz, IL.**, 2011. Analyzing nanomaterial bioconjugates: A review of current and emerging purification and characterization techniques. *Analytical Chemistry*, 83:4453–4488.
- Shaffiey, S.F., Shapoori, M., Bozorgnia, A., Ahmadi, M.**, 2014. Synthesis and evaluation of bactericidal properties of CuO nanoparticles against *Aeromonas hydrophila*. *Nanomedicine Journal*, 1 (3):198-204.
- Shao X.P., Liu, W.B., Lu, K.L., Xu, W.N., Zhang, W.W., Wang, Y., Zhu, J.**, 2012. Effects of tribasic copper chloride on growth copper status antioxidant activities immune responses and intestinal micro flora of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fed practical diets. *Aquaculture*, 338–341:154–159.
- Shaw, B.J., Al-Bairuty, G.A., Handy, R.D.**, 2012. Effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) physiology and accumulation. *Aquatic Toxicology*, 116–117:90–101.
- Shi, J.Y., Abid, A.D., Kennedy, I.M., Hristova, K.R., Silk, W.K.**, 2011. To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution. *Environmental Pollution*, 159(5):1277-1282.

- Smith, C.J., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007.** Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 82:94–109.
- Soltanian, S., 2007.** Protection of gnotobiotic *A. salina* against *Vibrio campbellii* using baker's yeast strains and extracts. *Phd Thesis* Ghent University, Belgium, 239s.
- Son, J., Vavra, J., Forbes, V.E., 2015.** Effects of water quality parameters on agglomeration and dissolution of copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) using a central composite circumscribed design. *Science of the Total Environment*, 521:183–190.
- Sondi, I., Salopek-Sondi, B., 2004.** Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria. *J Colloids and Interface Science*, 275:177-182.
- Song, M.F., Li, Y.S., Kasai, H., Kawai, K., 2012.** Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 50: 211e216.
- Soomro, R.A., Sherazi, S.H., Memon, N., Shah, M.R., Kalwar, N.H., Hallam, K.R., Shah A., 2014.** Synthesis of air stable copper nanoparticles and their use in catalysis. *Advanced Materials Letters*, 5(4):191-198.
- Srivastava, S., Kumar, M., Agrawal, A., Dwivedi, S.K., 2013.** Synthesis and characterisation of copper oxide nanoparticles. *Journal of Applied Physics (IOSR-JAP)* 5(4) (Nov.-Dec.), 2013, 61-65.
- Suman, T.Y., Rajasree, S.R., Kirubakaran, R., 2015.** Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113:23-30.
- Sun, S., Qin, J., Yu, N., Ge, X., Jiang, H., Chen, L., 2013.** Effect of dietary copper on the growth performance, non-specific immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunology*, 34:1195–1201.
- Tavana, M., Kalbassi, M.R., Abedian Kenari, A., Johari, S.A., 2014.** Assessment of assimilation and elimination of silver and TiO₂ nanoparticles in *Artemia franciscana* in different salinities. *Journal of Oceanography*, 5:91–103.
- Theodorakos, I., Zacharatos, F., Geremia, R., Karnakis, D., Zergioti, I., 2015.** Selective laser sintering of Ag nanoparticles ink for applications in flexible electronics. *Applied Surface Science*, 336:157–162.

- Torres-Duarte, C., Adeleye, A.S., Pokhrel, S., Mädler, L., Keller, A.A., Cherr, G.N.,** 2016. Developmental effects of two different copper oxide nanomaterials in sea urchin (*Lytechinus pictus*) embryos. *Nanotoxicology*, 10(6):671–679.
- Turnlund J.,** 1994. Copper, in: M.E. Shils, J.A. Olson, M. Shike (Eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease*, vol. 1, 8th edn, Lea & Febiger Malvern, USA, pp. 231–241.
- Umer, A., Naveed, S., Ramzan, N., Rafique, M.S., Imran, M.,** 2014. A green method for the synthesis of copper nanoparticles using L-ascorbic acid. *Revista Materia Artigo*, 19 (3): 197-203.
- URL-1, 2019 www.an-bonano.com.tr/camyuzeykoruma.html.16 Mart 2019.
- Wang, W., Mai, K., Zhang, W., Ai, Q., Yao, Q., Li, H., Liufu, Z.,** 2009. Effects of dietary copper on survival growth and immune response of juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino, *Aquaculture*, 297:122–127.
- Wang, Z., Li, J., Zhao, J., Xing, B.,** 2011. Toxicity and internalization of CuO nanoparticles to prokaryotic alga *Microcystis aeruginosa* as affected by dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology*, 45(14):6032-6040.
- Wang, Z., Von-Dem-Bussche, A., Kabadi, P.K., Kane, A.B., Hurt, R.H.,** 2013. Biological and environmental transformations of copper-based nanomaterials. *ACS Nano*, 7:8715-8727.
- Warheit, D.B., Laurence, B.R., Reed, K.L., Roach, D.H., Reynolds, G.A.M., Webb, T.R.,** 2004. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicological Sciences*, 77:117-125.
- Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S.,** 1997. Trace minerals in fish nutrition, *Aquaculture*, 151:185–207.
- Wiench, K., Wohlleben, W., Hisgen, V., Radke, K., Salinas, E., Zok, S., Landsiedel, R.,** 2009. Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *D. magna*. *Chemosphere*, 76:1356–365.
- Wood, C.M., McDonald, D.G.,** 1982. Physiological mechanisms of acid toxicity to fish, In: Johnson, R.E. (Ed.), *Acid Rain/Fisheries: Proceedings of the International Symposium on Acid Precipitation and Forest. Impacts in North-Eastern North America*. *American Fisheries Society, Bethesda*, pp. 197–226.
- Wu, B., Torres-Duarte, C., Cole, B.J., Cherr, G.N.,** 2015. Copper oxide and zinc oxidenanomaterials act as inhibitors of multidrug resistance transport in sea urchin embryos: their role as chemosensitizers. *Environmental Science Technology*, 49 (9):5760–5770.

Zhu, X., Chang, Y., Chen, Y., 2010. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *D. magna*. *Chemosphere*, 78:209–215.



ÖZGEÇMİŞ

Araştırmacı, 16.06.1985 yılında Tunceli’de doğmuş, ilk, orta ve lise eğitimini aynı ilde tamamlamıştır. 2004-2008 yılları arasında lisans eğitimini Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi’nde tamamlamıştır. Aynı yıl yüksek lisans eğitimine Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim dalında başlamıştır. 2010 yılında Avrupa Birliği Erasmus Staj Hareketliliği ile burslu olarak 3 ay Portekiz’in Porto şehrinde bulunan CIIMAR Enstitüsü’nde çalışmalara katılmıştır. 2013 yılında Munzur Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başlamıştır. 2015-2018 yılları arasında TÜBİTAK-ÇAYDAG, 114Y087 no’lu projede lisansüstü bursiyeri olarak görev almıştır. 2015 yılında Munzur Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi’nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başlamış ve halen bu göreve devam etmektedir. Araştırmacı evlidir.

