



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ



**ALFA VE GAMMA Fe₂O₃ NANOPARTİKÜLLERE MARUZ
BIRAKILAN *Daphnia magna*'da NANOTOKSİSİTE VE OKSİDATİF
STRES ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Bilal AYDIN

Su Ürünleri Temel Bilimler Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ALFA VE GAMMA Fe₂O₃ NANOPARTİKÜLLERE MARUZ
BIRAKILAN *Daphnia magna*'da NANOTOKSİSİTE VE OKSİDATİF
STRES ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Bilal AYDIN

Su Ürünleri Temel Bilimler Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 31/08/2018

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Selçuk BERBER

Eş Danışman:

Doç. Dr. Mehmet ATEŞ

ÇANAKKALE

Bilal AYDIN tarafından Doç. Dr. Selçuk BERBER yönetiminde ve Doç. Dr. Mehmet ATEŞ ikinci danışmanlığında hazırlanan ve **31/08/2018** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Alfa ve Gamma Fe₂O₃ Nanopartiküllere Maruz Bırakılan *Daphnia magna*'da Nanotoksosite ve Oksidatif Stres Etkilerinin Belirlenmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Su Ürünleri Temel Bilimler Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Doç. Dr. Selçuk BERBER

.....

Başkan

Doç. Dr. Sefa ACARLI

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Sevil ERDOĞAN

.....

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu çalışma TÜBİTAK-ÇAYDAG tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 114Y087

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Bilal AYDIN

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, araştırmanın hazırlık sürecinden bitimine kadar tüm aşamalarda değerli bilgi ve desteklerini gördüğüm sayın tez danışmanım Doç. Dr. Selçuk BERBER ve ikinci danışmanım Doç. Dr. Mehmet ATEŞ'e (*Munzur Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü*) içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu çalışmada kullanılan tüm sarf ve kimyasal malzemeleri ile deney süresince yapılan tüm analiz giderleri Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafınca sağlanan maddi destek ile karşılanmıştır. Bu sebepten dolayı, 1001-Bilimsel Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında, 114Y087 nolu araştırma projesine maddi destek sağlayan TÜBİTAK-ÇAYDAG birimine ayrıca teşekkür ederim. Yüksek Lisans öğrenimim boyunca yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Işıl Canan ÇİÇEK, Arş. Gör. İlkay ÜNAL, Doç. Dr. Hasan KAYA ve Arş. Gör. Semih KALE'ye teşekkürü bir borç bilirim. Özellikle hayatımın her evresinde bana destek olan ve yanımda olan babam Tuncay AYDIN, annem Ruhanne AYDIN ve kız kardeşim Gülçin AYDIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilal AYDIN
Çanakkale, Ağustos 2018

SİMGELER VE KISALTMALAR

nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
C	Karbon
O	Oksijen
H	Hidrojen
M	Molarite
Ag	Gümüş
CO ₂	Karbondioksit
TiO ₂	Titanyumdioksit
Rb ₂ CO ₃	Rubidyum Karbonat
Fe	Demir
Fe ₂ O ₃	Demir oksit
~	Yaklaşık
α	Alfa
γ	Gama
α -Fe ₂ O ₃	Alfa demir oksit
γ -Fe ₂ O ₃	Gama demir oksit
MR	Manyetik Rezonans
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
mm	Milimetre
°C	Santigrat derece
>	Büyüktür
<	Küçüktür
TEM	Transmisyon/Geçirimli Elektron Mikroskop
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
XRD	X-ışını Difraksiyon
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
UV-VIS	Ultraviyole Görünür Spektrofotometresi
kV	Kilovolt
μ L	Mikrolitre
Å	Ångström

Ppm	Milyonda bir kısım
mL	Millilitre
kW	Kilowatt
mg	Miligram
cm	Santimetre
KBr	Potasyum bromür
DTGS	Döterlenmiş triglisin sülfat
mg/L	Miligram/litre
ICP-MS	Endüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi
HNO ₃	Nitrik asit
gr	Gram
DORM-2	Mahmuzlu Camgöz Köpek Balığı Kası
TORT-2	Amerikan İstakozu Hepatopankreası
µg/L	Mikrogram/litre
µg/mL	Mikrogram/mililitre
µg/g	Mikrogram/gram
µm	Mikrometre
rpm	Dakikada ki devir sayısı
%	Yüzde
GSH	Glutasyon
TBARS	Tiyobarbitürat reaktif maddeler
MDA	Malondialdehit
DTNB	5-5'-Ditiyo-bis(2-Nitrobenzoik asit)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
TBA	Tiyobarbitürik asit
TCA	Trikloroasetik asit
NaOH	Sodyum hidroksit
BHT	Butil hidroksi toluen
PdI	Polidispersite indisi
mV	Zeta potansiyeli
(-)	Negatif
(+)	Pozitif
Ω	Omega

θ	Teta
$^{\circ}$	Derece
JCPDS	Toz Kırınım Standardı Birleşik Komitesi
D*	Dalga Boyu
G*	Geçirgenlik
R ²	Korelasyon katsayısı
LC ₅₀	Test hayvanlarının yarısını öldürmek için gerekli konsantrasyon



ÖZET

ALFA VE GAMMA Fe₂O₃ NANOPARTİKÜLLERE MARUZ BIRAKILAN *Daphnia magna*'da NANOTOKSİSİTE VE OKSİDATİF STRES ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Bilal AYDIN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Temel Bilimler Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Doç. Dr. Selçuk BERBER

İkinci Danışman : Doç. Dr. Mehmet ATEŞ

31/08/2018, 54

Nanopartikül (NP) (<100 nm) içeren ürünler; tıbbi cihazlar, elektronik, enerji üretimi ve depolanması, sağlık bilimleri ve gıda sektörleri gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Ancak, NP'lerin çevre ve insan sağlığına etkileri hakkında literatürdeki bilgi henüz yeterli düzeye ulaşamamıştır. Bununla birlikte nanomateryaller yarı-iletken maddeler, metal oksitler ve metaller olmak üzere oldukça geniş bir yelpazede kullanılmaktadır. Bu çalışmada, tatlısu ortamında yaşayan birincil tüketici zooplankton türlerinden *Daphnia magna*, demir oksit (Fe₂O₃) NP'lere maruz bırakılarak nanotoksisite testleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan Fe₂O₃ NP'lerin karakterizasyonu; TEM, DLS, Zeta Potansiyeli, XRD, SEM, FT-IR ve UV-görünüm spektroskopisi yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Organizmalarda NP'lere bağlı birikim ve atılım oranının belirlenmesi ICP-MS analiziyle yapılmıştır. Zooplanktonik organizmalarda NP etkileri faz kontrast mikroskopuyla görüntülenmiştir. Zooplanktonik organizmalardaki toksik etkiler, mortalite ve oksidatif stres testleriyle (GSH ve TBARS) incelenmiştir. Sonuçlar NP'lerin organizmalar üzerindeki farklı etkilerini göstermekle birlikte, NP'lerin birikim ve atılım oranlarında farklılıklar olduğunu göstermiştir. Organizmadaki birikim NP konsantrasyonuyla artış göstermiştir. Çalışmada her bir NP'nin tatlısuda farklı metal iyon salınımı gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, NP'lere maruz bırakılan zooplankterlerin yüzeylerinin NP'ler ile sarıldığı gözlemlenmiştir. Oksidatif stres analizlerinde, TBARS değeri *D. magna* bireylerinde artış göstermiş olup benzer şekilde GSH seviyesinde azalma

ve artmalar meydana gelmiştir. Organizma tarafından alınan NP'ler hem organizma hem de bir üst tüketici için tehlike oluşturmaktadır.

Anahtar sözcükler: Alfa-Gama Demir Oksit, Nanopartikül, Karakterizasyon, *Daphnia magna*, Birikim, Oksidatif Stres.



ABSTRACT

DETERMINATION OF THE EFFECTS OF OXIDATIVE STRESS AND NANOTOXICITY ON *Daphnia magna* EXPOSED TO ALPHA AND GAMMA Fe₂O₃ NANOPARTICLES

Bilal AYDIN

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Marine and Inland Water Sciences

Advisor : Assoc. Prof. Dr. Selçuk BERBER

Co-Advisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet ATEŞ

31/08/2018, 54

The products that include Nanoparticle (NP) are used in many fields, such as medical devices, electronics, the production and the storage of energy, health sciences and food sectors. Unfortunately, the knowledge in the literature is lack on the effects of NPs on the environment and human health. On the other hand, nanomaterials are commonly used in the wide range on half-conductive materials, metals and metal-oxides. This is because nanomaterials have a wide range, from metals, metal-oxides to half-conductive materials. In this study, nanotoxicity tests are conducted by means of exposing *Daphnia magna*, which is one of the primary zooplankton species living in freshwater ecosystem, to iron oxide (Fe₂O₃) NPs. The characterization of Fe₂O₃ NPs used in this study has been made with the methods of TEM, DLS, Zeta Potential, XRD, SEM, FT-IR and UV-Visible Spectroscopy. The measurement of NP-related accumulation and elimination rates has been made with ICP-MS analysis. The NP effects on zooplanktonic organisms has been monitored with phase-contrast microscopy. The toxic effects on zooplanktonic organisms have been examined with the GSH and TBARS, which are among mortality and oxidative stress symptoms. The results indicate that there are differences in the accumulation and the elimination rates of NPs, with differing influences of NPs on organisms. The accumulation in the organism increased with NP concentration. It has been observed that each NP made different metal ion oscillation in freshwater. The surfaces of the zooplankters which were exposed to NPs have been encapsulated with NPs. In oxidative stress analysis, TBARS

value has increased in *D. magna* individuals, whereas ups and downs have been observed on the level of GSH. NPs taken by an organism constitute danger for the higher consumer.

Keywords: Alpha-Gamma Iron Oxide, Nanoparticle, Characterization, *Daphnia magna*, Accumulation, Oxidative Stress.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	x
İÇİNDEKİLER	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	7
3.1. Kimyasal ve Nanomalzemeler	7
3.1.1. Metal Nanopartikül Süspansiyonlarının Hazırlanması.....	7
3.2. Biyodeneş Organizması	8
3.2.1. <i>Daphnia magna</i>	9
3.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	10
3.3.1. Transmisyon Elektron Mikroskobu Analizi	10
3.3.2. Dinamik Işık Saçılımı Analizi	11
3.3.3. Zeta Potansiyeli Analizi	11
3.3.4. X-Işını Kırınım Spektroskopisi Analizi.....	12
3.3.5. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi.....	12
3.3.6. Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi Analizi.....	12
3.4. UV-Vis Absorbans Değerlerinin İstatistiksel Olarak Belirlenmesi	13
3.5. Toksikite Biyodeneş Düzenegi	13
3.5.1. Faz Kontrast Mikroskopik Analizi	15
3.5.2. Zooplankton Sayımı	15
3.6. Kimyasal Analizler.....	16
3.7. Demir Metal İyon Analizleri	17
3.8. Biyokimyasal Analizler.....	18
3.8.1. Glutatyon Analizi	18

3.8.2. Tiyobarbitürik Asitle Tepkimeye Giren Maddelerin Analizi	19
3.9. İstatistiksel Analizler	20
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	21
4.1. Araştırma Bulguları.....	21
4.1.1. Nanomalzemelerin Karakterizasyon Bulguları	21
4.1.1.1. Transmisyon Elektron Mikroskobu Analiz Bulguları	21
4.1.1.2. Dinamik Işık Saçılımı Analiz Bulguları	22
4.1.1.3. Zeta Potansiyeli Analiz Bulguları.....	24
4.1.1.4. X-Işını Kırınım Analiz Bulguları.....	25
4.1.1.5. Taramalı Elektron Mikroskobu Analiz Bulguları	27
4.1.1.6. Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi Analiz Bulguları	28
4.1.1.6.1. Demir Grubu Nanopartiküllerin FT-IR Bulguları	29
4.1.1.7. Nanopartiküllerin UV-Vis Absorbans Değerlerini Gösteren İstatistiksel DeneySEL Tasarım Bulguları	31
4.1.2. Toksikite Analiz Bulguları.....	35
4.1.2.1. Faz Kontrast Mikroskobik Analiz Bulguları	35
4.1.3. Metal ve Metal Oksit Nanopartiküllerin Toksikite Oranları.....	36
4.1.3.1. <i>D. magna</i> Toksikite Test Bulguları	36
4.1.4. Kimyasal Analiz Bulguları	37
4.1.4.1. <i>D. magna</i> Bireylerinde Birikim ve Atılım Değerleri	37
4.1.4.1.2. Demir İyon Salınımı Analiz Bulguları.....	38
4.1.5. Biyokimyasal Analiz Bulguları	39
4.1.5.1. GSH Analizine Ait Bulgular	40
4.1.5.1.1. <i>D. magna</i>	40
4.1.5.2. Tiyobarbitürik Reaktif Maddeler Analiz Bulguları	40
4.1.5.2.1. <i>D. magna</i>	40
4.2. Tartışma.....	41
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	46
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 3.1. Biyodenyde kullanılan α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm), γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lerin stok solüsyonları (Orijinal).....	8
Şekil 3.2. a) <i>D. magna</i> organizma stok kültürü b) Akvaryumda çoğaltılan organizmalar (Orijinal)	9
Şekil 3.3. <i>D. magna</i> biyodeny düzeneği (Orijinal)	15
Şekil 3.4. <i>D. magna</i> 'nın büyüteç altında sayılması	16
Şekil 3.5. TBARS testi kalibrasyon grafiği	20
Şekil 4.1. Biyodenyde kullanılan α -Fe ₂ O ₃ (40 nm) NP'nin TEM görüntüsü.....	21
Şekil 4.2. Biyodenyde kullanılan γ -Fe ₂ O ₃ (40 nm) NP'nin TEM görüntüsü.....	22
Şekil 4.3. α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lerinin dinamik ışık saçılımı analiz sonuçları.....	23
Şekil 4.4. γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lerinin dinamik ışık saçılımı analiz sonuçları.....	24
Şekil 4.5. α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lerinin zeta potansiyeli analiz sonuçları	25
Şekil 4.6. γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lerinin zeta potansiyeli analiz sonuçları	25
Şekil 4.7. α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lerin XRD sonuçları	26
Şekil 4.8. γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lerin XRD sonuçları.....	27
Şekil 4.9. α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lerin SEM görüntü sonuçları.....	28
Şekil 4.10. γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lerin SEM görüntü sonuçları	28
Şekil 4.11. α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lerin FT-IR sonuçları.....	30
Şekil 4.12. γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lerin FT-IR sonuçları	31
Şekil 4.13. α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'ler için istatistiksel verilerin grafikleri.....	33
Şekil 4.14. γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'ler için İstatistiksel verilerin grafikleri	34
Şekil 4.15. Kontrol grubu ile NP'lere (50 μ g/mL, 72 saat) maruz bırakılan zooplankterler	35
Şekil 4.16. α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lerin <i>D. magna</i> 'da toksisite oranlarını gösteren grafikler.....	36
Şekil 4.17. γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lerin <i>D. magna</i> 'da toksisite oranlarını gösteren grafikler.....	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. Alfa ve gama demir oksit nanopartiküllere maruz bırakılan organizmaların biyodeneysel tasarımı.....	14
Çizelge 4.1. Sulu ortamdaki metal ve metal oksit parçacıkları ile laboratuvar ortamında sentezlenen nanomalzemelerin boyut dağılımı, Pdl ve yüzey yükü değerleri ..	23
Çizelge 4.2. Demir grubu nanopartiküllerin spesifik dalga boyu ve FT-IR spektrumlarının geçirgenlik değerleri	30
Çizelge 4.3. Absorbans ölçülmesinde kullanılan bağımsız değişkenlerin seviye ve aralıkları	31
Çizelge 4.4. İki bağımsız değişkenle BBD (Box Behnken Design) modeline göre oluşturulan deney tasarımı.	32
Çizelge 4.5. <i>D. magna</i> bireylerinde α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lerin birikim ve atılım değerleri (µg/g)	38
Çizelge 4.6. <i>D. magna</i> bireylerinde γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lerin birikim ve atılım değerleri (µg/g)	38
Çizelge 4.7. α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) ve γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lerin ortama verdiği Fe iyon miktarları (µg/L)	39
Çizelge 4.8. α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm), γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lere 72 saat süreyle maruz bırakılan <i>D. magna</i> bireylerinden elde edilen GSH bulguları	40
Çizelge 4.9. α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm), γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) NP'lere 72 saat süreyle maruz bırakılan <i>D. magna</i> bireylerinden elde edilen TBARS bulguları	41

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Nanoteknoloji, büyüklükleri 1-100 nm arasında değişiklik gösteren malzemeler kullanılarak yapılan çalışmalar vasıtasıyla hayatı tamamen değiştirmeyi amaçlayan yeni bir bilimsel vizyondur. Nanopartiküller (NP'ler) çok küçük olmaları sayesinde, optik, manyetik ve kimyasal özellikler sergilerler (Huber, 2005). Günümüzde nanomalzeme bilimi, elektronik ve eğlence sektörü, biyomedikal araştırmalar, çevre sağlığı ve hijyen, enerji üretimi ve depolanması gibi alanlarda nanoölçekteki malzemelerin yeni özelliklerinden yararlanılarak farklı teknolojilerin geliştirilmesine yönelik, aynı çizgide en hızlı gelişme gösteren endüstri olmuştur (Colvin, 2003). Nanomalzemelerin gerçeküstü özellikleri sayesinde neredeyse her alanda birçok yeni malzeme uygulamasına imkan sağlamaktadır. Özellikle elektronik, otomotiv sektörü, savunma sanayisi, inşaat, tekstil, ilaç endüstrisi ve gelişmiş tedavi yöntemleri gibi alanlarda nanopartiküllerden çok etkili biçimde faydalanılmaktadır. NP'ler ayrıca, materyali daha güçlü, daha dayanıklı ve hafif yapmak için kullanılmaktadır. Örneğin; tenis racketlerinin çerçevelerine, motorsiklet kasklarına ve kumaşlara NP'lerin ilave edilmesi ve nanoölçekte katkı maddelerinin eklenmesi sonucu lekelenmelere, kırışmalara ve bakteri üremelerine karşı daha dayanıklı ürünler elde edilir. Gözlük camlarında, bilgisayar ve fotoğraf makinesi gibi elektronik cihazların ekranlarında, pencerelerde ve diğer yüzeylerin üzerinde bulunan nanoölçek ince filmler, onları su geçirmez, yansıtmaz, kendi kendini temizleyen, ultraviyole veya kızılötesi ışığa dayanıklı, buğu tutmaz, anti mikrobik veya çizilmeye dirençli özellikler kazandırmaktadırlar (Pitkethly, 2004). Nanomalzemelerin etkileyici özelliklerine rağmen, çevre ve insan yaşamı üzerindeki yan etkileri konusunda ise bilinen çok az şey vardır. Mühendislik ürünü olarak tasarlanmış nanomalzemelerin yarattığı sorunlar, NP'lerle elde edilen ürünler insan yaşamıyla bütünleştikçe ortaya çıkmaktadır (Dagani, 2003; Dreher vd., 2004; Hoet vd., 2004).

Nanoboyutlarda üretilen mühendislik malzemeleri, nanoteknoloji üzerine gerçekleştirilen çalışmalarla elde edilmektedir. Dolayısıyla nanomalzeme terimi birçok ürün grubunu içermektedir. Hemen her çeşit malzeme mühendislik yöntemleriyle işlenerek nanoboyutta elde edilebilmektedir. Malzemelerin karakteristik özellikleri, yapısına ve kullanıldığı sürece göre değişkenlik göstermektedir. Gün geçtikçe artan nanomalzeme sayısı ve bu malzemelerin kullanıldığı süreçlerin çeşitliliği nanomalzemelerin belirli kurallara göre sınıflandırılmasını gerektirmektedir. İnsan yapımı tasarlanmış

nanomateryaller nanoölçekte ortaya çıkan özgün özelliklerinden faydalanılmak için özellikle üretilmektedirler. Bu tasarlanmış insan yapımı NP'lerin çevresel etkilerinin diğer parametreler ile ilgili olup olmadığının değerlendirilmesi önemlidir. İnsan yapımı veya doğal olarak meydana gelen NP'ler tüm sulara gözlenebilir; yüzey suyu, yeraltı suyu, okyanuslar, buzul ve atmosferik sular gibi tüm akuatik ortamlarda NP'ler bulunabilmektedir (Sondi ve Salopek-Sondi, 2004).

Nanomalzemelerin güvenilirliği ile ilgili sorulara yol açan iki önemli faktör vardır. Birincisi, nanoölçekli malzemeler çok çeşitlidir ve mikroölçekli her partikülden yapılabilirler. Bu da bize nanoboyuttaki malzemelerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkilerinin çeşitliliğini göstermektedir. İkincisi ise, nanomalzemeler o kadar küçüktür ki hücrelere, dokulara ve canlıların organlarına basit bir şekilde nüfuz edebilirler. Ayrıca, parçacık büyüklüğü partiküler malzemenin toksikolojik ve fiziko-kimyasal yapısını önemli derecede etkiler. Daha büyük ölçekteki tehlikesiz bir materyal, nanoölçekte toksik ve reaktif olabilir. Sadece kütleli özellikleri veya bir başka nanomalzemenin karakteristiklerinin bilinmesiyle, belirli bir partiküler nanomalzemenin toksikolojik ve fiziko-kimyasal özellikleri bilinemez. Çağımızda, nanoölçekli malzemenin birçok dikkat çekici özelliği olduğu bilinmektedir. Örneğin, karbon nanotüpleri ve titanyum dioksit (TiO₂) NP'leri kütleli halde nispeten zararsız nanomateryallerdir. Ancak, bu NP'lerin akciğer lezyonları, solunum yolu hastalıkları ve solunum yolları iltihabı olarak ortaya çıkan akciğer zehirlenmesine sebep oldukları bildirilmiştir (Lee vd., 1985; Bermudez vd., 2002; Warheit vd., 2004; Wiench vd., 2009; Zhu vd., 2010). Bununla birlikte, 1985 yılında bulunan buck kürelerinin (karbonun yuvarlak bir biçimi) balıklarda geniş çaplı beyin hasarına sebep olduğu rapor edilmiştir (Hood, 2004; Sampson, 2004;). Buck kürelerine maruz kalan balıklarda beyin hasarı oluşumunun yanında balıkların karaciğerlerindeki gen ekspresyonunda da değişimler görüldüğü bildirilmiştir (Oberdöster, 2004).

Son yıllarda hızla gelişmekte olan nanomalzemelerin üretimi ve kullanımı hakkında özellikle gelişmiş ülkeler, kendi çevresel koşullarını göz önünde bulundurarak bu malzemelerin akuatik çevrelerdeki etkileri konusundaki araştırmalara hız vermektedir. Günümüzde, nanoteknoloji temel olarak toksikolojik özellikleri hakkında hiçbir bilgiye sahip olmadan veya çok az bilgiyle yeni özellikleri olan nanomalzemelerin formülasyonu ve üretimi üzerine odaklanmıştır. Bu çalışmada, α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lerin, tatlısu akuatik organizmaları olan *D. magna* üzerindeki birikim ve atılım oranları araştırılmıştır. Ayrıca bu amaçla yapılan çalışmada hem iki farklı formda üretilen nanopartikülün tatlısuda

gösterdiği dağılımları incelenmiş hem de organizma üzerinde toksik etkileri, mortalite ve oksidatif stres değerleri ortaya çıkarılmıştır.



BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Nanomalzemeler, küçük boyutları ve yüksek reaktiviteleri nedeniyle potansiyel geniş kapsamlı ekolojik etkilere sahip önemli bir kirlenici sınıftır. Genellikle nano durumlarından dolayı daha büyük parçacıklarla karşılaştırıldığında farklı toksisite profilleri gösterirler (Manzo vd.,2013). Nanoboyut ve büyük yüzey alanı, NP'lerin biyolojik sistemler ile daha etkili bir şekilde etkileşime girerek toksiklik üretme potansiyelini verir (Manzo vd., 2011). NP'lerin özellikleri, çevresel etkileri nispeten keşfedilmemiş bir araştırma alanı olarak kalırken, yan etkileri hakkında endişe oluşturmaktadır (Farre vd., 2009; Melegari vd., 2013). Metal ve metal oksit NP'leri son yıllarda kapsamlı olarak geliştirilmiştir. Katalizörler, sensörler, yarıiletkenler, tıp bilimi, kapasitörler ve piller gibi birçok uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanoölçekli materyallerin kullanımı katlanarak artmaktadır. Ancak akuatik biyota ve çevresel zararları konusunda ciddi endişeler bulunmaktadır. Metal içeren bu yeni NP'ler mühendislik malzemelerinin önemli bir grubudur ve çoğunlukla bir metal (örn. Ag-NP), metal oksitler (örn. TiO₂ NP) veya birkaç metalin birleşimidir (örn: Rb₂CO₃) (Shaw ve Handy, 2011). Metal bazlı NP'lerin üretim hızı ve uygulamaları, ortama salıverilmeleri, suda ve karada yaşayan organizmalara karşı toksisiteye ilişkin endişeleri arttırmıştır (Madhav vd., 2017).

Teknoloji ve sanayideki gelişmelerle birlikte nanoteknoloji de ticari olarak büyük gelişim göstermektedir. Bununla birlikte toplumda ve sanayide nanopartiküllere maruz kalma oranı da artmaktadır. Dolayısıyla nanopartikül salınımının çevresel etkilerinin gelecekte çok ciddi boyutlara ulaşabileceği öngörülmektedir. Bu nedenle, mühendislik ürünü sonucunda elde edilmiş tüm metal ve metal oksit NP'leri ile yarı iletken kuantum noktalarının güvenliği dünya çapında bir konu haline gelmiştir. Mevcut bazı NP'ler ile ilgili dikkate değer miktarda toksikolojik bilgi mevcut olsa da (in-vitro hücre kültürlerinden biyolojik seviyelerde çeşitli kemirgenler üzerine yapılan çalışmalara kadar elde edilen verilere göre), NP'ler üzerine ekotoksikolojik veriler yeni ortaya çıkmaktadır (Kahru ve Dubourguier, 2010). Her bir NP'nin veya nanokristallerin ayrı bir özelliği veya kullanım alanı olduğu gibi ayrı özellikte toksik etki göstermektedir.

Metal bazlı NP'ler ile yapılmış bazı çalışmalar incelendiğinde, her birisinin birbirinden ayrı ve farklı karakteristik özellikler gösterdiği görülmektedir.

Demir (Fe) ve demir oksit (Fe₂O₃) NP'leri hacimsel yapılarından farklı manyetik özellik göstermekle birlikte olağandışı fiziksel ve kimyasal özellikler sergilemektedirler.

Son yıllardaki çalışmalar bu malzemelerin düşük ergime ve sinterleme sıcaklığı, süperplastik davranış, yüksek süneklik ve tokluk, yüksek ısıl genleşme katsayısı, farklı termofiziksel özellikler ve yüksek self difüzyon katsayısı gibi özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur. Dünya'nın kabuğunda en yaygın olarak bulunan geçiş metali demirdir (Huber, 2005). Demir ve oksijen kimyasal olarak demir oksitler (bileşikler) oluşturmak üzere birleşmektedir ve ~16 farklı Fe₂O₃ bulunmaktadır. Doğada, demir (III) oksit pas şeklinde bulunmaktadır (Cornell ve Schwertmann, 2003). Genellikle, Fe₂O₃ yaygın olarak buldukları ve ucuz olduklarından dolayı en çok kullanılanların başında gelmektedir. Birçok biyolojik ve jeolojik süreçte zorunlu bir rol oynamaktadırlar. Ayrıca, insanlar tarafından, örneğin termitteki demir cevheri, katalizör, dayanıklı pigmentler (kaplamalar, boyalar ve renkli betonlar) ve hemoglobin olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Laurent vd., 2008).

Doğadaki Fe₂O₃'lerin en yaygın üç formu manyetit (Fe₃O₄), maghemit (γ -Fe₂O₃) ve hematit (α -Fe₂O₃). Bu oksitler bilimsel teknoloji alanında çok önemlidir (Teja ve Koh, 2009). Küçük Fe₂O₃ parçacıkları in-vitro teşhislerde yaklaşık 40 yıldır uygulanmaktadır. Son on yılda, nanoboyuttaki manyetik parçacıklar alanında çeşitli Fe₂O₃ ile yapılan araştırmaların arttığı gözlemlenmiştir (Gilchrist vd., 1957). Manyetik NP'leri uygun yüzey kimyasıyla sentezlemek için çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır (Ali vd., 2016). Ferromanyetik malzemelerden oluşan ve <20 nm boyutunda olan NP'ler, eşsiz bir manyetizma şekli, yani süperparamanyetizma sergilemektedirler. Ferromanyetik malzemeler bir dış manyetik alanla mıknatıslanan elemental metaller, alaşımlar, oksitler ve diğer kimyasal bileşikleri kapsamaktadır (De Cuyper ve Joniau, 1988). Düşük toksisitesi, yüzey alanı ve hacim oranı gibi eşsiz mezoskopik fiziksel, kimyasal, termal ve mekanik özelliklerine dayanarak ve basit ayırma metodolojisinden dolayı, süperparamanyetik α -Fe₃O₄, α -Fe₂O₃, γ -Fe₃O₄ ve γ -Fe₂O₃ NP'leri çok dikkat çekmekte ve hücre etiketleme, hedefleme gibi hücre tedavide, hücre popülasyonlarının saflaştırılması ve ayrılmasında araç olarak, doku onarımı, ilaç salımı, manyetik rezonans görüntüleme (MR), hipertermi, magnetofeksiyon gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Gupta ve Gupta, 2005; Hasany vd., 2012).

Toksikolojik testlerde ekolojik bir şekilde güncel ve anlamlı sonuçlar elde etmek için sadece uygun test tipinin değil aynı zamanda uygun test organizmasının da seçilmesi gerekmektedir (Randy, 1995). Biyodeneş veya toksisite çalışmalarında kullanılacak organizmalar araştırmayı etkileyen faktörlerin başında gelmektedir. Çoğu kimyasal madde doğrudan ya da dolaylı olarak tatlısu veya deniz ekosistemlerine ulaşmaktadır. Tüm

muhtemel toksik etkileri olan kimyasallar veya parçacıkların her iki ekosistemdeki organizmalar üzerindeki etkilerinin toksikolojik değerlendirmeleri insanlar için önemlidir. Ekotoksikoloji çalışmalarında özellikle tatlısu zooplanktonik organizmalarından olan *D. magna* 'nın kullanımı standart olarak kullanılabilir bir çok kaynakla tanımlanmıştır (ISO 6341, 1996; USEPA, 2001; OECD, 2004).

D. magna gibi birincil tüketici olan organizmalarda biriken NP'lerin, bir üst besin zinciri olan balıklar veya kabuklularda beslenimsel (trofik) transfer potansiyeli ile kolayca geçişi olabilir. Bunun sonucunda ise besin zincirinde ekolojik dengesizliğe neden olabilir. Bu canlıların kullanımı ile farklı bir çok NP'lerin toksisite potansiyellerinin değerlendirildiği çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Fan vd., 2012; Blinova vd., 2013; Jared vd., 2014; Balusamy vd., 2015; Suman vd., 2015).



BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal ve Nanomalzemeler

Araştırmada kullandığımız, Sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), EDTA ($(HO_2CCH_2)_2NCH_2CH_2N(CH_2CO_2H)_2$), HEPES, fosfat ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), sodyum hidroksit ($NaOH$), TBA ($C_4H_4N_2O_2S$), TCA (Cl_3CCOOH), BHT ($[(CH_3)_3C]_2C_6H_2(CH_3)OH$), potasyum fosfat monobasic (KH_2PO_4), potasyum hidroksit (KOH), glutatyon redüktaz, DTNB ($[-SC_6H_3(NO_2)CO_2H]_2$), NADPH ($C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_4$), Bradford solüsyonu kimyasal malzemeleri Sigma-Aldrich firmasından ve metal bazlı NP'ler ise; α - Fe_2O_3 (20-40 nm), γ - Fe_2O_3 (20-40 nm), SkySpring ürünlerini ülkemizde satan ticari firmalardan temin edilmiştir. Analitik reaktif sınıfından olan tüm kimyasallar herhangi bir arındırma veya saflaştırılma yapılmadan kullanılmıştır.

3.1.1. Metal Nanopartikül Süspansiyonlarının Hazırlanması

α - Fe_2O_3 (20-40 nm), γ - Fe_2O_3 (20-40 nm) NP'lere ait stok süspansiyonları %10'luk (m/v) olacak şekilde tüm NP'ler ultra saf su (18,0 M Ω) içinde çözündürülerek hazırlanmıştır (Şekil 3.1). Bu çözeltiler, 10 saniye vortekslendikten sonra, maksimum NP dağılımını elde etmek için yaklaşık 15-20 dakika boyunca bir ultrasonik banyoda sonifikasyona tabi tutulmuştur. Stok süspansiyonundan, her bir deney grubunun konsantrasyon oranına göre otomatik pipet yardımıyla uygun hacimler alınarak, hemen deney üniteleri içine transfer edilmiş ve deney organizmaları NP'lere maruz bırakılmıştır. Tüm temin edilen nanoboyuttaki malzemelerin gerekli karakterizasyon analizleri yapılmıştır. Metal bazlı NP'ler için elde edilen tüm değerler üretici firmanın beyan ettiği değerler ile karşılaştırılmıştır. Şekil ve boyut olarak veriler doğrulandıktan sonra biyodeneysel çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Biyodenedeyde kullanılan α -Fe₂O₃ (20-40 nm), γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerin stok solüsyonları (Orijinal)

3.2. Biyodenedey Organizması

Biyodenedey için seçilen organizmalar tatlısu ortamında yaşayan birincil tüketici türlerinden kullanılmıştır. Nanotoksosite deneyi için birincil tüketici olarak zooplankton türlerinden *D. magna* kullanılmıştır. Deneysel araştırmalarda bu organizmaların kullanılmasının asıl amacı; laboratuvar koşullarına olan uygunluğu, kontrolünün kolaylığı, elde edilen verilerin güvenilirliği, ekonomik olarak temin edilebilmesi ve kolaylıkla üretilmesidir. Birincil tüketici organizmalar olarak kullanılan zooplanktonik organizmalar ise yurt içinden temin edilmiştir. *Daphnia magna* Akdeniz Su Ürünleri Araştırma, Üretme ve Eğitim Enstitüsü (Antalya) ve ticari bir firmadan temin edilmiştir.

Tatlısuda yaşayan ve su yüzeyinde pire gibi zıplayan bu zooplanktonik organizma yavru balıkların beslenmesinde kullanılan önemli bir canlı yem özelliğindedir. Bu organizma bulunduğu ortamdaki suyu süzerek fitoplanktonik organizmalar ile beslenir. Laboratuvarlarda yapılan toksikolojik veya biyodenedeysel çalışmalarda tatlısu deney organizması olarak kullanılmaktadır. Üretimi son derece basit ve masrafsızdır. Günde yüz kat çoğalabilme özellikleri vardır. Bu da laboratuvar ortamında yapılacak çalışmalar için bulunmaz bir fırsattır. Kültürü temin edilen *D. magna* laboratuvar ortamında akvaryumlarda çoğaltılmıştır. Zooplanktonik organizmaların özelliklerini ve kültürlerin çoğaltılması için izlenen yöntemler aşağıda açıklanmıştır.

3.2.1. *Daphnia magna*

D. magna, birincil tüketici olarak bilinen ve beslenmelerini ise ortamında bulunduğu suyu süzerek yapan bir zooplanktonik organizmadır. Akuatik zooplankton organizmalar arasında önemli bir yere sahip olan ve su piresi olarak bilinen *D. magna* bir tatlısu kabuklusu (Crustacea)'dur. Ekotoksosite deneylerinde kullanılan en hassas organizmalardan biridir ve Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü'nün (OECD) standart protokolleri için kullanılan standart bir test organizmasıdır. *D. magna*'nın akuatik toksisite testlerinde sıkça kullanılmasının sebepleri; laboratuvarda kolayca ve ekonomik şekilde kültürünün yapılması, küçük yapıda, kısa ömürlü ve yüksek doğurganlık kapasitesi ile partenogenetik üreme yapabilmesi, kirliliğe karşı duyarlı bir yapıya sahip olması ve tatlısu akuatik ekosistemlerinin besin zincirinin en alt basamağında olmasıdır. Bu nedenle *D. magna* popülasyonlarındaki nitelik veya miktar bakımından herhangi bir değişiklik diğer sucul organizmaların popülasyonlarında da değişikliklere neden olabilmektedir. Eklem bacaklılar şubesine ait bu organizmanın boyutları 0,2-5 mm arasında değişir (Şekil 3.2). Uygun sıcaklıktaki (15-22°C) su birikintilerinde, nehir kenarlarında, her türlü tatlısu ve göllerde, bataklıklarda yaşarlar. Bahar aylarında partenogenez olayı ile ürerler ve bu üreme, yaz sonuna kadar devam eder (Santojanni vd., 1995). Nanotoksosite deneyi için birincil tüketici olarak zooplankton türlerinden *D. magna* kullanılmıştır. Deneysel araştırmalarda bu organizmaların kullanılmasının asıl amacı; laboratuvar koşullarına olan uygunluğu, kontrolünün kolaylığı, elde edilen verilerin güvenilirliği, ekonomik olarak temin edilebilmesi ve kolaylıkla üretilmesidir.



(a)

(b)

Şekil 3.2. a) *D. magna* organizma stok kültürü b) Akvaryumda çoğaltılan organizmalar (orijinal)

3.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Partiküllerin karakteristik özellikleri, yapısına ve kullanıldığı sürece göre değişkenlik göstermektedir. Nanoyapıdaki partiküller, yığın (makro) halinde gösterdikleri özelliklerden çok farklı etkin özellikler gösterebilmektedirler. Özellikle 100 nm'den küçük boyuttaki partiküller toksikolojik temelli biyodeneş çalışmaları yapılırken, partiküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin iyi belirlenip çalışmanın amacına uygun olup olmadığı belirtilmelidir. Nanoboyuttaki malzemeler ile yapılan araştırmalarda veya nanotoksikolojik çalışmalarda özellikle nanomalzeme karakterizasyonu yapılmalıdır. Bu doğrultuda karakterizasyon için sıklıkla kullanılan analiz yöntemlerinin başında; 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 analizleri gelmektedir. Bu araştırmamızda çalışma takvimine uygun olarak, nanotoksikolojik etkilerini araştırdığımız α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lerinin karakterizasyon analizleri, aşağıda belirtilen yöntemler kullanılarak yapılmıştır.

3.3.1. Transmisyon Elektron Mikroskobu Analizi

Transmisyon (Geçirimli) Elektron Mikroskobu (TEM), görüntüleme ve kırınım tekniklerini birlikte kullanarak malzemelerin mikro yapısal incelemesini ve kristal yapılarının belirlenmesini birlikte sağlayabilen çok özel bir malzeme karakterizasyon cihazıdır. Bir başka deyişle, nanometre mertebesinde çok küçük ve ince alanlardan, milyon katı büyütmelede malzemenin kristalografik ve morfolojik bilgilerine aynı anda ulaşılmasını olanaklı kılan bir tekniktir. Bu çalışma deneyinde kullanılan α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lerinin kuantum noktacıklarının parçacık boyut ve şekilleri TEM ile 40-100 kV hızlanan gerilim altında 50-106 kat büyütme ile 0,2 nm çözünürlük sağlayan JOEL-1011 TEM enstrümanı kullanılarak karakterize edilmiştir (Cuhe vd., 2009). TEM ölçümleri için, NP'lerin koloidal çözeltisinin bir damlası (8-10 μ L) 50 A° kalınlığında karbon-kaplanmış bakır ızgaralar (grid) üzerine damlatılmıştır ve TEM görüntüsünü kaydetmek için 24 saat kurumaya bırakılmıştır. Ortalama parçacık çapı ve boyut dağılımı Image J yazılım programı kullanılarak tespit edilmiştir. Her bir NP için rastgele alanlardan alınan 3 mikroskop görüntüsünden ölçülen yaklaşık 100 adet parçacığın çapları incelenerek parçacıkların ortalama boyutları ile topaklanma (kümeleşme) yapıp yapmadıkları tespit edilmiştir.

3.3.2. Dinamik Işık Saçılımı Analizi

Dinamik Işık Saçılımı (DLS), seyreltik çözelti içerisindeki NP'lerden saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Saçılan ışığın şiddetindeki değişim, parçacığın hareketine, büyüklüğüne, ortamın viskozitesine, sıcaklığa ve tuzluluk gibi faktörlere bağlıdır. Akuatik ortamdaki NP'lerin karakteristik özellikleri açısından DLS analizlerinin yapılması önemlidir. Bu açıdan her bir NP'nin sulu ortamdaki (solüsyon/medium) gerçek boyut dağılımı DLS ölçümleri (Malvern Zetasizer Nano ZS Instrument) ile belirlenmiştir. Metal NP'lerin gerçek boyut dağılımları, deiyonize su içinde stok süspansiyonlarında incelenmiştir. Konsantrasyonun çok yüksek olması durumunda, seyreltilip cihazın saniyede sayım elde edebileceği düşük konsantrasyonlara (<10 ppm) ayarlanmıştır. Her bir süspansiyonun bir kısmı, görünür kümelerin parçalanması (eğer varsa) için birkaç dakika sonike edilmiştir ve daha sonra DLS ölçümleri için 1,5 mL'lik temiz kare küvete konulmuştur (Brar ve Verma, 2011). Her bir NP çözeltisi için ortamdan beş DLS ölçümü arka arkaya alınmıştır ve ortalama boyut; ölçülen yoğunluk, hacim ve sayı dağılımlarından enstrüman yazılımı ile elde edilmiştir.

3.3.3. Zeta Potansiyeli Analizi

Zeta potansiyeli, nanoparçacıklar (tane) arasındaki itme veya çekme değeridir. Zeta potansiyel ölçümü dağılma mekanizmaları ile ilgili ayrıntılı bilgi verir ve elektrostatik dağılma kontrolünün anahtarıdır. Belli bir yükteki parçacık, süspansiyon içerisindeki karşı yükteki iyonları çeker, bunun sonucunda yüklü parçacık yüzeyinde güçlü bir bağ yüzeyi oluşur ve daha sonra da yüklü parçacığın yüzeyinden dışa doğru yayılmış bir yüzey oluşur. Yayılmış bu yüzey içerisinde "kayma yüzeyi" diye adlandırılan bir sınır bulunur. Yüklü parçacık ve onun etrafında bulunan iyonların kayma yüzeyi sınırına kadar olan kısım tek bir parça olarak hareket eder. Bu kayma yüzeyindeki potansiyel zeta potansiyeli olarak isimlendirilir ve hem parçacığın yüzey yapısından hem de içinde bulunduğu sıvının içeriğinden etkilenir. Parçacıkların polar sıvılar içerisindeki davranışlarını yüzeylerindeki elektrik yükü ile değil, zeta potansiyeli değerleri belirler (Choi vd., 2011). Zeta potansiyeli için standart analiz yöntemi esas alınarak DLS analizleri için hazırlanan aynı solüsyonlardan (çözelti) analizler yapılmıştır. Zeta potansiyeli ölçümleri için çözüldüden 1 mL örnek alınarak, temiz elektrotlu Zeta potansiyel küvetine konularak zetasizer (Malvern Nano ZS) cihazında analizler yapılmıştır.

3.3.4. X-Işını Kırınım Spektroskopisi Analizi

X-Işını Kırınım spektroskopisi veya X-Işını Difraksiyon (XRD) spektroskopisi olarak bilinen, isminden anlaşılacağı üzere X-ışını denilen Ultraviyole ışıktan daha kuvvetli fakat Gama ışınından daha zayıf enerjili ışın kullanılarak yapılan analizi temel almaktadır. Bu yöntem, her bir kristal fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak, X-ışınlarını karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanır. Bu araştırma için gerektiğinde kullanılıncaya kadar katı (toz) formdaki NP numuneleri, bir desikatör içinde ve karanlık bir ortamda saklanmıştır. NP'lerin kristal yapıları, X-ışını toz difraksiyonu ile (D8 Geliştirilmiş X-ışını difraktometresi, Bruker, Almanya) karakterize edilmiş ve Seramik X-ışını tüpü ile 1,54 Å dalga boyunda üretilen 2,2 kW bakır anodu radyasyonu ile taranmıştır (Sapsford vd., 2011). Her bir NP'den yaklaşık 250 mg 10-100 aralığında tarama için numune tutucu üzerine ayrı ayrı konulmuştur. Kristal oluşumu difraksiyon deseninden belirlenmiş ve kristalit boyutu Scherrer formülü ile hesaplanmıştır.

3.3.5. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), çok küçük bir alana odaklanan yüksek enerjili elektronlarla parçacık yüzeyinin taranması prensibiyle çalışmaktadır. SEM yüksek çözünürlüklü resim oluşturmak için vakum ortamında oluşturulan ve aynı ortamda elektromagnetik lenslerle inceltelen elektron demeti ile incelenecek malzemeyi analiz etme imkanı sağlar. SEM analizinde görüntü alınması, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla yüzey görüntüsü elde edilir (Bernier vd., 2012). Metal ve metal oksit NP'leri ile laboratuvar ortamında sentezlediğimiz kuantum noktacıkların morfolojisi 25 kV'de KYKY-EM3200 enstrümanı ile taramalı elektron mikroskobunda (SEM) belirtilen prosedüre bağlı olarak standart analiz yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Numune üzerinde oluşturulan elektron demetinin saçtığı karakteristik X ışınları ile elementlerin çizgisel dağılımı izlenmiştir.

3.3.6. Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi Analizi

Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi incelenmek istenen örnek makro moleküllerin fonksiyonel gruplarının titreşimlerinden kaynaklanan yapısal, kompozisyonel

ve fonksiyonel bilgilerinin elde edilmesini sağlayan bir tekniktir. Bu çalışmada kullanılan α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lerin katı (toz) formlardaki örnekleri FT-IR analizleri için standart yöntemle hazırlanmıştır. FT-IR spektrumu, bir Nicolet Nexus 6700 FT-IR spektrometresi (Thermo Scientific Instruments, Madison, WI) kullanılarak 4000–400 cm⁻¹ aralığında kaydedilmiş ve örnekler, potasyum bromür (KBr) peletleri içinde hazırlanmıştır. Spektrumlar 4 cm⁻¹ çözünürlükte 32 taramalı tek ışın modunda toplanmıştır. Enstrüman detektörü döterlenmiş triglisin sülfat (DTGS) üzerine, kızılötesi dedektör materyali ve Işın Splitter de KBr üzerinde kurulmuştur. Detektörün sinyalini amplifiye etmek için kullanılan kazanç parametresi Autogain moduna ayarlanmıştır. Aynanın hızı 0,6329 olarak ve diyafram değeri 60 KBr (150 mg) olarak belirlenmiştir. Örnekler (2-4 mg), bir havan tokmağı kullanılarak bir havan içinde birlikte öğütülmüş ve iyi bir saydımlığa sahip peletler hazırlanmıştır. İlk olarak, background spektrumu kaydedilmiştir ve ardından örneklerin spektrumları aynı koşullarda elde edilmiştir. Background otomatik olarak numune spektrumundan çıkarılmıştır ve nihai spektrumlar, transmisyon modunda kaydedilmiştir. Spektrumların yönetimi enstrümanın yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.4. UV-Vis Absorbans Değerlerinin İstatistiksel Olarak Belirlenmesi

Ultraviyole-görünür (UV-Vis) spektroskopi genellikle çözeltilerdeki moleküller veya inorganik iyon ve komplekslerin ölçümünde kullanılır. Normalde UV taraması 200-400 nm dalga boyu aralığına denk gelirken görünür ışık taraması 400-800 nm aralığına karşılık gelir. Metal bazlı NP'ler büyüklüğe, biçime, yoğunluğa, kümeleşme durumuna ve yüzeyine yakın kırılma indeksine karşı hassas optik özelliklere sahiptir. Bu sebepten dolayı UV-Vis spektroskopisi ile NP'lerin teşhis edilmesi, karakterize edilmesi ve incelenmesi oldukça önemlidir. NP'lerin UV-görünür spektrası UV-Vis spektrofotometre (Optima, SP-3000 Nano) kullanarak absorpsiyon modunda 300-800 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Denemelerde; α -Fe₂O₃ (20-40 nm), γ -Fe₂O₃ (20-40 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.

3.5. Toksikite Biyodeneği Düzenegi

Bu çalışmanın toksisite immobilizasyon testleri, ticari olarak elde ettiğimiz her bir NP için Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı [OECD 202 (zooplankton)] test yönergelerine (OECD 2004) göre gerçekleştirilmektedir. Kontrol grubu da, aynı deneysel

koşullarda hedeflenen NP'lerin yokluğunda hazırlanmıştır. Toksikite deneylerinde metal ve metal oksit NP konsantrasyonlarının önemli olduğu bilinmektedir. Tez önerisinde de belirtildiği gibi çalışmada özellikle çevresel oranda olacak şekilde düşük NP konsantrasyonları ayarlanmıştır. Bu kapsamda bütün deneysel konsantrasyonlar maruziyet ortamına hazırlanan bu stoklardan verilmiştir. Organizmaların maruz bırakılmış oldukları deneysel konsantrasyonlar, mümkün olduğu kadar geniş kapsamlı olarak yapılmaya özen gösterilmiş olan literatür taramasında elde edilen verilere dikkat edilerek belirlenmiştir (OECD, 2014). *D. magna* için tipik bir maruziyet tertibi aşağıda gösterilmektedir (Çizelge 3.1). Deney düzeneğinde görüldüğü gibi kontrol ve tüm gruplar 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Alfa ve gama demir oksit 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>D. magna</i> ***	100	100	100	100	100	100	100
Tekerrür	3	3	3	3	3	3	3

*Metal ve metal oksit nanopartikül konsantrasyonunun mg/L oranını göstermektedir.

*** Her bir grupta ortalama 200 mL hacim içerisinde 100 adet *D. magna* organizmaları konularak deney başlatılmıştır.

D. magna deney çalışmaları için ise cam beher kullanılmıştır (Şekil 3.3). Çizelge 3.1'de görüldüğü gibi kontrol ve tüm gruplar 3 tekrarlı olarak çalışma yürütülmüştür. 16:8 saat aydınlık: karanlık ışık rejimi ve 24±2°C'lık sıcaklık temin edilmiştir. Test ortamının oksijen (6,9 mg/L) ve pH (7,9-8,3) değerleri deneyin başında ve sonunda ölçülmüştür. Araştırma verilerinin elde edilmesinde fiziksel metotlar, analitik spektrometrik teknikler ve biyokimyasal testler kullanılmıştır. α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lere maruz bırakılan organizmalar üzerinde bu NP'lerin toksisite oranlarının belirlenmesi için ise her gruptaki ölüm oranları düzenli ve ayrı olarak maruziyet sürelerine göre kayıt edilmiş ve grafiklere dökülmüştür.



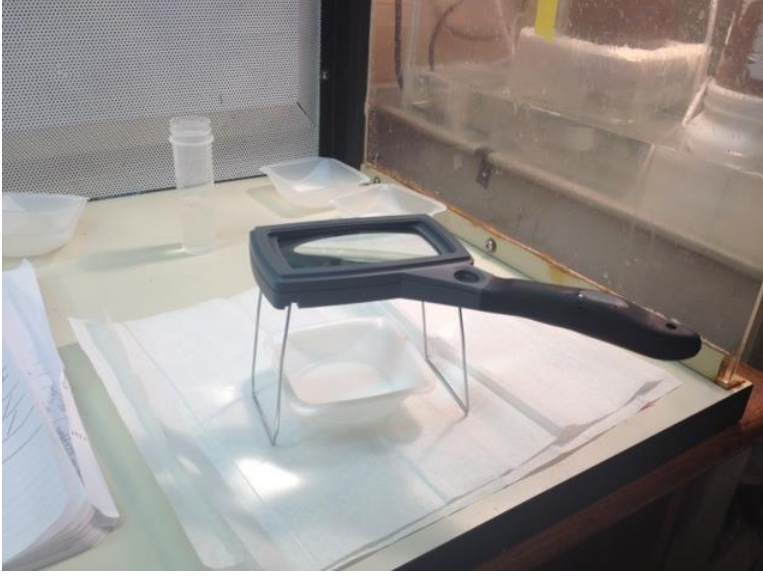
Şekil 3.3. *D. magna* biyodeneş düzeneği (orijinal)

3.5.1. Faz Kontrast Mikroskopik Analizi

Faz kontrast görüntüleri dijital kamera ile donatılmış faz kontrast mikroskobu (Micromaster, Model 12-575-252, Fisher Scientific) kullanılarak, maruziyet süreci sonunda incelenen *D. magna* organizmalarında metal birikmesini aydınlatmak için gri-ölçekte görüntüler alınmıştır. Görüntüler özel lam içindeki canlı organizmalardan Micron Görüntüleme yazılım programı ile (Micron Imaging software) elde edilmiştir.

3.5.2. Zooplankton Sayımı

D. magna sayısını mümkün olduğu kadar doğru saymak önemlidir. Bunun için zooplanktonik organizmalarda seyreltme yöntemi ile populasyon miktarı belirlenmiştir. *D. magna* örnekleri ise bir petri kabına konulmuş ve sayılmıştır (Zhu vd., 2010). Zooplankterlerin sayısı bu hacimde görsel olarak belirlenmiştir. *D. magna* bireylerinin büyüteç altında sayılması Şekil 3.4'te verilmiştir. Deney için gerekli zooplankton ayarlandıktan sonra yukarıdaki Çizelge 3.1'de belirtilen konsantrasyon oranlarında organizmalar maruz bırakılmıştır.



Şekil 3.4. *Daphnia magna*'nın büyüteç altında sayılması

3.6. Kimyasal Analizler

Deney organizmalarında muhtemel NP birikim ve atılım tespiti için, deney süresinin belirli zaman dilimlerinde ve deneyin sonunda [24. saat; 48. saat; 72. saat ve atılım (ilave 24 saat)] organizmadan numuneler alınarak kimyasal analizler yapılmıştır. Organizmalarda NP'lere bağlı olarak birikim ve atılım oranının belirlenmesi ancak ICP-MS (Endüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi) cihazında metal analizi yapılmasıyla tespit edilir. Çünkü ICP-MS, katı ve sıvı örneklerde çok sayıda elementin hızlı, ucuz, hassas ve doğru biçimde, niteliksel, niceliksel ya da yarı-niceliksel olarak ölçülmesine olanak sağlayan ileri teknoloji ürünü bir analiz tekniğidir.

Bu kapsamda *D. magna*'da birikim ve atılım oranlarının belirlenmesi için uygulanan analiz öncesi örneklerin hazırlanma prosedürü kısaca şu şekildedir; vakum pompasına bağlı bir filtre düzeneğinde kullanılan 0,47 mm Whatman filtre kâğıdından örnekler süzülerek bir kaç sefer saf su ile yıkanarak filtre edilmiştir. Filtre edilen yaş örnekler hassas terazide tartılıp ve bir spatula yardımı ile numaralandırılmış (kodlanmış) 2 mL'lik ependorf tüplere aktarılmıştır; Digest (çözdürme) analizlerin yapılma zamanına kadar ependorf tüplerdeki örnekler minimum 4 °C olacak şekilde soğuk bir dolapta bekletilmiştir. 0,5 mL (yaklaşık 500 µL) saf nitrik asit (HNO₃) otomatik pipet yardımı ile örneklerin olduğu ependorf tüplere aktarılmış ve örnekler asitle hafif bir şekilde karıştırıldıktan sonra bekletmeden çözdürmek için ısıya dayanıklı teflon tüplere aktarılmıştır. Teflon tüplerdeki asit oranı 2 mL'ye tamamlanmış ve daha sonra tüplerin ağızları dikkatlice kapatılıp

örnekler mikro dalga fırında çözdürülmüştür. Çözdürme işleminden sonra örnekler soğumaya bırakılmış ve çeker ocak altında çözülmüş örnekler 15'lik tüplere aktarılmıştır; Bunu takiben teflon tüpler 1-2 sefer daha ultra saf su (yaklaşık 4-5 mL) ile yıkanıp örneklerin konulduğu 15 mL'lik tüplere aktarılarak tüpler saf su ile 15 mL'ye tamamlanmıştır. Bu seyreltmeler sonucunda ortamdaki nitrik asit oranı %5'e düşürülmüş ve bu ortamdaki örneklerden ependorf tüplere 2 mL aktarılmıştır. Ayrıca tüm NP'lerin tamamen çözünmesi görsel olarak da kontrol edilmiştir (örnekte herhangi bir bulanıklık olmadan berrak çözelti elde edilmesi gibi). Seyreltme sonucunda ortamdaki nitrik asit oranı %5 olduktan sonra örneklerde ICP-MS cihazı ile metal analizi yapılmıştır.

Organizmalardaki birikim ve atılım metal analizleri için Mahmuzlu Camgöz Köpek Balığı (*Squalus acanthias*) kası (DORM-2) ile Amerikan İstakozu (*Humarus 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 satın alınmıştır. Sertifikalı değerler için ölçülen ilgili metallerin değerleri genellikle %90-115 arasında bulunmuştur. Ayrıca ICP-MS analizinde kullanılan stok metal standart çözeltileri ise (100 µg/mL) SCP Science (Champlain, NY, ABD) firmasından satın alınmıştır. ICP-MS ölçümleri için kalibrasyon standartları 0-100 µg/L aralığında olacak şekilde %5'lik HNO₃ içindeki her bir metal standart çözeltisinden hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerin (nihai asit oranı %5'lik HNO₃ olacak şekilde), metal içeriğinin belirlenmesi için, ICP-MS cihazı (Varian 820-MS, Avustralya) kullanılarak analizler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda, kullanılan asitin seyreltme oranı ile kullanılan yaş organ ağırlık oranları dikkate alınarak toplam metal içeriğinin hesaplanması, kuru ağırlık (µg/g) olarak ifade edilmiştir.

3.7. Demir Metal İyon Analizleri

α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ 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 artışı ise ortamda bulunan iyon salınımlarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca tüm nanomalzemelerin, akuatik ortamda çözünmeleri farklılık göstermektedir. Çalışmada kullandığımız α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lerin ortamda çözünmelerini ve iyon miktarlarını belirlemek için deney ortamından (NP'lere maruz bırakılan organizmaların bulunduğu ortamdan) su örneği alınarak ICP-MS cihazı ile iyon analizi yapılmıştır. Alınan su örneğinden herhangi bir partikül veya

organizma gelmemesi için bir mikro gözenekli plankton kepçe kullanılarak zooplankton organizmalarının bulunduğu ortamdan steril bir şırınga yardımıyla 2 mL örnek alınmış ve 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 (10 kat seyreltme yapıldı) ve ICP-MS cihazı ile metal analizleri yapılmıştır.

3.8. Biyokimyasal Analizler

D. magna organizmalarındaki oksidatif stres etkilerinin belirlenmesi için glutatyon (GSH) ve tiyobarbitürat reaktif maddeler (TBARS) analizleri yapılmıştır. Malondialdehit (MDA) ve TBARS analiz sonuçları aynı değerleri vermektedir. Çalışmamızda MDA sonuçlarının belirlenmesi için TBARS analiz yöntemi kullanılmıştır.

3.8.1. Glutatyon Analizi

Glutatyon (GSH), kendisini oksidize olmuş eski halinden geriye döndüren enzim olan Glutatyon redüktaz yapısal olarak aktif ve oksidatif stresle uyarılabilir olduğundan sadece indirgenmiş biçimiyle bulunur. Hücrelerdeki indirgenmiş glutatyonun oksidize glutatyon oranı bilimsel olarak hücrel toksisitenin bir ölçüsü gibi kullanılır (Oberdöster, 2004). Toplam glutatyon 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 [KH₂PO₄], 5 mM potasyum EDTA ve 2,0 M potasyum hidroksit (KOH) ile pH 7,5'e ayarlanır. Daha sonra ayrı kaplarda 2U/mL glutatyon redüktaz, 10 mM DTNB ve 3,63 mM NADPH -2mL buffer içerisinde hazırlanır. Bu kapsamda deneyin uygulanışı ise; GSH analizi Thermo Scientific marka mikropılaka okuyucuda 412 nm dalga boyunda yapılmıştır. Plakanın tüm kuyucuklarına ilk olarak 20 µL DNTB konulmuş, sonra ilk kuyucuklara 40'ar µL kör örnek (A1-3) ve standartlar (B,C,D,E,F,G,H 1-3) konulmuştur. Geriye kalan 78 kuyucuğa ise 26 zooplankton örneğinden (26x3) 40'ar µL eklenmiştir. Daha sonra tüm kuyucukların üzerine 20 µL glutatyon redüktaz ve 260 µL analiz bufferından ilave edilmiştir. Tüm kimyasallar dengelendikten sonra multipipetle (8 kanallı) 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 de yapılarak sonuçlar protein içerisindeki GSH olarak verilmiştir.

3.8.2. Tiyobarbitürik Asitle Tepkimeye Giren Maddelerin Analizi

Bu yöntem MDA içeriğini belirlemek amacıyla uygulanmaktadır. Tiyobarbitürik asitin (TBA) yönteminin prensibi, MDA ve TBA reaksiyona girerek kırmızı renkli pigment oluşturması esasına dayanmaktadır. TBARS testi kalibrasyon grafiği Şekil 3.5'te verilmiştir. Oluşan kırmızı-pembemsi renkteki pigment spektrofotometrede 532-535 nm'de ölçülmektedir. TBARS yöntemi ile sadece ikincil bir reaksiyon ürünü olan MDA ölçülmez çünkü aynı zamanda diğer gıda bileşenleride TBA ile reaksiyona girebilmektedir. TBA ile reaksiyona giren ama MDA olmayan bileşiklere TBARS denir (Fernandez vd., 1997). Deney ayıraçları aşağıda verilmiştir;

Ayıraç 1; Fosfat bufferı hazırlamak için 7,8005 g sodyum dihidrojen ortofosfat 400 ml saf su içerisinde çözdürülmüştür. 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.

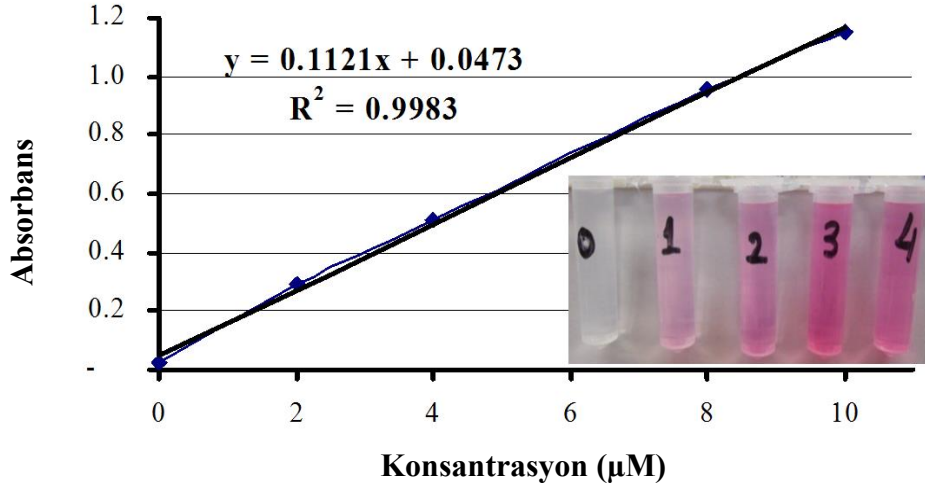
Ayıraç 2: 5 gr Trikloroasetik asit (TCA) katı çözeltisi üzeri 10 ml olacak kadar saf su ilave edilerek ayrı bir kaba alınmıştır.

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

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

Ayıraç 5: 2,2 gr Butil hidroksi toluen (BHT) 10 ml ethanol içerisinde çözdürülerek ayrı bir behere alınmıştır.

Deneyin Uygulanışı: TBARS analizi Thermo Scientific marka (96 kuyucuklu) plaka okuyucu kullanılarak yapılmıştır. Tüm çözeltiler hazırlandıktan sonra mikrolaka 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 hürelere koyulmuştur. Daha sonra 75 µL TBA ilave edildikten sonra mikrolakanın üzeri kapatılarak 60 °C'de 1 saat etüvde inkübe edilmiştir. Sonra mikrolaka okuyucusunda 530 nm dalga boyunda okunmuştur. Sonuçlar aynı dokulardan Bradford protein analizi de yapılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.5. TBARS testi kalibrasyon grafiği

3.9. İstatistiksel Analizler

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.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

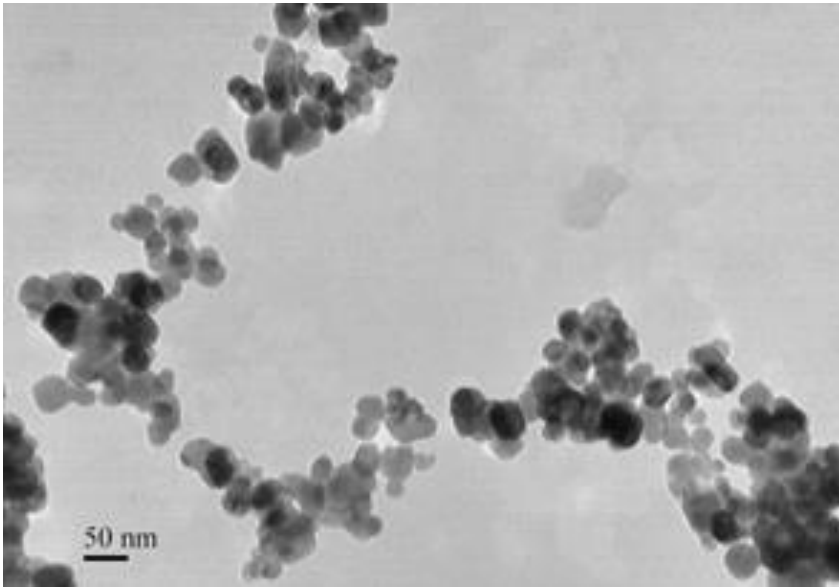
4.1. Araştırma Bulguları

4.1.1. Nanomalzemelerin Karakterizasyon Bulguları

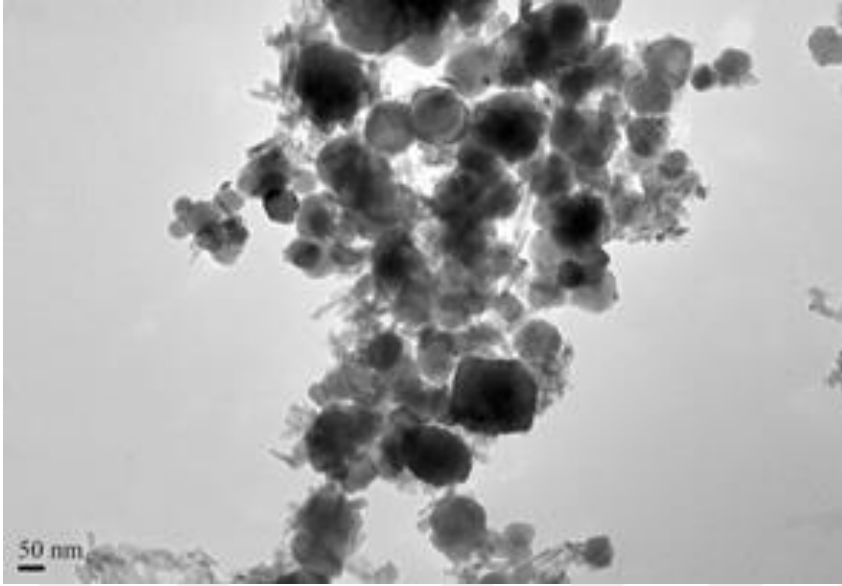
Nanotoksisite biyodeneý çalışmamızda kullandığımız α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lerinin karakterizasyonu için gerçekleştirilmiş olan TEM, DLS, Zeta Potansiyeli, XRD, SEM, FT-IR ve UV-görünüm spektroskopisi analiz sonuçları aşağıda değerlendirilmiştir.

4.1.1.1. Transmisyon Elektron Mikroskobu Analiz Bulguları

Her bir NP için rastgele alanlardan alınan 3 mikroskop görüntüsünden ölçülen yaklaşık 100 adet parçacığın çapları incelenerek parçacıkların ortalama boyutları ile topaklanma (kümeleşme) yapıp yapmadıkları tespit edilmiştir. α -Fe₂O₃ (40 nm) NP'nin TEM görüntüsü Şekil 4.1'de ve γ -Fe₂O₃ (40 nm) NP'nin TEM görüntüsü Şekil 4.2'de verilmiştir. Her metal grubu ayrı bir karakteristik özellik göstermesine rağmen metal ve metal oksit NP'lerin kolloidal (akuatik ortamda) yapıda agregat (kümeleşme) yapmaya meyilli olduğu bilinmektedir (Ateş vd. 2014). Bu çalışmada da benzer sonuçlar alınmıştır. Ayrıca metal ve metal oksit NP'lerin şekilsel yapısı incelendiğinde büyük çoğunluğun yuvarlak veya küresel bir yapı sergiledikleri görülmektedir. Tüm NP'lerde olmamakla birlikte nanorod olarak adlandırılan farklı ebatlarda çubuksu yapıların da olduğu görülmektedir.



Şekil 4.1. Biyodeneýde kullanılan α -Fe₂O₃ (40 nm) NP'nin TEM görüntüsü



Şekil 4.2. Biyodenedeyde kullanılan γ -Fe₂O₃ (40 nm) NP'nin TEM görüntüsü

4.1.1.2. Dinamik Işık Saçılımı Analiz Bulguları

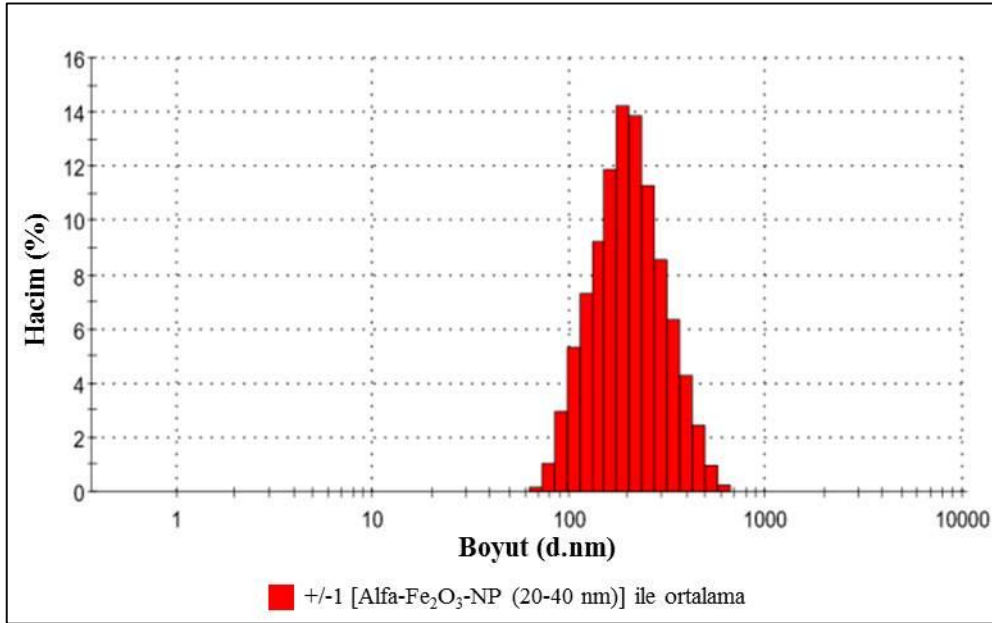
Dinamik Işık Saçıcısı (DLS), çoğunlukla NP'lerin bulunduğu koloidal çözelti ortamında boyutlandırılması ve süspansiyonlarda kümeleşmelerini belirlemek için kullanılır. DLS ile ölçülen çap değeri bir partikülün sıvı içerisinde nasıl hareket ettiğini gösterir. Buna hidrodinamik çap denir. Hidromatik çap (karakterize edilen parçacıklarla aynı hızda yayılan varsayımsal geçirgen olmayan bir kürenin çapı), saçılma yoğunluğu ölçümlerinin zamana bağlılığından ölçülebilir. Elde edilen çap değeri partikülle aynı difüzyon katsayısına sahip kürenin çapıdır. Bu difüzyon katsayısı sadece partikülün esas boyutuna bağlı değildir, aynı zamanda ortamdaki iyonların tipine ve konsantrasyonuna da bağlıdır. Hidrodinamik çap, TEM gibi diğer büyüklük ölçümleri için tamamlayıcı niteliktedir. Çünkü NP çözeltilerinin agregasyon (kümeleşme) durumları hakkında bilgi sağlar. Son derece kümeleşmiş çözelti TEM büyüklüğünden çok daha büyük hidrodinamik çaplara sahip olurken sabit, kümeleşmemiş koloidal çözeltiler TEM büyüklüğüne benzer veya biraz daha büyük hidrodinamik çaplara sahip olmaktadır.

Çalışmada kullandığımız α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'ler için elde edilmiş DLS sonuçları Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir. Ayrıca ortalama parçacık boyut değerleri ise Çizelge 4.1'de verilmiştir. DLS sonuçları incelendiğinde tüm NP'lerin gerçek boyutlarının birkaç veya 10-100 katı arasında büyüme olduğu görülmektedir. Bu da metal ve metal oksit NP'lerin genel karakteristik özellikleri olup sulu ortamda büyüme gösterdiği görülmektedir.

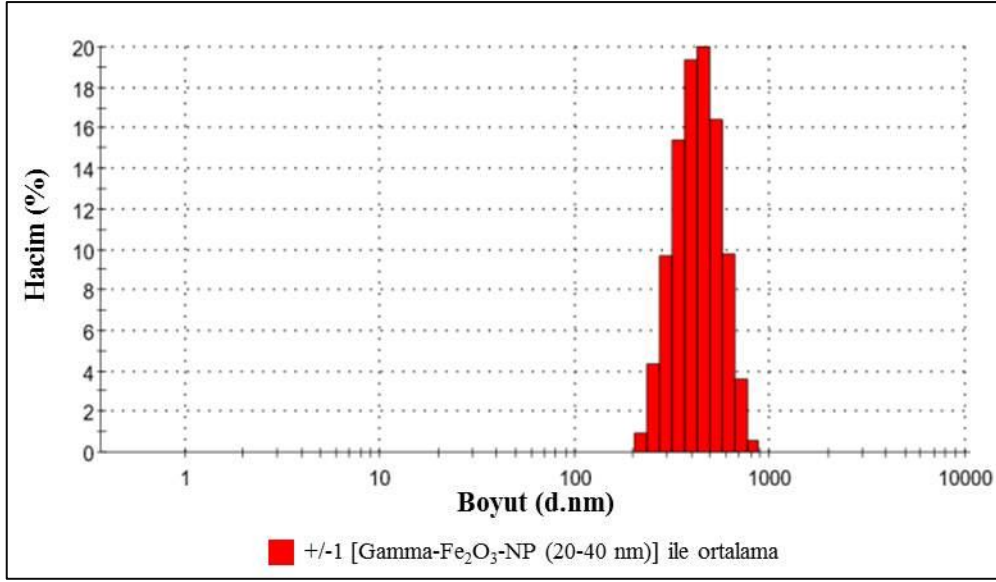
Çizelge 4.1. Sulu ortamdaki metal ve metal oksit parçacıkları ile laboratuvar ortamında sentezlenen nanomalzemelerin boyut dağılımı, PDI ve yüzey yükü değerleri

Nanopartiküller	DLS Boyut [Z-Average (d.nm)]	PDI*	Zeta Potansiyeli (mV)
α -Fe ₂ O ₃ NP'leri (20-40 nm)	196,5	0,141	+32,1
γ -Fe ₂ O ₃ NP'leri (20-40 nm)	501,5	0,329	+20,1

*: 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 4.3. α -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerinin dinamik ışık saçılımı analiz sonuçları

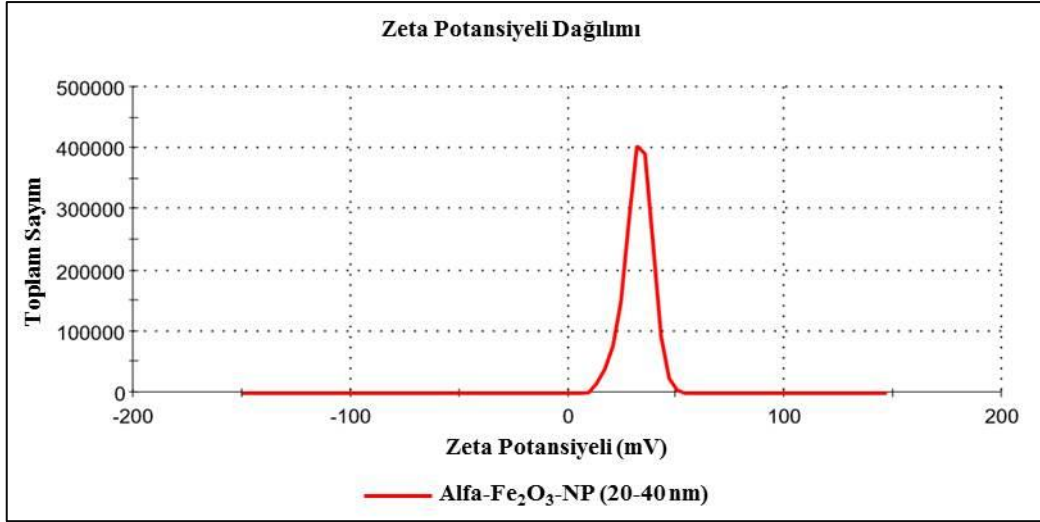


Şekil 4.4. γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerinin dinamik ışık saçılımı analiz sonuçları

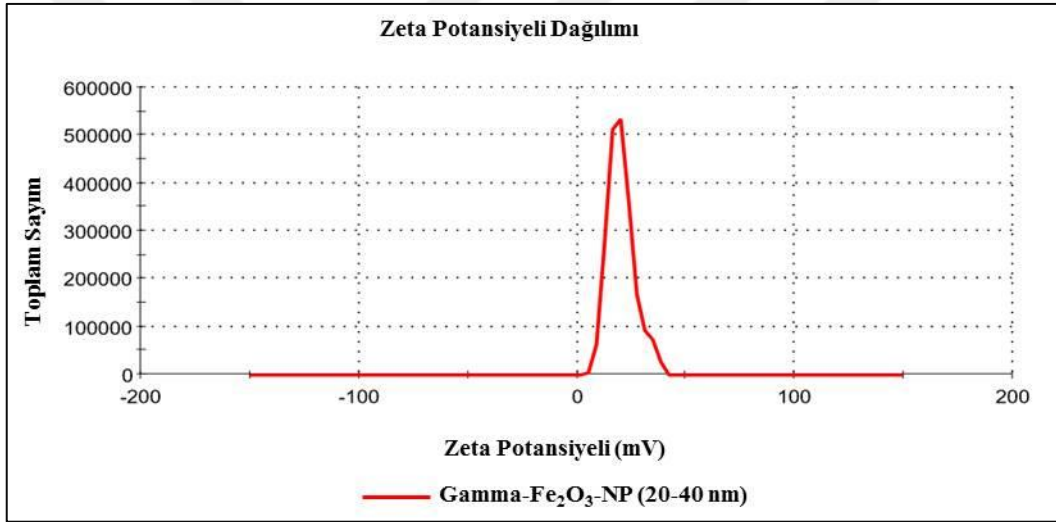
4.1.1.3. Zeta Potansiyeli Analiz Bulguları

Bu çalışmada α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'leri ve kuantum noktacıkların zeta potansiyeli analizi sonucunda elde edilen (+/-) yüzey yükü ve değerleri (mV) Çizelge 4.1'de, Zeta potansiyeli grafikleri ise Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir. Zeta potansiyeli sonuçları incelendiğinde NP'ler pozitif (+) yüzey yükü göstermektedir. Zeta potansiyeli, içinde bir parçacığın dağıldığı yığın sıvısı ve NP yüzeyi ile alakalı zıt yüklü iyonları içeren sıvı tabakası arasındaki potansiyel farkının bir ölçüsüdür. Zeta potansiyeli ölçümü, dağılma mekanizmaları ile ilgili ayrıntılı bilgi verir ve elektrostatik dağılma kontrolünün anahtarıdır. Pozitif bir zeta potansiyeline sahip parçacıklar negatif yüklü yüzeylere bağlanırlar veya bunun tersi durumunda da aynı durum olmaktadır.

Zeta potansiyelinin büyüklüğü parçacık kararlılığı hakkında bilgi sağlar. Daha yüksek büyüklükteki potansiyeller artan elektrostatik itme ve dolayısıyla artan kararlılığı göstermektedir. Örneğin 0-5 mV parçacıklar kümeleşme veya bir araya gelme eğilimi sergilerler, 5-20 mV parçacıklar minimal düzeyde kararlıdırlar, 20-40 mV parçacıklar orta düzeyde kararlıdırlar, 40+ mV'den büyükler ise parçacıklar son derece kararlıdırlar. Buna göre çalışmada kullandığımız α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ bazlı NP'ler 20,1 ile 32,1 mV özellik gösterdikleri için orta düzeyde kararlıdırlar. Bu NP'lerin Polidispersite indisi değeri ise 0,141 ve 0,329 olmuştur.



Şekil 4.5. α -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerinin zeta potansiyeli analiz sonuçları



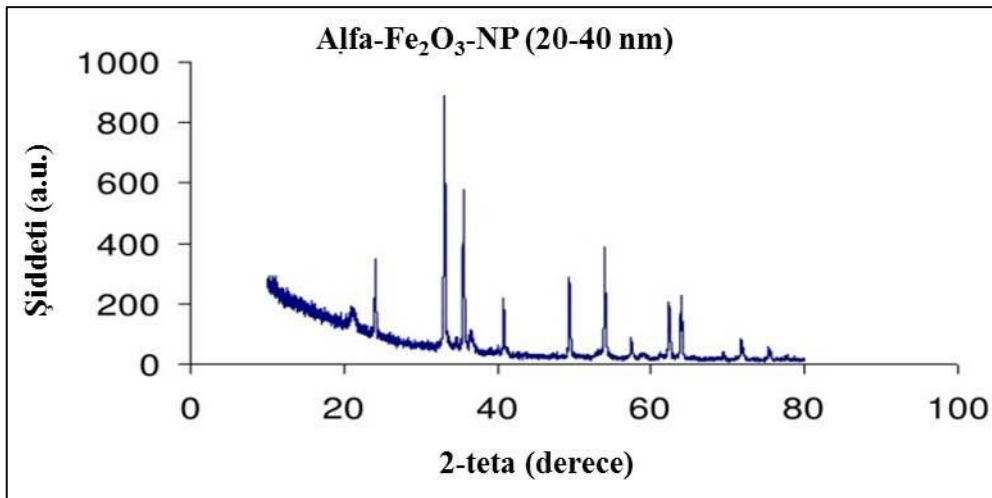
Şekil 4.6. γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerinin zeta potansiyeli analiz sonuçları

4.1.1.4. X-Işını Kırınım Analiz Bulguları

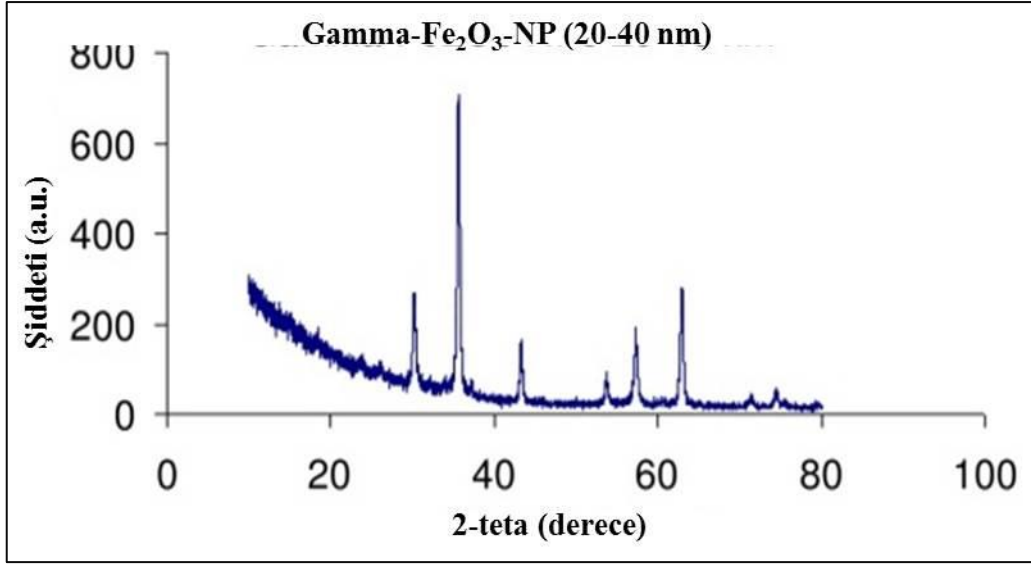
α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lerin XRD analizleri yapılmış ve sonuçları Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir. Buna göre bu NP'lerin XRD sonuçları incelendiğinde; XRD spektrumlarındaki spesifik tepe noktalarının sayısı, konumları ve keskin formu 20,6-38,8 nm aralığında kristalit boyutu ile belirgin ve saf demir nanooksitler olan α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃'i göstermektedir. Kırınımın keskin tepe noktaları, örneklerin yüksek kristalligini gösterir ve hesaplanan kristalit boyutları üretici verileri ile uyum içindedir.

α -Fe₂O₃ NP'nin (20-40 nm) XRD kırınım görüntüsü Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Bunun belirli on bir doruk noktası, raporlanan verilerle uyumlu olarak, 20-80° aralığındaki 2 θ 'nin şu değerleri gözlenmiştir: 24,18, 33,2, 35,7, 40,7, 49,5, 54,1, 57,6, 62,5, 64,1, 72,04

ve 75,6°. Ayrıca, bu doruk noktaların konumları, α -Fe₂O₃ fazının oluşumunu onaylayan, Toz Kırınım Standardı Birleşik Komitesinin (JCPDS) veri tabanının 33-0664 nolu Kart dosyasındakiyle uyşur (Nidhin vd., 2008; Long vd., 2015). Nanooksidin yüksek derecede kristallenmesi keskin doruk noktaları ile kanıtlanmıştır ve katışıksız doruk noktaları da gözlemlenmiştir (Sohoo vd., 2010). Kristalitlerin boyutu, 28,4 nm ortalama boyuta sahip, 20,6-38,6 nm aralığndaki 11 2 θ değeri için Scherrer formülü ile belirlenmiştir. α -Fe₂O₃ için, literatürde raporlananlarla uyumlu olarak, XRD kırınım görüntüsünde 2 θ için altı doruk noktası belirlenmiştir: 30,27, 35,6, 43,4, 53,7, 57,2, 62,9°, elde edilen doruk noktaları Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de verilmiştir (Guivar vd., 2014). Bu konumlar, γ -Fe₂O₃ için JCPDS’nin 39-1346 nolu kart dosyasında bulunan konumlarla uyşmuştur. Bütün doruk noktalarının keskin yönleri bileşimin yüksek kristallenme derecesini göstermiştir. 21,2-38,8 nm aralığında ve 29,1 ortalama boyutunda yukarıdaki doruk noktaları için hesaplanmış kristalitlerin boyutudur. Belirli doruk noktalarının sayısı, konumu ve XRD spektrumundaki keskin formu, 20,6-38,8 nm aralığında kristalit boyutuna sahip belirgin ve saf demir nanooksitler, α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃’i açığa çıkarmıştır. Demir nanooksitlerin SEM görüntüleri Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’da sunulmuştur. Demir nanooksit kristallerinde iyi homojenlik ve küresel şekil olduğu görülmüştür. Her iki bileşik kümeler oluştursa da, α -Fe₂O₃, γ -Fe₂O₃’e kıyasla daha fazla kümelenmiş görünür. NP boyutları, XRD analizi ile belirlenmiş olanlara yakındır (örn, α -Fe₂O₃ için 29,6 nm).



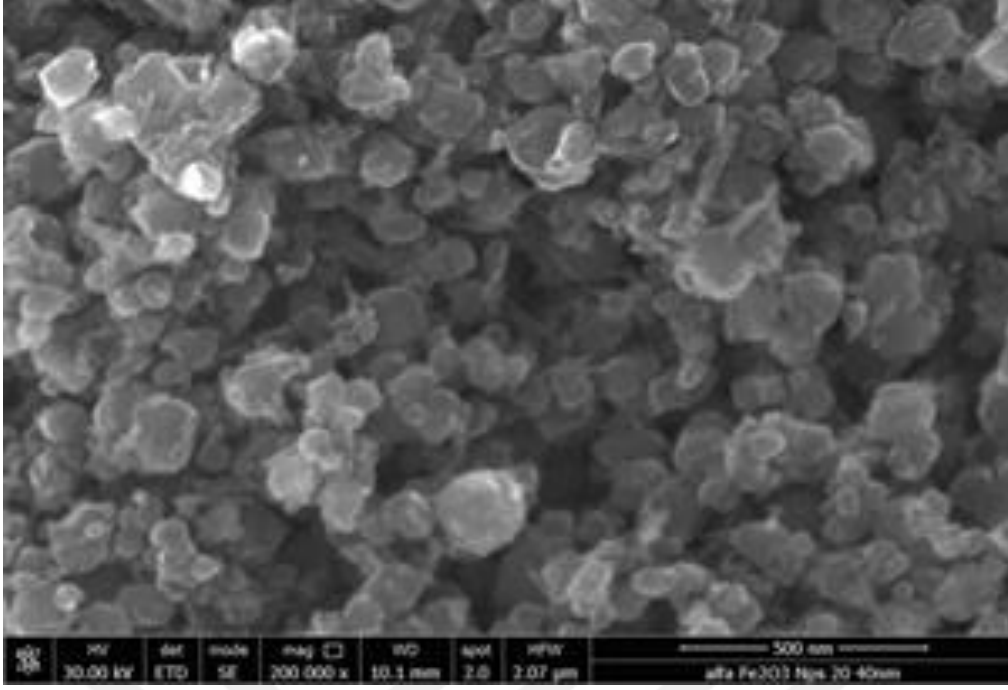
Şekil 4.7. α -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP’lerin XRD sonuçları



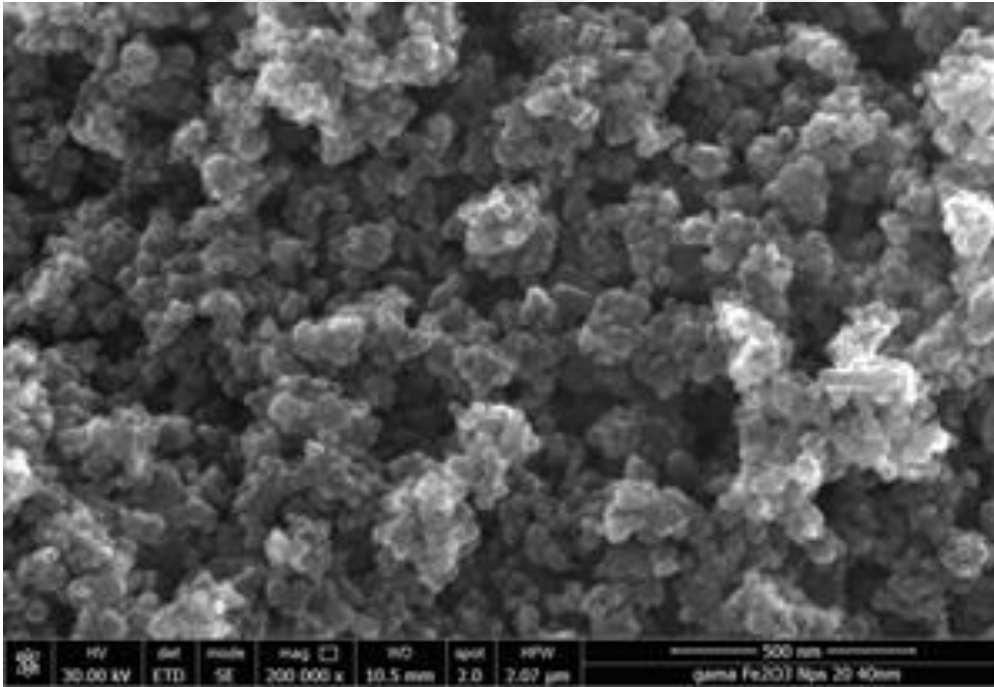
Şekil 4.8. γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerin XRD sonuçları

4.1.1.5. Taramalı Elektron Mikroskobu Analiz Bulguları

α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lerin morfolojisi 25 kV de KYKY-EM3200 enstrümanı ile taramalı elektron mikroskobunda (SEM) analiz edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. Buna göre bu NP'lerin SEM sonuçları incelendiğinde; Demir nanooksit kristallerinin homojenliği ve küresel şekilleri gözlenmiştir. Her iki bileşikte kümeler oluşmasına rağmen, α -Fe₂O₃ NP'lerin γ -Fe₂O₃ NP'lerine göre daha fazla kümelenme (agregat) yaptığı gözlenmiştir. NP'lerin boyları XRD analizi ile belirlenen değerlere yakındır, örneğin γ -Fe₂O₃ için 29,6 nm. XRD spektrumları içindeki spesifik doruk noktalarının sayısı, konumu ve keskin formu, 20,6-38,8 nm arasında kristal boyutuna sahip, belirgin ve saf demir nanooksitlerini (α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃) göstermiştir. Ayrıca, SEM analizleri ile de onların homojenlik ve kristaliniteleri kanıtlanmıştır.



Şekil 4.9. α -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerin SEM görüntü sonuçları



Şekil 4.10. γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerin SEM görüntü sonuçları

4.1.1.6. Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi Analiz Bulguları

FT-IR Spektroskopisi analizine ait sonuçların değerlendirilmesi α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ nanopartiküller için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Sonuçlar aşağıda verilmiştir.

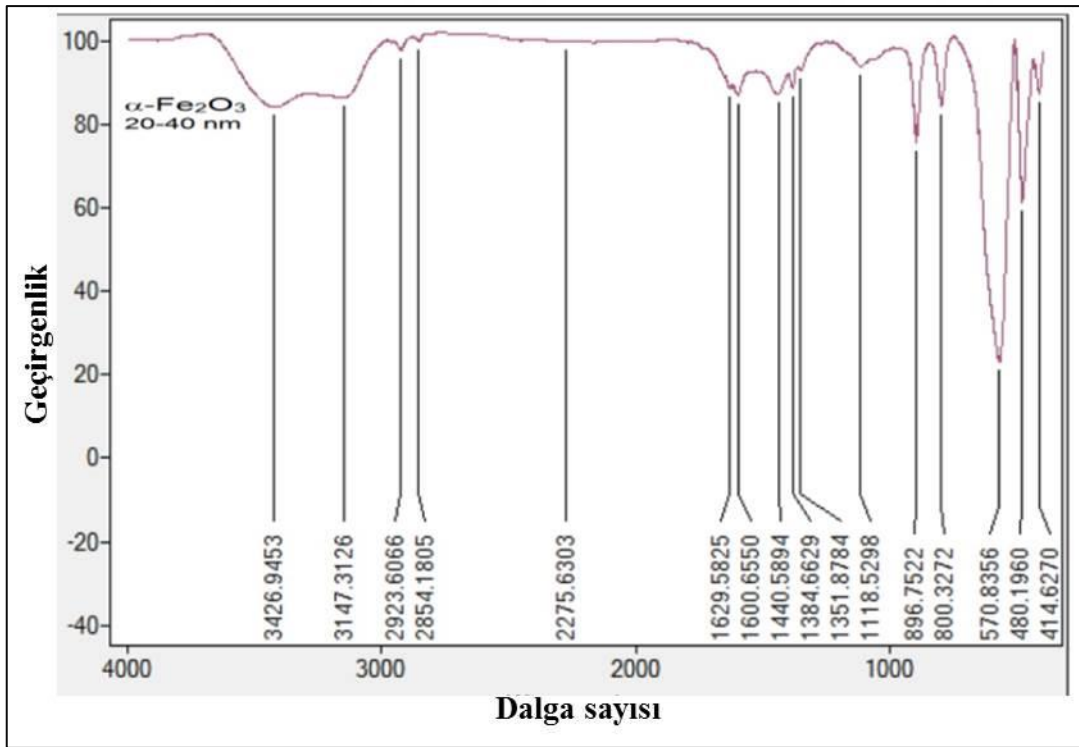
4.1.1.6.1. Demir Grubu Nanopartiküllerin FT-IR Bulguları

α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) arasındaki FT-IR spektrumları, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir ve 4000-400 cm⁻¹ bölgesi için karşılık gelen transmittans değerlerine sahip spesifik dalga boyları Çizelge 4.2'de sunulmuştur. Demir grubu NP'lerin FT-IR sonuçları incelendiğinde, α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ FT-IR spektrumlarındaki kaydedilen bantlar ve tepe noktaları atmosferden absorbe edilmiş su ve karbondioksit eser miktarlarına tahsis edilmiştir. Ayrıca ~750-400 cm⁻¹ bölgesindeki spesifik maksimumlar ile Fe-O bağları ile ilgili olan ve oksitlerin saflığını ve kristalleşmesini ortaya koyan keskin bant ve tepe noktaları gözlenmiştir. Bu da literatürde yayınlanan verilerle uyum içindedir. Her bir NP'nin FT-IR sonuçları ayrı ayrı incelendiğinde; her iki spektrum da, O-H'nin gerilme titreşiminden dolayı 3426,9 ve 3428,8 cm⁻¹ maksimumuna sahip kuşaklarda ve atmosferdeki absorbe suyun O-H eğilme titreşimine karşılık gelen 1629,5 cm⁻¹'de seyretmişlerdir (Li vd., 2012; Kazemzadeh ve Ataie, 2012). α -Fe₂O₃ için 896,7, 800,3 cm⁻¹'deki ve γ -Fe₂O₃ için 879,3, 817,6 cm⁻¹'deki iki doruk nokta O-H'nin düzlem dışı eğilmesi ile ilgilidir (Lopez vd., 2010). 2923,6 ve 2854,1 cm⁻¹'deki düşük doruk noktaları sırasıyla karbondioksit sebebiyledir. 1440,5 ve 1438,6 cm⁻¹ arasındaki soğurum kuşakları karbonattaki CO₂ ile ilgilidir ve diğeri her iki spektrum için CO₂'ye olan 1384,6 cm⁻¹'deki değer bikarbonattandır (Galhotra, 2010). Nanoboyutlu oksitlerin bölgede ~750-400 cm⁻¹ aralığında belirli kuşakları vardır. α -Fe₂O₃'ün durumunda, sırasıyla %23,2 ve %61,3 değerlerinde yüksek ve orta transmittansa sahip 570,8 ve 480,1 cm⁻¹'de iki keskin kuşak ve %87,3'lük 414,6 cm⁻¹ ayrı bir doruk gözlenmiştir. Bunlar, Fe-O bağına karşılık gelen raporlanmış verilerle uyum içindedir (Duhan ve Devi, 2012; Li vd., 2012). γ -Fe₂O₃ için, 694,2, 640,2, 562,1 cm⁻¹ maksimumuna ve sırasıyla %45,6, %31,1 ve %39,9 transmittansa ve %85,2 ve %70,3 transmittansa karşılık gelen 482,1, 422,3 cm⁻¹'lik iki zirveye sahip geniş ve keskin bir kuşak kaydedilmiştir. Bu kuşak ve doruklar γ -Fe₂O₃'ün Fe-O bağından kaynaklanmaktadır. Böylelikle yayınlanmış verilere uygun olarak, hem α -Fe₂O₃ hem de γ -Fe₂O₃'ün saflığını ve kristalliğini açığa vuran 750-400 cm⁻¹ bölgesinde belirli bir maksimuma sahip doruklar ve keskin kuşaklar kaydedilmiştir.

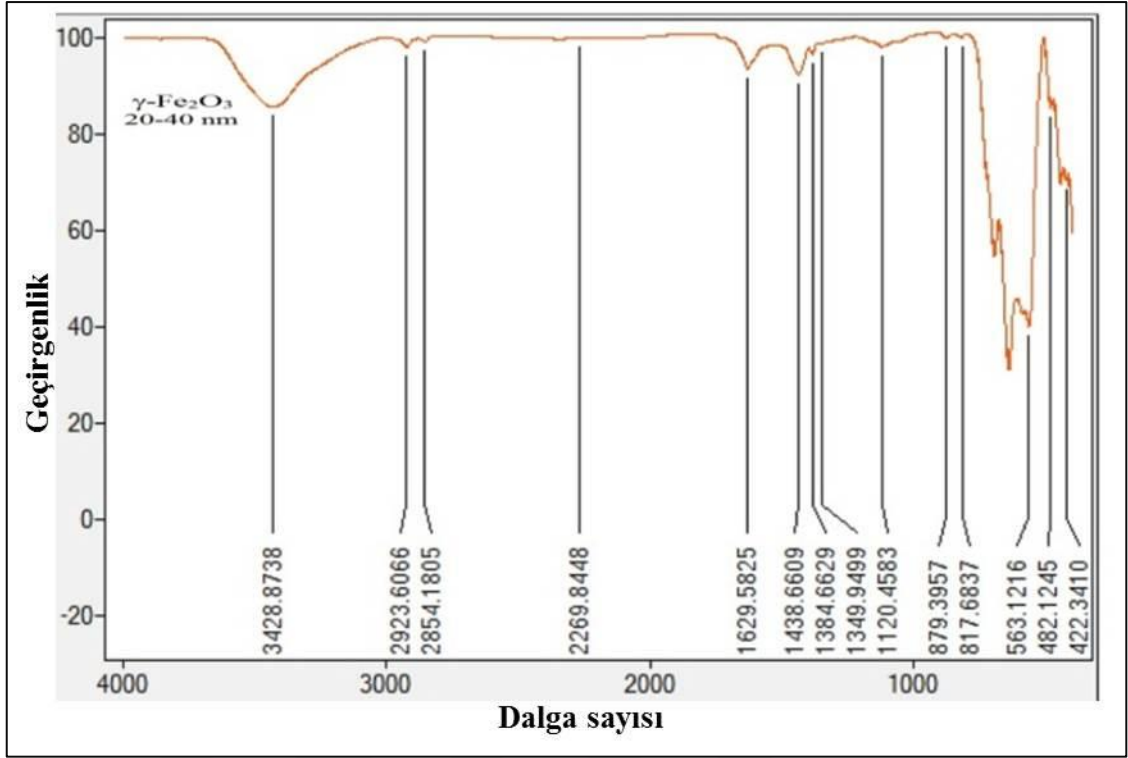
Çizelge 4.2. Demir grubu nanopartiküllerin spesifik dalga boyu ve FT-IR spektrumlarının geçirgenlik değerleri

No	α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm)		γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm)	
	D*(cm ⁻¹)	G*(%)	D*(cm ⁻¹)	G*(%)
1	3426.9	84.1	3428.8	85.6
2	3147.3	86.4	2923.6	98.2
3	2923.6	97.6	2854.1	99.2
4	2854.1	99.9	2269.8	99.4
5	275.6	99.9	1629.5	93.6
6	1629.5	88.4	1438.6	92.1
7	1600.6	87.0	1384.6	96.7
8	1440.5	86.8	1349.9	98.7
9	1384.6	88.7	1120.4	98.2
10	1351.8	93.1	879.3	99.8
11	1118.5	93.8	817.6	99.9
12	896.7	75.4	694.2	54.6
13	800.3	84.1	640.2	31.1
14	570.8	23.2	563.1	39.9
15	480.1	61.3	482.1	85.2
16	414.6	87.3	422.3	70.3

*D: Dalga boyu (cm⁻¹); *G: Geçirgenlik (%)



Şekil 4.11. α -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerin FT-IR sonuçları



Şekil 4.12. γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerin FT-IR sonuçları

4.1.1.7. Nanopartiküllerin UV-Vis Absorbans Değerlerini Gösteren İstatistiksel Deneysel Tasarım Bulguları

Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'e göre yapılan deney tasarımı sonucunda elde edilen verilerle, en küçük kareler yöntemi ile regresyon analizi yapılmıştır. Üç değişken üç seviyeli bu tasarımın sonucunda elde edilen polinomal denkleme göre eşitlik 4.1 ve eşitlik 4.2 kullanılarak cevap yüzey grafikleri elde edilmiştir.

$$y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (4.1)$$

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (4.2)$$

Çizelge 4.3. Absorbans ölçülmesinde kullanılan bağımsız değişkenlerin seviye ve aralıkları.

Değişkenler	Değişken kodları	Seviyeler		
		-1	0	+1
Nanopartikül dozu (mg/L)	X1	1	10	50
Etkileştirme süresi (Saat)	X2	24	36	48

Çizelge 4.4. İki bağımsız değişkenle BBD (Box Behnken Design) modeline göre oluşturulan deney tasarımı.

Deneme	X1: Dozu (mg/L)	X2: Süre (Saat)	α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm)	γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm)
1	10.00	48.00	0.099	0.14
2	10.00	24.00	0.0266	0.338
3	10.00	48.00	0.098	0.143
4	50.00	48.00	0.02	0.025
5	1.00	48.00	0.028	0
6	10.00	48.00	0.133	0.136
7	10.00	72.00	0.025	0.024
8	50.00	72.00	0	0
9	10.00	48.00	0.131	0.138
10	1.00	24.00	0.069	0.013
11	50.00	24.00	0.067	0.168
12	10.00	48.00	0.11525	0.13875
13	1.00	72.00	0.006	0

İkinci dereceden polinomal eşitlik esas alınarak absorbands değerlerinin farkının bulunmasında; NP konsantrasyonu (ppm) ve etkileştirme süresinin istatistiksel analizi yapılmış ve uygulanan modelin %95 güven aralığı içerisindeki ANOVA analizi ile incelenmiş ve model ile deneysel bulguların uyumuna bakılmıştır. Anlamlılık F değerinin 0,05'den küçük olması (%95 güven aralığında) modelin istatistiksel olarak önemli olduğunun göstergesidir. Yapılan istatistiksel 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 Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

α -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'si için verilen istatistiksel tablo sonuçlarına göre; uygun görülen Quadratik model için Korelasyon katsayısı (R²) değeri sırasıyla; Çoklu R=%81,65, R²=%66,67 ve ayarlı R²=%42,87 olarak belirlenmiştir. (R²) değerinin %66,67 olarak belirlenmesi, gözlenen değerlerle öngörülen değerler arasında uyumluluğun az olduğunu ve uygulanan modelin güven aralığı içerisinde yer almadığını göstermektedir. Çoklu R değerinin %81,65 olması, regresyonun istatistiksel olarak önemli olduğunu ve toplam değişkenlerin %19,35'lik bir kısmının bu modelle açıklanamayacağını belirtmektedir. Modelin istatistiksel değerini belirlemek için ANOVA testi içerisindeki "Anlamlılık F"

değerine bakılmıştır. Anlamlılık F değerinin 0,05'den büyük olması (0,1060) ve model F değerinin 2,80 olarak elde edilmesi, %95 güven aralığında modelin istatistiksel olarak değerli olmadığını göstergesidir (Şekil 4.13).

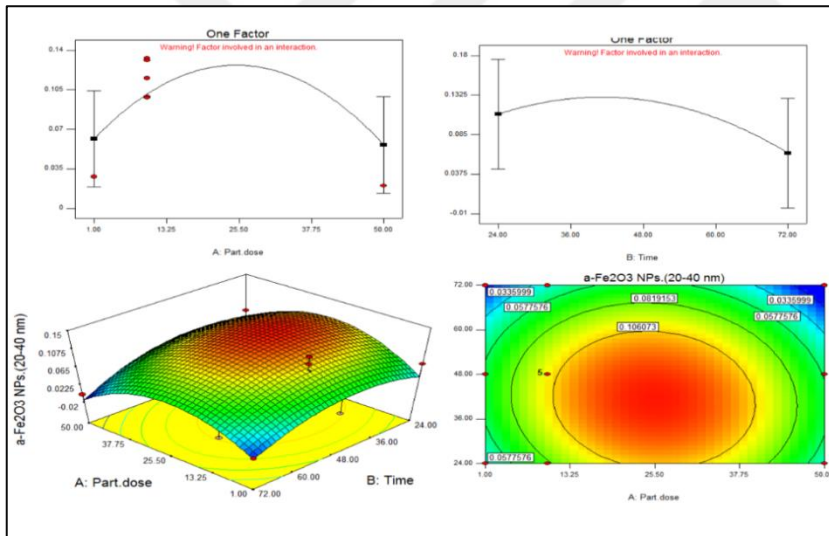
Matematiksel modellemede ise;

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (4.3)$$

$$Abs. = 0.13 - 0.0026 X_1 - 0.023 X_2 - 0.0067 X_{12} - 0.068 X_1^2 - 0.041 X_2^2 \quad (4.4)$$

olarak bulunmuştur.

Yapılan değerlendirme sonucunda, α -Fe₂O₃ (20-40 nm) için seçilen parametrelerden partikül dozunun ve sürenin absorbans değerini azaltıcı etkilediği sonucuna varılmıştır. Katsayıların mutlak değerlerine bakıldığında etkiye sırası süre ve doz şeklindedir.



Şekil 4.13. α -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'ler için istatistiksel verilerin grafikleri

γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'si için verilen istatistiksel tablo sonuçlarına göre; uygun görülen Quadratik model için Korelasyon katsayısı (R^2) değeri sırasıyla; Çoklu R^2 =%89,78, R^2 =%80,61 ve ayarlı R^2 =%66,76 olarak belirlenmiştir. (R^2) değerinin %80,61 olarak belirlenmesi, gözlenen değerlerle öngörülen değerler arasında uyumluluğun yüksek olduğunu ve uygulanan modelin güven aralığı içerisinde yer aldığını göstermektedir. Çoklu R değerinin %89,78 olması, regresyonun istatistiksel olarak önemli olduğunu ve toplam değişkenlerin %10,22'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 (0,0195) ve model F değerinin 5,82 olarak elde edilmesi, %95 güven aralığında modelin istatistiksel olarak değerli olduğunun göstergesidir (Şekil 4.14).

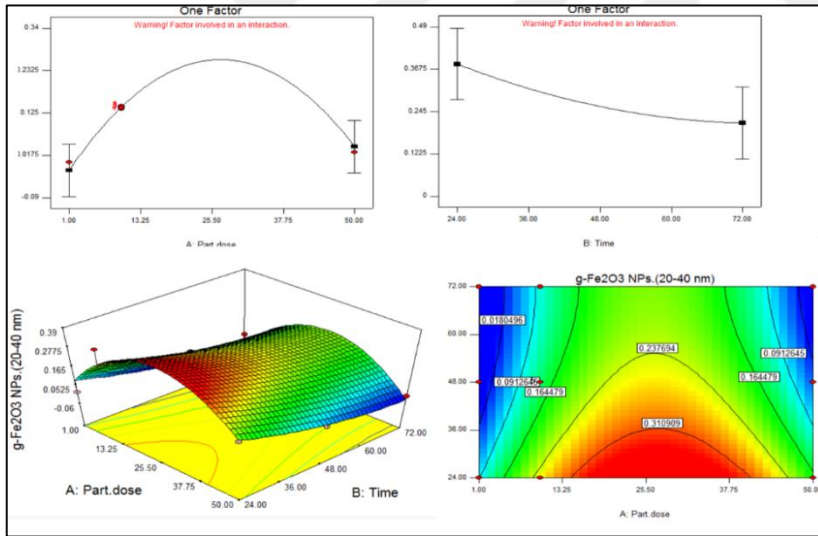
Matematiksel modellemede ise;

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (4.5)$$

$$Abs. = 0.26 + 0,030 X_1 - 0.085 X_2 - 0.013 X_{12} - 0.25 X_1^2 + 0.037 X_2^2 \quad (4.6)$$

olarak bulunmuştur.

Yapılan değerlendirme sonucunda, γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) için seçilen parametrelerden partikül konsantrasyonu ve sürenin absorbans değerini azaltıcı etkilediği sonucuna varılmıştır. Katsayıların mutlak değerlerine bakıldığında etkiye sırası süre ve doz şeklindedir.



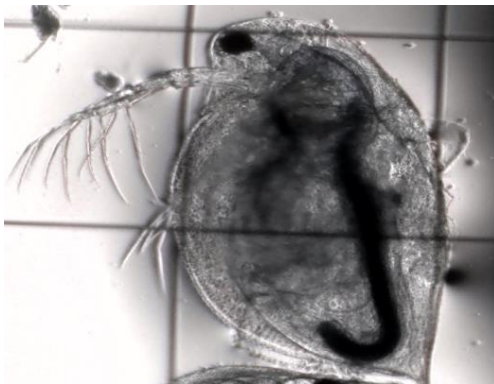
Şekil 4.14. γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'ler için İstatistiksel verilerin grafikleri

4.1.2. Toksikite Analiz Bulguları

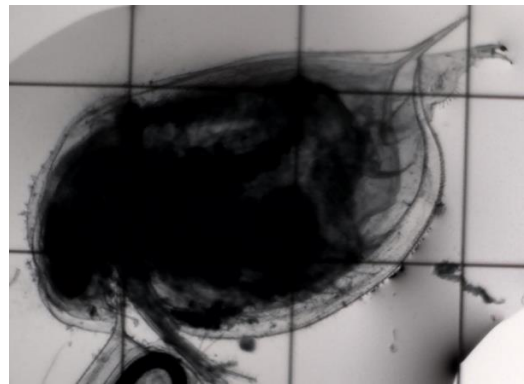
4.1.2.1. Faz Kontrast Mikroskopik Analiz Bulguları

Herhangi bir uygulamaya tabi tutulmayan kontrol grubu ile α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lere maruz bırakılan *D. magna* bireylerinin faz kontrast resimleri Şekil 4.15'te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, hem tatlısu hem de deniz suyu türlerinin akuatik ortamda bulunan NP'lerden etkilendiği görülmüştür. NP'lere maruz bırakılan *D. magna* türünün hemen hemen her yüzeyi bireysel veya topaklanmış nanomalzeme ile sarılmaktadır.

Herhangi bir uygulamaya tabi tutulmayan kontrol grubu ile NP'lere (50 µg/mL, 72 saat) maruz bırakılan zooplanktonların faz kontrast resimleri Şekil 4.15'te verilmiştir. Faz kontrast mikroskopik sonuçları incelendiğinde; *D. magna* organizmasının ortamda bulunan NP'leri aldığı görülmektedir. Bu organizma da süzerek beslediği için sulu ortamda bulunan mikro veya makro boyuttaki tüm parçacıkları besin yoluyla vücuduna alır. Bu zooplanktonik organizmalar beslenme alışkanlıklarından dolayı ortamda bulunan tüm partikülleri ayırım yapmadan süzerek bünyesine alırlar. Ancak vücuda alınan bu parçacıkların ne kadarının NP olduğu veya organizmada bu NP'lerin birikim yapıp yapmadığı ise ancak ICP-MS analizleri sonuçları ile belirlenebilir. Bu sonuçlar ICP-MS analizi sonucunda yapılan birikim sonuçları ile aynı paralellik göstermektedir. NP konsantrasyonu arttıkça birikim oranında da artış olduğu görülmektedir. Organizma tarafından alınan NP'ler dokuda metal olarak birikim yaptığında bir üst tüketici organizmalar için tehlike oluşturmaktadır.



Kontrol grubu *D. magna*



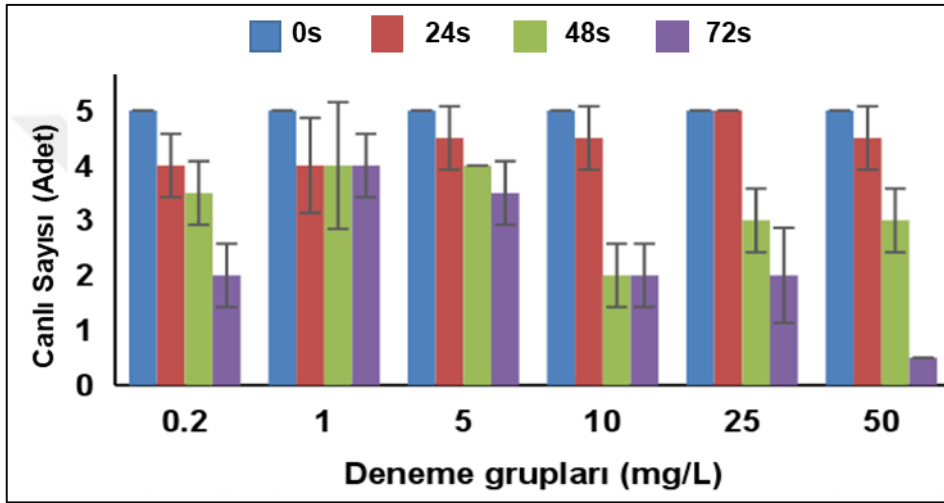
NP'lere maruz bırakılan *D. magna*

Şekil 4.15. Kontrol grubu ile NP'lere (50 µg/mL, 72 saat) maruz bırakılan zooplankterler

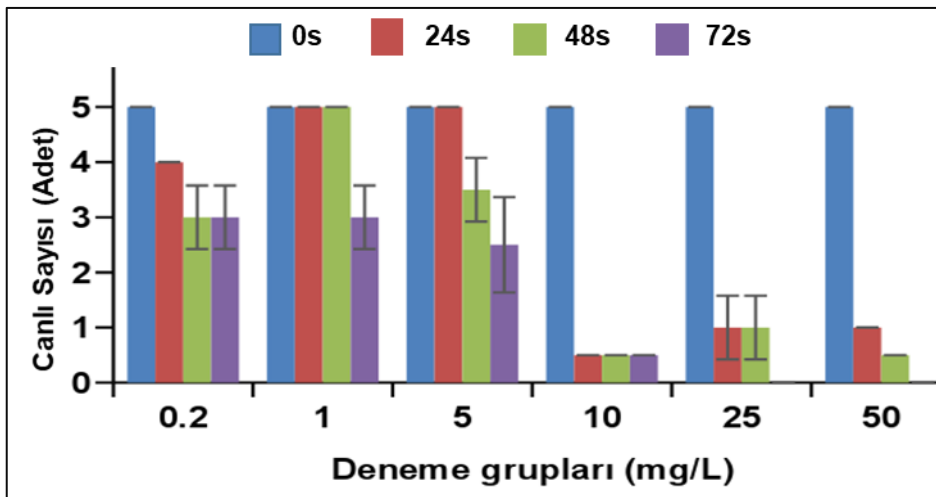
4.1.3. Metal ve Metal Oksit Nanopartiküllerin Toksikite Oranları

4.1.3.1. *D. magna* Toksikite Test Bulguları

α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lerin etkileri sonucunda *D. magna*'ya ait toksisite sonuçlarını gösteren grafikler Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de verilmiştir. α -Fe₂O₃ NP'leri (20-40 nm) diğerlerine kıyasla çok daha az toksik etkiye sahip olduğu vurgulanabilir. Çalışılan sürelerin sonunda hiçbir konsantrasyonda letal doz saptanmamıştır. γ -Fe₂O₃ NP'lerinde (20-40 nm) ise 25 ppm'den itibaren 72. saatte letal doz saptanmış, diğer sürelerde herhangi bir letal doz etkisi gözlenmemiştir.



Şekil 4.16. α -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerin *D. magna*'da toksisite oranlarını gösteren grafikler



Şekil 4.17. γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerin *D. magna*'da toksisite oranlarını gösteren grafikler

4.1.4. Kimyasal Analiz Bulguları

Birincil tüketici organizmaların beslenme alışkanlıklarından dolayı, yaşadıkları veya buldukları ortamdaki her türlü faydalı veya zararlı parçacıkları suyu süzerek almaları kaçınılmazdır. Bu özellik beslenme alışkanlıklarından dolayı gelmekte ve bu tür zooplanktonik organizmalar, bünyelerinde birikim oluşturmaktadır. Ancak her organizma farklılık göstermekle birlikte özellikle NP'lerin birikim ve atılım oranları aynı değildir. Bu kapsamda biyodeneysel aşamada kullandığımız α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lere maruz bırakılan zooplanktonik organizmalardaki birikim ve atılım oranları ICP-MS ile analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıda ayrı bölümler halinde verilmiştir.

4.1.4.1. *D. magna* Bireylerinde Birikim ve Atılım Değerleri

Biyodenejde kullanılan *D. magna* bireylerinin metal ve metal oksit NP'lere maruz bırakılması sonucunda bireylerde birikim ve atılım değerlerin belirlenmesi için yapılan ICP-MS analiz sonuçları aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6).

α -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerine maruz bırakılan *D. magna* bireylerinde Fe birikimi ve atılım sonuçları incelendiğinde; her uygulama saatinde, konsantrasyon artışına paralel olarak birikim ve atılımın gerçekleştiği belirlenmiştir. Konsantrasyon oranı arttıkça birikim miktarları katlanarak bir artış göstermiştir. Birikim oranları ise uygulama süreleri açısından değerlendirilirse, süre artışına paralel olarak bir birikim azalmasının olduğu belirlenmiştir. Çalışmada α -Fe₂O₃ NP'sinin tüm konsantrasyonlarında denemenin 24. saat sonucunda en yüksek birikimlere ulaştığı ve daha sonraki günlerde ise giderek azalma gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek birikim ve atılım oranları yüksek konsantrasyonlarda belirlenmiştir. Atılım oranlarında da konsantrasyon arttıkça katlanarak bir artış eğilimi görülmüştür. Çalışma sonucunda yapılan atılım süreci sonucunda ise ciddi oranlarda Fe atılımının gerçekleştiği görülmüştür.

γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerine maruz bırakılan *D. magna* bireylerinde Fe birikimi ve atılım sonuçları incelendiğinde; her uygulama saatinde, konsantrasyon artışına paralel olarak birikim ve atılımın gerçekleştiği belirlenmiştir. En yüksek birikim ve atılım oranları yüksek konsantrasyonlarda belirlenmiştir. Çalışmada γ -Fe₂O₃ NP'sinin tüm konsantrasyonlarında denemenin 24. saati sonucunda yüksek birikimlere ulaştığı ve daha sonraki günlerde ise genellikle birikimin daha az olduğu görülmüştür. Atılım oranlarında da konsantrasyon arttıkça katlanarak bir artış eğilimi görülmüştür.

Çizelge 4.5. *D. magna* bireylerinde α -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerin birikim ve atılım değerleri (µg/g)

Gruplar	Birikim			Atılım
	24 saat	48 saat	72 saat	
Kontrol	88,7±2 ^{Ac}	87,2±22 ^{Ad}	84,3±9 ^{Ad}	89,1±5 ^{Ac}
0,2 ppm	205,3±31 ^{Ae}	129,8±9 ^{Bd}	96,1±3 ^{Bd}	79,4±3 ^{Bc}
1 ppm	277,6±23 ^{Ade}	173,1±5 ^{Bdc}	143,4±9 ^{Bd}	78,9±3 ^{Cc}
5 ppm	443,1±73 ^{Ad}	239,6±24 ^{Bdc}	210,6±3 ^{Bdc}	138,3±10 ^{Bc}
10 ppm	632,4±65 ^{Ac}	353,3±63 ^{Bc}	265,4±42 ^{Bc}	144,1±22 ^{Bc}
25 ppm	1049,1±23 ^{Ab}	793,9±33 ^{Bb}	628,8±33 ^{Cb}	340,6±33 ^{Db}
50 ppm	1322,4±31 ^{Aa}	1207,1±62 ^{Ba}	956,3±30 ^{Ba}	719,4±61 ^{Ca}

Çizelge 4.6. *D. magna* bireylerinde γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerin birikim ve atılım değerleri (µg/g)

Gruplar	Birikim			Atılım
	24 saat	48 saat	72 saat	
Kontrol	78,9±2 ^{Ac}	76,4±4 ^{Ac}	78,1±3 ^{Ad}	77,2±5 ^{Ac}
0,2 ppm	90,0±9 ^{Ac}	82,1±31 ^{Ac}	79,9±0 ^{Ad}	60,8±4 ^{Bc}
1 ppm	273,4±5 ^{Abc}	198,8±23 ^{Abc}	166,0±16 ^{Ac}	98,0±5 ^{Bc}
5 ppm	643,1±73 ^{Ab}	339,4±24 ^{ABb}	261,8±29 ^{ABc}	196,6±9 ^{Bbc}
10 ppm	832,6±65 ^{Ab}	553,1±63 ^{ABb}	423,7±86 ^{ABc}	227,9±40 ^{Bbc}
25 ppm	1151,1±23 ^{Aab}	1040,4±33 ^{Aab}	951,1±94 ^{Ab}	448,4±10 ^{Bb}
50 ppm	1825,6±31 ^{Aa}	1649,8±62 ^{Aa}	1574,7±37 ^{ABa}	817,5±79 ^{Ba}

Not 1: Aynı konsantrasyonlarda (aynı satırda) farklı büyük harflerle gösterilen zaman ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).

Not 2: Aynı zamanda (aynı sütunda) farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).

4.1.4.1.2. Demir İyon Salınımı Analiz Bulguları

Biyodenedeyde kullandığımız *D. magna* organizmalarının buldukları ortamdan su örnekleri alınarak α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lerin her iki ortamdaki iyon salınımları incelenmiştir. Bu kapsamda tatlı su (*D. magna* organizmaların bulunduğu ortam) ortamında NP'lerin çözünmelerine bağlı olarak ortama (medium) saldıkları metal iyon analizleri ICP-MS ile yapılmış ve sonuçlar ppm (µg/L) olarak aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.7). Tatlı su ortamındaki iyon sonuçları incelendiğinde her bir NP ortama farklı miktarda iyon bırakmaktadır. Bazı NP'lerde konsantrasyon artışına bağlı iyon artışı olurken diğer

NP'lerde zaman artışına bağlı olarak ortama iyon salınımlarında artış olmamıştır. Bu sonuçlar α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lerin suda çözünmelerini hakkında bilgileri vermektedir.

α -Fe₂O₃ (20-40 nm) ve γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerinin ortama verdiği Fe iyon miktarları değerlendirildiği zaman; α -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'si için uygulama gruplarında kontrol grubuna oranla bir düşüş gerçekleşmiş ve konsantrasyon artışına paralel olarak gerçekleşen artış ile birlikte nispeten dengelenmiştir. Ancak, 25 ve 50 ppm konsantrasyonlarının 48 ve 72. saatlerinde kontrol grubunun üzerinde değerler elde edilmiştir. γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'de ise 0,2, 1 ve 5 ppm konsantrasyonlarının 24. saatlerinde kontrol grubundan daha düşük değerler elde edilmişken, tüm diğer konsantrasyon ve uygulama sürelerinde kontrol grubundan daha yüksek değerler elde edilmiştir. Belirlenmiş olan artış miktarları süre ve konsantrasyon artışı ile birlikte gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.7. α -Fe₂O₃ (20-40 nm) ve γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerin ortama verdiği Fe iyon miktarları (μ g/L)

Gruplar Tatlı su	α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm)			γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm)		
	24.s	48.s	72.s	24.s	48.s	72.s
0,2 ppm	6,0	11,3	22,6	51,3	81,6	128,1
1 ppm	19,9	22,9	36,4	67,0	98,7	114,4
5 ppm	20,1	32,2	37,8	70,0	103,4	138,3
10 ppm	30,7	36,6	82,0	83,8	119,0	155,3
25 ppm	68,0	95,7	117,1	91,2	129,1	169,9
50 ppm	69,2	98,5	136,8	98,4	138,7	174,7

4.1.5. Biyokimyasal Analiz Bulguları

Organizmalarda oksidatif stres oluşumu, yağ asitlerinin oksidasyonu reaktif bir radikal tarafından yağ asitlerinin metilen gruplarından bir hidrojen atomunun koparılması ile başlar. Oksidatif stres ile birlikte oluşan ve reaktif oksijen türleri/metabolitleri olarak bilinen moleküller özellikle lipid, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verir. Karbon merkezli radikal oluşması ve daha sonra moleküler oksijenin bağlanması ile lipid hidroperoksitleri meydana gelir. Lipid hidroperoksitleri, lipid peroksidasyonunun erken aşamasına neden olur. Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile de biyoaktif aldehitler oluşur. Bunlardan en önemlileri Glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA)'tir. Organizmanın bütün hücrelerinde bulunan ve hücrelerin protein yapısı dışındaki sülfidril grubu içeriğinin %90 kadarını oluşturan GSH ise zararlı bileşiklerin etkisizleştirilmesinde önemli rollere sahiptir. GSH radikal kaynaklı hasara karşı koyarken antioksidan enzimlere substrat olarak görev yapar ve bir radikal tutucusu gibi davranır. Özellikle peroksidaz ve redüktaz

enzimlerinin aktiviteleri için son derece önemlidir. MDA ise lipid hidroperoksit ayrışmasının birçok düşük molekül ağırlıklı nihai ürünüdür ve çoğunlukla lipid peroksidasyonunun en son ürünü olup, oksidatif stres belirleyicisi olarak sıklıkla kullanılan testtir. Bu amaçla MDA üretimini değerlendirmek için kullanılan en yaygın yöntem ise tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) belirleyicisidir. Biyodeneç çalışmasında kullanılan zooplanktonik organizmalardaki oksidatif stresin göstergesi olarak GSH ve TBARS biyomarkırları değerlendirilmiş olup sonuçları aşağıda ayrı ayrı olarak verilmiştir.

4.1.5.1. GSH Analizine Ait Bulgular

4.1.5.1.1. *D. magna*

α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lere maruz bırakılan *D. magna* bireylerinden elde edilen GSH bulguları Çizelge 4.8'de verilmiştir. α -Fe₂O₃ (20-40 nm) ve γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'leri için ise benzer bir şekilde sadece 0,2 ppm konsantrasyonu kontrol grubuna göre yüksek veriler vermişken, diğer tüm gruplarda ise GSH verilerinin konsantrasyon artışına paralel olarak bir genel düşüş gösterdiği görülmüştür. Her iki NP içinde en düşük veriler 25 ppm konsantrasyonundan elde edilmiştir. α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerine maruziyet sonucunda elde edilen GSH bulguları daha düşük olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.8. α -Fe₂O₃ (20-40 nm), γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lere 72 saat süreyle maruz bırakılan *D. magna* bireylerinden elde edilen GSH bulguları

Gruplar	α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) (mg/L)	γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) (mg/L)
Kontrol	7,43±0,11 ^a	7,97±0,14 ^a
0,2 ppm	9,20±1,18 ^a	8,21±0,31 ^a
1 ppm	6,78±1,12 ^a	6,46±0,32 ^a
5 ppm	6,15±0,30 ^a	6,31±0,23 ^a
10 ppm	6,35±0,34 ^a	6,00±0,27 ^a
25 ppm	4,65±0,27 ^b	5,50±0,26 ^a
50 ppm	4,87±0,50 ^b	6,17±0,16 ^a

Not: Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).

4.1.5.2. Tiyobarbitürik Reaktif Maddeler Analiz Bulguları

4.1.5.2.1. *D. magna*

α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lere maruz bırakılan *D. magna* bireylerinden elde edilen TBARS bulguları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

α -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'si için en yüksek TBARS değeri 1 ppm konsantrasyonunda, en düşük değer ise 10 ppm konsantrasyonunda bulunmuştur. TBARS değerleri arasında bariz ve düzensiz bir dalgalanmanın olduğu görülmüştür. γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'si için ise nispeten tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna benzer veriler elde edilmiştir. En düşük değer 10 ppm ve en yüksek değer ise 1 ppm konsantrasyonlarından elde edilmiştir.

Çizelge 4.9. α -Fe₂O₃ (20-40 nm), γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lere 72 saat süreyle maruz bırakılan *D. magna* bireylerinden elde edilen TBARS bulguları

Gruplar	α -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) (mg/L)	γ -Fe ₂ O ₃ (20-40 nm) (mg/L)
Kontrol	5,21±0,12 ^a	5,33±0,55 ^a
0,2 ppm	5,58±0,21 ^a	6,00±0,57 ^a
1 ppm	6,11±0,06 ^a	6,32±0,65 ^a
5 ppm	4,72±0,37 ^a	5,20±0,41 ^a
10 ppm	4,41±0,19 ^a	4,72±0,35 ^a
25 ppm	5,89±0,12 ^a	5,09±0,46 ^a
50 ppm	5,78±0,33 ^a	5,99±0,18 ^a

Not: Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen konsantrasyon ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).

4.2. Tartışma

En az bir boyutlu, farklı şekil ve büyüklükte olabilen nanomalzemeler, çok elementli veya tek elementli yapıda ve biçimlerde olabilir ve arzu edilen biçimlerde oluşturulabilirler. Bu nanomalzemelerden olan NP'ler çok kullanışlı olmaları nedeniyle yoğun miktarda üretilmektedirler. Yoğun düzeyde gerçekleştirilen bu üretim sebebiyle de doğada bulunan organizmalarda doğrudan veya dolaylı olarak potansiyel birikim artmaktadır. Ancak, henüz son zamanlarda araştırılmaya başlanan NP'lerin doğal ortama olan etkileri ve bu araştırmalardan elde edilen ilk bulgular durumun çok ciddi olabileceğini ortaya çıkarmaktadır. Yapılan birçok araştırmada bazı NP'lerin yüksek toksik özelliğe sahip olduğu rapor edilmiştir (Baun vd., 2008; Adam vd., 2015; Aravantinou vd., 2015). Organizmaların toksik maddelere karşı göstermiş olduğu toleransın genel anlamda değişkenlik göstermesinden dolayı toksikolojik etkiler, farklılıkların büyük bir bölümünü açıklamaktadır. Bu nedenle, aynı NP'lerin farklı çevreler ve farklı organizmalar üzerindeki etkilerinin eş zamanlı olarak belirlenebilmesi 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 fitoplanktonik organizmalar ve birincil tüketici organizmalar olan zooplanktonik organizmalardır. İnsanların yiyeceklerinin önemli bir kısmını oluşturan balıkların, suyla taşınan besinlerde veya beslenme yoluyla nanoboyuttaki parçacıklarla kirlenmiş zooplankton türleriyle beslenmeleri ve her türlü NP'nin birincil tüketici organizmalarda birikmesi endişe verici bir durumdur. Bu birikim ile organizmalar arasındaki av-avcı ilişkisini göz önüne alarak besin zinciri boyunca NP'lerin nasıl taşındığını ve en önemlisi de nanoboyuttaki malzemelerin farklı ortam ve konsantrasyonlarda nanotoksitesinin nasıl oluştuğu açıklanabilmektedir.

Metal bazlı NP'lerin her biri ayrı bir karakteristik özellik göstermesine rağmen araştırmada kullanılan α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lerinin kolloidal yapıda genellikle kümeleşme yapmaya meyilli olduğu görülmektedir. Ayrıca bu NP'lerin morfolojik yapısı incelendiğinde büyük çoğunluğunun yuvarlak veya küresel bir yapı sergiledikleri görülmektedir. Tüm NP'lerde olmamakla birlikte nanorod olarak isimlendirilen farklı ebatlarda çubuksu yapıların da olduğu görülmektedir. NP'lerin tanımlanması için yapılan karakterizasyon analiz sonuçları daha önce metal NP'ler ile yapılmış çalışmalar ile benzer sonuçlar göstermektedir (Lin vd., 2014).

Karakterizasyon analizi verilerine göre, metal bazlı NP'lerin kolloidal 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 vd., 2009). α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'ler pozitif (+) yüzey yükü göstermektedir. Sapsford vd. (2011) zeta potansiyelini NP yüzeyi ve içinde bir parçacığın dağıldığı yığın sıvısı ile ilgili zıt yüklü iyonların bulunduğu sıvı tabakası arasındaki potansiyel farkının bir ölçüsü olarak ifade etmiştir. Metal NP'lerin sıvı ortamdaki kararlılık değerleri ve yüzey yükü değerleri bakımından ise biyodenedeyde kullanılan NP'ler 20,1 ile 32,1 mV arasında özellik gösterdikleri için orta düzeyde kararlı oldukları görülmüştür.

α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lerin FT-IR'de spektrumları, absorbe su izleri, atmosferdeki karbondioksitin sebep olduğu kaydedilmiş kuşaklar ve doruk noktalarıdır. Ayrıca, yayınlanmış verilere uygun olarak, oksitlerin saflığını ve kristalleşme derecesini açığa çıkaran Fe-O bağlarla ilişkili ~750-400 cm⁻¹ bölgesinde belirli maksimumlara sahip keskin kuşaklar ve doruk noktaları gözlenmiştir. Belirli doruk noktalarının sayısı, konumu ve XRD spektrumundaki keskin formu, 20,6-38,8 nm aralığında kristalit boyuta sahip belirgin

ve saf demir nanooksitler, α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃'i açığa çıkarmıştır. Ayrıca, bunların homojenliği ve kristallliği SEM analizi ile kanıtlanmıştır.

Deneyde kullanılan canlı organizmaların NP'ler ile olan etkileşimlerini görmek için yapılan faz kontrast mikroskopik analizi sonucunda elde edilen görsellere göre; zooplanktonik olan *D. magna* 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 olduğu veya organizmada bu NP'lerin birikim yapıp yapmadığı ise ancak ICP-MS analizleri sonuçları ile belirlenebilir. Bu kapsamda birikim ve atılım oranlarının belirlenmesi için ICP-MS ile yapılan analiz sonuçları ile NP konsantrasyonları aynı paralelliği göstermektedir. NP konsantrasyonu arttıkça birikim oranında da artış olduğu görülmektedir. Organizmalarda ne kadar birikim ve atılım yapıldığı Bölüm 4.4.1'de açıklanmıştır.

Nanotoksisite deneyinde kullanılan α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'leri, organizma üzerinde ölüme neden olabilecek düzeyde farklı toksik etkiler oluşturmuştur. Bu da metal NP'lerin buldukları ortamın etkisinden kaynaklanmaktadır. Üretilen nanomalzemelerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki olası etkileri üzerine olan çalışmalar son yıllarda yapılmakla beraber nanoteknolojinin insan sağlığı ve çevre üzerindeki muhtemel etkileri konusunda henüz yeterli düzeyde bilgi oluşmamıştır (Arslan vd., 2011; Primera-Pedrozo vd., 2012). Son zamanlarda, nanoyapılı malzemeler ile ilgili muhtemel çevresel etkilerini açıklığa kavuşturmak için kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır. Yine de, bu çabalar kesin sonuçlar sağlamaktan çok uzaktır. Farklı araştırma gruplarının bulguları önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Örneğin hem tatlı hem de tuzlu suda yaşayabilen (örneğin) Dişli Sazancık (*Cyprinodon variegatus*) balığı üzerinde yapılan araştırmada, aynı NP'nin nanotoksisite etkileri incelendiğinde, düşük tuzlulukta daha çok olduğu saptanmıştır (Ates vd., 2014). Yukarıda da belirtildiği gibi, NP'lerin toksikolojik ve biyokimyasal etkilerinin tam anlamıyla tespit edilebilmesi gözlenen etkilerin nanoboyuttaki malzemenin fiziko-kimyasal özelliklerine, büyüklüğüne, organizma çeşitliliğine, türüne ve çevreye bağlı olmasından dolayı oldukça zordur. Deneysel araştırmada ise benzer sonuçlar elde edildiği gibi farklı sonuçlar da alınmıştır. Tatlısu ortamında yaşayan *D. magna* için ise γ -Fe₂O₃ NP'lerinde (20-40 nm) ise 25 ppm'den itibaren 72. saatte letal doz saptanmış, diğer sürelerde herhangi bir letal doz (LC₅₀) etkisi gözlenmemiştir.

α -Fe₂O₃ (20-40 nm) ve γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'leri *D. magna*'da konsantrasyon artışına bağlı olarak birikim oranında artış olmuştur. Genellikle 24 saat içerisinde maksimum birikim olduğu görülmüştür. Ayrıca α -Fe₂O₃ (20-40 nm) ve γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerin her konsantrasyonuna ait atılım değerleri oran olarak genellikle %20-40 arasında olmuştur. NP'nin toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda pek çok farklı NP ve tür için benzer sonuçlar ortaya koyulmuştur. *D. magna* ve su mercimeği (*Lemna minor*) 'nde titanyum dioksit (TiO₂) NP'lerin olası etkileri irdelenmiştir. Çalışmada, NP'ye maruz bırakılan *D. magna* türlerinde önemli miktarda TiO₂ birikimi gözlenmiş ve yüksek TiO₂ konsantrasyonlarında da (> 10 mg/L) *D. magna* türünde yüksek ölüm oranı görülmüştür. Pinheiro vd. (2013) TiO₂'nin NP'ye maruz bırakılan organizmaların popülasyon düzeyi ve fizyolojisi üzerinde değişikliğe yol açarak sucul ekosistemlerde risk oluşturabileceğini bildirmiştir.

Metal bazlı NP'lerin buldukları sıvı ortamında çözünmesi, kendilerini eşleştiren iyonik türleri toksik özellik gösterir. Bu nedenle, zamanla organizmalar üzerindeki potansiyel etkilerini 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. α -Fe₂O₃ (20-40 nm) ve γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerinin tatlısu ortamına verdikleri iyon miktarları konsantrasyonun ve zamanın artmasıyla artış 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, vd., 2011; Melegari, vd., 2013). Biyodeneysel çalışmada farklı konsantrasyonlarda (0,2; 1; 5; 10; 25 ve 50 ppm) 72 saat süreyle α -Fe₂O₃ (20-40 nm) ve γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lere maruz bırakılan *D. magna* bireylerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak GSH seviyesinde azalma olmuştur. Ayrıca γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) ve α -Fe₂O₃ (20-40 nm) GSH seviyelerindeki bu azalış, γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP için 25 ppm de ve α -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'leri için 50 ppm'de en yüksek oranda olmuştur. Elde edilen bu verilere göre GSH seviyelerinde artmalar ve azalmalar olmuştur. GSH seviyesi ılımlı oksidatif stres koşullarında artış gösterip radikalleri temizlemekte, yüksek oksidatif stres koşullarında ise azalmaktadır. Ercal vd. (1996) yaptığı çalışmada kurşun toksisitesine maruz bıraktıkları sıçanların karaciğer dokusunda GSH seviyesinin azaldığını, lipid

peroksidasyonda artma meydana geldiğini rapor etmişlerdir. GSH miktarındaki bu azalmalar, lipid peroksidasyonunun ve serbest radikal oluşumunun uzun süreli artışına bağlı olarak antioksidan enzim aktivitelerinde azalmaların görülmesi ve hücrel antioksidan savunma sisteminin aşılmasıyla açıklanabilir. Bunun yanında bazı bilim adamları metal etkisindeki GSH seviyelerindeki azalmaları, GSH sentez mekanizmasının bloklanmasına da bağlamaktadırlar (Griffith, 2007).

TBARS lipid peroksidasyonunun 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 vd., 1997; Suman vd., 2015). 72 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda (0,2; 1; 5; 10; 25 ve 50 ppm) α -Fe₂O₃ (20-40 nm) ve γ -Fe₂O₃ (20-40 nm) NP'lerine maruz bırakılan *D. magna* bireylerinde, konsantrasyon artışına bağlı olarak TBARS seviyelerinde çok fazla artış olmadığı gibi 5 ppm ve 10 ppm konsantrasyonlarında kontrole göre azalma olmuştur. Smith vd. (2007), karbon nanotübün alabalık üzerine toksisitesini araştırdıkları çalışmalarında TBARS ve GSH biyomarkırlarını incelemişlerdir. Çalışma sonucunda TBARS düzeyinin özellikle karaciğer, beyin ve solungaçta kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azaldığını, GSH seviyesinin ise tüm konsantrasyonlarda aynı düzeyde kaldığını bildirmişlerdir. Oksidatif stres koşullarında azalan TBARS değerlerinin, diğer antioksidanların indüksiyonundan kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir. Benzer şekilde Oberdörster (2004) İri Ağızlı Siyah Levrek (*Micropterus salmoide*) üzerinde 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.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonucunda α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'ler organizmalar üzerinde farklı etkiler göstermekle birlikte özellikle NP'lerin birikim ve atılım oranları açısından farklılıklar görülmektedir. ICP-MS analiz sonucu verilerine göre NP konsantrasyonu arttıkça organizmada birikim oranında da artış olduğu görülmektedir. NP'lerin metal iyon salınımları ise tatlısu ve deniz suyu ortamında farklılıklar göstermekle birlikte, her bir NP'nin iyon salınım oranları kendilerine özgü farklı karakteristik özellikler göstermektedir.

Faz mikroskopik analiz sonucunda NP'lere maruz bırakılan zooplanktonik türlerin hemen hemen her yüzeyi bireysel veya topaklanmış NP'ler ile sarılmaktadır. Birincil tüketici olan zooplakton üzerinde yapılan oksidatif stres analizlerinde ise TBARS ve GSH değerleri *D. magna* bireylerinde artış göstermiştir. Zooplanktonik organizmalar tarafından alınan NP'ler dokuda metal olarak birikim yaptığında bir üst tüketici organizmalar için tehlike oluşturmaktadır.

Biyolojik sistemdeki organizmalar; nanoboyuttaki malzemeler başta olmak üzere, ağır metaller, toksinler ya da patojenlere maruz kalmak, zayıf antioksidan savunma sistemi, besleme sistemi, aşırı olumsuz çevresel uyarıcılar ve günlük metabolik ürünler organizmalarda oksidatif strese neden olurlar. α -Fe₂O₃ ve γ -Fe₂O₃ NP'lerin ciddi toksik etkileri olduğunu gösteren bu araştırma, her bir NP'nin çok yönlü yapılan analizleri sonucunda elde edilmiştir. Bu malzemeler kullanım alanlarının artmasıyla birlikte çevre için büyük bir sorun olmaya başlamıştır. Bunların çevre için oluşturabilecekleri tehditler olumsuz etkilerin sadece laboratuvar koşullarında gözlemlenebilmesi nedeniyle göz ardı edilmemelidir. Doğada nanopartiküllerin birikim miktarı artmaya devam ettiği sürece neden olabileceği olumsuz sonuçlar daha anlaşılır bir biçimde ortaya çıkacaktır. Halihazırda, nanoboyuttaki materyallerin çok yoğun ve olası yanlış kullanımı küresel ölçekte çevre için çok büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Son yıllarda nanoboyuttaki malzemeler konusundaki bilgilerin artmasıyla birlikte bu malzemelerin yanlış ve aşırı miktarda kullanılması dünyadaki tüm canlıların varlığı onarımı mümkün olmayacak biçimde etkileme potansiyeline sahiptir.

KAYNAKLAR

- 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.
- Ali A., Hira Zafar M.Z., ul Haq I., Phull A.R., Ali J.S., Hussain A., 2016. Synthesis, Characterization, Applications, and Challenges of Iron Oxide Nanoparticles. *Nanotechnology Science and Applications*, 9: 49.
- 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.
- Ates 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.
- Balusamy B., Taştan B.E., Ergen S.F., Uyar T., Tekinay T., 2015. Toxicity of Lanthanum Oxide (La₂O₃) Nanoparticles in Aquatic Environments. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 17 (7): 1265-1270.
- 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 Titaniumdioxide Particles. *Toxicological Sciences*, 70 (1): 86-97.
- Bernier M.C., Besse M., Vayssade M., Morandat S., El Kirat K., 2012. Titaniumdioxide Nanoparticles Disturb the Fibronectin-Mediated Adhesion and Spreading of Pre-

- Osteoblastic Cells. *Langmuir*, 28: 13660–13667.
- Blinova I., Niskanen J., Kajankari P., Kanarbik L., Käkinen A., Tenhu H., Penttinen O.P., Kahru A., 2013. Toxicity of Two Types of Silver Nanoparticles to Aquatic Crustaceans *D. magna* and *Thamnocephalus platyurus*. 20 (5): 3456-3463.
- Brar S.K., Verma M., 2011. Measurement of Nanoparticles by Light-Scattering Techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30 (1) : 4–17.
- Choi J., Reipa V., Hitchins V.M., Goering P.L., Malinauskas R.A., 2011. Physicochemical Characterization and In Vitro Hemolysis Evaluation of Silver Nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 123: 133–143.
- Colvin V.L., 2003. The Potential Environmental Impact of Engineered Nanomaterials. *Nature Biotechnology*, 21: 1166-1170.
- Cornell R.M., Schwertmann U., 2003. *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*. Second Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim. 703 p.
- 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 and Engineering News*, 81 (17): 30-33.
- De Cuyper M., Joniau M., 1988. Magnetoliposomes. *European Biophysics Journal*, 15 (5): 311-319.
- Dreher K.L., 2004. Health and Environmental Impact of Nanotechnology: Toxicological Assessment of Manufactured Nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 77: 3-5.
- Duhan S., Devi S., 2012. Synthesis and Structural Characterization of Iron Oxide-Silica Nanocomposites Prepared by the Sol Gel Method. *International Journal of Electronics Engineering*, 2 (1): 89-92.
- Ercal N., Treeratphan P., Hammond T.C., Matthews R.H., Grannemann N.H., Spitz D.R., 1996. In vivo indices of oxidative stress in lead-exposed C57BL/6 mice are reduced by treatment with *meso*-2,3-Dimercaptosuccinic Acid or *N*-acetylcysteine. *Free*

- Radical Biology and Medicine, 21 (2): 157–161.
- 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.
- Fan W., Shi Z., Yang X., Cui M., Wang X., Zhang D., Guo L., 2012. Bioaccumulation and Biomarker Responses of Cubic and Octahedral Cu₂O Micro/Nanocrystals in *D. magna*. *Water Research*, 46 (18): 5981-5988.
- Farre M., Gajda-Schranz K., Kantiani L., Barcelo D., 2009. Ecotoxicity and Analysis of Nanomaterials in the Aquatic Environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393: 81–95.
- Fernandez J., Alvarez J.A., Lopez J.A., 1997. Thiobarbituric Acid Test for Monitoring Lipid Oxidation in Meat. *Food Chemistry*, 59: 345-353.
- Galhotra P., 2010. Carbon dioxide Adsorption on Nanomaterials. PhD Dissertation. University of Iowa, Iowa, USA.
- Gilchrist R.K., Medal R., Shorey W.D., Hanselman R.C., Parrott J.C., Taylor C.B., 1957. Selective Inductive Heating of Lymph Nodes. *Annals of Surgery*, 146 (4): 596.
- Gophen M., Geller W., 1984. Filter Mesh Size and Food Particle Uptake by *Daphnia*. *Oecologia*, 64 (3): 408-412.
- 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 and Technology*, 41: 8178-8186.
- Guivar J.A.R., Martínez A.I., Anaya A.O., Valladares L.D.L.S., Félix L.L., Dominguez A. B., 2014. Structural and Magnetic Properties of Monophasic Maghemite (γ -Fe₂O₃) Nanocrystalline Powder. *Advances in Nanoparticles*, 3 (3): 114.
- Gupta A.K., Gupta M., 2005. Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Biomaterials*, 26 (18): 3995-4021.
- Hasany S.F., Ahmed I., Rajan J., Rehman A., 2012. Systematic Review of the Preparation Techniques of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles. *Nanoscience and Nanotechnology*, 2 (6): 148-158.

- 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.
- Huber D.L., 2005. Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles. *Small*, 1: 482-501.
- ISO 6341., 1996. Water Quality – Determination of the Inhibition of the Mobility of *D. magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute Toxicity Test Tyurus. *Environmental Science and Pollution Research*, 20 (5): 3456-3463.
- Jared S.B., Samuel E.L., Marco D.T., Catherine J.M., Robert J.H., Rebecca D.K., 2014. Surface Chemistry, Charge and Ligand Type Impact the Toxicity of Gold Nanoparticles to *Daphnia magna*. *Environmental Science: Nano*, 1: 260.
- Kahru A., Dubourguier H.C., 2010. From Ecotoxicology to Nanoecotoxicology. *Toxicology*, 269 (2): 105-119.
- Kazemzadeh H., Ataie A., 2012. Synthesis of Magnetite Nano-Particles by Reverse Coprecipitation. *International Journal of Modern Physics: Conference Series*, 5: 160–167.
- Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Vander Elst L., Muller R.N., 2008. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations and Biological Applications. *Chemical Reviews*, 108 (6): 2064-2110.
- Lee K.P., Trochimowicz H.J., Reinhardt H.J., 1985. Pulmonary Response of Rats Exposed to Titaniumdioxide (TiO₂) by Inhalation for Two Years. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 79: 179-192.
- Li A., Lv Z., Yu Y., Tan H., 2012. Synthesis and Characterization of Iron Oxide Nanoparticles Using Amphiphilic Diblock Copolymer PS-b-PAA Micelle as Soft Template. *Fibers and Polymers*, 13 (4): 425-428.
- Lin P.C., Lin S., Paul C., Wang P.C., Sridhar R., 2014. Techniques for Physicochemical Characterization of Nanomaterials. *Biotechnology Advances*, 32 (4): 711–726.

- Long N.V., Yang Y., Thi C.M., Hang B.T., Cao Y., Nogami M., 2015. Controlled Synthesis and Characterization of Iron Oxide Micro-Particles for Fe-Air Battery Electrode Material. *Colloid and Polymer Science*, 293 (1): 49-63.
- Lopez J.A., González F., Bonilla F.A., Zambrano G., Gómez M.E. 2010. Synthesis and Characterization of Fe₃O₄ Magnetic Nanofluid. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 30 (1): 2010, 60–66.
- Madhav M.R., Einstein Mariya David S., Suresh Kumar R.S., J.S. Swathy., J.S., Bhuvaneshwari M., Amitava Mukherjee N., Chandrasekaran N., 2017. Toxicity and Accumulation of Copper Oxide (CuO) Nanoparticles in Different Life Stages of *A. Salina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 52 (2017): 227–238.
- Manzo S., Rocco A., Carotenuto R., Picione F.D.L., Miglietta M.L., Rametta G., Di Francia G., 2011. Investigation of ZnO Nanoparticles Ecotoxicological Effects Towards Different Soil Organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 18 (5): 756-763.
- Manzo S., Miglietta M.L., Rametta G., Buono S., Francia G.D., 2013. Toxic Effects of ZnO Nanoparticles Towards Marine Algae *Dunaliella tertiolecta*. *Science of the Total Environment*, 445–446: 371–376.
- 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 Algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, 142–143: 431–440.
- 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.
- Nidhin M., Indumathy R., Sreeram K.J., Nair B.U., 2008. Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles of Narrow Size Distribution on Polysaccharide Templates. *Bulletin of Materials Science*, 31 (1).
- Oberdöster E., 2004. Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C60) Induce Oxidative Stress in the Brain of Juvenile Largemouth Bass. *Environmental Health Perspectives*, 112: 1058-1062.
- OECD. 2004. Test No. 202: *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for

the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris,
<https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>.

- Pinheiro T., Moita L., Silva L., Mendonca E., Picado A., 2013. Nuclear Microscopy as a Tool in TiO₂ Nanoparticles Bioaccumulation Studies in Aquatic Species. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms, 306: 117-120.
- Pitkethly M.J., 2004. Nanomaterials – the Driving Force. Materials Today, 7 (12): 20-29.
- 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.
- Randy G.M., (Ed.), 1995. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment. CRC press.
- Ranjbar M., Shahsavan N., Yousefi M., 2012. Synthesis and Characterization of Nano Structures Zinc (II) Cysteine Complex Under Ultrasound Irradiation. American Chemical Science Journal, 2 (4): 111-121.
- Ravichandrika K., Kiranmayi P., Ravikumar R.V.S.S.N., 2012. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of ZnO Nanoparticles. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 4 (4): 336-338.
- Ren G., Hu D., Cheng E.W., Vargas-Reus M.A., Reip P., Allaker R.P., 2009. Characterisation of Copper Oxide Nanoparticles for Antimicrobial Applications. International Journal of Antimicrobial Agents, 33: 587–590.
- Rodea-Palomares I., Gonzalo S., Santiago-Morales J., Leganes F., Garcia-Calvo E., Rosal R., Fernandez-Pinas F., 2012. An Insight into the Mechanisms of Nanoceria Toxicity in Aquatic Photosynthetic Organisms. Aquatic Toxicology, 122–123: 133–143.
- Sampson M. T., Type of Buckyball Shown to Cause Brain Damage in Fish. Erişim tarihi, March 2004. www.eurekalert.org/pub_releases/2004-03/acs-ob031904.php
- Santojanni A., Gorbi G., Sartore F., 1995. Prediction of Mortality in Chronic Toxicity Tests on *D. magna*. Water Research, 29 (6): 1453-1459.
- 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.
- Shaw Benjamin J., Handy Richard D., 2011. Physiological Effects of Nanoparticles on Fish: A Comparison of Nanometals Versus Metal Ions. *Environment International*, 37 (2011): 1083–1097.
- 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(2): 94-109.
- Sohoo S.K., Agarwal K., Singh A.K., Polke B.G., Raha K.C., 2010. Characterization of γ - and α - Fe_2O_3 Nano Powders Synthesized by Emulsion Precipitation-Calcination Route and Rheological Behaviour of α - Fe_2O_3 . *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2 (8): 2010, 118-126.
- Sondi I., Salopek-Sondi B., 2004. Silver Nanoparticles as Antimicrobial Agent: A Case Study on *E. coli* As A Model for Gram-Negative Bacteria. *Colloids and Interface Science*, 275: 177-182.
- 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.
- Teja A.S., Koh P.Y., 2009. Synthesis, Properties, and Applications of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 55 (1): 22-45.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA)., 2001. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. 5th edn, EPA- 821-R-02–012, Washington DC, USA, 2001, p. 266.
- 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.
- 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 TiO_2 and ZnO Particles on

Mobility and Reproduction of the Freshwater Invertebrate *D. magna*. *Chemosphere*, 76: 1356–365.

Zhu X., Chang Y., Chen Y., 2010. Toxicity and Bioaccumulation of TiO₂ Nanoparticle Aggregates in *D. magna*. *Chemosphere*, 78: 209–215.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Bilal AYDIN

Doğum Yeri : Altındağ/ANKARA

Doğum Tarihi : 01.06.1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Su Ürünleri Mühendisliği, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi,
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Yüksek Lisans Öğrenimi : Su Ürünleri Temel Bilimler ABD, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

1. **Aydın, B.**, Berber, S., Ateş, M., 2018. Determination of Accumulation, Elimination and Ion Release Rates in *Daphnia magna* Organisms Exposed to Alpha and Gamma Fe₂O₃ Nanoparticles. International Symposium of Ecology 2018, Kastamonu, Turkey. p. 823.
2. **Aydın B.**, Şasi E., Shigeoka Y., Zabun M., Kaya H., Ateş M., Kale, S., 2015. Nanotechnology as a Novel Tool in Fisheries and Aquaculture Industry. Turkish-Japanese Marine Forum-III International Workshop on Recent Developments in Marine & Environmental Sciences, Sustainable Utilization of Water Resources, Çanakkale, Türkiye, p. 13.

c) Katıldığı Projeler

1. Metal ve Metal Oksit Nanopartiküller ile Kuantum Noktacıklarının Fitoplankton ve Zooplankton Organizmalarda Etkilerinin Araştırılması. TÜBİTAK-ÇAYDAG 114Y087, Bursiyer.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

İLETİŞİM

E-posta Adresi : aydinbilal2@gmail.com