

**TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MÜHENDİSLİK ÜRÜNÜ NANOPARÇACIKLARIN SAYI, MİKTAR VE  
YAPISAL ÖZELLİKLERİNİN SUCUL EKOTOKSİKOLOJİ YÖNÜNDEN  
İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Ezgi ULUER TÜRKMEN**

**Mikro ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hatice DURAN DURMUŞ**

**AĞUSTOS 2021**



## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Ezgi Uluer Türkmen

## ÖZET

Doktora Tezi

### MÜHENDİSLİK ÜRÜNÜ NANOPARÇACIKLARIN SAYI, MİKTAR VE YAPISAL ÖZELLİKLERİNİN SUCUL EKOTOKSİKOLOJİ YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

Ezgi Uluer Türkmen

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Mikro ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hatice Duran Durmuş

Tarih: Ağustos 2021

Seryum oksit nanoparçacıklarının (nano-CeO<sub>2</sub>) kozmetikten gıda endüstrisine kadar birçok alanda yaygın olarak kullanılmasıyla birlikte doğaya salınımı artmıştır. Bu nedenle, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü'nün (OECD) mühendislik nanomalzemeler (MNM) için hazırlanan öncelik listesine nano-CeO<sub>2</sub> dahil edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında, iki tatlı su canlısı; tatarcık sineği (*Chironomus riparius*) ve tatlı su midyesi (*Unio crassus*) üzerindeki nano-CeO<sub>2</sub>'nin toksik etkileri araştırılmıştır. *Chironomus riparius* larva çalışması için doğal şartlara uygun 2,5, 25, 250, 2.500 mg CeO<sub>2</sub> NP/kg sediment konsantrasyon aralığı ve *Unio crassus* çalışması için 10 mg, 25 mg ve 50 mg CeO<sub>2</sub> NP/L su konsantrasyon aralığı seçilmiştir.

İlk olarak, nano-CeO<sub>2</sub>'nin kimyasal ve yapısal özellikleri, transmisyon elektron mikroskobu (TEM), taramalı elektron mikroskobu (SEM), enerji dağılımlı spektroskopisi (EDS), X-ışını kırınımı (XRD), X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), A Brunauer–Emmett–Teller (BET) yöntemi, dinamik ışık saçılımı (DLS) ve zeta potansiyeli analizleri ile ayrıntılı olarak karakterize edilmiştir.

Kronomidlerin nano-CeO<sub>2</sub>'ye uzun süreli maruziyet çalışması OECD test kılavuzu 218'e göre tasarlanmıştır. Larvalar tarafından nano-CeO<sub>2</sub> alımı, oksidatif stres parametreleri, *in vivo* genotoksik etki çalışması ve yaşam özelliği (gelişim süresi, ortaya çıkma, ölüm ve hayatta kalma oranı) parametreleri araştırılmıştır. ICP-MS analizi, sedimentteki nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonu ile larvalar tarafından alınan konsantrasyon arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermiştir. Çalışma sırasında, kronomidlerde önemli bir mortalite gözlenmemiş ve oksidatif stres saptanmamıştır. Bununla birlikte, doza bağlı bir şekilde, 25 mg/kg ve daha yüksek konsantrasyonlarda önemli DNA hasarları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, kısa vadede nano-CeO<sub>2</sub>'nin kronomidler için doğrudan toksik etkisinin olmadığını göstermektedir. Ancak, tek önemli subletal etki genotoksisite çalışmasında 25 mg/kg sediment konsantrasyonunda ortaya çıkmış ve daha yüksek konsantrasyonlarda artarak devam etmiştir.

Tatlı su midyeleri üzerinde nano-CeO<sub>2</sub>'ye maruziyet çalışması iki zaman aralığında (48 saat ve 7 gün) tasarlanmıştır. Bu çalışmada, midyeler tarafından nano-CeO<sub>2</sub> alımı, toplam hemosit sayılarının hesaplanması, histopatoloji ve biyokimyasal analiz (biyo-belirteç deneyleri) parametreleri araştırılmıştır. Her iki zaman aralığında da yapılan deneylerde önemli bir mortalite görülmemesine rağmen, histopatoloji sonuçları sudaki nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonu ile dokularda oluşan hasar miktarı arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Ayrıca, biyo-belirteç analizinde önemli bir değişiklik tespit edilmemesine rağmen oksidatif stres parametrelerinin ikili karşılaştırmalarında sapmalar gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması, kısa sürelerde tatlı su midgeleri ve midyelerinin nano-CeO<sub>2</sub>'ye akut maruziyetinin önemli bir biyolojik risk oluşturmadığını göstermiştir. Ek olarak, midge ve midyelerin nano-CeO<sub>2</sub>'yi vücutlarında önemli ölçüde biriktirebildikleri kanıtlanmıştır. Bu durum bu tatlı su canlılarının ekosistemdeki konumu nedeniyle ekosistemdeki diğer organizmalar için besin ağında trofik transfer yoluyla nano-CeO<sub>2</sub>'nin bir risk oluşturabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Tatlı su midgesi, *Chironomus riparius*, Tatlı su midyesi, *Unio crassus*, Metal oksit, Nanoparçacık, CeO<sub>2</sub>, Toksisite, Sediment, Tatlı su, Genotoksisite, Histopatoloji.

## ABSTRACT

Doctor of Philosophy

### INVESTIGATION OF NUMBER, AMOUNT AND STRUCTURAL PROPERTIES OF ENGINEERING NANOPARTICLES IN TERMS OF AQUATIC ECOTOXICOLOGY

Ezgi Uluer Türkmen

TOBB University of Economics and Technology  
Institute of Natural and Applied Sciences  
Micro and Nanotechnology Science Programme

Supervisor: Assoc. Prof. Hatice Duran Durmuş

Date: August 2021

The release of Cerium oxide nanoparticles (nano-CeO<sub>2</sub>) to the environment has increased with extensive usage of them in many areas ranging from cosmetics to food industry. Therefore, it is included in the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) priority list of engineered nanomaterials. The present study was carried out to assess the nano-CeO<sub>2</sub> toxicity on the freshwater midge, *Chironomus riparius* larvae at concentrations of 2.5, 25, 250, 2500 mg of CeO<sub>2</sub> NP/kg of sediment and freshwater mussels, *Unio crassus*, at concentrations of 10 mg, 25 mg, and 50 mg of CeO<sub>2</sub> NP/L in freshwater.

Firstly, the chemical and structural properties of nano-CeO<sub>2</sub> were characterized by transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive spectroscopy (EDS), X-ray diffraction (XRD), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), A Brunauer–Emmett–Teller (BET), dynamic light scattering (DLS) and zeta potential analyses.

The prolonged exposure of midges to nano-CeO<sub>2</sub> were designed according to OECD test guide 218. The following parameters were investigated: nano-CeO<sub>2</sub> uptake by the

larvae, oxidative stress parameters, *in vivo* genotoxic effect and life trait parameters (developmental time, emergence, mortality and survival rate). ICP-MS analysis showed significant positive correlation between the concentration of the nano-CeO<sub>2</sub> in the sediment and its uptake by the larvae. No significant mortality was observed in *Chironomus riparius* and oxidative stress was not detected. Nevertheless, significant DNA damage was detected in the midges at concentrations of 25 mg/kg and higher, in a dose-dependent manner. Obtained results indicate that nano-CeO<sub>2</sub> is not directly toxic to chironomids. Furthermore, the only significantly induced sublethal effect is genotoxicity which begin to manifest at a concentration of 25 mg/kg of sediment and is progressively increasing at higher concentrations.

Two types of time intervals (48 hours and 7 days) were designed to investigate the effect of nano-CeO<sub>2</sub> exposure on mussels. The following parameters were investigated: nano-CeO<sub>2</sub> uptake by mussels, calculation of total hemocyte counts, histopathology and biochemical analysis (biomarker experiments). Although no significant mortality was observed during the experiments' time frame, histopathology results showed a positive correlation between the concentration of CeO<sub>2</sub>-NPs in the water and the amount of tissue damage. Furthermore, no significant alteration was detected in biomarker analysis. However, it was observed in binary comparisons that oxidation stress parameters were deviating.

As a result, our experiment indicates that exposure to nano-CeO<sub>2</sub> does not induce biological risk for freshwater midges and mussels during acute exposure. In addition, the location of midges and mussels in the ecosystem may pose a risk through trophic transfer to other organisms of the food web due to the significant accumulation and biomagnification of nano-CeO<sub>2</sub> in the midges and mussels.

**Keywords:** Freshwater midge, *Chironomus riparius*, Freshwater mussels, *Unio crassus*, Metal oxide, Nanoparticles, CeO<sub>2</sub>, Toxicity, Sediment, Freshwater, Genotoxicity, Histopathology.

## TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren danışmanım Doç. Dr. Hatice DURAN DURMUŞ'a ve bütün tez sürecim boyunca her daim yanımda olup bana destek olan, çalışmalarına ışık tutan ortak danışmanım Prof. Dr. Figen ERKOÇ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımda bana büyük katkısı bulunan, gerektiğinde benimle laboratuvara girerek birlikte çalışan değerli hocam Prof. Dr. Aysel Çağlan GÜNAL'a ve tez izleme komitemde bulunan Prof. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN'e değerli katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Doktora tez sürecimde ders aldığım tüm TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi öğretim üyelerine, MiNiERG araştırma grubu üyelerine, kronomid çalışmalarını beraber yürüttüğümüz Boris Jovanović ve Dimitrija Savić Zdravković'e, özellikle midye çalışmalarını yaptığım Gazi Üniversitesi'nden Prof. Dr. Figen ERKOÇ'un laboratuvarında deneylerimde bana yardımcı olan arkadaşlarıma ve Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında görev yapan Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN ve Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ'ye tez çalışmalarımındaki katkılarından dolayı çok teşekkür ederim

Ar-ge bursu ile çalışırken doktora yapmama imkân sağlayan okulum TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi'ne ve finansal desteklerinden dolayı Avrupa Birliği destekli NANOFISH projesine çok teşekkür ederim.

Son olarak her zaman yanımda olan annem Fatma ve eşim İbrahim'e katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>viii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>ix</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	<b>xiv</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>xv</b>
<b>SEMBOLOL LİSTESİ</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Mühendislik Ürünü Nanoparçacıklar .....	1
1.1.1 MNP Çeşitleri .....	2
1.1.2 MNP Üretim Yöntemleri .....	3
1.1.3 MNP Uygulama Alanları .....	6
1.1.4 MNP Toksikolojisi .....	8
1.1.5 MNP'lere Maruz Kalma Yöntemleri .....	9
1.2 Nanotoksikoloji .....	9
1.2.1 Karbon Nanotüplerin Toksik Özellikleri .....	11
1.2.2 Titanyum Dioksit (TiO <sub>2</sub> ) Nanoparçacıkların Toksik Özellikleri .....	13
1.2.3 Gümüş (Ag) Nanoparçacıkların Toksik Özellikleri .....	15
1.2.4 Çinko Oksit (ZnO) Nanoparçacıkların Toksik Özellikleri .....	16
1.2.5 Demir/Demir Oksit Nanoparçacıkların Toksik Özellikleri .....	18
1.2.6 Bakır (II) Oksit Nanoparçacıkların Toksik Özellikleri .....	19
1.3 Tez kapsamında kullanılan MNP: Seryum Oksit (CeO <sub>2</sub> ).....	19
1.3.1 Seryum .....	19
1.3.2 Seryum Kimyası .....	20
1.3.3 Seryum ve Seryum Oksitin Geçmişten Bugüne Kullanım Alanları .....	21
1.3.4 Seryum Oksit (CeO <sub>2</sub> ) .....	23
1.3.5 CeO <sub>2</sub> 'nin Kristal Yapısı .....	23
1.3.6 CeO <sub>2</sub> 'nin Uygulama Alanları .....	24
1.3.7 CeO <sub>2</sub> Nanoparçacıkların Toksik Özellikleri .....	25
1.3.8 CeO <sub>2</sub> Ekotoksikolojisinin Araştırılma Nedenleri .....	28
1.3.9 Nano CeO <sub>2</sub> Hakkında Çelişkili Araştırmalar .....	29
1.4 Tezin Amacı .....	30
<b>2. NANO CeO<sub>2</sub>'NİN <i>CHIRONOMUS RIPARIUS</i> ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİ</b> .....	<b>33</b>
2.1 Çalışmanın Amacı .....	33
2.2 Materyal ve Yöntem .....	34
2.2.1 Test Maddesi: Nano CeO <sub>2</sub> .....	34
2.2.2 Karakterizasyon Yöntemleri .....	34
2.2.2.1 Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) .....	34
2.2.2.2 X-Işını Kırınım Yöntemi (XRD) .....	34
2.2.2.3 X-Ray Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) .....	35

2.2.2.4 Brunauer-Emmett-Teller (BET).....	35
2.2.2.5 Dinamik Işık Saçılma Spektroskopisi (DLS) & Zeta Potansiyel .....	36
2.2.2.6 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) .....	36
2.2.3 Test Organizması: <i>Chironomus riparius</i> .....	37
2.2.4 Deney Tasarımı ve Nano CeO <sub>2</sub> 'ye Maruz Bırakma.....	38
2.2.4.1 Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi Analizi (ICP-MS).....	40
2.2.4.2 Yaşam Döngüsü Toksikite Analizi.....	43
2.2.4.3 Toplam Protein İçeriği ve Oksidatif Stres Analizi.....	44
2.2.4.4 Genotoksikite Analizi-Komet Yöntemi (Tek Hücre Jel Elektroforezi) .....	46
2.3 Bulgular .....	49
2.3.1 Nano CeO <sub>2</sub> Karakterizasyonu .....	49
2.3.1.1 Morfolojik Analiz.....	49
2.3.1.2 CeO <sub>2</sub> Nanoparçacıkların Kristal Yapısı .....	51
2.3.1.3 CeO <sub>2</sub> Nanoparçacıkların Yüzey Kimyası.....	52
2.3.1.4 CeO <sub>2</sub> Nanoparçacıkların Yüzey Alanı ve Gözenek Yapısı .....	54
2.3.1.5 CeO <sub>2</sub> Nanoparçacıkların Hidrodinamik Çapları ve Sulu Ortamdaki Kararlılıkları .....	55
2.3.1.6 Sediment Analizleri.....	56
2.3.2 <i>Chironomus riparius</i> larvaları tarafından Nano-CeO <sub>2</sub> alımı.....	61
2.3.3 Nano-CeO <sub>2</sub> 'nin <i>Chironomus riparius</i> 'ların yaşam döngüsü üzerindeki toksik etkisi .....	61
2.3.4 Oksidatif Stres .....	64
2.3.5 Genotoksikite.....	64
2.4 Değerlendirme .....	65
<b>3. NANO CeO<sub>2</sub>'NİN TATLI SU MİDYELERİ ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİ .....</b>	<b>69</b>
3.1 Çalışmanın Amacı .....	69
3.2 Materyal ve Yöntem .....	70
3.2.1 Test Maddesi: Nano CeO <sub>2</sub> .....	70
3.2.2 Test Organizması: Tatlı Su Midyesi ( <i>Unio crassus</i> ).....	70
3.2.3 Deney Tasarımı ve Nano CeO <sub>2</sub> 'ye Maruz Bırakma.....	71
3.2.3.1 Midye Ölçümleri .....	74
3.2.3.2 Hemolemf Alımı ve Toplam Hemosit Sayısının Hesaplanması .....	75
3.2.3.3 Midyelerden Dokuların Çıkarılması.....	75
3.2.3.4 Histopatoloji Çalışması .....	79
3.2.3.5 Biyokimyasal Analizler: Biyo-belirteç Deneyleri.....	80
3.2.3.6 Su Analizi Çalışmaları .....	83
3.2.4 İstatistik Analizler .....	83
3.3 Bulgular .....	84
3.3.1 Midye Ölçümleri .....	84
3.3.2 Hemolemf Alımı ve Toplam Hemosit Sayısının Hesaplanması .....	85
3.3.3 Histolojik Bulgular.....	86
3.3.4 Biyokimyasal Analiz Sonuçları.....	90
3.3.4.1 Toplam Antioksidan Statüsü (TAS).....	90
3.3.4.2 Redükte Glutasyon.....	91
3.3.4.3 Toplam Protein.....	92
3.3.4.4 Glutasyon S-transferaz (GST) Aktivitesi.....	94
3.3.4.5 İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products - AOPP).....	95

3.3.5 Su Analizi Sonuçları .....	99
3.3.5.1 CeO <sub>2</sub> Nanoparçacıkların Dispersiyonu ve Parçacık Boyutu Analizi .	99
3.3.5.2 Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) ile CeO <sub>2</sub> Konsantrasyon Tayini .....	100
3.4 Değerlendirme .....	101
<b>4. DEĞERLENDİRME ve TARTIŞMA .....</b>	<b>105</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>110</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1 : MNP üretim yöntemleri özeti ve sınıflandırması .....	4
Şekil 1.2 : Nanomalzeme kullanım alanları diyagramı.....	8
Şekil 1.3 : Tek duvarlı (SWCNT) ve çok duvarlı (MWCNT) karbon nanotüp görüntüleri.....	12
Şekil 1.4 : Ferroseryum (çakmak taşı).....	21
Şekil 1.5 : CeO <sub>2</sub> için FCC yapısı.....	23
Şekil 2.1 : <i>Chironomus riparius</i> 'un gelişim evreleri.....	38
Şekil 2.2 : Deney prosedürü.....	38
Şekil 2.3 : <i>Chironomus riparius</i> dördüncü instar larvalarında nano CeO <sub>2</sub> ile muameleden sonra DNA hasarını gösteren komet testlerinin fotomikrografları.....	48
Şekil 2.4 : CeO <sub>2</sub> parçacıkların TEM görüntüleri.....	50
Şekil 2.5 : CeO <sub>2</sub> kristal yapısının XRD görünümü.....	52
Şekil 2.6 : CeO <sub>2</sub> nanoparçacıkların XPS spektra incelemesi.....	53
Şekil 2.7 : Ce3d pikinin XPS spektrası.....	53
Şekil 2.8 : O1s pikinin XPS spektrası.....	54
Şekil 2.9 : (a) Tek bir kum yüzeyinde bulunan topaklanmış CeO <sub>2</sub> nanoparçacığın SEM görüntüsü (konsantrasyon nano-CeO <sub>2</sub> /sediment: 2.500 mg/kg), (b) Şekil a'da gösterilen CeO <sub>2</sub> topağının büyütülmüş SEM görüntüsü, (c) aynı noktanın EDX dataları.....	58
Şekil 2.10: (a) Farklı yerlerde topaklanmış CeO <sub>2</sub> nanoparçacıklarının SEM görüntüsü (konsantrasyon nano-CeO <sub>2</sub> /sediment: 2.500 mg/kg), (b) Şekil a'da gösterilen iki noktanın büyütülmüş SEM görüntüsü, (c) ilgili noktaların EDX dataları.....	59
Şekil 2.11: (a) Tek bir kum yüzeyinde bulunan topaklanmış CeO <sub>2</sub> parçacığının SEM görüntüsü (konsantrasyon nano-CeO <sub>2</sub> /sediment: 250 mg/kg), (b) ilgili noktaların EDX dataları.....	60
Şekil 2.12: Nano-CeO <sub>2</sub> 'ye maruz kalan <i>Chironomus riparius</i> 'taki yaşam döngüsü parametreleri: A: Ortaya çıkma oranı, B: Mortalite, C: Gelişim süresi, D: Gelişim hızı, E: ergin midgelerin kümülatif günlük ortaya çıkması....	63
Şekil 3.1 : Deney çalışmasında kullanılan tatlı su midyeleri.....	70
Şekil 3.2 : Sonike edilmiş nano-CeO <sub>2</sub> /Su karışımı.....	72
Şekil 3.3 : İlk gün sağdan sola; kontrol, 10 mg/L, 25 mg/L ve 50 mg/L nano CeO <sub>2</sub> ile dozlanmış akvaryum görüntüleri.....	73
Şekil 3.4 : 48 saat sonra akvaryumların görüntüsü.....	74
Şekil 3.5 : Midye ölçümleri; a) Uzunluk b) Yükseklik c) Kalınlık.....	74
Şekil 3.6 : Hemolemf sıvısının alınma görüntüsü.....	75
Şekil 3.7 : Midye doku örnekleri a) açılmış midye, b) parçalara ayrılmış midye dokuları, c) alüminyum folyoya sarılmış doku numuneleri.....	76
Şekil 3.8 : Histopatoloji çalışması için kasetlere konulan doku örneği.....	77
Şekil 3.9 : Yedinci gün çalışma başlangıcındaki deney düzeneği.....	78

Şekil 3.10 : Yedinci gün tüm midyeler alındıktan sonraki deney düzeneği.....	78
Şekil 3.11 : Midyelerin diseksiyon sonrası iç organ morfolojisi görüntüleri.....	79
Şekil 3.12 : 48 saatlik deney kapsamındaki midye ağırlık grafiği.....	84
Şekil 3.13 : 7 günlük deney kapsamındaki midye ağırlık grafiği.....	85
Şekil 3.14 : 48 saatlik deney kapsamındaki hücre sayısı.....	86
Şekil 3.15 : 7 günlük deney kapsamındaki hücre sayısı.....	86
Şekil 3.16 : Kontrol grubuna ait sindirim bezi.....	88
Şekil 3.17 : 50 mg/L nano CeO <sub>2</sub> 'ye maruz kalan tatlı su midyelerinin sindirim bezinde lipofuscin (küçük ok) ve tubul dejenerasyonu (büyük ok).....	88
Şekil 3.18 : Kontrol grubuna ait solungaç dokusu.....	89
Şekil 3.19 : 7 gün süre ile 50 mg/L nano-CeO <sub>2</sub> 'ye maruz kalan tatlı su midyelerinin solungaçlarında lipofuscin (siyah ok) ve hemolenfatik sinüs genişlemesi (mavi ok).....	89
Şekil 3.20 : 48 saat sonraki TAS verilerinin karşılaştırılması.....	90
Şekil 3.21 : 7 gün sonundaki TAS verilerinin karşılaştırılması.....	91
Şekil 3.22 : 48 saat sonundaki GSH verilerinin karşılaştırılması.....	92
Şekil 3.23 : 7 gün sonundaki GSH verilerinin karşılaştırılması.....	92
Şekil 3.24 : 48 saat sonundaki toplam protein verilerinin karşılaştırılması.....	93
Şekil 3.25 : 7 gün sonundaki toplam protein verilerinin karşılaştırılması.....	94
Şekil 3.26 : 48 saat sonundaki GST verilerinin karşılaştırılması.....	95
Şekil 3.27 : 7 gün sonundaki GST verilerinin karşılaştırılması.....	95
Şekil 3.28 : 48 saat sonundaki AOPP verilerinin karşılaştırılması.....	96
Şekil 3.29 : 7 gün sonundaki AOPP verilerinin karşılaştırılması.....	97

## ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 : MNP çeşitleri .....	3
Çizelge 1.2 : Bazı MNP çeşitleri için en çok kullanılan üretim yöntemleri.....	5
Çizelge 2.1 : ICP-MS Ce konsantrasyonunu belirlemek için ICP-MS işletim parametreleri .....	42
Çizelge 2.2 : Kometlerin hasar miktarına göre sınıflandırılması .....	47
Çizelge 2.3 : Hesaplanan tanecik boyutu değerleri .....	51
Çizelge 2.4 : BET analiz sonuçları .....	54
Çizelge 2.5 : CeO <sub>2</sub> nanoparçacıkların hesaplanmış ortalama hidrodinamik çapları ve polidispersite değerlerinin zamanla değişimi .....	55
Çizelge 2.6 : <i>Chironomus riparius</i> larvalarındaki ICP-MS ile saptanan toplam seryum (Ce) konsantrasyonları ve CeO <sub>2</sub> 'ye oranlanması.....	61
Çizelge 2.7 : Nano-CeO <sub>2</sub> 'lere maruz kalan <i>Chironomus riparius</i> 'ta yaşam döngüsü parametreleri .....	62
Çizelge 2.8 : Nano-CeO <sub>2</sub> 'lere maruz kalan <i>Chironomus riparius</i> 'ta oksidatif stres parametreleri .....	64
Çizelge 2.9 : <i>Chironomus riparius</i> dördüncü instar larvalarında nano-CeO <sub>2</sub> 'nin genotoksik etkisi .....	65
Çizelge 3.1 : Deney protokolü.....	71
Çizelge 3.2 : Ortalama midye ağırlık değerleri .....	84
Çizelge 3.3 : Hücre sayımı değerleri .....	85
Çizelge 3.4 : CeO <sub>2</sub> 'ye maruz kalan tatlı su midyeleri'ndeki histopatolojik bulgular	87
Çizelge 3.5 : Biyokimyasal analiz sonuçları .....	98
Çizelge 3.6 : Farklı konsantrasyonlardaki su numuneleri içindeki CeO <sub>2</sub> nanoparçacıkların ortalama hidrodinamik çapları ve polidispersite değerlerinin zamanla değişimi .....	99
Çizelge 3.7 : Farklı konsantrasyonlardaki su numuneleri içindeki nano CeO <sub>2</sub> miktarları .....	101

## KISALTMALAR

<b>ACTICOAT</b>	: Nanokristal gümüş içerikli antimikrobiyal bariyer pansuman
<b>AOPP</b>	: İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products)
<b>BET</b>	: Brunauer-Emmett-Teller
<b>BSA</b>	: Sığır serum albümini
<b>CMP</b>	: Kimyasal-mekanik cilalama
<b>CNT</b>	: Karbon nanotüp
<b>DLS</b>	: Dinamik Işık Saçılma
<b>DR</b>	: Gelişim hızı
<b>DT</b>	: Gelişim süresi
<b>EDX</b>	: Enerji Dağılımlı X-Işınları Spektroskopisi
<b>ER</b>	: Ortaya çıkma oranı
<b>FCC</b>	: Yüzey merkezli kübik
<b>FDA</b>	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
<b>GSH</b>	: Redükte Glutasyon
<b>GST</b>	: Glutasyon S-transferaz
<b>IARC</b>	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
<b>ICP-MS</b>	: Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi
<b>LMA</b>	: Düşük erime noktalı agar
<b>M</b>	: Mortalite
<b>MDA</b>	: Melonil dialdehit
<b>MDA-TBA</b>	: Melondialdehit-tiyobarbiturat
<b>MNP</b>	: Mühendislik ürünü nanoparçacık
<b>MRI</b>	: Manyetik rezonans görüntüleme
<b>MWCNT</b>	: Çok duvarlı karbon nanotüpler
<b>NP</b>	: Nanoparçacık
<b>OECD</b>	: Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
<b>PBS</b>	: Tamponlu salin agar
<b>PDI</b>	: Polidispersite
<b>PVP</b>	: Polivinilpirolidonun
<b>REACH</b>	: Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, İzni ve Kısıtlanması
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>SWCNT</b>	: Tek duvarlı karbon nanotüpler
<b>TAS</b>	: Toplam Antioksidan Statüsü
<b>TEM</b>	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
<b>THC</b>	: Total hemocyte count
<b>XPS</b>	: X-Ray Fotoelektron Spektroskopisi
<b>XRD</b>	: X-Işını Kırınımı

## SEMBOL LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
$A_{toplam}$	Toplam absorbans değeri
$A_{532nm}$	532nm dalga boyundaki absorbans değeri
$A_{600nm}$	600nm dalga boyundaki absorbans değeri
D.F.	Dilüsyon faktörü
$d_H$	Hidrodinamik çap
GST	Spesifik aktivite



## 1. GİRİŞ

Günümüzün en popüler araştırma alanlarından biri olan nanoteknoloji, ilk olarak 1959 yılında Nobel ödüllü Richard Feynman'ın Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü'nde Amerikan Fizik Derneği toplantısında "There's plenty of room at the bottom" başlıklı konuşması ile hayatımıza girmiştir [1]. Ünlü bilim insanının bu konuşması ile nano ölçekli materyallerin endüstride kullanımı büyük dikkat çekmeye başlamıştır. Daha sonra nano boyuttaki malzemelerin üretimini ve kullanımını sağlayan bu yeni araştırma alanı 1974 yılında Norio Taniguchi tarafından nanoteknoloji olarak adlandırılmıştır [2].

Böylelikle atom ve/veya moleküllerin birleşmesi ile oluşan nanometre ölçekli yeni yapıların elde edilmesi, cihazların üretilmesi, sistemlerin tasarlanması ve karakterizasyonu olarak tanımlanan nanoteknoloji, günümüzde modern teknolojinin yapı taşlarından biri haline gelmiştir [2]. Nanoteknoloji tıp, enerji ve savunma gibi pek çok sektörde aktif olarak yer almaktadır. Böylelikle gelişen bu teknolojilerle de "nano parçacık/partikül" kavramı hayatımıza girmiş bulunmaktadır.

Nano malzemeler doğal ve sentetik olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Doğal nano malzemeler doğal proseslerle kendiliğinden oluşmuş nano boyutlu malzemelerdir. Bu malzemeler mekanik, kimyasal, fotokimyasal, ısıl ve biyolojik gibi yollarla oluşmaktadırlar. Atmosferden geçerken meteor ve kozmik tozların parçalanması, volkanik patlamalar, fırtınalar, kasırgalar, rüzgarlar, dalgalar vb. atmosfer ve doğa olayları sonucunda doğal nano malzemeler oluşmaktadır. Sentetik nano malzemeler ise doğal yollarla oluşmayan nano boyutta endüstriyel üretim ile elde edilen malzemelerdir ve genel olarak "mühendislik ürünü nanoparçacıklar" olarak adlandırılmaktadır.

### 1.1 Mühendislik Ürünü Nanoparçacıklar

Mühendislik ürünü nanoparçacık (MNP), 1-100 nm<sup>2</sup> büyüklüğünde bir veya daha fazla yüzey alanına sahip, endüstriyel olarak üretilmiş malzeme şeklinde tanımlanmaktadır.

MNP'lerin aynı malzemenin yığın (bulk) formuna göre hem farklı hem de sıra dışı kimyasal, fiziksel ve optik özellikler göstermesi son yıllarda dünyada MNP üretiminde ve kullanımında büyük artışa sebep olmuştur. Malzemelerin boyutları azaldıkça sahip oldukları özellikler değişmekte ve yığın formundaki hallerinden farklı özellikler göstermektedir. Örneğin,  $TiO_2$  ve  $CeO_2$  gibi malzemelerin nano boyutlarına inildikçe UV absorplama kapasiteleri ve fotokatalitik aktivitesi artmaktadır. Yığın formundaki karbon temelli malzemelere göre karbon nano tüpler hem elektrik hem de ısı iletkenliği olarak üstün özellikler göstermektedir. Ancak, günümüzde MNP'lerin doğaya karışması sonucu oluşacak etkileri bilinmezliğini korumaktadır [3]. Bu malzemelerin canlılar ve doğa üzerine toksik etkileri olabileceği düşünülmekte ve bu sebeple pek çok araştırma yapılmaktadır. Ancak, bu malzemelerin şekli, boyutu vb. özellikleri değişkenlik gösterdiği için toksik özellikleri konusunda bir arşiv oluşturmak kolay değildir. Bununla birlikte, endüstride kullanımı ve toksikolojik testler için çeşitli öneriler de mevcuttur (U.S. Food and Drug Administration (FDA) ve Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)). 2012 yılında Avrupa Komisyonu, mikro ve nanoparçacıkların boyutlarının standardize edilebilmesi amacıyla bu parçacıkların boyutlarının ölçümlerinde gereksinim duyulan parametrelerin belirlenmesi için bir kılavuz (REACH) yayımlamıştır [4]. Avrupa Komisyonunun çalışmalarının nihai sonucuna göre mevcut yöntemlerin hiçbiri tek başına tüm partikül boyutlarını kapsayacak şekilde parçacıkların sayı-boyut bilgileri ile ilgili sağlıklı bilgi sağlamak için yeterli değildir [4]. Dolayısıyla hali hazırda kullanılan ölçme yöntemleri test edilen partiküllerin komisyon tarafından belirlenen standart tanıma uyup uymadığı konusunda güvenilir bilgiler verememektedir.

### **1.1.1 MNP Çeşitleri**

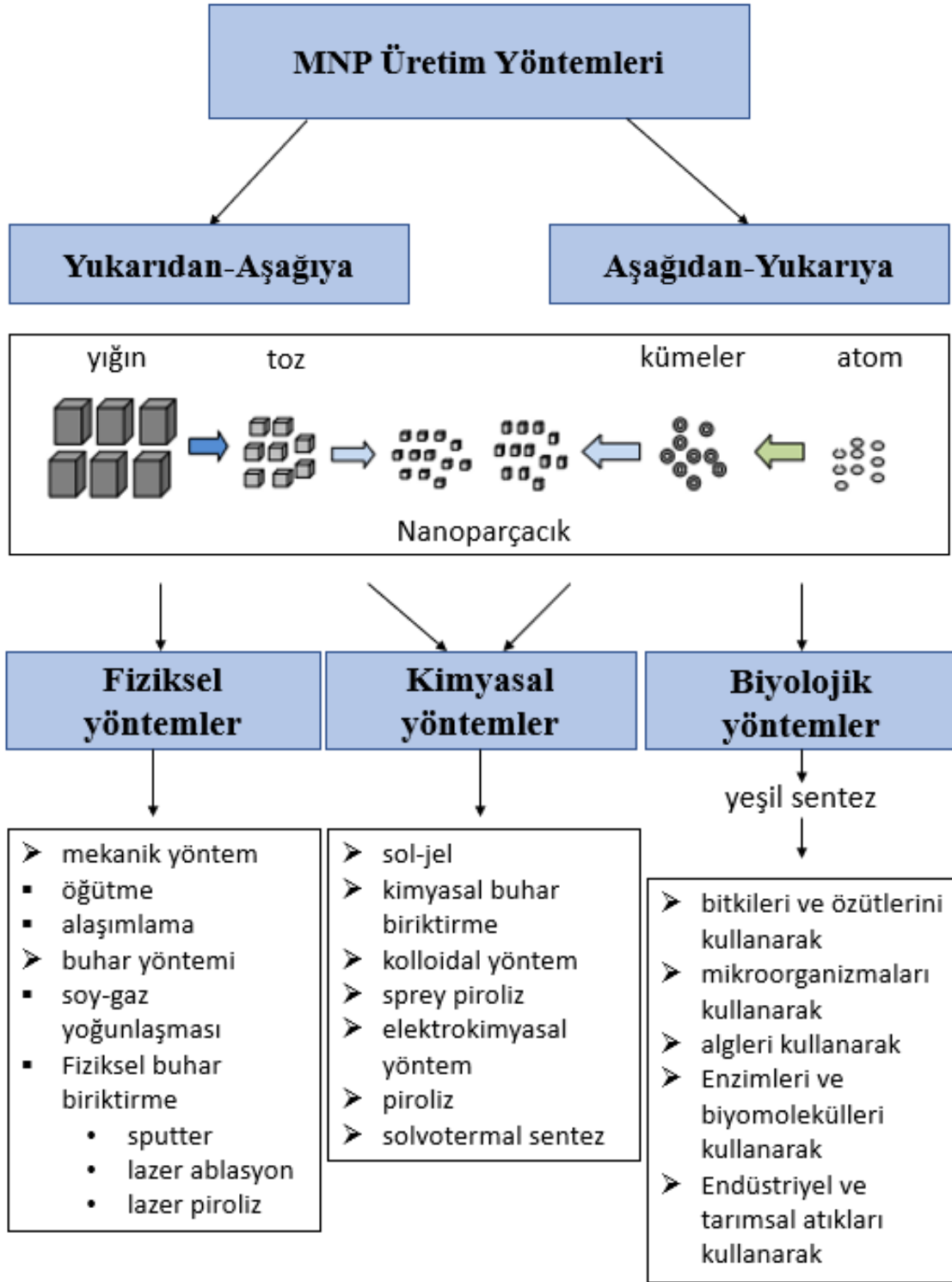
Literatürde mühendislik ürünü bu nanoparçacıklar oluşturuldukları malzemelere göre sınıflandırılmaktadır. Bunlar Çizelge 1.1'de sıralanmıştır [5].

Çizelge 1.1 : MNP çeşitleri.

MNP Çeşitleri	Örnekler
Karbon bazlı nanoparçacıklar	fullerenler ve karbon nanotüpler (tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNTs) ve çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNTs))
İnorganik nanoparçacıklar	metal oksitler (TiO <sub>2</sub> , ZnO, and Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , CeO <sub>2</sub> , vb.)
Nano ölçekli metaller	altın, gümüş, alüminyum, demir vb.
Kuantum noktalar	kadmiyum sülfid ve kadmiyum selenid vb.
Polimer bazlı nanoparçacıklar	Dendrimerler, sentetik polimerler vb.
Kompozitler	nanopartikülleri diğer nanoparçacıklarla veya daha büyük hacimli yapılarla birleştiren kompleks yapıli malzemeler

### 1.1.2 MNP Üretim Yöntemleri

Aynı yapı taşına sahip MNP'ler farklı yöntemlerle üretilebilir ya da sentezlenebilirler böylelikle farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olabilir ve farklı toksik özellikler gösterebilirler. Günümüzde üretilen MNP'ler için en çok kullanılan üretim yöntemleri ve sınıflandırılması Şekil 1.1'de özetlenmiştir [5-12].



Şekil 1.1 : MNP üretim yöntemleri özeti ve sınıflandırması.

Çizelge 1.2 : Bazı MNP çeşitleri için en çok kullanılan üretim yöntemleri [5-12].

<b>Fiziksel yöntemler</b>		
<i>Mekanik yöntemler</i>		<b>Üretilen MNP'ler</b>
	Öğütme	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Metal NP'ler: Fe, Co</li> <li>○ İntermetalik NP'ler: FeCo<sub>3</sub>, CeCo<sub>5</sub></li> <li>○ Tek kristal NP'ler</li> </ul>
	Alaşımlama	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nanokompozit NP'ler</li> </ul>
<i>Buhar yöntemi</i>	Soy gaz yoğunlaşması	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Metal NP'ler: Au, Ag, Pt, Mn</li> <li>○ İntermetalik NP'ler: AuPd</li> <li>○ Çekirdek-kabuk NP'ler: FeAg (çekirdek) – Si (kabuk)</li> </ul>
	Fiziksel Buhar Biriktirme	<p><b>Sputter:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Metal NP'ler: Au, Ag, Pt, Co, Fe, Y</li> <li>○ Metal oksit NP'ler: TiO<sub>2</sub>, ZnO</li> <li>○ Yarı iletken: Ge</li> <li>○ Manyetik: Fe-Pt</li> </ul> <p><b>Lazer ablasyonu:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Metal NP'ler: Ag, Fe, Ni, Se</li> <li>○ Metal oksit NP'ler: ZnO</li> </ul> <p><b>Lazer piroliz:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Metal oksit NP'ler: TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></li> <li>○ Si, SiC, MoS<sub>2</sub></li> </ul>
<b>Kimyasal yöntemler</b>		
	Sol-jel	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Metal oksit NP'ler: ZnO, SnO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></li> <li>○ Seramik NP'ler: TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub></li> </ul>
	Kimyasal Buhar Biriktirme	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Metal oksit NP'ler: CoO, SiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZnO</li> <li>○ Karbon ve silikon bazlı NP'ler: karbon nano tüp (CNT)</li> </ul>
	Termal yöntemler	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Metal NP'ler: Ag, Pt, Zr</li> <li>○ Metal oksit NP'ler: ZnO, CeO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO</li> <li>○ CdS, FeWO<sub>4</sub></li> </ul>
<b>Biyolojik yöntemler</b>		
	Mikroorganizmaları kullanarak	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Metal NP'ler: Ag, Pt, Au, Hg, Cu, Pd</li> <li>○ Metal oksit NP'ler: TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub></li> <li>○ Metal sulfit NP'ler: CdS, PbS</li> </ul>
	Bitkileri ve özütlerini kullanarak	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Metal NP'ler: Ag, Au, Pd, Pt</li> </ul>
	Enzim ve biyomolekülleri kullanarak	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Metal NP'ler: Ag, Au, Pt</li> </ul>

Çizelge 1.2’de günümüzde en çok kullanılan MNP çeşitleri için en yaygın üretim yöntemleri sıralanmıştır. Tez kapsamında kullanılan MNP olan seryum oksitin sentezi için ise literatürde en çok kullanılan yöntem hidrotermal metottur. Ayrıca, solvotermal yöntem, elektrikle biriktirme yöntemi, çöktürme, fiziksel buhar biriktirme, kimyasal buhar biriktirme, yanma ve sol-jel yöntemleri de seryum oksit sentezinde kullanılan yöntemlerdir [12].

### **1.1.3 MNP Uygulama Alanları**

Nanoparçacıkların benzersiz özellikleri nedeniyle, her geçen gün uygulama alanları artmaktadır. Kozmetikler, güneş losyonları, boyalar, kendi kendini temizleme özelliğine sahip camlar, yüksek performanslı lastikler, lekeye dayanıklı giysiler, dolgular, katalizörler ve yarı iletkenler nano yapı malzemelerin popüler kullanım alanlarıdır [13,14]. Nanoparçacıklar ayrıca tenis, golf ve bowling topları gibi malzemelerde, güneş kremi, yüz yıkama jeli gibi kozmetik ürünlerinde de yer aldığı için günlük hayatımızda pek çok kez fark etmeden temas ettiğimiz materyallerdir [13,14].

Son yıllarda nanopartiküller, su arıtma temel olmakla birlikte birçok çevresel çözüm için filtrelerde ve membranlarda da katkı malzemesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, atık su arıtımı için geleneksel absorbanaya önemli bir alternatif olarak nanopartiküllerin kullanıldığı da bilinmektedir [15].

Savunma sanayisi içinde kimyasal-biyolojik silah detektörlerinde veya daha hafif ama daha güçlü silahların üretiminde de performans arttırmak için çeşitli nanopartiküller kullanılmaktadır [16].

"The Nanotechnology Consumer Products Inventory/ Nanoteknoloji Tüketici Ürünleri Envanteri"ne göre en yaygın kullanılan nanoparçacık türü karbon bazlı nanopartiküllerdir. İkinci sırada ise gümüş nanopartiküller gelmektedir [17].

Nanoparçacıklar, kozmetik ürünleri (krem, deterjan, yüz yıkama jelleri, diş macunları vb.), elektronik ürünler (piller, bataryalar vb.), tekstil materyalleri (antibakteriyel, leke tutmayan, kırışmayan kumaşlar vb.), inşaat dolgu malzemeleri (çizilmez, su tutmaz yüzeyler, boyalar vb.), medikal ürünler (biyosensörler, kalp kapakları, antibakteriyel bandajlar, ilaçlar vb.) ve su arıtma sistemleri gibi birçok alanda üretilen nihai üründe katkı malzemesi olarak yer alarak bu ürünlerin kalite ve performansı arttırılmaktadır.

CNT'ler sağlık sektöründe ve alternatif enerji kaynaklarında farklı amaçlarla tercih edilmektedir. Elektronik cihazlarda, implant malzemelerinde, katalizörde, kompozit malzemelerde, biyosensörlerde, çok sayıda biyolojik, medikal ve tıbbi uygulamalarda, su arıtma sistemlerinde kirletici maddeleri sudan uzaklaştırmak için adsorban malzemesi olarak gibi farklı amaçlarla pek çok alanda CNT'ler kullanılabilir [18].

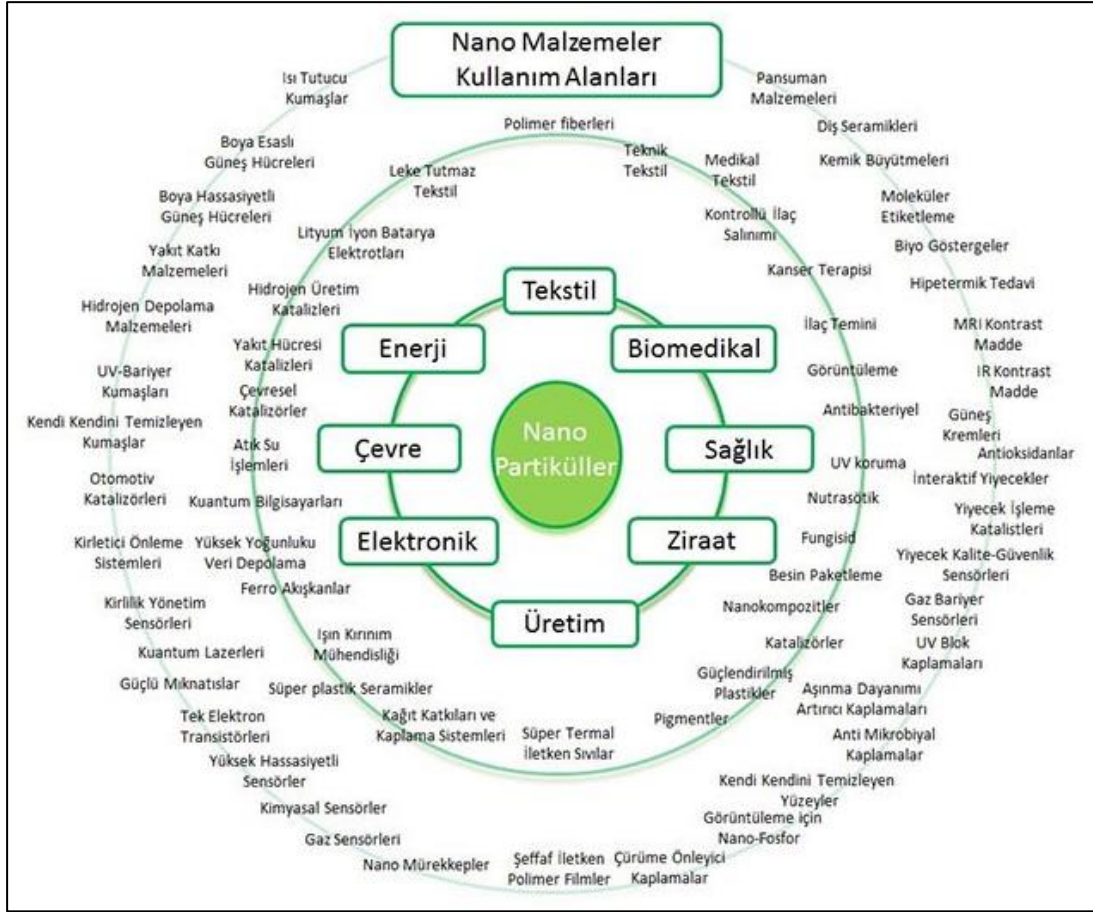
Kalay oksit ( $\text{SnO}_2$ ) nano partiküller, şeffaf iletken cam kaplamalarda, gaz sensörlerinde, güneş pillerinde kullanılmaktadır [19]. Alüminyum Oksit ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), pillerde, bataryalarda, katalizörlerde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır [20].

Titanyum dioksit ( $\text{TiO}_2$ ), gıda boyası, fotokatalizör, pigment, ilaç ve kozmetikte katkı maddesi, boyalar, antibakteriyel ve kendi kendini temizleyen malzemeler, güneş kremi, kozmetikler, UV koruması, kataliz, kendi kendini temizleyen pencere kaplaması, dolgular, katalizör destekleri olarak yaygın kullanılan bir nanomalzemedir [20].

Silikon dioksit ( $\text{SiO}_2$ ), eczacılık ürünlerinde, bitkisel yağ arıtma sistemlerinde, seramiklerde, deterjanlarda, yapıştırıcılarda, kromatografilerde, yangına dayanıklı camlarda, dolgu maddelerinde ve katalizörlerde kullanılan bir materyaldir [21].

Demir (II, III) Oksit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), DNA algılama, ilaç dağıtım sistemi ve kanser tedavisi gibi başta sağlık sektörü olmak üzere, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), manyetik depolama, manyetik soğutma, kontaminasyon uzaklaştırıcı, sensörler gibi pek çok alanda kullanılmaktadır [22].

Seryum oksit ( $\text{CeO}_2$ ) ise kimyasal-mekanik cilalama (CMP) için aşındırıcı malzeme, cila malzemesi, cam sektörü için parlaklık arttırıcı, alternatif enerji kaynakları için elektrolit, oksijen sensörü, gaz sensörleri, yakıt katkı maddesi olarak pek çok alanda kullanılmaktadır [23]. Günümüzde nanopartiküllerin uygulama alanlarını gösteren diyagram Şekil 1.2'de sunulmuştur.



Şekil 1.2 : Nanomalzeme kullanım alanları diyagramı [24].

### 1.1.4 MNP Toksikolojisi

Son yıllarda nanoteknolojinin gelişimindeki hızın artması ile, farklı yapılarda nanopartiküllerin üretimine ve bu yapıların çeşitli alanlarda kullanımına hız verilmiştir. Ancak aynı zamanda, atmosferdeki, doğadaki, su ortamlarındaki nanoparçacık miktarı da istenmeden artmıştır. Bu sebeple, bilim insanlarının bir kısmı nanoteknolojinin cazibesıyla yeni yüksek verimli ve performanslı ürün, sistem ve modeller üretirken bir diğer bilim insanları ise doğaya salınan bu nanopartiküllerin olumsuz etkileri üzerine araştırmalara başlamıştır. Böylelikle günümüzde nanoteknolojinin hızlı gelişimi ve uygulamaları nedeniyle, nanoparçacıklar çevreyi ve insan sağlığını önemli ölçüde tehdit etmeye başlamıştır. Her geçen gün endüstriyel uygulamalarda artan nanoparçacıkların kullanımıyla birlikte bu parçacıkların doğaya, atmosfere, karasal ve su ortamlarına salındığı bilinmekte ve bu da önemli bir araştırma alanı doğurmaktadır.



Aynı atom ya da molekülden üretilmiş olsa bile nano boyuta inildikçe malzemelerin şekil, boyutu vb. özellikleri değişkenlik gösterdiği için toksik özelliklerinin de farklılık gösterebileceği bilinmekte olup bu konu hakkında literatürde yeterli bilgi yer almamaktadır. Genel olarak, nanoparçacıkların, makro boyuttaki malzemelere kıyasla daha çok zarar verme eğiliminde olduğu bilinmektedir. Biyolojik organizmalar yeme, solunum, yüzeye tutunma, gözenekli dokudan içeri girme gibi birçok yoldan nanoparçacıklara maruz kalabilmektedir. Ayrıca her bir nanoparçacık için maruziyet mekanizması da farklılık gösterebilmektedir [25].

### **1.1.5 MNP'lere Maruz Kalma Yöntemleri**

Nanoparçacıklara maruz kalma yolları üç temel yöntem ile açıklanabilir.

1. Mesleki maruziyet: Kişinin üretim/imalat veya araştırma esnasında nanopartiküller ile temas ettiği durumdur.
2. Tüketici maruziyeti: Kişinin, farklı kişisel bakım, güneş kremi, yüz yıkama jeli, deterjan vb. ürünlerinin kullanımını sırasında temas ettiği durumdur.
3. Ekolojik maruziyet: Üretilen nanoparçacıkların hava, su ve toprak yoluyla ekosisteme ulaşması nedeniyle bu parçacıklara maruz kalınması durumudur.

### **1.2 Nanotoksikoloji**

Nanoteknolojinin hayatımıza girmesi ile nanopartiküllerin yüksek miktarda üretimi ve çevreye salınımı ancak ekosistem üzerindeki toksik etkilerinin bilinmemesi "Nanotoksikoloji" kavramının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Nanotoksikoloji, nanoyapıların biyolojik sistemlerle etkileşimlerinin ve etki mekanizmalarının araştırılması anlamına gelmektedir. Nanoparçacıkların yüzey kimyası, malzeme kompozisyonu, boyutu, şekli ve agregasyonu gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerine biyolojik sistemlerin verdiği tepki ile farmakodinamik, farmakokinetik ve metabolizmaları nanotoksikolojinin temel inceleme alanlarıdır [17].

Nano boyuta inildikçe malzemelerin yüzey hacim oranları makro boyutlarına göre artış göstermektedir. Bu karakteristik yüksek yüzey hacim oranı malzemelerin toksik özelliğini de değiştirmektedir. Yapılan araştırmalar gümüş, silikon dioksit, titanyum dioksit gibi nanoparçacıkların boyutu küçüldükçe, biyolojik sistemler üzerindeki toksik etkilerinin arttığını ortaya koymaktadır. Nanoparçacıklar makro boyuttaki malzemelere kıyasla daha fazla toksiklik göstermeye eğilimlidirler. Bu durum,

nanoparçacıkların canlılarda hücre membranına tutunmaları, elektron transferi ve solunumu engelleyebilmeleri gibi çok ciddi sorunları ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca malzemenin boyutu küçüldükçe, özellikle nano mertebelere ulaştıkça erişebildikleri alanlarda da artmaktadır. Canlı dokularında daha rahat emilim sağladıkları ve birikebildikleri çalışmalar ile kanıtlanmıştır [26]. Nano boyutlu malzemelerin yüzey alanı yığın formuna göre yüksek olduğu için yüzeye tutunma kapasitesi de yüksektir. Böylelikle yüzey kimyası, malzeme kompozisyonu gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerinin etkisi de yüzey ile temas oranı yüksek olduğu için artacaktır. Bu durum, azalan boyut ile artan toksik etki oranını açıklamaktadır [27].

Nanoparçacıkların toksikolojisini etkileyen bir diğer özelliği ise formlarıdır. Nanoparçacıklar farklı üretim ve sentez yöntemleri ile farklı boyut ve şekillerde üretilmektedirler. Bu durum toksik özelliklerinde de farklılıklara neden olmaktadır. Farklı şekillerdeki malzemelerin yüzey temas açıları değişmekte böylelikle yüzey kimyaları da farklılık göstermektedir. Bu durum aynı nanoparçacıkların farklı formlarının farklı toksik özellikler göstermesine neden olmaktadır [28].

Nanoteknoloji ile birlikte yüzey kimyası ve yüzey modifikasyonu güncel çalışma alanlarından biri haline gelmiştir. Örneğin, yüzey modifikasyonları ile partiküllerin yüzey yüklerini değiştirerek aynı malzemeye hidrofobik ya da hidrofilik özellik kazandırmak mümkündür. Ancak nanoparçacıkların değişen yüzey kimyası ile doku ve hücrelerle olan etkileşimi de değişmektedir. Nanoparçacıkların toksisitesi yüzeyi fonksiyonlandırılarak arttırılıp azaltılabilir. Bazen ise toksisite, malzemenin sentezinde kullanılan başlatıcı materyalin toksik olması sebebiyle olmaktadır. Bu nedenle nanopartiküller, sentez yöntemine göre de toksik özellik gösterebilmektedir [29]. Nanopartiküller esas olarak canlıların solunum organlarını hedef almaktadır, ancak yapılan çalışmalar ağızdan doğrudan ilaç, su ve gıda alımı ile ya da dolaylı olarak mukus yoluyla mide ve bağırsak sistemine de ulaştığını kanıtlamaktadır [29].

Endüstriyel ve ticari ürünlerde farklı amaçlarla metal oksit nanopartiküllerin artan kullanımı, ekosistemde yüksek miktarda nanopartikül oluşumuna yol açmakta ve ekosisteme karışan nanopartiküllerin varlığı da tehdit edici sonuçlar doğurmaktadır. Karbon bazlı nanopartiküllerin (CNT'ler, fullerenler vb.), gümüş nanopartiküllerin,  $TiO_2$ 'nin,  $ZnO$ 'nun ve nano boyutlu demir partiküllerin çeşitli uygulamalarda sıklıkla

kullanıldıkları ve çevreye salınmaları ile insanları, hayvanları, bitkileri ve sucul türlerini doğrudan etkiledikleri bilinmektedir [30].

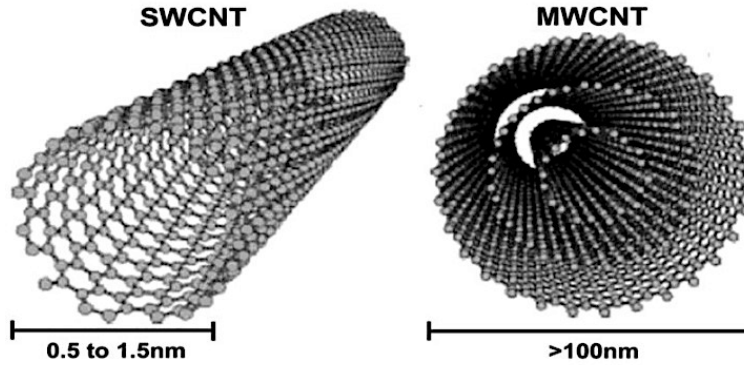
CeO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve CuO nanopartiküller kozmetiklerde ve antimikrobiyal ürünlerin içerisinde yer almaktadır. Bu nedenle bu nanopartiküllerin atık sular yoluyla, kişisel kullanım sebebiyle ya da yüzme gibi aktiviteler sonucunda sucul ekosistemlerine girme olasılığı çok yüksektir. Nanopartiküllerin sucul ekosistemine ulaşması flora, fauna ve hatta insanlar üzerinde toksik etkiler oluşturabilmektedir. Nanopartiküllerin toksisitesini gözlemek için birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılmaktadır. *In vitro* çalışmanın sonuçlarının *in vivo* çalışma ile iyi bir korelasyon gösterdiği, ancak bazen *in vitro* çalışmanın sonuçlarının *in vivo* çalışmada uygulanmadığı bildirilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* çalışma arasındaki ilişkiyi gözlemek için yapılan bir çalışmada, sıçanlarda bazı karbonil demir, kristalin silika, amorf silika, nano boyutlu çinko oksit ve ince boyutlu çinko oksidin *in vitro* ve *in vivo* pulmoner toksisite profilleri karşılaştırılmıştır. *In vivo* ve *in vitro* ölçümleri arasında çok az korelasyon olduğunu gözlemlenmiştir [31].

Nanoteknolojinin artan uygulama alanları ile artan nanoparçacık üretimi bu parçacıkların toksik etkileri üzerine de araştırma yapma ihtiyacı doğurmuştur. Nanoparçacıkların yüzey kimyası, malzeme kompozisyonu, boyutu, şekli ve agregasyonu gibi fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle aynı malzeme bile olsa biyolojik sistemlerin verdiği toksik tepki değişiklik gösterdiği için nanotoksikoloji alanında oldukça farklı ve çeşitli araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde çokça kullanılan bazı nanoparçacıkların toksik etkileri ile ilgili yapılan bazı çalışmalar aşağıda derlenmiştir.

### **1.2.1 Karbon Nanotüplerin Toksik Özellikleri**

Karbon nanotüpler (CNT'ler), spesifik mekanik, elektriksel ve manyetik özellikleri nedeniyle en çok kullanılan nanoparçacıklardan biridir. İlk olarak Ijima tarafından 1991'de keşfedilen karbon nanotüpler, tek bir grafit tabakasının yani grafenin yuvarlanarak silindir formuna getirilmesi ile üretilmiştir ve karbon nanotüpler karbonun allotropik bir modifikasyonudur. Altıgen kafes yapıya sahip grafit levhadan oluşturulmuş dikişsiz silindir yapıya sahiptirler [32]. Sıra dışı özelliklere sahip olan bu malzemeler kimyasal ve termal olarak çok kararlıdır [33]. CNT'lerin iki temel

formu bulunmaktadır. Bunlar, tek duvarlı (SWCNT) ve çok duvarlı (MWCNT) karbon nanotüpleridir.



Şekil 1.3 : Tek duvarlı (SWCNT) ve çok duvarlı (MWCNT) karbon nanotüp görüntüleri [34].

Hem SWCNT'ler hem de MWCNT'ler, birbirinden farklı ve sıra dışı özelliklere sahiptir. CNT'ler yüksek sıcaklıklarda ( $800^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar) kararlı yapıya sahiptir. CNT'ler yüksek termal iletkenlik (MWNT için yaklaşık  $2000 \text{ W/Mk}$  ve SWNT için yaklaşık  $6000 \text{ W/Mk}$ ) ve elektriksel iletkenlik (MWNT için yaklaşık  $10^3 - 10^5 \text{ S/cm}$  ve SWNT için yaklaşık  $10^2 - 10^6 \text{ S/cm}$ ) değerlerine sahiptir. SWNT'lerin young modülü yaklaşık  $1 \text{ TPa}$  ve MWNT'lerin yaklaşık  $1.28 \text{ TPa}$ 'dır. CNT'ler yüksek mukavete sahiptirler. Özellikle elektronik özellikleri ticari ve endüstriyel alanlarda pek çok uygulamada kullanılmalarına imkân sağlamaktadır [34].

CNT'ler, yakın kızılötesi bölgede benzersiz absorpsiyon özelliğine sahiptir, bu özellik biyolojik algılama/duyarlılık imkânı sağlamaktadır. CNT'lerin nano boyutta olması proteinler ve DNA gibi makromoleküllerle kolay etkileşime girmesini sağlamaktadır. Yakın kızılötesi bölgedeki absorpsiyon özelliği ve sahip oldukları eşsiz tek boyutlu içi boş silindirik yapıları sayesinde CNT'ler, Lazerle Isıtmalı Kanser Tedavisi'nde (Laser heating cancer therapy) ve yeni ilaç/gen dağıtım sistemlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca, CNT'lerin elektronik özellikleri hassas ve spesifik uygulama alanlı nano ölçekli biyosensörlerin geliştirilmesi için kullanılmaktadır. CNT'ler çeşitli elektroanalitik nanotüp cihazlarının ve yapay kaslar için elektromekanik aktüatörlerin üretiminde de kullanılmaktadır. [35, 36].

CNT'lerin nanoteknolojideki bu geniş kullanılma kapasitesi hem ekosistem hem de insan için yüksek dozda bu nano malzemeye maruziyete sebep olmaktadır. Bu nedenle

CNT'lerin hem toksisitesinin hem de biyoyumluluğunun incelenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda, CNT'lerin vücuda girmesiyle akciğer, deri ve vücudun diğer kısımları üzerindeki doğrudan veya dolaylı zararlı etkileri araştırılmaktadır [37]. Bu araştırmalar, CNT'lerin toksisitesinin boyut, doz ve ortama bağlı olduğunu göstermektedir [38].

Sıçanlar ve fareler üzerinde yapılan bazı çalışmalar, SWCNT ve MWCNT'nin akciğerlerde oksidatif stres, inflamasyon, granülomlar ve fibrozisi uyardığını göstermiştir [39]. Karbon nanotüplerin 24 saat maruziyetten sonra insan akciğer tümör hücreleri için önemli ölçüde toksik olduğu bulunmuştur [40]. Bir araştırmada, beş farklı karbon nanopartikülünün (SWCNT'ler, aktif karbon, karbon siyahı, MWCNT'ler ve karbon grafitin) insan fibroblast hücreleri üzerindeki toksikolojik etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir. Tespit edilen nanopartiküllerin tanımlanmamış formlarından daha fazla toksik etki gösterdikleri görülmüştür [41]. CNT'lerin hücre hasarından sorumlu olan hücre içi Reaktif Oksijen Türlerinde (ROS) doz ve zamana bağlı olarak bir artışa neden olduğu bulunmuştur. CNT'lerin tek hücreli ilkel canlılar olan protozoada büyümeyi inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, CNT'lerin tıpkı asbest gibi akciğer hastalığına neden olabildiği bildirilmiştir [42].

Cheng ve arkadaşlarını yaptığı çalışmada ise MWCNT'lerin zebra balığı (*Danio rerio*) üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu *in vivo* çalışmada, fonksiyonelleştirilmiş MWCNT'lerin zebra balığının büyümesindeki uzun süreli embriyotoksik etkisi incelenmiştir. Bir hücreli aşamada fonksiyonelleştirilmiş MWCNT'lerle yüklü zebra balıklarının daha düşük hayatta kalma oranlarına sahip olduğu gözlenmiştir [43].

### **1.2.2 Titanyum Dioksit (TiO<sub>2</sub>) Nanoparçacıkların Toksik Özellikleri**

Titanyum dioksit nanoparçacıklar, ilaç, gıda, kozmetik gibi birçok sektörde boya ve katkı maddesi olarak en çok tercih edilen nanoparçacıklardan biridir [44]. Güneş kremleri ve kendi kendini temizleyen pencere kaplamaları gibi pek çok ticari ürünün içinde nano boyutlu TiO<sub>2</sub> bulunmaktadır [45]. Bu nedenle bu partiküle en çok deri ve solunum yoluyla maruz kalınmaktadır. Yapılan başka bir çalışmada, TiO<sub>2</sub>'nin beyin murin mikroglia hücrelerini etkilediği kanıtlanmıştır [46].

Hu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, farklı metal oksit nanopartiküllerin (ZnO, CuO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, SnO<sub>2</sub> ve TiO<sub>2</sub>) *Escherichia coli* test organizması üzerindeki *in vitro* sitotoksitesi araştırılmıştır. Daha yüksek katyon yüklü TiO<sub>2</sub>'nin daha düşük sitotoksiteye gösterdiği görülmüştür. Tüm metal oksitler arasında, ZnO'nun en toksik olduğu bulunmuştur [47].

Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, nano boyutlu TiO<sub>2</sub>'nin serbest radikaller üretebildiği ve yüksek oksitleme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir [48].

Lovern ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *Daphnia magna*'nın, ortalama çapı 30 nm olan TiO<sub>2</sub> nanoparçacıklara maruz bırakıldığında, 100–500 nm'ye maruz kalanlara göre daha yüksek ölüm oranı sergilediği raporlanmıştır [49].

TiO<sub>2</sub>, üç ana kristalografik yapıda (anataz, rutil ve brookit) bulunmaktadır. Bu formların her biri farklı özelliklere sahip olmakta ve bu nedenle farklı uygulamalarda kullanılmakta böylelikle farklı çevresel etkiler göstermektedir. Ayrıca, ışık altında mikroorganizmalar, TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerden olumsuz etkilenerek ROS üretmektedir. TiO<sub>2</sub> nanopartikülleri suda yaşayan organizmalarda oksidatif stres üretimine neden olmaktadır. Gökkuşluğu alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerine maruz kaldıktan sonra inflamasyon ve solunum sıkıntısı gözlemlenmiştir [50].

Tatlı su salyangozu *Physa acuta* (Draparnaud) üzerindeki farklı TiO<sub>2</sub> ( $\gamma$ -alümina,  $\alpha$ -alümina, modifiye TiO<sub>2</sub> (M-TiO<sub>2</sub>) ve ticari TiO<sub>2</sub>) nanopartiküllerin etkisini göstermek için Musee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada,  $\gamma$ -alümina/ $\alpha$ -alümina konsantrasyon oranındaki artışın embriyo kuluçka kabiliyetinde ve embriyo büyüme hızında hayati bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca nanopartiküllerin embriyoların gelişiminde deformasyona neden olduğu gözlemlenmiştir [51].

Sadiq ve arkadaşlarının yaptığı mikroalg türleri (*Scenedesmus sp.* ve *Chlorella sp.*) üzerinde TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin ekotoksite çalışmasına göre, TiO<sub>2</sub>'ye maruz kalmış alg türlerinin klorofil içeriğinin, maruz kalmamış algelere kıyasla azaldığı fark edilmiştir [52].

Seitz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada TiO<sub>2</sub> nanoparçacıkların boyut, yüzey ve kristal yapısının *Daphnia magna* ve *Gammarus fossarum* üzerindeki etkileri

incelenmiş, nanopartikül toksisitesinin partikül özelliklerine bağlı olduğu bildirilmiştir [53].

İki TiO<sub>2</sub> formunun (anataz ve anataz/rutil karışımı) *Danio rerio* balıklarının embriyosu üzerindeki etkileri incelenmiş, anataz / rutil karışımının, anataza kıyasla larvaların daha fazla ölümüne neden olduğu raporlanmıştır [54].

2006 yılında, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) TiO<sub>2</sub>'yi insanlar ve hayvanlar için muhtemel kanserojen maddeler sınıfına koymuştur. TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin farklı faz bileşimlerinin (örneğin, anataz ve rutil karışımı) akciğer hücrelerinde sitotoksositeye neden olduğu raporlanmıştır. Anataz TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin aynı orandaki rutil TiO<sub>2</sub>'ye göre 100 kat daha toksik olduğu gözlenmiştir, bu da insan akciğer epitel hücrelerindeki oksidatif hasarın nanopartiküllerin kristal faz bileşimine büyük ölçüde bağlı olduğunu ortaya koymuştur [55].

### **1.2.3 Gümüş (Ag) Nanoparçacıkların Toksik Özellikleri**

Gümüş nanoparçacıklar antiseptik özelliklerinden dolayı kremlerde, tekstil ürünlerinde, kumaşlarda, cerrahi protezlerde, kozmetiklerde ve birçok tüketici ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hem nano hem de yığın formundaki gümüş antiseptik özelliğe sahiptir. Ancak, nano ölçekli gümüş daha geniş yüzey alanı sahip olması nedeniyle daha yüksek bir antimikrobiyal özellik gösterebilmektedir [56].

ACTICOAT (Nanokristal Gümüş İçerikli Antimikrobiyal Bariyer Pansuman) yıllardır yaraları iyileştirmek için kullanılmaktadır. ACTICOAT pansuman, bası yarası, venöz bacak yarası, diyabetik yaralar, yanıklar, donör ve alıcı doku greft yerleri için antimikrobiyal bariyer tabakası olarak kullanılmaktadır [57].

Yaygın uygulamaları nedeniyle, nano ölçekli gümüş partiküller, çevreye kolayca dağılmaktadır. Derinin gümüş nanopartiküllere maruziyetinin potansiyel toksisitesi, insan epidermal keratinosit canlılığının azalması olarak ortaya çıkmaktadır [58].

Yapılan çalışmalar Ag nanopartiküllerin çevreye de zararları olabileceğini göstermektedir. Ag nanoparçacıklarına maruziyet genomik ve proteomik değişikliklere neden olabilmektedir. Gümüş nanopartiküller kök ucu hücrelerinde morfolojik modifikasyona neden olmaktadır [59]. Gümüş nanopartiküllerin *Catla*

*catla* ve *Labeo rohita* üzerinde sitotoksik etkiler oluşturduğu raporlanmıştır. Bakır ve gümüş nanopartiküllerin *Drosophila*'ların yetişkin yaşam süresini ve sperm rekabetini azaltabileceği belirtilmiştir [60].

Gümüş nanopartiküllerin, nitrifikasyon bakterilerinin P, S ve N döngülerini sağlayan enzimleri engellediği raporlanmıştır. Ayrıca DNA transkripsiyonunu ve adenzin trifosfat (ATP) üretimini bloke ettikleri de bildirilmiştir. Gümüş nanopartiküller, proteinlerle reaksiyona girerek proteinlerin aktivasyonu engellediği ve bakteri solunumunu kestiği belirtilmiştir [61].

Ag nanoparçacıkların gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) hepatositlerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışma, Ag nanoparçacıkların hormonların düzenlediği hücre sinyal yollarını etkileyebileceğini öne sürmüştür [62].

Fajardo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, Ag veya Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerin maruziyetinin toprak bakterilerinde (*Pseudomonas stutzeri* ve *Bacillus cereus*) sitotoksik etkileri gözlemlenmiş ve nanopartikül uygulanan topraklarda bakteriyel transkripsiyon yanıtında azalma tespit edilmiştir [63].

Katuli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, gümüş nanopartiküllerin eritrosit asetilkolinestraz (AChE) ve Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase aktivitelerini inhibe edebileceği ve ergin zebra balıklarında (*Danio rerio*) plazma biyokimyasını etkileyebileceği raporlanmıştır [64].

İplik kurdu (*Caenorhabditis elegans*) üzerinde çıplak ve polivinilpirolidonun (PVP) kaplı Ag nanopartiküllerin kıyaslanması için Ahn ve arkadaşlarının yaptığı toksisite çalışmasında ise kaplanmış gümüş nanopartiküllerin çıplak gümüş nanopartiküllere kıyasla daha toksik olduğu sonucuna varılmıştır. Böylelikle yüzeyde yapılan değişikliklerin de toksisiteyi değiştirdiği kanıtlanmıştır [65].

#### **1.2.4 Çinko Oksit (ZnO) Nanoparçacıkların Toksik Özellikleri**

Çinko oksit (ZnO) parçacıklar nano boyutta sahip oldukları farklı özellikler sayesinde son yıllarda tercih edilen nanomalzemelerdendir. ZnO nanoparçacıklar güneş kremi ve kozmetik ürünlerde kullanılmaktadır. Ayrıca, nano ölçekteki ZnO farklı elektronik ve optoelektronik özelliklere sahiptir böylelikle biyosensörlerde, diş dolgu



malzemelerinde ve yara iyileşmesi amaçlı tıbbi uygulamalarda kullanılabilir [66].

ZnO nanoparçacıkların yaygın kullanımı nedeniyle, bu nanoparçacıkların çevreye ulaşması ve dağılması kaçınılmazdır. Son yıllarda, diğer metal oksit nanoparçacıklar gibi ZnO nanoparçacıklarının potansiyel toksisitesi üzerine araştırmalar yapılmış ve bu nanoparçacıkların doğrudan ya da dolaylı yolla fauna, flora, hayvanlar ve insanlar için bir tehdit oluşturduğu sonucuna varılmıştır [67]. ZnO nanoparçacıklarının gün geçtikçe artan kullanımı nedeniyle hem biyolojik sistemlerle biyouyumluluğunun hem de ekosistemdeki etkisinin araştırılması oldukça önemlidir.

Nations ve arkadaşlarının ZnO nanoparçacıkların ekosistemdeki etkisini araştırdığı çalışmada, nano ZnO'nun *Xenopus laevis* üzerindeki etkisi incelenmiştir. Yüksek dozda ZnO nanoparçacıklarına maruz kalan *Xenopus laevis* öldüğü veya büyüme hızının düştüğü raporlanmıştır [68].

Su ekosistemlerinde ise ZnO nanoparçacıklarının varlığının, yosun gibi gıda kaynaklarını azaltabileceği belirtilmiştir. Su ekosistemlerine yüksek konsantrasyonlarda salınan ZnO nanoparçacıklarının, amfibiler gibi suda yaşayan organizmalar üzerinde zararlı etkileri olabileceğini bildirilmiştir. Zebra balıkları üzerine yapılan çalışmada ise ZnO nano materyaline maruz kalan zebra balıklarının ölüm oranının önemli ölçüde arttığı ve larva çıkış oranının azaldığı raporlanmıştır [69].

ZnO nanoparçacıklarının, metal oksit MNP'ler arasında en toksik nanoparçacık olduğu bildirilmiştir. Fine ve arkadaşlarının solunum üzerine yaptığı çalışmada, domuzların ZnO'yu solması durumunda solunum fonksiyonunda bozulmaya (akciğer bozuklukları) neden olduğu, insanlarda solunum durumunda ise, metal ateşi hastalığına neden olabileceği belirtilmiştir [70].

Ayrıca, ZnO nanoparçacıklarının hücre hasarına neden olduğu üzerine de literatürde çalışmalar bulunmaktadır. Bu parçacıkların hücre zarında hasara neden olmak için hücrelere girmesine gerek olmadığı, parçacık ile hücre duvarı arasındaki temasın yeterli olabileceği ve bu temas ile metallerin çözünürlüğünün arttığı bildirilmiştir.

Brunner ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ZnO nanoparçacıklarının çözünmesi ile ortaya çıkan metal iyonlarının akciğer hücre hatlarındaki *in vitro* toksisiteden sorumlu olduğu bildirilmiştir [71].

ZnO nanoparçacıklarının ekosistem üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar da literatürde yer almaktadır. Zebra balıkları üzerine yapılan çalışmada, balıkların gelişimi üzerindeki nöro-davranışsal toksisitesi incelenmiştir. ZnO nanoparçacıklarına maruz bırakılan zebra balıklarında embriyo-larva gelişimi sırasında yumurtadan çıkma gecikmesi gözlemlenmiştir [72].

ZnO nanoparçacıklarının fare dermal fibroblast hücreleri (mDF'ler) ve insan periodontal ligament fibroblast hücreleri (hPDLF'ler) üzerindeki olumsuz sitotoksik etkileri olduğu da raporlanmıştır [73].

### **1.2.5 Demir/Demir Oksit Nanoparçacıkların Toksik Özellikleri**

Nano yapılı demir oksitler, biyomedikal görüntüleme, manyetik hedefli ilaç dağıtımı, çevresel kataliz, manyetik depolama vb. pek çok nanoteknoloji ile ilgili alanlarda çeşitli potansiyel uygulamalara sahiptir. Çevre ve biyomedikal alanında geniş kullanımı, demir ve demir oksit nanoparçacıklarının çevre ve canlılar üzerindeki toksik etkilerinin araştırılmasını önemli kılmaktadır. Demir oksit nanoparçacıklar birçok çeşitli yöntem ile üretilmektedir ve farklı pek çok türü bulunmaktadır [3].

Karlsson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Hematit ( $Fe_2O_3$ ) nanoparçacıkların hücre canlılığını azalttığı raporlanmıştır. Hücrelerde oksidatif stresin artması ile antioksidan savunma sistemi enzimlerinin aktivitesinde azalma meydana geldiği bildirilmiştir [74].

Karlsson ve arkadaşları,  $Fe_2O_3$ ,  $Fe_3O_4$ ,  $TiO_2$  ve  $CuO$  gibi bazı metal oksit mikro ve nanoparçacıkları karşılaştırarak toksisitelerini incelemiştir. Bu nanoparçacıklara insan hücre hattı A549 maruz kaldığı zaman, hücre ölümü, mitokondriyal hasar, DNA hasarı ve oksidatif DNA lezyonları olduğu raporlanmıştır. Bu çalışma,  $CuO$  nanoparçacıklarının  $CuO$  mikropartiküllerine kıyasla çok daha toksik olduğunu kanıtlamıştır.  $TiO_2$  partikülleri için ise mikro boyutlular, nanoparçacıklara kıyasla daha fazla DNA hasarına neden olmuştur [74].

Bregoli ve arkadaşları, yedi farklı nanoparçacığın ( $Sb_2O_3$ ,  $TiO_2$ ,  $Fe_2O_3$ ,  $Fe_3O_4$ , Au, Co ve Ag) insan hematopoietik projenitör hücrelerinin primer kültürü üzerindeki toksik etkisi araştırmıştır. Bu araştırmaya göre bu yedi partikülün tümü arasında  $Sb_2O_3$  ve kobalt (Co) nanoparçacıklar diğerlerinden daha toksik bulunmuştur. Ayrıca,  $Sb_2O_3$  nanoparçacıkların eritroid progenitörlerinin proliferasyonunu bozduğu raporlanmıştır [75].

### 1.2.6 Bakır (II) Oksit Nanoparçacıkların Toksik Özellikleri

Nanoteknolojinin gelişimi ile kullanımını artan bir diğer nano malzeme olan CuO ile ilgili de literatürde yapılan toksikoloji çalışmaları bulunmaktadır.

CuO nanoparçacıklarının bir tür tatlı su canlısı olan *Allogamus ligonifer* üzerindeki öldürücü etkileri araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonda (0, 50, 100, 250, 500 ve 1000 mg/L) CuO nano süspansiyonlar hazırlanarak yapılan çalışmada yüksek konsantrasyonlarda ölümcül etkilere yol açtığı görülmüştür [76].

CuO nanoparçacıklarının memeli hücrelerine etkisi üzerine Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, CuO nanoparçacıklarının, doza ve boyuta bağlı olarak H4 ve SHSY5Y hücrelerinin ölümüne neden olduğu raporlanmıştır [77].

### 1.3 Tez kapsamında kullanılan MNP: Seryum Oksit ( $CeO_2$ )

Günümüzde pek çok alanda kullanılan MNP'lerden biri de seryum dioksit nanoparçacıklardır ( $CeO_2$  NP).  $CeO_2$  NP'lerin boya, kozmetik, temizlik gibi sektörlerde kullanımı ve bu sektörlerde üretim yapan fabrikaların atık sularını denize bırakması ile  $CeO_2$  NP'ler kolaylıkla doğal su ortamlarına karışmaktadır. Bu sebeple,  $CeO_2$  NP'ler su ortamındaki canlılara farklı yollarla nüfus etmektedir ve suçul canlıları üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar da böylelikle gittikçe önem kazanmaktadır. Ayrıca, OECD,  $CeO_2$  NP içeren malzemelerin test edilmesi için OECD, 2010b kodlu bir öncelik listesi yayınlamıştır [78].

#### 1.3.1 Seryum

Seryum (Ce), periyodik tablodaki metallerin lantanit serisine ait bir elementtir. Seryum, 1803 yılında Jöns Jacob Berzelius ve Wilhelm Hisinger tarafından İsveç Bastnas'taki demir madeninde bulunan silikat minerali Cerite içinde keşfedilmiştir.

Daha sonra seryumun iki oksit hali olduğu bulunmuştur. Bunların birincisinin renksiz tuz formunda, diğerinin ise sarı kırmızı renkte olduğu tespit edilmiştir. Bulunan elementin ismi için güneş sisteminin en büyük cüce gezegeni olan Ceres asteroitinden esinlenerek “Seryum” olarak adlandırılmıştır. Seryum ilk olarak 1803 yılında keşfedilmesine rağmen o yıl saf metal formu izole edilememiştir, metal seryumun ilk eldesi 1839 yılında İsveçli kimyager Carl Gustaf Mosander tarafından yapılmıştır [79,80].

Ce yer kabuğunda bulunan nadir toprak metalleri içinde kütlece %0,0046 oranıyla en çok bulunan elementtir [79, 81]. Ce ve diğer lantanit metaller, silikatlar, fosfatlar, oksitler gibi çevrede bulunan minerallerin içerisinde doğal olarak oluşmaktadır [79].

### 1.3.2 Seryum Kimyası

Doğal olarak oluşan Ce'nin %89'u dört kararlı izotoptan oluşmaktadır ( $^{136}\text{Ce}$ ,  $^{138}\text{Ce}$ ,  $^{140}\text{Ce}$ ,  $^{142}\text{Ce}$ ). Bu dört izotoptan  $^{140}\text{Ce}$ , %88,5'i doğal olarak oluşan en bol bulunan çeşittir. Seryum, lantanitler arasında en yaygın bulunan nadir toprak elementidir. Seryum'un elektron konfigürasyonu:  $[\text{Xe}] 4f^1 5d^1 6s^2$  şeklindedir. Ce, diğer lantanitlerden farklı olarak, değişken elektron yapıları sergilemektedir. İçerideki 4f enerji seviyesi, dışarıdaki veya valans elektronların enerjisi ile neredeyse eşittir. Elektron seviyelerindeki yakın boşluklara geçmek için ihtiyaç duyulan enerji çok az olduğundan, seryumda  $+3$  ve  $+4$ 'te çift valans durumu oluşmaktadır [79].

Seryum, bu sıra dışı özelliği sayesinde genellikle üç değerli ( $\text{Ce}^{3+}$ ) ve dört değerli ( $\text{Ce}^{4+}$ ) durumlarda aynı anda bulmaktadır. Diğer lantanitler sadece üç değerli durumda kararlı iken, seryum dört değerli durumda da özgün bir kararlılık göstermektedir. Bu özellik, seryumun oksidasyonunu ( $\text{CeO}_2$  oluşumunu) ve böylelikle diğer nadir toprak elementlerinden kolayca ayrılmasını sağlamaktadır [79]. Seryumun, seryum dioksit ve Ce (III) oksit, arasındaki geçişi serya döngüsü olarak adlandırılmaktadır. Serya döngüsü, hidrojen üretimi için kullanılmaktadır. Serya ise, florit yapıdadır ve beyaza yakın soluk sarı renge sahiptir [82].

Seryumun redoks özelliği sayesinde seryum oksit genellikle katalizör olarak kullanılmaktadır. Nano boyuta inildiği zaman ise seryum oksit nanoparçacıklar çoğunlukla Ce(III) ve Ce(IV) karışımı olarak bulunmaktadır. Nanoparçacık içindeki Ce(IV) miktarının artması ile daha güçlü katalaz etki ortaya çıkmaktadır [83].

Ce'nin bir diğere özelliği ise, diğere lantanitlerin  $E^\circ$  değeri 2.9 iken, Ce(IV)suda/Ce(III)suda için  $E^\circ$  değeri 1.72 V'tur. Bu değere Ce'nin pH gibi hidroliz ve kompleks oluşturma özelliklerine bağlıdır [79, 84].

Seryum, oksitlenme özelliği yüksek bir elementtir. Bu açıdan demire benzer özellik göstermektedir demirin paslanma özelliği gibi yüzeyinde oksit bir tabaka oluşturmaktadır. Seryumun yüzeyi yaklaşık bir yıl içinde tamamen korozyona uğramaktadır [79].

Seryumun kimyasal sembolü "Ce"dir. Atom numarası 58, atom ağırlığı 140,11, yoğunluğu 6,77'dir. Erime noktası 799 derece, kaynama noktası 3443 derecedir. Periyodik element tablosunun 3-B grubunda yer alan lantanit serisinin ikinci elementidir. Geleneksel olarak nadir toprak elementlerinden kabul edilir. Kristal yapısı, 726 derecenin altında yüzey merkezli kübik kafes şeklindedir. 726 derecenin üzerinde vücut merkezli kübik bir kristal yapıya geğer. Gümüş parlaklığında, gümüşü beyaz renkte, yumuşak, sünek bir metaldir. Bileşiklerinin bazıları sarı ve kırmızı renklidir. Saf seryum bıçak ile kesilebilir, kolayca işlenebilir, elektropozitifliği yüksektir [79-84].

### 1.3.3 Seryum ve Seryum Oksitin Geçmişten Bugüne Kullanım Alanları

Seryum ilk olarak Avusturyalı kimyager Carl Auer Von Welsbach tarafından gaz lambası mantosu için kullanılmıştır. Saf toryum oksit yandığında mavi ışık vermektedir ancak seryum oksitle karıştırarak parlak beyaz bir ışık vermesi sağlanmıştır. Seryum oksit, toryum dioksidin yanmasında katalizör görevi görmüştür. Welsbach'ın bu icadı ticari anlamda büyük önem taşımaktadır. Welsbach, Seryum oksit ile çalışmalarına devam etmiş ve ferroseryum (çakmaktaşı) diye adlandırılan ve seryum katkı maddeli demir alaşımını da bulmuştur [85].



Şekil 1.4 : Ferroseryum (çakmaktaşı).

Seryum bileşiklerinin on dokuzuncu yüzyılın ortalarından itibaren ilaçlar ve tıbbî ürünlerde kullanıldığı bilinmektedir. İlk olarak 1854 yılında, seryum nitratın kusmayı rahatlattığı raporlanmıştır. Seryum (III) oksalat, 1950'li yıllara kadar günümüzde bile hala kullanılan antihistamin meclizin ile değiştirilene kadar antiemetik (kusma sinir merkezlerini etkileyen ilaç) olarak kullanılmıştır [79, 86].

Seryum klorit ( $CeCl_3$ ), Friedel-Crafts alkilleşme reaksiyonlarında katalizör olarak kullanılmasıyla birlikte seryum tuzlarının hazırlanması için başlangıç malzemesi olarak da kullanılmıştır [79].

Seryum, su-hava değişimi, etanolden buhar oluşumu, dizel yakıtın hidrojen gazına ve karbon dioksite dönüşümü gibi birçok reaksiyonda ko-katalist olarak kullanılmaktadır. Fischer-Tropsch reaksiyonlarında ve bazı yükseltgenme reaksiyonlarında da kullanıldığı bilinmektedir. Elektrosentez uygulamalarında seryum oksit, oksidasyona destek amaçlı kullanılmaktadır. Elektronik bileşenlerde oksitleyici olarak, kantitatif analizlerde birincil standart olarak kullanılmaktadır. Ce (IV) bileşikleri, iyi bir oksitleyici ajandır [87].

Özellikle serya, seryumun ticari olarak en yaygın kullanılan bileşiğidir. Serya, yüksek kaliteli optik yüzeylerde kullanılmaktadır. Uzun yıllardır bilinen ilk ve en yaygın kullanım alanlarından biri aydınlatma sistemleridir. Serya, demir alaşımlarında önemli bir yan malzemedir [85].

Günümüzde Seryum elemental formda ya da seryum bileşikleri olarak pek çok alanda kullanılmaktadır. Cam, boya, pigment, cila, katalitik konvertörler, mıknatıslar gibi malzemelerde kullanılmaktadır. Floresan lambalar, televizyon ekranları, projektörler, manyetik optik kompakt diskler, oksijen geçirgen membran sistemler ve yakıt hücreleri gibi teknolojik malzemelerde yer almaktadır. Motor alaşımları, porselen kaplamalar, paslanmaz çelik malzemeler, krom kaplamalar gibi malzemelerin içinde otomotiv sektörü gibi öncü sektörlerde de kullanılmaktadır. Aydınlatma alanında da önemli bir yeri alan seryum ve bileşikleri akkor lambalar, karbon ark lambaları, enerji tasarruflu ampullerde bulunmaktadır. Gözlüklerde, kendi kendini temizleyen yüzeylerde, cam yüzeylerde çizik giderici ve parlatici olarak da seryum kullanılan bir malzemedir [85, 86, 87].

### 1.3.4 Seryum Oksit (CeO<sub>2</sub>)

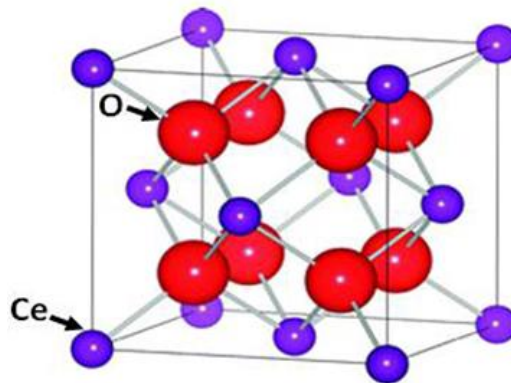
Seryum dioksit (CeO<sub>2</sub>), lantanit grubuna ait nadir toprak metali Seryum'un oksit formudur. CeO<sub>2</sub> genellikle mikro veya nano ölçekli beyaz ile açık sarı renkli toz formunda bulunan bir malzemedir.

Seryum, lantanit serisinin ikinci üyesi ve en reaktif elementidir. Doğası gereği elektropozitif olan seryum, Ce<sup>3+</sup> ve Ce<sup>4+</sup> olmak üzere ikili oksidasyon modlarında bulunur. Ce<sup>4+</sup> oksidasyon durumu genellikle Ce<sup>3+</sup>'ten daha kararlı bir yapıya sahiptir, çünkü Ce<sup>4+</sup> elektronik konfigürasyonu [Xe]4f<sup>0</sup> kararlı yapıya sahipken, Ce<sup>3+</sup> elektronik konfigürasyonu [Xe]4f<sup>1</sup> boş bir elektron seviyesine sahiptir [79].

Seryum, seryum dioksit (CeO<sub>2</sub>) ve seryum trioksit (Ce<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) adında iki tip oksit yapıya sahiptir. CeO<sub>2</sub> daha kararlı yapıdadır ve daha çok bulunduğu için kısaca CeO<sub>2</sub> seryum oksit olarak kullanılmaktadır.

### 1.3.5 CeO<sub>2</sub>'nin Kristal Yapısı

Seryum dioksit (CeO<sub>2</sub>), florit/yüzey merkezli kübik yapıya (FCC) sahiptir. Şekil 1.5'te gösterildiği gibi alternatif küp merkezlerini işgal eden seryum iyonları ile basit bir kübik oksijen alt kafesinden oluşur. CeO<sub>2</sub>'nin stokiyometrik yapısı, dört koordineli oksijen ve sekiz koordineli seryum ile temsil edilmektedir. Seryum, köşeleri oksijen atomlarıyla dolu olan tetrahedronun merkezindedir [88].



Şekil 1.5 : CeO<sub>2</sub> için FCC yapısı [88].

Nano boyuta inildikçe nanoparçacıklarda bulunan geniş yüzey alanı/hacim oranı benzersiz özellikler kazandırmaktadır. Partikül boyutunu azaltmak, CeO<sub>2</sub> nanoparçacıklarda daha fazla oksijen boşluğu oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca,

nano boyutlu CeO<sub>2</sub>, yığın formuna göre elektronik iletkenlik gibi birçok yeni ve üstün özellikler kazanmaktadır [79].

### 1.3.6 CeO<sub>2</sub>'nin Uygulama Alanları

Günümüzde teknolojik açıdan önemli bir yer edinen CeO<sub>2</sub>, birçok farklı alanda dikkate değer uygulama alanlarına sahiptir. CeO<sub>2</sub>'nin en çok bilinen ticari ve endüstriyel uygulamalarının bazıları aşağıda özetlenmiştir.

CeO<sub>2</sub> bazlı seramiklerin, Ce<sup>3+</sup> ve Ce<sup>4+</sup> arasındaki tersine çevrilebilir redoks geçişi sayesinde indirgen bir atmosferde karışık iyonik ve elektronik iletkenlik sergiledikleri iyi bilinmektedir. Ayrıca, oksijen boşluğu oluşum mekanizması sayesinde mükemmel katalitik aktiviteler göstermektedir. Bu özellikleri sayesinde başta katı oksit yakıt pilleri olmak üzere pil teknolojisi içinde potansiyel bir kullanım alanına sahiptir [89].

CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkları, üç değerli ve dört değerli halleri arasında kolay geçiş yapması ve doğada çokça bulunması sebebiyle yüksek oksijen depolama kapasitesine sahiptir. Bu durum CeO<sub>2</sub>'yi kataliz olarak mükemmel bir seçim haline getirmektedir. Karbon monoksit (CO) oksidasyonu, katalitik uygulamalar için önemli bir reaksiyondur. CO oksidasyonu sırasında, CeO<sub>2</sub> nanomalzemelerin, düşük sıcaklıklarda katalizörlerin oksijen depolama kapasitesini artırabildiği bilinmektedir. Genel olarak, yüksek yüzey alanına sahip nanomalzemeler bu uygulama için ideal kabul edilir. Yüksek yüzey alanı, aktif türlerin reaktanlarla temas etmesi için daha büyük bir eğilim sağlar ve bu nedenle, gelişmiş bir katalitik performans beklenebilmektedir [89]. Ek olarak, Au-destekli CeO<sub>2</sub> nanoparçacık bazlı fotokatalizörler üretildiği de rapor edilmiştir [91].

CeO<sub>2</sub> nanomalzemeler ayrıca çevresel iyileştirme için de kullanılmaktadır. CeO<sub>2</sub> nanotüplerin ve nanoparçacıkların ortaya çıkan kirletici maddelerin iyileştirilmesi amacıyla yapılmış araştırmalar literatürde yer almaktadır [91, 92]. Örnek bir çalışmada kentsel ortam havasında bulunan ve çevre sağlığı ile ilgili önemli bir endişe kaynağı olan aromatik benzenin iyileştirilmesi üzerine çalışılmış ve bu amaç için CeO<sub>2</sub> nanomalzemelerin fotokatalitik aktiviteleri incelenmiş ve bir diğer nano malzeme olan ticari TiO<sub>2</sub> (P25) ile sonuçları karşılaştırılmıştır [92].

Ayrıca, CeO<sub>2</sub> nanoparçacıklar, dizel yakıt için daha fazla yanmaya ve egzoz emisyonlarını azaltmaya yardımcı olması için kullanılan ideal bir katkı maddesidir.



Seryum oksit katkısı, motordaki kurumları yok ederek motor performansını artırmaktadır [87].

CeO<sub>2</sub> suda ve seyreltik asitte tamamen çözünmemesi sayesinde, yaygın bir şekilde aşındırıcı olarak kullanılmaktadır. Camların cilalanmasında kullanıldığı ve ayrıca ısıya dayanıklı alaşım kaplama ve seramik kaplamada da kullanıldığı bilinmektedir [90].

### 1.3.7 CeO<sub>2</sub> Nanoparçacıkların Toksik Özellikleri

Nanoteknolojide birçok kullanım alanına sahip olan CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların ekosisteme karışması ile oluşabilecek toksik etkiler merak uyandırmakta ve bu konuda da araştırmalar yapılmaya devam etmektedir. Kullanımı her geçen gün artan CeO<sub>2</sub> nanoparçacıklar üzerine yapılan çalışmalar literatürde mevcut olmakla birlikte bu araştırmalar toksik etkileri üzerine yeterli veri sağlayacak düzeyde değildir. Mevcut araştırmalardan bazı örnekler aşağıda sunulmuştur.

CeO<sub>2</sub> nanoparçacıklarının iki farklı amfibi larva türü (*Pleurodeles waltl* ve *Xenopus laevis*) ve omurgasız *Chironomus riparius* ve diatom *Nitzschia palea* üzerindeki toksik etkileri araştırılmıştır. *Pleurodeles waltl* üzerinde genotoksik bir etki yaratabileceği belirtilmiştir [93].

Nano boyuttaki CeO<sub>2</sub>'nin *in vivo* toksik etkileri üzerine yapılan çalışmada, 96 saat boyunca 100 µg/L CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalan *Mytilus galloprovincialis* deniz midyelerinin hemosit ve doku (solungaçlar, sindirim bezi) seviyesinde çeşitli lizozomal, immün, inflamatuvar ve antioksidan biyobelirteçleri ölçülmüştür. Hemositlerde ve sindirim bezindeki moleküler sonuçlar, biyolojik fonksiyonları bilinen 11 gen belirlenerek değerlendirilmiştir. Sonuçlar, nano boyutlu CeO<sub>2</sub>'nin dokularda birikimi ile farklı biyolojik organizasyon seviyelerinde spesifik immünomodülatör ve antioksidan etkilere sebep olduğunu göstermektedir. Bu veriler ayrıca nano CeO<sub>2</sub>'nin fizyolojik etkilerinin ve muhtemel oksidatif hasarların nedeninin CeO<sub>2</sub>'nin redoks mekanizması olduğunu desteklemektedir. Ayrıca, tüm organizmalar düzeyinde nano CeO<sub>2</sub>'nin olası toksik etkilerini belirlemek için, geniş bir konsantrasyon aralığında 48 saatlik embriyotoksisite testi de bu çalışmada yapılmıştır. Nano CeO<sub>2</sub> maruziyeti sonucunda, normal embriyo gelişiminde küçük bir miktar azalma tespit edilmiştir. Genel olarak, sonuçlar midyelerde nano CeO<sub>2</sub>'nin farklı biyolojik organizasyon seviyelerinde farklı fizyolojik süreçleri etkileyebileceğini göstermektedir [94].

Garauda ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada ise iki tatlı su omurgasızında (tatlı su amfipodu *Gammarus roeseli* ve zebra midyesi *Dreissena polymorpha*) çevreye duyarlı konsantrasyonlarda nano CeO<sub>2</sub>'nin kısa vadeli etkilerinin araştırılmıştır. Çalışmada, çoklu belirteç yaklaşımı kullanılarak nano CeO<sub>2</sub>'nin organizma biyolojisi üzerindeki olumsuz etkileri incelenmiştir. Çalışmada, su kolonundaki organizmalardaki farklılıklarının, farklı nano CeO<sub>2</sub> biyoakümüülasyonuna yol açtığı ve sonucunda *Gammarus roeseli*'nin, *Dreissena polymorpha*'dan daha fazla seryum biriktirdiği raporlanmıştır. Nano CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalma, membran stabilitesine, katalaz aktivitesinde ve midye sindirim bezlerindeki lipid peroksidasyonunda (LPO) azalmaya yol açarken, aynı zamanda hemolenf iyon konsantrasyonlarını da olumsuz etkilemiştir. Azalmanın nano CeO<sub>2</sub> antioksidan özelliklerinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Aynı zamanda, *Gammarus roeseli* üzerinde nano CeO<sub>2</sub>'nin güçlü yan etkileri gözlenmemiştir [95].

Sitrat kaplı nano CeO<sub>2</sub> (ci-CeO<sub>2</sub>) ve çıplak nano CeO<sub>2</sub>'ye (ba-CeO<sub>2</sub>) kronik maruz kalmanın tatlı zebra midyesi *Dreissena polymorpha* üzerindeki etkilerini değerlendirmek için basitleştirilmiş bir ekosistem üreten Garaud ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, organizmalar üç hafta boyunca partiküllere maruz bırakılmış ve biyobelirteç analizi için haftalık olarak örnekler alınmıştır. Midyelerin filtre besleme aktivitesi sonucunda, nano CeO<sub>2</sub>'nin midyeler tarafından su kolonundan önemli ölçüde uzaklaştırıldığı gözlemlenmiştir. Midyelerin, ci-CeO<sub>2</sub>'yi ba-CeO<sub>2</sub>'den üç kat daha fazla biriktirdiği kaydedilmiştir. Biyomarker sonuçları, pi-glutatyon-S-transferaz (piGST) mRNA, katalaz (CAT) aktivitesi ve lizozomal sistemin, diskriminant analiz ile seçilen yedi biyobelirteçten en çok etkilenenler olduğunu vurgulamaktadır. Bu biyobelirteç sonuçları, nano CeO<sub>2</sub>'nin her iki formuna da maruz kalan midyelerin stres altında olduğunu ve kontrol grubundan farklı sonuçlar gösterdiğini kanıtlamaktadır. Ayrıca, ba-CeO<sub>2</sub> ve ci-CeO<sub>2</sub> maruziyetine midyelerin farklı tepkiler verdiği belirtilmiş ancak ciddi toksik etki gözlemlenmemiştir [96].

Sendraa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, farklı fiziko-kimyasal özelliklere (boyut, şekil, zeta-potansiyeli ve Ce<sup>+3</sup>/Ce<sup>+4</sup> oranı) sahip iki farklı CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların toksik etkileri incelenmiştir. Bu iki farklı CeO<sub>2</sub>'nin aynı zamanda plazma sıvısındaki biyomoleküllerle de farklı davranışlar sergilediği gözlemlenmiştir. Bu çalışma, deniz türü kara midyelerinin (*Mytilus galloprovincialis*) birincil hemositlerinin kullanıldığı

*in vitro* bir çalışmadır. Sonuçlar, maruziyet ortamındaki CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların aglomerasyon durumunun, partikül etkilerinde önemli bir role sahip olmadığını, ancak nanoparçacıklarda şekil, zeta-potansiyeli ve biyokorona oluşumundaki farklılıkların hemositler üzerinde olumsuz etkilere neden olacak önemli faktörler olduğu tespit edilmiştir. Negatif yüklü ve yuvarlak şekilli CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların stres biyobelirteçlerinde (LMS) ve immünolojik parametrelerde (ROS ve fagositoz kapasitesi) daha yüksek değişikliklere neden olduğu raporlanmıştır. CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların neredeyse nötr yüzey yükü ve iyi şekillendirilmiş olanlarının önemli toksik özellikler göstermediği tespit edilmiştir. Sonuçlara göre, CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların sahip olduğu farklı fiziko-kimyasal özellikler nanoparçacıkların toksisitesinde önemli bir rol oynamaktadır, aynı zamanda nanoparçacıklarının biyolojik sıvılarla etkileşiminin incelenmesi de hücresel düzeyde davranışını ve toksisitesini bilmek için araştırılması gereken önemli bir konudur [97].

Sugantharaj David ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, nano ve yığın CeO<sub>2</sub> parçacıkların *Artemia salina* üzerindeki etkisi karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. CeO<sub>2</sub>'nin TEM analizi ile belirlenen boyutları sırasıyla  $15 \pm 3,5$  (nano) ve  $582 \pm 50$  nm (yığın) olarak belirtilmiştir. CeO<sub>2</sub> partiküllerinin her iki boyutu da *Artemia salina*'nin yumurtadan çıkma oranını engellemiştir. Nano-CeO<sub>2</sub>'nin yığın CeO<sub>2</sub> ile *Artemia salina* için daha toksik olduğu tespit edilmiştir. Nano-CeO<sub>2</sub>, *Artemia salina* üzerinde yığın formdan daha yüksek oksidatif strese (ROS) sebep olmuştur. Antioksidan aktivitesindeki azalma, hücrelerdeki oksidatif streste bir artış olduğunu ve savunma sisteminin yetersiz kaldığını göstermiştir. Nano ve yığın CeO<sub>2</sub> parçacıklara maruz kalma sonucunda yüksek asetilkolin esterase aktivitesi (AChE) gözlenmiştir. Konsantrasyon ve partikül boyutu arttıkça CeO<sub>2</sub> partiküllerinin alımı ve birikimi de artmıştır. Bu nedenle, sonuçlar nano CeO<sub>2</sub>'nin yığın partiküllere kıyasla *Artemia salina* için daha toksik olduğunu ortaya koymuştur [98].

Koehlé-Divoa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın amacı, kuyruklu yıldız testi ve çoklu enzimatik biyobelirteç yaklaşımı kullanılarak CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların tatlı su midyesi (bivalve) *Corbicula fluminea* üzerindeki genotoksik ve fizyolojik etkilerinin değerlendirilmesidir. Kısa süreli deney sırasında (6 gün) iki farklı konsantrasyondaki CeO<sub>2</sub> nanoparçacıklara maruz bırakılmıştır. Birinci doz 10 µg/L düşük ancak ölçülebilir bir konsantrasyon ve ikinci doz ise on kat daha yüksek olan 100 µg/L olarak

seçilmiştir. DNA hasarının, iki günlük maruziyette başlayarak test edilen her iki konsantrasyon için de kontrole kıyasla devam eden sürede önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Bazı enzimatik anti-oksidatif savunmalar (toplam antioksidan kapasite, katalaz aktivitesi), anti-toksik mekanizmalar (glutasyon-S-transferaz aktivitesi, kaspaz-3 aktivitesi) ve enerji metabolizması aktiviteleri (laktat dehidrojenaz aktivitesi) 6 günlük maruziyetten sonra artmaya başladığı raporlanmıştır. Bu çalışmada, CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların *Corbicula fluminea* üzerindeki zaman ve konsantrasyon etkileri, genotoksisite ve biyobelirteç analizlerinin birlikte yorumlanmasıyla vurgulanmıştır [99].

### 1.3.8 CeO<sub>2</sub> Ekotoksikolojisinin Araştırılma Nedenleri

Nanomateriyal üretimindeki sürekli artış nedeniyle üretilen nanomalzemelerin sucul ortama salınma potansiyeli, her geçen yıl giderek artmaktadır. Seryum oksit (CeO<sub>2</sub>) nanoparçacık (nano-CeO<sub>2</sub>) üretimi yılda yaklaşık 10.000 ton seviyesindedir [100, 101]. 2014 yılında yalnızca Avrupa Birliği'nde 3,240 ton nano-CeO<sub>2</sub> kullanılmıştır [100, 102]. Nano-CeO<sub>2</sub>, kozmetik endüstrisinden otomotiv endüstrisine kadar, elektronik, optik, katalizör, kaplama ve boya olmak üzere pek çok uygulama alanında kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, MNP'lerin malzeme akış modellemesine göre, yıllık 300 ton nano-CeO<sub>2</sub>'nin sucul ekosistemlere karıştığı tahmin edilmektedir. Aynı çalışma, kaplamaların, boyaların, pigmentlerin ve kozmetiklerin de nano-CeO<sub>2</sub>'nin sucul ekosistemlere karışmasına sebep olduğunu göstermektedir. Bu çalışma, çevreye atılan nano-CeO<sub>2</sub>'nin gelecekte su ekosistemlerindeki varlığının artacağını da kanıtlamaktadır [100, 103]. Sucul ekosistemdeki nano-CeO<sub>2</sub>'nin başlıca birikme sebebi, su kenarlarında ve atık su kaynakları yoluyla sediment ortamına karışmasından kaynaklanmaktadır [100, 102]. Sucul ekosistemlerde nano-CeO<sub>2</sub>'nin doğrudan ölçümü oldukça zordur, bu nedenle konsantrasyon tahminleri modelleme yöntemlerine dayanmaktadır. Tatlı su sedimentlerinde tahmini nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonu 0,2-95 µg/kg arasında değişmektedir, atık su arıtma sedimentleri içinde ise bu konsantrasyonun 350 µg/kg değerinde olduğu tahmin edilmektedir [100, 102, 104].

Nano-CeO<sub>2</sub>'nin çevre salımı tahminlerine rağmen, bentik komüniteler üzerindeki etkileriyle ilgili veriler yetersizdir. Üretilen nano-malzemelerin spesifik özellikleri nedeniyle kullanımları gün geçtikçe artmaktadır. Ayrıca bu spesifik özelliklerin

çevresel ve biyolojik davranışları hakkındaki bilgi kısıtlıdır [100, 105]. Bu sebeple, organizmaların nano-CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalma durumlarını, bunların biyota ve dolayısıyla çevre sağlığına potansiyel toksik etkilerinin araştırılmasına olan ihtiyaç hala devam etmektedir.

Nano-CeO<sub>2</sub>'nin hızlı sedimentasyonundan dolayı, bentik organizmaların maruz kalma olasılığı oldukça yüksektir ve bu nedenle bu organizmalar tatlı su kirliliğinin biyoindikatörleri olarak kullanılabilir. Larva evresinde sedimente bağlı birçok türe sahip çeşitli makro-omurgasızlar grubu olan kronomidler, toksisite çalışmaları için standardize edilmiş bir model organizmadır [100, 106].

Nanoparçacıklar, tatlı su ortamlarında dibe çöktükleri için doğrudan bentik organizmaları etkilemektedir. Bu sebeple, bu tez çalışmasında farklı konsantrasyonlarda nano-CeO<sub>2</sub>'nin bir bentik organizma olan *Chironomus riparius* üzerindeki toksik etkisi incelenmiştir.

### **1.3.9 Nano CeO<sub>2</sub> Hakkında Çelişkili Araştırmalar**

Literatürde, CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların etkileri üzerine çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkları hem antioksidan hem de birçok Reaktif Oksijen Türü (ROS) üretimini tetikleyici etken madde olarak rapor edilmiştir [79].

Bazı araştırmalarda, CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların serbest radikal türlerini uzaklaştırmayı sağlayan antioksidan olarak kullanılabileceğini raporlanmıştır. CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların, süper oksidin oksijen ve hidrojen peroksida dönüşmesi ile ROS üretiminin ve memeli hücrelerindeki zararlı etkilerinin azaltılmasında süper oksit dismutaz (SOD) benzeri ana katalizör olarak davrandığı raporlanmıştır. Ayrıca, körlüğe neden olan retina bozukluklarını engellediği belirtilmiştir [79].

Ancak CeO<sub>2</sub> nanoparçacıklar hakkında zıt sonuçlar da literatürde bulunmaktadır. CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların, birçok biyolojik sistemde ROS üretimini sağladığı ve hızlandığı raporlanmıştır. Sıçanların karaciğerlerinde hasara sebep olduğu, akciğer dokuları gibi çeşitli insan kas dokularında orta derecede toksik olduğu raporlanmıştır [79].

Son çalışmalarda CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların boyutundaki, şeklindeki ve Ce<sup>3+</sup>/Ce<sup>4+</sup> oranındaki farklılıkların bu zıt davranışlara sebep olduğu belirtilmesine rağmen [79], CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların zararlı mı yoksa faydalı mı olduğuna karar verebilmek için

daha fazla araştırma sonucuna ihtiyaç duyulmaktadır ve bu tez çalışması bu anlamda literatüre katkı sağlayacaktır. Son yıllarda kullanım alanı gün geçtikçe artan seryum dioksit nanoparçacıklar boya, kozmetik, temizlik gibi sektörlerde kullanmakta ve bu sektörlerde üretim yapan fabrikaların atık sularını denize bırakması ile CeO<sub>2</sub> nanoparçacıklar kolaylıkla doğal su ortamlarına karışmaktadır. Bu sebeple, CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların sucul ortamdaki toksik etkilerini inceleyen çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır ve bu tez çalışması da literatürdeki bu boşluğu doldurmada katkı sağlayacaktır.

#### **1.4 Tezin Amacı**

Günümüzde nanoparçacıkların, sucul ortamdaki doğal hayata etkilerinin araştırıldığı çalışmalar henüz yeterli düzeyde değildir ve elimizdeki bilgiler sınırlıdır. Ancak, yapılan bazı çalışmalar parçacık boyut ve şekil etkisinin önemini ortaya koymaktadır. MNP'lerin çevreye etkileri hakkında daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. Daha fazla bilgi elde edebilmek için çeşitli deneysel yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. En önemli ihtiyaçlar aşağıda sıralanmıştır:

1. Nanoparçacıklar için numune alma, ölçme ve saptama yöntemlerinin geliştirilmesi/iyileştirilmesi ve her malzeme için ayrı bir standart oluşturulması gerekmektedir.
2. Her bir nano malzeme için belirli standartlar oluşturularak ayrıntılı karakterizasyonun yapılması ve bir kılavuz oluşturulması gerekmektedir.
3. Sucul organizmalar üzerinde nano boyuta özgü etkilerin araştırılması ve yığın/makro boyuttan farkının incelenmesi gerekmektedir.

Bu nedenlerle bu tez kapsamında aşağıda sıralanan hedefler tez çalışmasının amacı olarak belirlenmiştir.

- MNP'lerden önemli biri olan nano-CeO<sub>2</sub>'nin endüstriyel alanda en çok kullanılan nano boyuttaki türlerinden biri seçilerek malzemenin fiziksel, kimyasal özellikleri, kristal yapısı, morfolojisi, su ve sediment ortamındaki davranışlarının ayrıntılı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Böylelikle tez kapsamında çalışılan nano-CeO<sub>2</sub> için yukarıda belirtilen 1 ve 2 numaralı ihtiyaçların giderilmesi amaçlanmıştır.

- Nano-CeO<sub>2</sub>'nin artan üretimi ve kullanımı sonucunda bu parçacıkların tatlı su ortamlarına ulaştıkları ve su ortamında dibe çöküp biriktikleri bilinmektedir. Böylelikle nano-CeO<sub>2</sub>'nin bu hızlı sedimentasyonundan dolayı, bentik organizmaların nano-CeO<sub>2</sub>'ye maruz kaldıkları tahmin edilmektedir. Bu sebeplerle bu tez kapsamında tatlı su ortamında yaşayan ve biyo-indikatör olarak toksikoloji çalışmalarında sıkça kullanılan iki canlı türü *Chironomus riparius* ve *Unio crassus* seçilerek bu iki organizma üzerindeki nano-CeO<sub>2</sub>'nin toksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Böylelikle yukarıda ifade edilen 3 numaralı ifadeye katkı sağlanması hedeflenmiştir.







## 2. NANO CeO<sub>2</sub>'NİN *CHIRONOMUS RIPARIUS* ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİ

### 2.1 Çalışmanın Amacı

Günümüzde pek çok alanda kullanımı artan Seryum Oksit nanoparçacıklarının (nano-CeO<sub>2</sub>), çevreye etkisinin araştırılabilmesi için bu nano-malzemeler OECD öncelik listesine dahil edilmiştir. Nanoparçacıklar, tatlı su ortamlarında dibe çöktükleri için doğrudan bentik organizmaları etkilemektedirler. Bu sebeple Chironomidae (Diptera) familyasına ait olan *Chironomus riparius*, çalışma kapsamında model organizma olarak seçilmiştir. Deney prosedürü, OECD 218 numaralı kılavuza uygun olarak tasarlanmıştır.

Bu çalışmanın genel amacı farklı konsantrasyonlarda nano-CeO<sub>2</sub>'nin bir bentik organizma olan *Chironomus riparius* üzerindeki toksik etkilerinin incelenmesidir. Bu temel amaç doğrultusunda belirlenen alt hedefler aşağıda sıralanmıştır.

1. Nanoparçacık özelliklerinin modern analitik yöntemlerle incelenmesi (kristal yapısı, morfolojik özellikleri, nanoparçacık boyutu ve ortam içinde (sediment ve su) kümelenmesinin özellikleri/davranışları, spesifik yüzey analizi, yüzey kimyası, hidrodinamik çap, polidispersite ve zeta potansiyel değerleri)
2. Nano-CeO<sub>2</sub>'nin toksik etkilerinin araştırılabilmesi için uygun test düzeneğinin OECD'nin 218 numaralı prosedüründen de faydalanarak kurulması ve sucul ekosistemlerde biyolojik izleme yöntemlerinin uygulanması
3. Model organizma tarafından nano-CeO<sub>2</sub> parçacıklarının biyoakümüülasyonunun belirlenmesi (ICP-MS çalışması)
4. Nano-CeO<sub>2</sub>'nin yaşam döngüsü toksisite parametrelerinin gözlemlenmesi ve parametrelerin değerlendirmesi
5. Biyobelirteç çalışmaları yapılarak oksidatif stres parametrelerin bulunması
6. Somatik hücrelerdeki DNA hasarının belirlenmesi

## **2.2 Materyal ve Yöntem**

### **2.2.1 Test Maddesi: Nano CeO<sub>2</sub>**

Ticari partikül çapı <25 nm olan CeO<sub>2</sub> (Seryum (IV) Oksit) NP'ler (ürün numarası 544841) Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Çalışmalara başlamadan önce CeO<sub>2</sub> NP'lerin kimyasal ve yapısal özellikleri ayrıntılı olarak karakterize edilmiştir.

### **2.2.2 Karakterizasyon Yöntemleri**

#### **2.2.2.1 Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)**

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM (Transmission Electron Microscope)) çok ince bir örnek içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanmaktadır. Elektronların örnek ile etkileşimleri sonucu oluşan görüntü büyütülür ve sensör üzerine odaklanır. Nanometre mertebesinde çok küçük ve ince alanlardan, milyon katı büyütmelede malzemenin kristalografik ve morfolojik bilgilerine aynı anda ulaşılmasını olanaklı kılan bir tekniktir [107]. Tez çalışmasında, TEM parçacıkların şeklini, morfolojisi, parçacık büyüklüklerini ve topaklanma gibi özelliklerini görüntülemek için kullanılmıştır.

CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların TEM görüntüleri FEI Tecnai G2 F30 cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Örnekler, parçacık dağılımını sağlayabilmek için 1-2 damla etanol damlatılarak karbon kaplı bakır grid üzerinde hazırlanmıştır.

#### **2.2.2.2 X-Işını Kırınım Yöntemi (XRD)**

X-Işını Kırınım yöntemi (XRD), her bir kristalin fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak, X-ışınlarını karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanmaktadır. Her bir kristalin faz için bu kırınım profilleri o kristalin parmak izi olarak tanımlanabilmektedir [107].

X-Işını Kırınım (XRD) ölçümleri Pananalytical X'pert Pro çok amaçlı X-Işını Kırınım Ölçer cihazında yansıma geometrisi ile gerçekleştirilmiştir. CuK-Alpha ışını (dalga boyu=0.154 nm) 40 kV ve 40 mA koşullarında kullanılmıştır. Ölçümler 2 Theta'da, 1° ile 90° arasında 0,05°'lik adımlarla yapılmıştır.

### 2.2.2.3 X-Ray Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

X-Ray Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) katı materyallerin yüzeyleri hakkında kimyasal bilgi elde etmek için kullanılan gelişmiş bir yüzey analiz tekniğidir. Metot, katı örnekleri uyaran bir x-ışın demeti kullanarak foto-elektronların saçılmasını sağlamaktadır. Fırlatılan elektronunun kinetik enerjisi numuneye gönderilen X-ışınlarının enerjisi ve elektronun bağlanma enerjisine bağlıdır. Elektron X-ışınlarından aldığı enerjinin bir kısmını bağlanma enerjisini yenmek için kullanır ve geriye kalan elektronun kinetik enerjisidir. Bağlanma enerjisi elektronun bağlandığı atomun ve bulunduğu orbitalin karakteristik bir değeridir. XPS ile NP'lerin yüzeyinin kimyasal yapısı ve bağlanma enerjileri tayin edilmiştir [107].

XPS'de, yayılan kinetik enerji dağılımı, uygun elektron enerji çözümleyicisi kullanılarak ölçülmüş ve bu sayede foto elektron spektrumları kaydedilmiştir. Ayrıca XPS, çekirdek seviyelerini analiz edebilmek için hassas X-ışınımı (200-1500 eV) değerlerini kullanmıştır.

XPS analizlerinde, Mg K-Alpha (1253.6 eV) X-ışınımı kaynağı 300 W değerinde çalıştırılmıştır. İnceleme spektrası olarak 117.40 eV geçiş enerjisi kullanılmıştır. Spektra, normal yüzeye 60° çıkış açısı kullanılarak kaydedilmiştir.

### 2.2.2.4 Brunauer-Emmett-Teller (BET)

BET cihazı katı veya toz numunelerde fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle yüzey alanı ölçümleri, mikro/mezo/makro gözenek boyutunu ve gözenek boyut dağılımını düşük basınçlarda ve yüksek çözünürlükte tespit edebilmektedir. Cihaz numune yüzeyini tek bir moleküler tabaka ile kaplamak için gerekli gaz miktarını tayin etmekte, Brunauer Emmett ve Teller teorisini kullanarak yüzey alanını hesaplamaktadır [107]. Tez çalışmasında, Brunauer-Emmett-Teller yüzey alanı analizi (BET) tekniği ile NP'lerin yüzey alanı ve porozitesinin ölçümü için kullanılmıştır.

CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların Brunauer-Emmett-Teller (BET) yüzey alanı analizi Autosorb-iQ Station 1 cihazında N<sub>2</sub> ortamında gerçekleştirilmiştir. CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların (BET) yüzey alanları, 77 K'de N<sub>2</sub>'nin yüzeye tutunması ve yüzeyden ayrılmasından elde edilmiştir. Ölçümler yapılmadan önce örnekler 120°C'de 15 saat boyunca gazlardan arındırılmıştır.

### **2.2.2.5 Dinamik Işık Saçılma Spektroskopisi (DLS) & Zeta Potansiyel**

Dinamik ışık saçılma spektroskopisi, seyreltik çözelti içerisindeki küçük parçacıklardan saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Saçılan ışığın şiddetindeki değişim, parçacığın hareketine buna bağlı olarak da parçacığın büyüklüğüne, ortamın viskozitesine ve sıcaklığına bağlıdır [107].

Zeta potansiyel ise, taneler arasındaki itme veya çekme değeri ölçümüdür. Zeta potansiyel ölçümü dağılma mekanizmaları ile ilgili ayrıntılı bilgi vermektedir. Belli bir yükteki tane, süspansiyon içerisinde karşı yükteki iyonları çeker, sonuç olarak, yüklü tanenin yüzeyinde güçlü bir bağ yüzeyi oluşur ve daha sonra da yüklü tanenin yüzeyinden dışa doğru yayılmış bir yüzey oluşur. Yayılmış bu yüzey içerisinde "kayma yüzeyi" diye adlandırılan bir sınır bulunur. Yüklü tane ve onun etrafında bulunan iyonların kayma yüzey sınırına kadar olan kısım tek bir parça olarak hareket eder. Bu kayma yüzeyindeki potansiyel zeta potansiyeli olarak isimlendirilir ve hem tanenin yüzey yapısından hem de içinde bulunduğu sıvının içeriğinden etkilenir. Tanelerin polar sıvılar içerisindeki davranışlarını yüzeylerindeki elektrik yükü değil, zeta potansiyel değerleri belirler [107]. DLS, nanoparçacıkların su içerisindeki hidrodinamik çapı, zeta potansiyel ve polidispersite değerlerini ölçmek için kullanılmıştır.

CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların hidrodinamik yarı çapı ve zeta potansiyeli, 633 nm dalga boyunda 5mW He-Ne lazer kaynağı kullanılarak 25°C'de Malvern ZetaNano ZS cihazında ölçülmüştür. CeO<sub>2</sub> çözeltisi deiyonize edilmiş suda 0,1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Çözelti ultrasonik banyoda tutulmamıştır. Çözelti hazırlandıktan sonra ortalama hidrodinamik yarıçap 1 saat boyunca her 5 dakikada bir ölçülmüştür. Bu ölçümler, yüksek çökelti oluşumu beklendiğinden, zamanla meydana gelen çözelti kararsızlığını görmek için yapılmıştır.

### **2.2.2.6 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)**

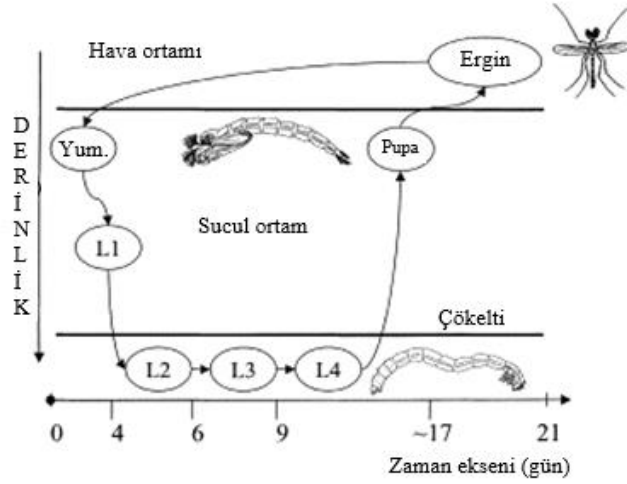
Taramalı elektron mikroskobu (SEM (Scanning Electron Microscope)), odaklanmış bir elektron demeti ile numune yüzeyini tarayarak görüntü elde eden bir elektron mikroskobu türüdür. Elektronlar numunedeki atomlarla etkileşerek numune yüzeyindeki topografi ve kompozisyon hakkında bilgiler içeren farklı sinyaller üretmektedir [107].

CeO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin morfolojisi, agregasyon durumu ve partikül büyüklüğü orta ivmeli voltajda (10-20 kV) FEI Nova Nano SEM 430 Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu ile analiz edilmiştir. Vakum altındaki partiküllerin iyi çözünürlükle araştırılabilmesi için numuneler, püskürtme yoluyla 10nm kalınlığında ince bir Au tabaka ile kaplanmıştır.

SEM analizi için 250 ve 2500 mg/kg nano-CeO<sub>2</sub>/ince kum (sediment içindeki kum) numuneleri hazırlanmıştır. Au kaplı CeO<sub>2</sub> nanoparçacıklarının ve kum parçacıkları karışımının SEM görüntülerini doğru tanımlayabilmek için Enerji Dağılımlı X-ışınları Spektroskopisi (EDX) analizi, SEM analiziyle eş zamanlı yapılmıştır. EDX, sediment içindeki CeO<sub>2</sub> parçacıkların tespit edilmesinde yardımcı olmuştur. Ayrıca kum ile karışık CeO<sub>2</sub> parçacıkların yüzey üzerindeki konumunun yüksek hassasiyetle haritalamasına imkân sağlamıştır.

### 2.2.3 Test Organizması: *Chironomus riparius*

Bu çalışmada kullanılan test hayvanı larvadan ergin evreye kadar ısırmayan midge *Chironomus riparius*'tur (Diptera, Chironomidae). Deneylerde kullanılan *Chironomus riparius*'un örnekleri, OECD kılavuzuna göre yetiştirilmiş, Niş Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi laboratuvarında bulunan stok kültüründen alınmıştır (OECD, 2004). Stok kültürün üreme popülasyonunu oluşturmak için örnekler, Niş yakınlarındaki doğal bir habitattan (eski Nisava nehir yatağı, 43 ° 19'01.73" K; 21° 51'21.79" Doğu; deniz seviyesinden 187 metre) alınmıştır. Kılavuza göre, larvalar öğütülmüş selüloz kağıtları ve musluk suyu-deiyonize su karışımıyla dolu olan cam tanklarda 23°C ± 2 °C'lik sıcaklıkta, 16:8 saatlik fotoperiyod ve sabit havalandırma şartlarında tutulmuştur. Kronomidlere Tetra-Min® ince öğütülmüş yem verilmiştir. 20 ml distile suya 1-3 g yem eklenip manyetik karıştırıcı ile homojenize edilip, günlük 5 ml verilerek kronomidler beslenmiştir. Taze yumurtalar toplanmış ve stok kültür akvaryumundaki su ile doldurulmuş Petri kaplarına (klorsuz musluk ve deiyonize su karışımı, pH 7,6 ve toplam sertlik 350 mg/L CaCO<sub>3</sub> ile) yerleştirilmiştir. Larvalar iki gün sonra yumurtadan çıkmıştır. Genetik homojenliği korumak için her yumurtadan çıkan ilk instar larvalar kullanılmıştır. Larvalar dört günlükken test kabına yerleştirilmiştir.

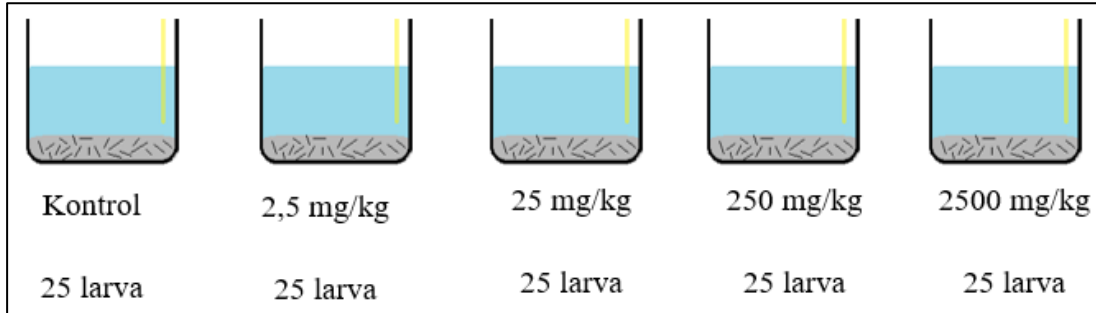


Şekil 2.1 : *Chironomus riparius*'un gelişim evreleri.

## 2.2.4 Deney Tasarımı ve Nano CeO<sub>2</sub>'ye Maruz Bırakma

Bu çalışma iki deneyden oluşmuştur:

1. deney: CeO<sub>2</sub>'nin ergin larvaların yaşam döngüsü üzerindeki toksisitesinin değerlendirilmesi,
2. deney: CeO<sub>2</sub>'nin kronomid larvalarındaki sublethal toksisitesinin değerlendirilmesi.



Şekil 2.2 : Deney prosedürü.

*Chironomus riparius* larvaları, OECD Test No. 218 (Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment) (OECD, 2004) [108] kılavuzundan adapte edilerek oluşturulmuş deney prosedürüne göre nano-CeO<sub>2</sub>'ye maruz bırakılmıştır. Larvalar, sırasıyla artan nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonları içeren sediment ortamına bırakılmıştır. 2,5, 25, 250 ve 2500 mg/kg nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyon miktarlarıdır ve bir de kontrol grubu bulunmaktadır. Tüm deney prosedürü 4 tekrar

olacak şekilde tasarlanmıştır. Tüm deney kurulumu iki kez tekrarlanmıştır. Test kabı olarak 8 cm çapında 600 ml yüksekliğinde cam beher kullanılmıştır.

Deney tasarımında maruziyet konsantrasyonları, daha önceki yapılan çalışmalar incelenerek belirlenmiştir. Gottschalk ve arkadaşlarının yaptığı modelleme çalışmasına göre tatlı su sediment ortamında tahmini ortalama nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonu 0,2 to 45 µg/kg arasında ve arıtma çamurlarında ise yaklaşık 350 µm/kg olabileceği tahmin edilmiştir [104]. Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre ise Avrupa Birliği kapsamındaki ülkelerde, tatlı su sedimentleri içerisinde tahmini ortalama nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonu 2 ile 95 µg/kg arasında değişmektedir [102]. Bu nedenle, bu çalışmada kullanılan en düşük 2,5 mg/kg nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonu, güvenlik faktörleri eklendikten sonra nano-CeO<sub>2</sub>'nin kapsamlı kullanımına devam edilmesi durumunda çevreyle ilgili en kötü durum senaryosu olarak düşünülerek belirlenmiştir. En yüksek doz olan 2500 mg/kg nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonu ise maksimum maruziyet durumunda olabilecek en kötü senaryonun belirlenmesi için seçilmiştir.

OECD Test 218'e göre, sediment olarak seçilebilecek opsiyonlardan biri aşağıdaki gibidir.

- %75-76 (kuru kütle ağırlığı) kuvars kum (ince kum oranı daha baskın olmalı ve parçacıkların % 50'sinden fazlasının boyutu 50- 200 µm arasındaki olmalı)

Bu çalışmada sediment olarak bu koşula uyumlu kuvars kum kullanılmıştır. Kuvars kumunun partiküllerinin %50'sinden fazlası 50 ila 200 µm arasında değişmektedir. Sedimentin farklı bölgelerinden alınan kum taneciklerinin ortalama parçacık boyutu SEM analizi ile  $152 \pm 46$  µm olarak tayin edilmiştir. Maksimum boyut yaklaşık 243 µm ve minimum boyut yaklaşık 650 µm olarak ölçülmüştür. Kullanılacak sediment, çalışmadan önce suyla iyice yıkanmış ve daha sonra ısı sterilizatöründe (VimS Electric SSW 120) 180 °C'de 180 dakika sterilizasyon için inkübe edilmiştir.

Sediment karışımını oluşturmak için, uygun nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonu ıslak sediment içine iyice ve eşit bir şekilde elle karıştırılarak dağıtılmıştır. Nanoparçacıkları test kaplarında mümkün olduğunca eşit bir şekilde dağıtmak için karıştırma işlemi günde 10 dakika olacak şekilde üç gün boyunca tekrarlanmıştır. Her test kabının dibine 3 cm derinliğinde sediment katmanı konulmuştur. Test kapları deiyonize ve kloru

uzaklaştırılmış musluk suyu (1:1) karışımı (pH  $7 \pm 0.5$ ; sertlik  $7.0^\circ$  dH; iletkenlik 326 mS/cm) ile sediment:su oranı 1:4 olacak şekilde doldurulmuştur. Test kapları, 16:8 fotoperiyod döngüsü ile  $23 \pm 1^\circ$  C'de izotermal bir odaya yerleştirilmiştir. Hazırlanan test kapları, larvalar eklenmeden önce tüm parçacıkların çökmesi yaygın dağılımın sağlanması için üç gün dinlendirilmiştir.

Deney düzeneğine eklenmek için hazırlanan larvaların yumurtadan çıkması iki gün sürmüştür. Larvalar yumurtadan çıktıktan dört gün sonra her test kabına 25'er tane ilk çıkan instar larva eklenmiştir. İlk deney düzeneğinde (25 larva x 4 konsantrasyon ve bir kontrol x 4 tekrar) toplam 500 larva, ikincinin de ise bir başka 500 larva kullanılmıştır.

İlk deney setinden gelen larva sinekleri, yaşam kalitesi toksisite analizi için kullanılırken, ikinci deney setindeki larvalar, genotoksisite, oksidatif stres ve endüktif olarak eşleşmiş plazma kütle spektrometrisi analizi (ICP-MS) için kullanılmıştır. Larvaların eklenmesinden 24 saat sonra sediment katmanının 2 cm üzerine plastik bir pipet sabitlenerek genel havalandırma sağlanmıştır. Larvalar, ilk 2 gün için günde larva başına 0,5 mg ve deneyin geri kalanı için günde larva başına 1 mg olacak şekilde 2 günde bir TetraMin<sup>®</sup> balık yemi ile beslenmiştir.

#### **2.2.4.1 Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi Analizi (ICP-MS)**

Kronomid larvalarındaki nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonunun belirlenebilmesi için, ikinci deneyden *Chironomus riparius*'un dördüncü instar larvaları saf su ile iyice yıkayıp analiz için kullanılmıştır. Etanolde bekletilen yaklaşık 0,1 g (ıslak kütle) *Chironomus riparius* larva örnekleri, sabit bir kütle elde edebilmek için bir gece boyunca  $75^\circ$  C'de fırında kurutulmuştur. Numuneler, CEM MARS 6 Mikrodalga Parçalama Sistemi (Matthews) kullanılarak mikrodalga destekli asit parçalama sistemi ile parçalanmıştır. Yaklaşık 0,01 g ağırlığındaki kurutulmuş numuneler tartılıp mikrodalga kabına konulmuştur ve 1,0 ml hidrojen peroksit (%30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suprapure, Merck Millipore) ve 3,0 ml nitrik asit (%67-69 HNO<sub>3</sub>, suprapure, Carlo Erba) eklenmiştir. Numuneler, belirtilen prosedürle kapalı kap mikrodalga parçalama sistemine tabi tutulmuştur: 30 dakika boyunca sıcaklık  $200^\circ$  C'ye çıkarılmış, 60 dakika boyunca sıcaklık  $200^\circ$  C'de tutulmuştur, daha sonra oda sıcaklığına soğutulmuştur. Parçalanmadan sonra, berrak çözeltiler elde edilmiştir. Parçalanmış numuneler 30 ml polietilen tüplere aktarılmış ve



Milli-Q su ile 30 ml'lik bir nihai hacme seyreltilmiştir. Blank değerini belirlemek için aynı prosedür örneksiz olarak uygulanmıştır.

Numuneler içindeki Ce iyonunun ICP-MS analiziyle tespitinin doğru yapılabilmesi için öncelikle cihaz kalibrasyonu yapılmıştır. Cihaz iç standardizasyonu 25 µg/L Rh çözeltisi olarak ayarlanıp, 0,1-1.000 µg/L konsantrasyon aralığında Ce standartlarını ölçerek harici kalibrasyon yapılmıştır. Matriks uyumlu kalibrasyon standart çözeltileri, Ce stok solüsyonundan (Merck, %5 HNO<sub>3</sub> içerisinde 1000 µg Ce m/L) hazırlanmıştır.

ICP-MS analizi için, SPS4 Agilent otomatik numune alma cihazı içeren Agilent 7900 ICP-MS cihazı kullanılmıştır. Enstrümantal parametrelerin optimizasyonu Çizelge 2.1'de özetlenmiştir. Parametrelerin optimizasyonu, yüksek hassasiyet, düşük oksit seviyeleri ve iki kat yüklü iyonlar elde etmek için her gün düzenli olarak yapılmıştır.

Çizelge 2.1 : ICP-MS Ce konsantrasyonunu belirlemek için ICP-MS işletim parametreleri.

Parametreler	Tür/Değer
<b><i>Numune Girişi</i></b>	
Nebulizatör	Miramist
Sprey Odası	Scott
Skimmer and Sampler Cone	Ni
<b><i>Plazma Parametreleri</i></b>	
İtici Güç	1480 W
Plazma Gaz Akışı	15,0 l/dk
Taşıyıcı Gaz Akışı	1,05 l/dk
Numune Derinliği	7,0 mm
Dilüsyon Gaz Akışı	0,1 l/dk
<b><i>Hücre Parametreleri</i></b>	
Gaz Akışı	/
Octopole Bias	-10,0 V
Enerji Diskriminasyonu	5,0 V
<b><i>Veri Toplama Parametreleri</i></b>	
İzlenen İzotop	<sup>140</sup> Ce
İç Standard İzotopları	<sup>103</sup> Rh

Analitik yöntemin doğruluğunu değerlendirmek için standart nano-CeO<sub>2</sub> (US Research Nanomaterials, ağırlıkça %20 nano-CeO<sub>2</sub> süspansiyonu), kronomid dokusu için standart referans materyali (SRM) (2976, US National Institute of Standards and Technology, 0,109 ± 0,008 mg/kg Ce içeren) ve nano-CeO<sub>2</sub> süspansiyonu ile birleştirilmiş SRM 2976, numunelerle aynı şekilde parçalanmıştır. Nano-CeO<sub>2</sub> süspansiyonu önce vorteks (10 sn) ve ultrasonik banyo (20 dk) kullanılarak dağıtılmış ve sonra 10 µg/ml nihai CeO<sub>2</sub> konsantrasyonlu bir süspansiyon elde etmek için seyreltilmiştir. Bu süspansiyonun 100 µl'si, mikrodalga kaplara aktarılmış ve parçalanmıştır. İyi geri kazanımlar (121 ± 4%, n = 3) elde edilmiştir. SRM 2976'nın

parçalanması için  $0,1 \pm 0,005$  g numune (kuru kütle) kullanılmış ve tespit edilen Ce konsantrasyonu  $0,097 \pm 0,013$  mg/kg ( $n = 3$ ) olmuştur. Ek olarak, 0,1 g SRM 2976, 100 µl ve 10 µg/ml nano-CeO<sub>2</sub> ile birleştirilip, yine aynı mikrodalga destekli parçalanmaya tabi tutulup ve ICP-MS ile ölçülmüştür. %93 ± 1 geri kazanım ( $n = 3$ ) elde edilmiştir.

Nano-CeO<sub>2</sub>'ye maruz bırakılan larvaların CeO<sub>2</sub> alım konsantrasyonlarını hesaplamak için aşağıdaki denklem kullanılmıştır:

$$CeO_2 \text{ kons.} = (\text{Deney numunesinin Ce kons.} - \text{Kontrolün background Ce kons.}) * (CeO_2 / Ce) \text{ kütle oranı}$$

$$(CeO_2 / Ce) \text{ kütle oranı} = 1,2286 \quad (2.1)$$

Veriler, Kolmogorov-Smirnov istatistiği (Lilliefors Significance Correction tekniği ile) kullanılarak normal dağılıma uyum ve varyansların homojenitesi açısından analiz edilmiştir.

Sediment içindeki CeO<sub>2</sub> konsantrasyonları (maruziyet konsantrasyonu) ile kronomit larvalar tarafından alınan nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonu arasındaki korelasyonu araştırmak için non-parametrik Spearman Rank Order Korelasyon Testi kullanılmıştır.

Farklı maruziyet konsantrasyonları ile dozlanmış larvaların nano-CeO<sub>2</sub> alım konsantrasyonlarını karşılaştırmak için, normalite testi ve varyansların homojenliği varsayımlarına uygunluğu belirlendikten sonra tek-yönlü varyans analiz yöntemi (ANOVA) kullanılmıştır.

Analizler, SPSS istatistiksel yazılım paketi (IBM, Windows sürüm 15.0) kullanılarak yapılmıştır. Anlamlılık seviyesi  $p < 0,05$  olarak ayarlanmıştır.

#### **2.2.4.2 Yaşam Döngüsü Toksikite Analizi**

Nano-CeO<sub>2</sub>'nin ergin bireyler üzerindeki öldürücü etkilerini değerlendirmek için yapılan bu çalışmada, kronomid bireyler ilk larva aşamasından itibaren CeO<sub>2</sub> nanoparçacıklarına maruz bırakılmıştır.

Larvalar sediment ortamına sokulduktan sonra;

- 10. Gün: ilk midgeler (sinekler) ortaya çıkmaya başlamıştır.
- 22. Gün: son ergin midge ortaya çıkmıştır.
- 27. Gün: beş gün gözlem yapılmış ve yeni bir midge gözlenmediği için deney sonlandırılmıştır.

Deney boyunca her gün tam olarak ortaya çıkan midge (sinek) sayısı kaydedilmiştir. Deney, son ergin midge ortaya çıktıktan beş gün (27. Gün) sonra sonlandırılmıştır.

Veriler, Kolmogorov-Smirnov istatistiği (Lilliefors Significance Correction ile) ve Shapiro-Wilk ve Levene istatistikleri kullanılarak normalite ve homojenlik açısından analiz edilmiştir.

Normalite ve homojenite testlerinin normal dağılım göstermemesi nedeniyle mortalite, non-parametrik ANOVA (Kruskal-Wallis testi) kullanılarak analiz edilmiştir. Gelişim süresi ve gelişim hızı, tek-yönlü ANOVA (ikili karşılaştırma için Dunnett post-hoc testi ile) kullanılarak test edilmiştir.

Analizler, SPSS istatistiksel yazılım paketi (IBM, Windows sürüm 15.0) kullanılarak yapılmıştır. Anlamlılık seviyesi  $p < 0,05$ 'tir.

### **2.2.4.3 Toplam Protein İçeriği ve Oksidatif Stres Analizi**

Nano-CeO<sub>2</sub>'nin kronomidler üzerindeki subletal etkilerini değerlendirmek için yapılan bu çalışmada, kronomidlerin dördüncü instar larvaların görülmesinden üç gün sonra (10. gün) deney tamamlanmıştır. Hayatta kalan larvaların sayısı kaydedilmiş ve kaydedilen tüm örnekler hemen toplanarak, distile suyla iyice yıkanıp ve %95 etanol içine alınıp saklanmıştır. Her düzenekten toplam beş larva alınmıştır.

İkinci deneyden alınan *Chironomus riparius*'un dördüncü instar larvaları homojenleştirilip, nano-CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalması sebebiyle oluşan oksidatif stres parametreleri ölçülmüştür.

Total protein konsantrasyonu, Lowry ve arkadaşlarının 1951'de standart olarak sığır serum albümini (BSA) kullanılarak geliştirdikleri yöntemle göre hesaplanmıştır [109].

Lipid peroksidasyonu, Ohkawa ve arkadaşlarının 1979'da modifiye ettikleri malonil dialdehit (MDA) konsantrasyonunun ölçülmesi için kullanılan metot ile hesaplanmıştır [110].

200 µl homojenize doku örneği, 200 µl %8,1 sodyum dodesil sülfat (SDS), 1,5 ml %20 asetik asit (pH = 3,5) ve 1,5 ml %0,81 tiobarbitürik asit ile karıştırılmış ve 95 °C'de 60 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Buz üzerinde soğutulduktan ve santrifüjlendikten sonra, oluşan süpernatantın Libro S22 Spektrofotometre cihazı (Biochrom) ile 532 ve 600 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülmüştür. Toplam absorbans değeri, aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir:

$$A_{toplam} = A_{532nm} - A_{600nm} \quad (2.2)$$

MDA seviyeleri, malondialdehit-tiyobarbiturat (MDA-TBA) kompleksi için molar absorpsiyon katsayısı ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) kullanılarak belirlenmiştir.

Süperoksit dismutaz (SOD) seviyeleri, Flohé, 1984, yönteminde modifiye edilen SOD yöntemi kullanılarak saptanmıştır [111]. SOD aktivitesi, ksantin oksidasyonunun ( $\Delta A/dk \sim 0,025$ ) inhibisyon yüzdesi hesaplanarak bulunmaktadır. Ksantin oksidasyonu, örneklerde bulunan SOD için substrat olarak süperoksit anyon oluşturmaktadır. Enzim tarafından kullanılmayan süperoksit anyonu, sitokromu okside etmektedir. Seyreltilmemiş bir numune (25 µl), 1,45 ml reaksiyon çözeltisi (sitokrom C, 0,05 mM; ksantin, 1 mM, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic asit ile 10:1 oranında karıştırılmış) ile karıştırılmıştır. Reaksiyonu başlatmak için 20 µl ksantin oksidazdan (0.4 U/mL) ilave edilmiştir. Reaksiyon, Libro S22 Spektrofotometre (Biochrom) cihazı ile 550 nm dalga boyunda 3 dakika bir ölçülmüştür. Toplam SOD aktivitesinin bir birimi, standart SOD ile elde edilen tipik kalibrasyon eğrisinde %50 inhibisyon elde etmek için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. At kalbi sitokrom C (tip VI), insan kanı SOD (tip I, liyofilize toz, 2400 U/mg protein), ksantin ve ksantin oksidaz (200 U/mL) Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir.

Veriler, Kolmogorov-Smirnov istatistiği (Lilliefors Significance Correction ile) kullanılarak normalite ve homojenlik açısından analiz edilmiştir. Analiz için tek-yönlü ANOVA (ikili karşılaştırma için Dunnett post-hoc testi ile) kullanılmıştır.

Analizler, SPSS istatistiksel yazılım paketi (IBM, Windows sürüm 15.0) kullanılarak yapılmıştır. Anlamlılık seviyesi  $p < 0,05$ 'tir.

#### **2.2.4.4 Genotoksisite Analizi-Komet Yöntemi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)**

Nano-CeO<sub>2</sub>'nin somatik hücrelerde DNA'ya zarar verip vermeyeceğini belirlemek için, ikinci deneyden *Chironomus riparius*'un dördüncü instar larvası analiz için alınmıştır.

1988 yılında Singh tarafından bulunan Komet analiz yönteminin Bernabo ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiş şekli çalışmada kullanılmıştır [112]. Çalışmada kullanılan kontrol grubu negatif kontrol olarak adlandırılmıştır. Negatif kontrol nano-CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalmadığı için hasarsız dokuların tespitinde faydalı olmuştur. Ek olarak, hasar miktarı belirlemede katkı sağlaması için hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 4 °C'de 1 saat boyunca 100 mM) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan fosfat tamponlu salin agar (PBS), kalsiyum ve magnezyum içermeyen ve düşük erime noktalı agar (LMA), Alfatrade Enterprise (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Almanya)'dan temin edilmiştir.

Somatik hücrelerdeki DNA hasarı seviyesini belirlemek için, deney başına 10 adet canlı larva 1 ml süspansiyon tamponu (1\*PBS, 20 mM EDTA, %10 DMSO, pH 7,4) içine yerleştirilip, mekanik olarak parçalanıp, filtre edilmiştir. 3 ml'lik bir süspansiyon tamponunda yeniden süspense edilmiştir. Homojen karışım, 15 dakika boyunca 1500 rpm'de 4°C'de santrifüjlenmiş ve 150 µL süspansiyon tamponunda yeniden süspense edilmiştir. Hücre süspansiyonundan 10 µl, 75 µl %1 LMA ile karıştırılmış ve 75 µl bu karışım, bir mikroskop lamı üzerine yayılmıştır.

İçinde hücre olan slaytlar karanlıkta 10 dakika boyunca etidyum bromür ile boyanıp, daha sonra cam kapağı üzerine kapatılıp ve Nikon floresan mikroskobu (Ti-Eclipse) altında gözlemlenmiştir. Toplam 150 hücre (üç kopya lamın her birinden 50 hücre) analiz edilmiştir. Her slayt için, DNA hasarının kapsamı, farklı migrasyon sınıflarına ayırarak görsel olarak belirlenmiştir. Sübjektif olabilmek için, hangi örneğin hangi numuneden geldiği önceden bilinmemektedir. Kometler, beş kategoride sınıflandırılmıştır.

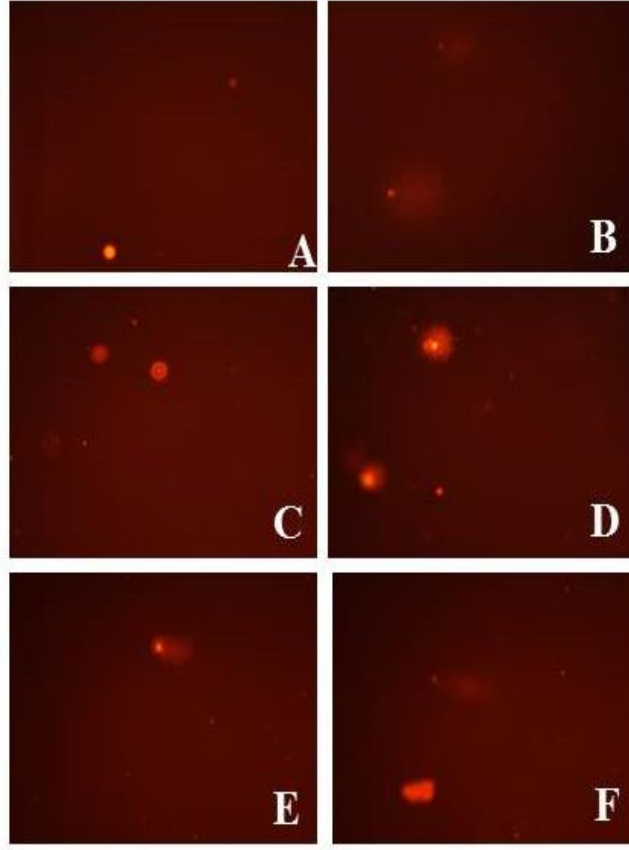
Çizelge 2.2 : Kometlerin hasar miktarına göre sınıflandırılması.

0	Hiç ya da çok düşük
1	Az
2	Orta
3	Çok
4	en yüksek hasar (yüksek degradasyon (bozunma seviyesi)) (çok küçük baş, uzun kuyruk)

Toplam komet puanı aşağıdaki denkleme göre hesaplanmaktadır:

$$(\% \text{ hücre (0. Sınıf)} * 0) + (\% \text{ hücre (1. Sınıf)} * 1) + (\% \text{ hücre (2. Sınıf)} * 2) + (\% \text{ hücre (3. Sınıf)} * 3) + (\% \text{ hücre (4. Sınıf)} * 4) \quad (2.3)$$

Böylece, toplam puan 0 (tümü hasarsız) ila 400 (tamamen hasar görmüş) arasında değişmektedir. Nano-CeO<sub>2</sub> ile maruziyetten sonra *Chironomus riparius* dördüncü instar larvalarındaki DNA hasarını gösteren komet analizi sonuçlarının temsili fotomikrografları Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3 : *Chironomus riparius* dördüncü instar larvalarında nano CeO<sub>2</sub> ile muameleden sonra DNA hasarını gösteren komet testlerinin fotomikrografları.

- Negatif kontrol (A),
- Pozitif kontrol, 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B),
- 2,5 mg/kg nano CeO<sub>2</sub> içeren sediment örneği (C),
- 25 mg/kg nano CeO<sub>2</sub> içeren sediment örneği (D),
- 250 mg/kg nano CeO<sub>2</sub> içeren sediment örneği (E),
- 2500 mg/kg nano CeO<sub>2</sub> içeren sediment örneği (F).

Kontrol ve dozlanmış larvalar arasındaki istatistiksel farklar, SPSS istatistiksel yazılım paketi (IBM, Windows sürüm 13.0) kullanılarak tek-yönlü ANOVA analizi ile incelenmiştir. Anlamlılık seviyesi  $p < 0,05$  olarak ayarlanmıştır.

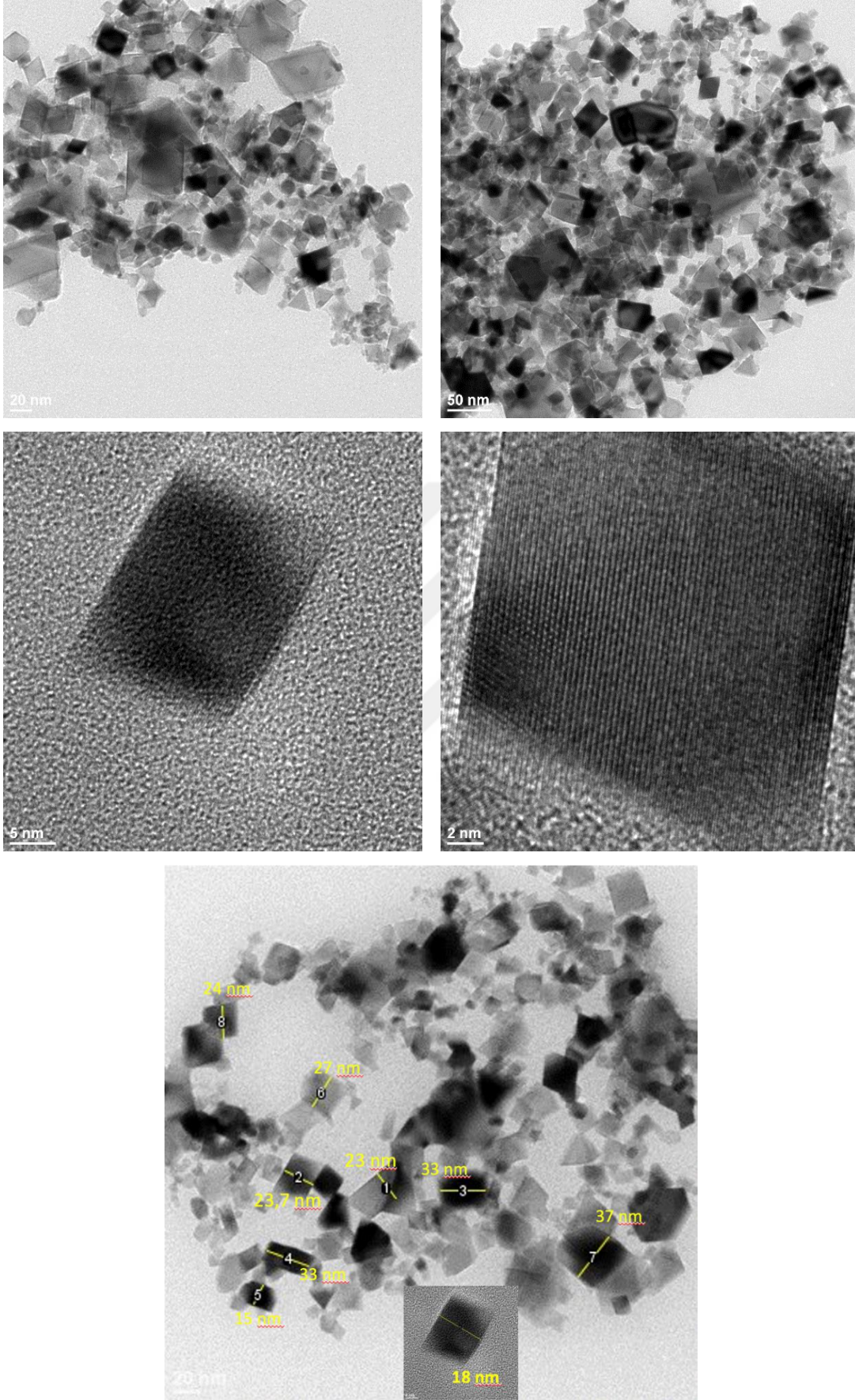


## **2.3 Bulgular**

### **2.3.1 Nano CeO<sub>2</sub> Karakterizasyonu**

#### **2.3.1.1 Morfolojik Analiz**

CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların morfolojisi (partikül çapı, boyut dağılımı ve yüzey özellikleri) geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) (FEI Tecnai G2 F30) ile incelenmiştir. TEM görüntüleri CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların geniş bir parçacık dağılımına sahip olduğunu göstermiştir. Parçacıklar tam bir küre değil, açılı (köşeli) bir şekle sahiptir. Parçacık boyutları 23,25 ile 29,30 nm arasında değişmektedir. Ayrıca, parçacıklar etanol çözeltisi içerisinde topaklanmıştır. TEM görüntülerine göre tanecik boyutu hesaplaması yapılmıştır. Parçacık boyutunun ortalaması ve standart sapması  $25,32 \pm 1,81$  nm'dir.



Şekil 2.4 : CeO<sub>2</sub> parçacıklarının TEM görüntüleri.

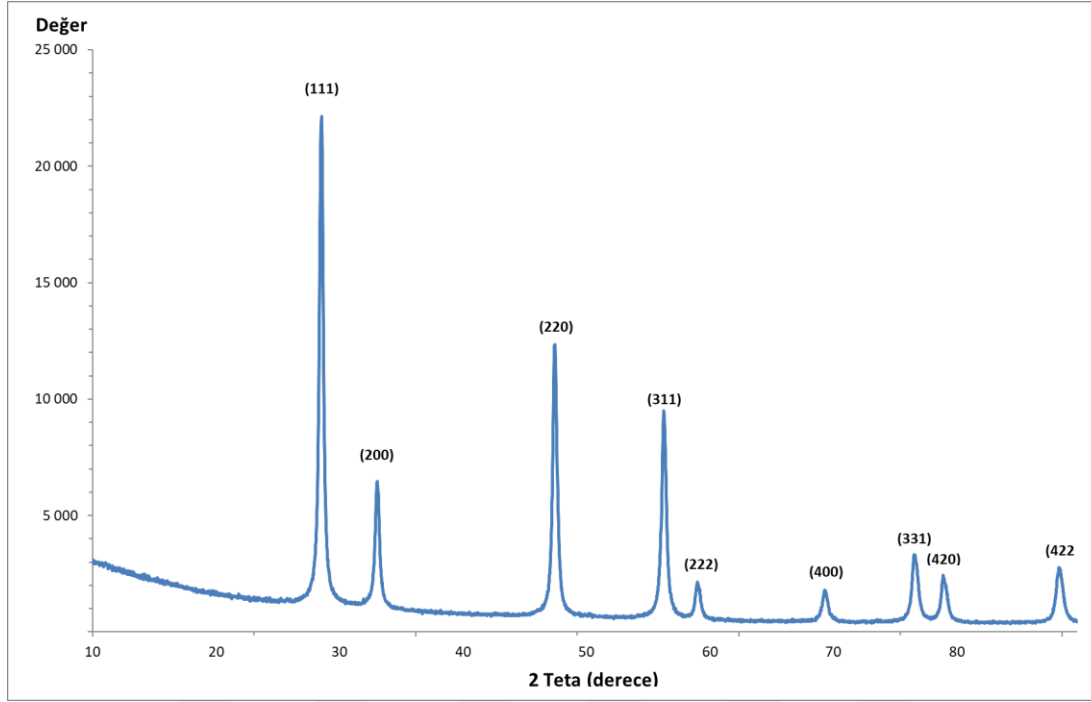
Çizelge 2.3 : Hesaplanan tanecik boyutu değerleri.

Ölçülen Değerler (nm)	
1	29,30
2	27,24
3	27,09
4	26,97
5	26,59
6	25,75
7	25,44
8	25,12
9	24,76
10	23,95
11	23,82
12	23,64
13	23,52
14	23,32
15	23,25

### 2.3.1.2 CeO<sub>2</sub> Nanoparçacıkların Kristal Yapısı

CeO<sub>2</sub> nanoparçaların kristal yapısı X-Işınımı Kırınım (XRD) ölçümleri (Pananalytical X'pert Pro çok amaçlı X-Işınımı Kırınım Ölçer) cihazında yansıma geometrisi ile gerçekleştirilmiştir.

XRD analizinde elde edilen bütün kırınım pikleri iyi tanımlanmıştır ve bu piklerin kusursuz florit kristal (yüzey merkezli kübik/fcc) yapıda olduğu belirlenmiştir. Keskin pikler CeO<sub>2</sub> parçacıkların (111), (200), (311), (200), (220), (311), (222), (400), (311), (420) ve (422) kristal yüzeylerine karşılık gelmektedir. Başka kristal yapılara ait karakteristik piklere rastlanmamıştır.

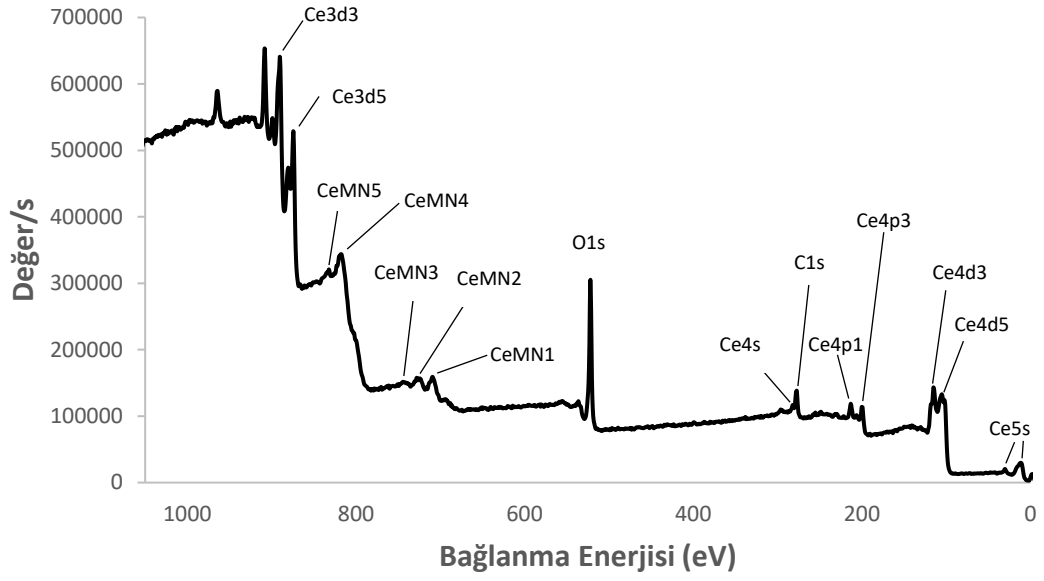


Şekil 2.5 : CeO<sub>2</sub> kristal yapısının XRD görünümü.

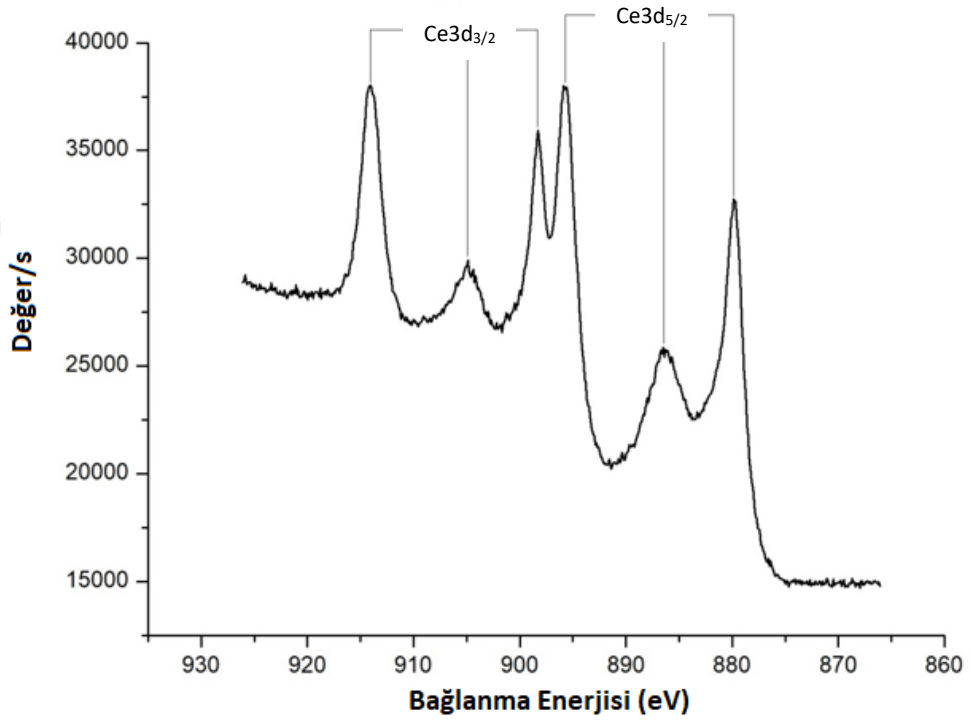
### 2.3.1.3 CeO<sub>2</sub> Nanoparçacıkların Yüzey Kimyası

CeO<sub>2</sub> örneğinin XPS incelemesi Şekil 2.6'da gösterilmiştir. Ce3d spektrası, CeO<sub>2</sub> karakteristiği olan, 915-900 eV arasında Ce<sub>3/2</sub> pikleri ve 895-875 eV arasında Ce<sub>5/2</sub> pikleri göstermiştir (Şekil 2.7).

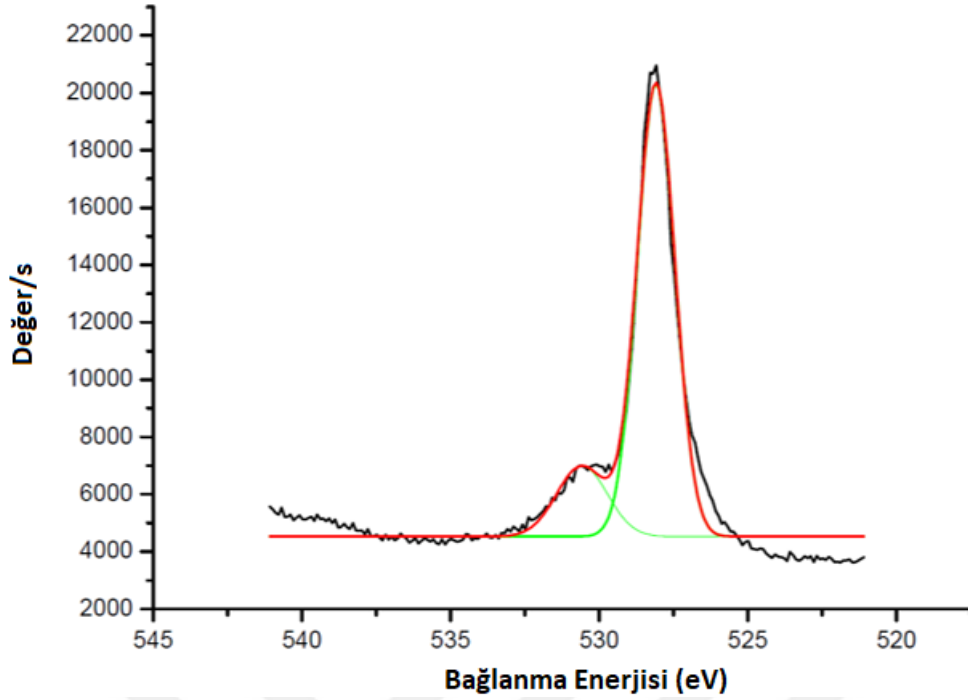
O1s spektrası 529.2 eV değerinde, tetravalent Ce iyonlarına bağlı oksijen olarak saptanan bir ana pik ile ~532.5 eV değerinde, yüzeyin kısmen hidroksit OH grupları ile kaplandığına işaret eden başka bir pik daha göstermiştir (Şekil 2.8). Ayrıca Seryum:Oksijen oranı, CeO<sub>2</sub>'nin florit kristal yapıda olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.6 : CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların XPS spektra incelemesi.



Şekil 2.7 : Ce3d pikinin XPS spektrası.



Şekil 2.8 : O1s pikinin XPS spektrası.

#### 2.3.1.4 CeO<sub>2</sub> Nanoparçacıkların Yüzey Alanı ve Gözenek Yapısı

BET analizlerine göre, CeO<sub>2</sub> topraklarının özgül yüzey alanı 42,602 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, gözenek hacmi 1,172cc g<sup>-1</sup> ve gözenek yarıçapı 1075.761 Å olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 2.4'te gösterilmiştir. Sonuçlara göre topraklanma eğiliminden dolayı CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların yüzey alanı ve gözenek yarıçap değerleri tanecik boyutuna göre büyüktür.

Çizelge 2.4 : BET analiz sonuçları.

CeO <sub>2</sub>	Özgül yüzey alanı	Gözenek hacmi	Gözenek yarıçapı
	42,602 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>	1,172 cc g <sup>-1</sup>	1075,761 Å

### 2.3.1.5 CeO<sub>2</sub> Nanoparçacıkların Hidrodinamik Çapları ve Sulu Ortamdaki Kararlılıkları

Deiyonize su içindeki CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların ortalama hidrodinamik çaplarının zamanla değişimi Çizelge 2.5'te gösterilmiştir. Çözeltinin polidispersite değerleri 0,879 ile 0,55 arasında değişkenlik göstermiştir. Ölçümler sonucunda solvasyon kuvvetlerin etkisi ile CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların su moleküllerinin üzerine adsorplanarak tutunduğu, böylelikle daha yüksek çap değerlerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların suda çözünmediği ya da dağılmadığı daha çok çözelti oluşturma eğiliminde olduğu kanıtlanmıştır.

Çizelge 2.5 : CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların hesaplanmış ortalama hidrodinamik çapları ve polidispersite değerlerinin zamanla değişimi.

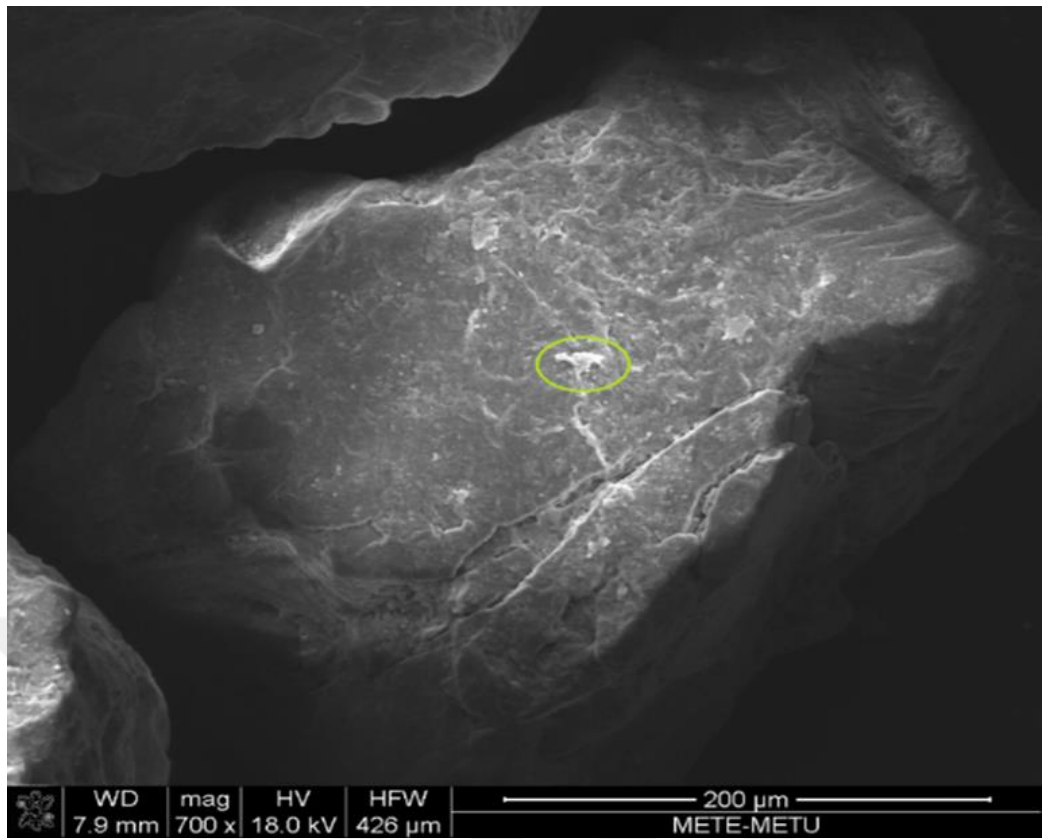
Zaman (dk)	d <sub>H</sub> (nm)	PDI
5	1068	0,879
10	803,2	0,784
15	687,7	0,68
20	716,1	0,71
25	552,3	0,571
30	513,3	0,525
35	477,2	0,61
40	558,2	0,818
45	580,9	0,594
50	817,9	0,795
55	642,8	0,652
60	639,9	0,655

Ayrıca zeta potansiyel değeri, deiyonize su içerisinde çözelti hazırlandıktan sonra 28mV olarak ölçülmüştür. Bu değer CeO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin deiyonize suda orta derecede bir stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir.

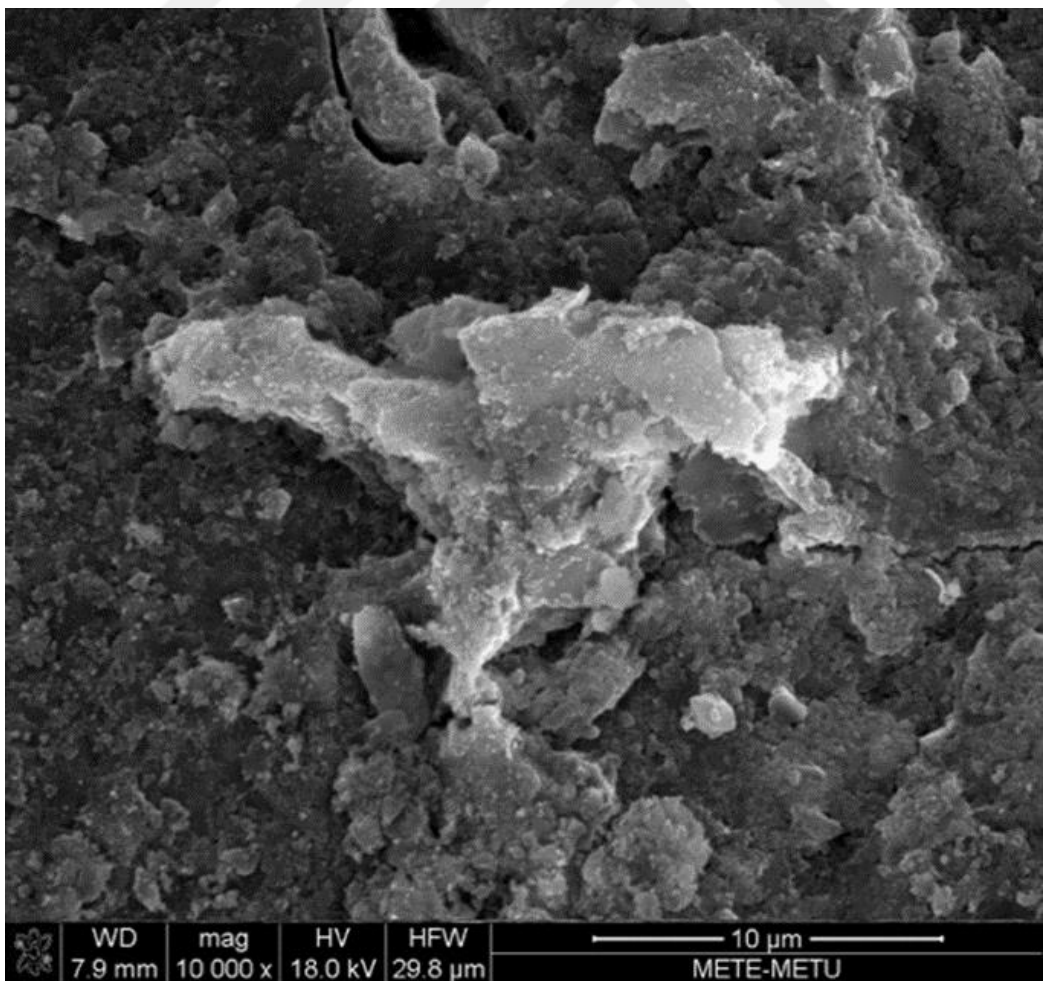
### 2.3.1.6 Sediment Analizleri

CeO<sub>2</sub> nanoparçacıklar normal şartlar altında nano boyutta oldukları için SEM ile görüntülenememektedirler. Ancak, sediment içinde nano-CeO<sub>2</sub>'ler topaklanarak SiO<sub>2</sub> (silika) partiküllerinin üzerine tutunmuşlardır. Bu sebeple SEM ile görüntü alınabilmektedir. Şekil 2.9a'da bu durumu göstermektedir. Şekil 2.9b, aynı partikülün daha büyütülmüş görüntüsüdür. Silika taneciklerinin üzerindeki CeO<sub>2</sub>'nin varlığı EDX analizi ile teyit de edilmiştir. Si ve Ce'nin ağırlıkça miktarları %17,32 ve 82,68'dir (Şekil 2.9c). CeO<sub>2</sub>'nin sediment içinde farklı boyutlarda topaklanarak dağılım gösterdiği açıktır. CeO<sub>2</sub> topaklanmaları, test edilen 2.500 mg/kg CeO<sub>2</sub> konsantrasyonu için 2-25 µm arasında değişen geniş bir dağılım gösterirken, CeO<sub>2</sub> kümelenmeleri, 250 mg/kg CeO<sub>2</sub> konsantrasyonu için 5-10 µm arasında değişmektedir. SEM görüntülerinden, sadece CeO<sub>2</sub> partiküllerinin bir araya toplanmadığı, aynı zamanda silika partiküllerinin üzerine yapıştığı sonucuna da varılmıştır çünkü SEM'in metal numune koyma haznesi üzerinde herhangi bir CeO<sub>2</sub> topaklanmasına rastlanmamıştır.

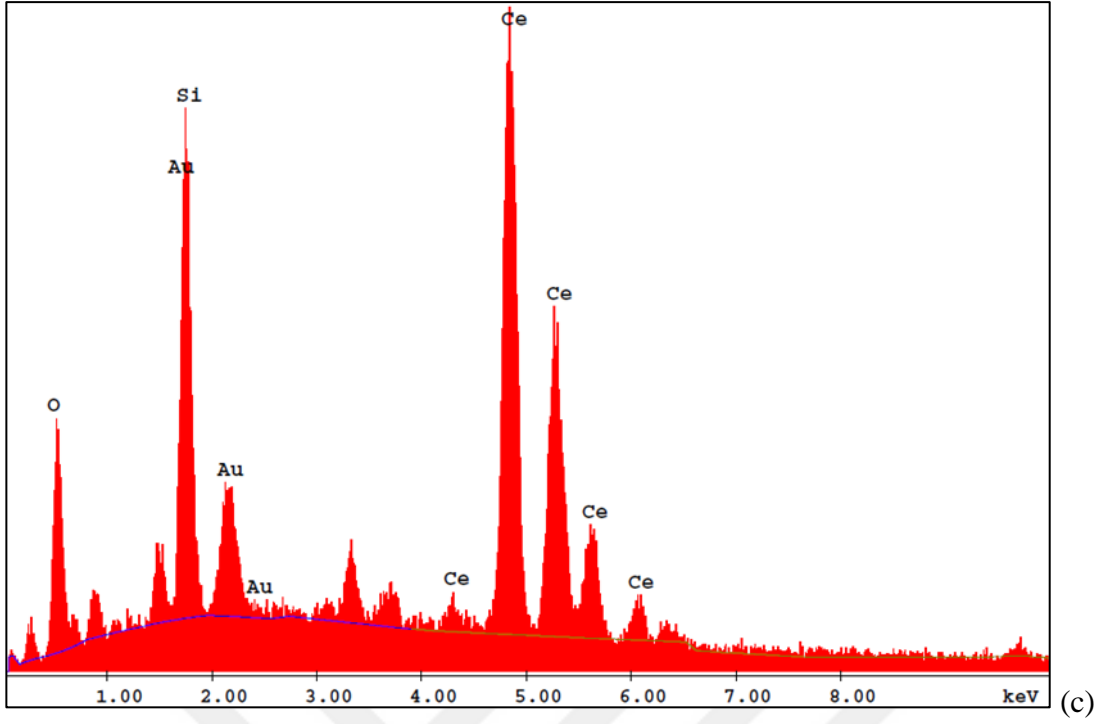




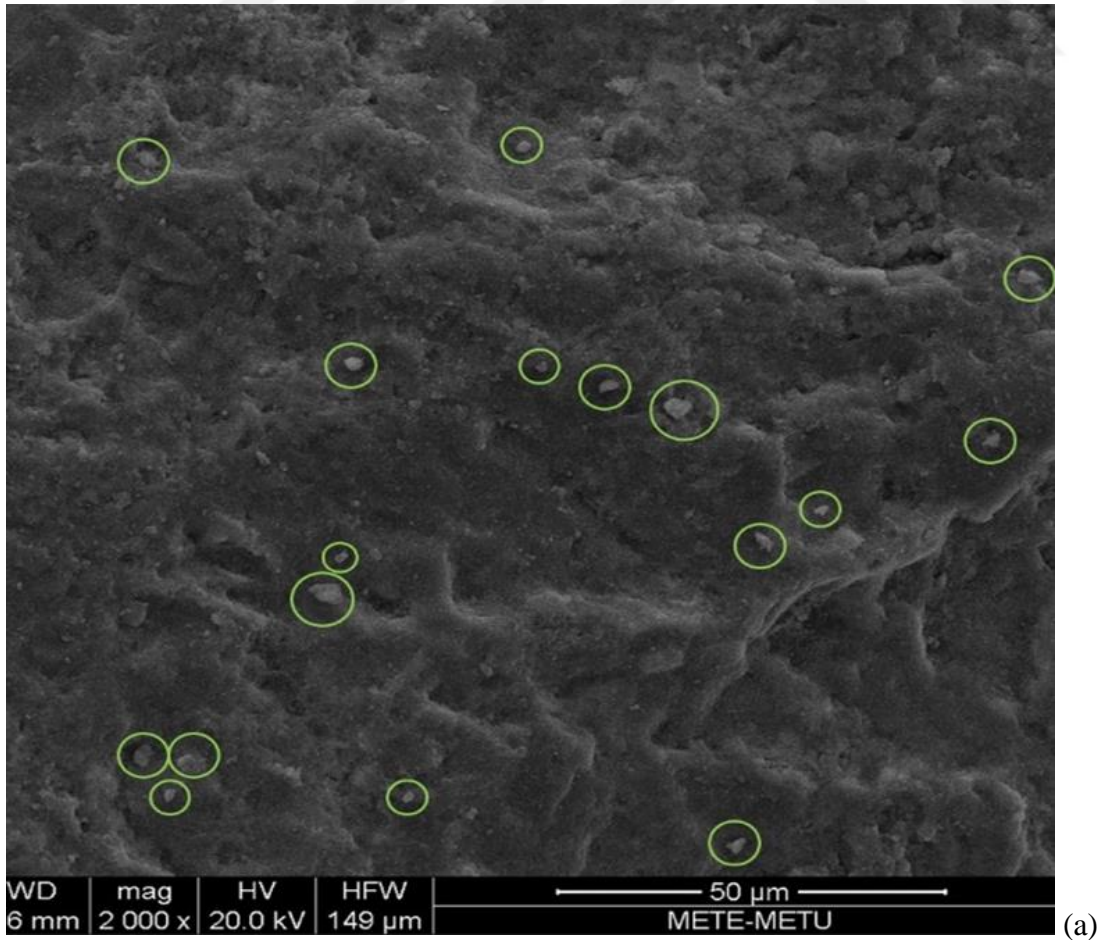
(a)

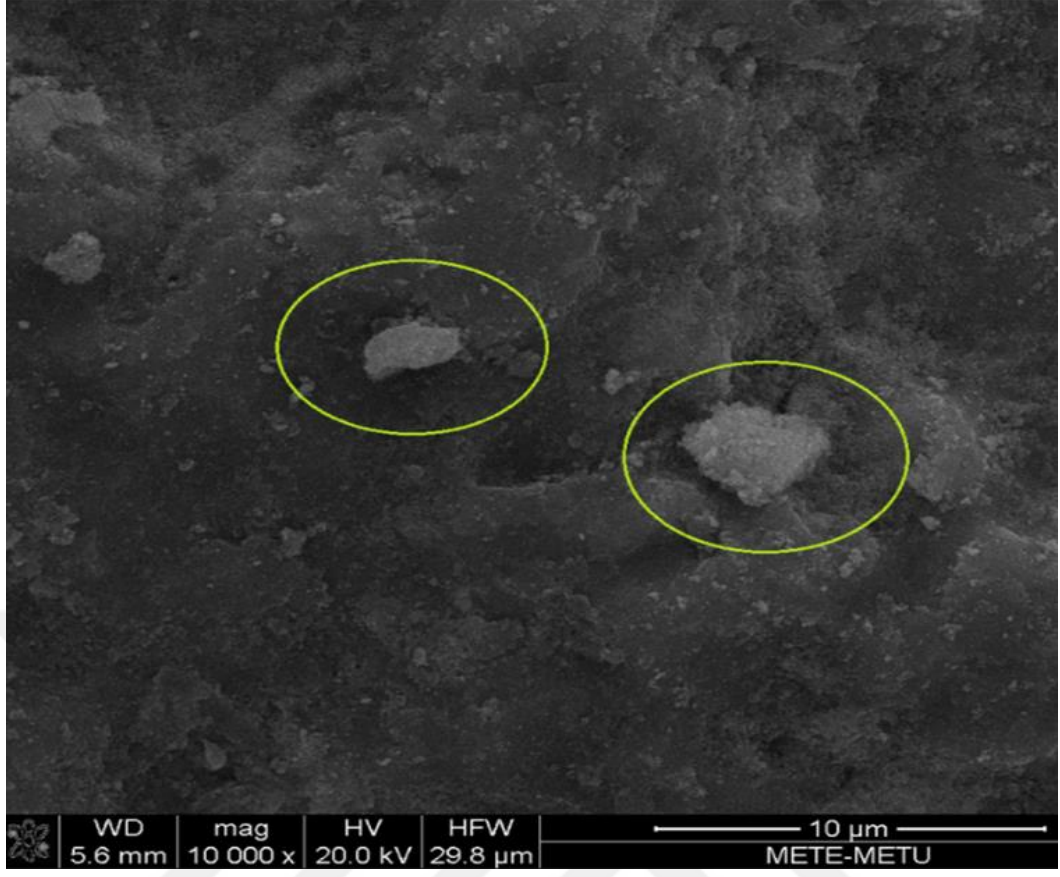


(b)

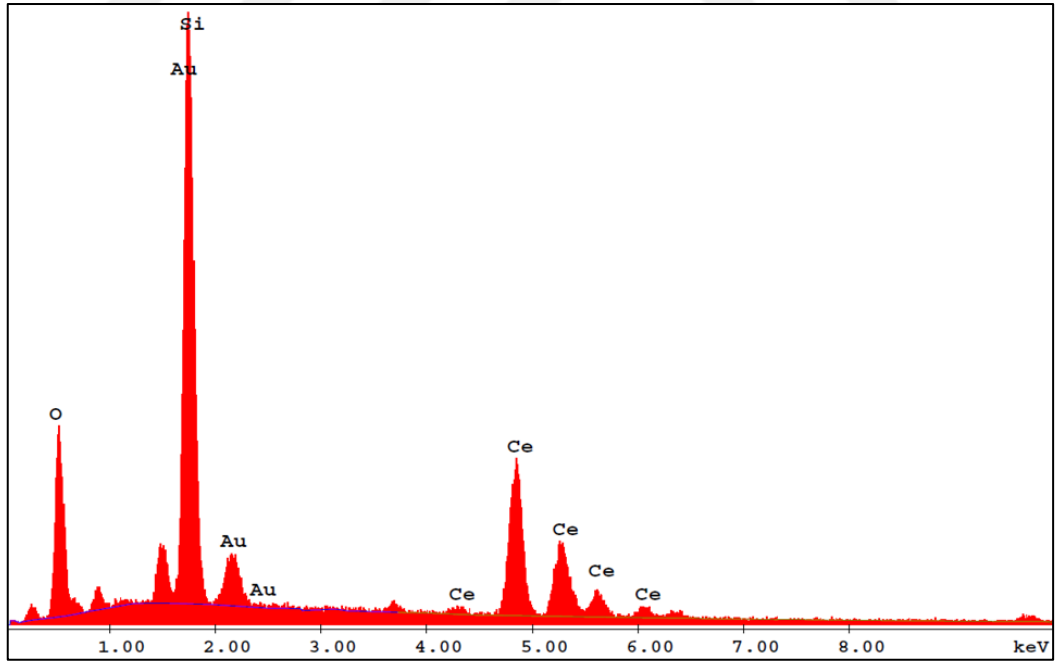


Şekil 2.9 : (a) Tek bir kum yüzeyinde bulunan topaklanmış  $\text{CeO}_2$  nanoparçacığın SEM görüntüsü (konsantrasyon nano- $\text{CeO}_2$ /sediment: 2.500 mg/kg), (b) Şekil a'da gösterilen  $\text{CeO}_2$  topağının büyütülmüş SEM görüntüsü, (c) aynı noktanın EDX dataları.



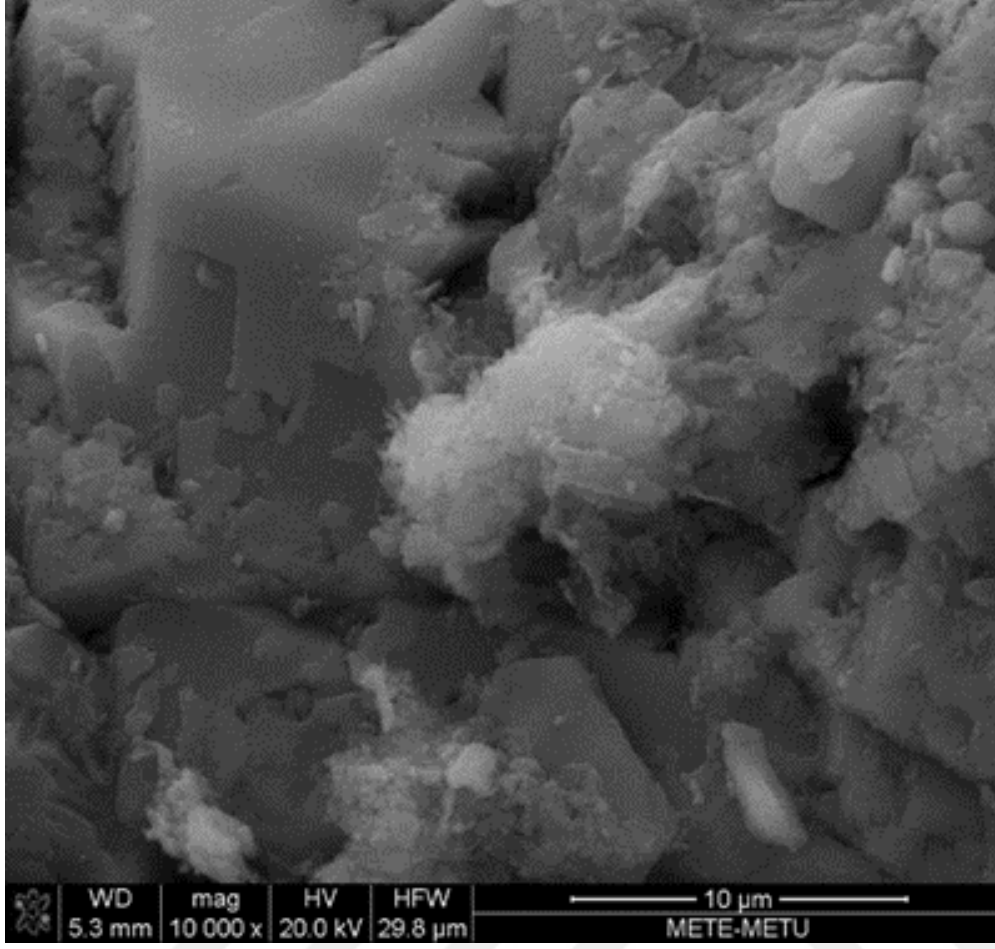


(b)

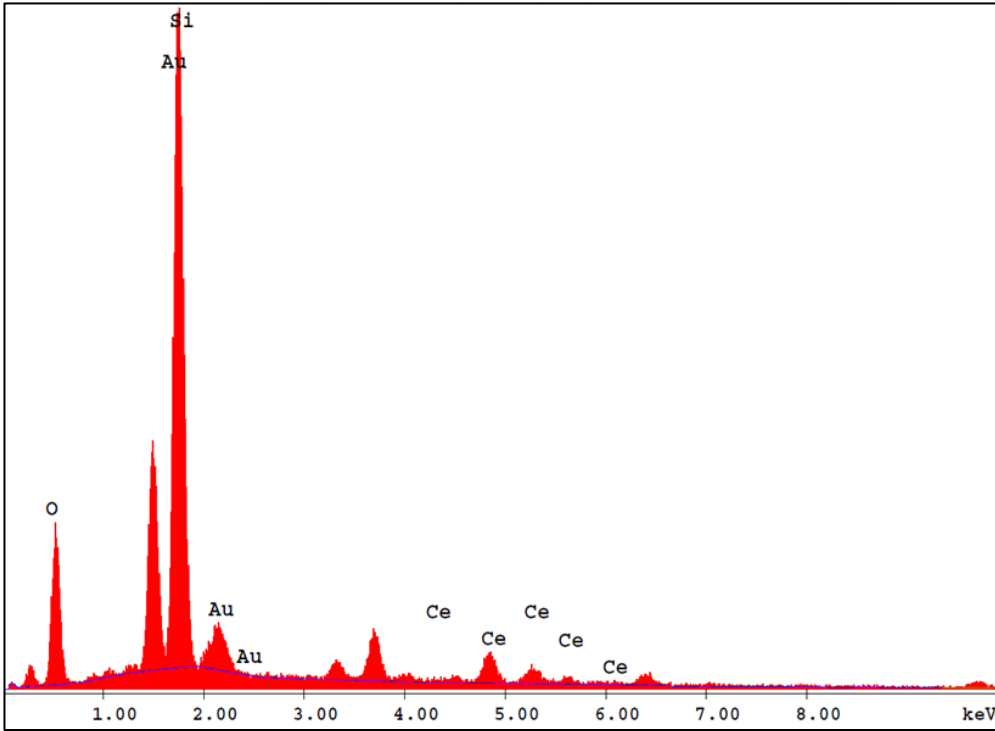


(c)

Şekil 2.10 : (a) Farklı yerlerde topaklanmış  $\text{CeO}_2$  nanoparçacıklarının SEM görüntüsü (konsantrasyon nano- $\text{CeO}_2$ /sediment: 2.500 mg/kg), (b) Şekil a'da gösterilen iki noktanın büyütülmüş SEM görüntüsü, (c) ilgili noktaların EDX dataları.



(a)



(b)

Şekil 2.11 : (a) Tek bir kum yüzeyinde bulunan topaklanmış  $\text{CeO}_2$  parçacığının SEM görüntüsü (konsantrasyon nano- $\text{CeO}_2$ /sediment: 250 mg/kg), (b) ilgili noktaların EDX dataları.

### 2.3.2 *Chironomus riparius* larvaları tarafından Nano-CeO<sub>2</sub> alımı

*Chironomus riparius* larvalarının CeO<sub>2</sub> nanopartikül maruziyetini tespit etmek için yüksek hassasiyeti nedeniyle ICP-MS tekniği tercih edilmiştir. ICP-MS analiz sonuçları Çizelge 2.6'da verilmiştir. Sonuçlar, *Chironomus riparius* larvalarındaki CeO<sub>2</sub> konsantrasyonlarının, kontrollerde ortalama 12 mg/kg CeO<sub>2</sub> vücut ağırlığında iken, en yüksek doz uygulanmış numunede 29.100 mg/kg vücut ağırlığına ulaştığını ve CeO<sub>2</sub> konsantrasyonları arasında önemli ölçüde farklılıklar olduğunu göstermiştir. (Tek yönlü ANOVA:  $p < 0.05$ ,  $F = 69.331$ ; Çizelge 2.6). Spearman'ın rank korelasyonu, sedimentteki nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonu ile kronomid larvadaki nano-CeO<sub>2</sub> miktarı arasında yüksek oranda pozitif korelasyon olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Çizelge 2.6 : *Chironomus riparius* larvalarındaki ICP-MS ile saptanan toplam seryum (Ce) konsantrasyonları ve CeO<sub>2</sub>'ye oranlanması.

Numuneler (mg/kg nano CeO <sub>2</sub> /sediment)	Ce (mg/kg vücut ağırlığı)	CeO <sub>2</sub> (mg/kg vücut ağırlığı)
Kontrol	10 ± 4	12 ± 5
2,5	53 ± 1	66 ± 1
25	251 ± 54	309 ± 66
250	1910 ± 300	2340 ± 370
2500	23700 ± 5300	29100 ± 6500

### 2.3.3 Nano-CeO<sub>2</sub>'nin *Chironomus riparius*'ların yaşam döngüsü üzerindeki toksik etkisi

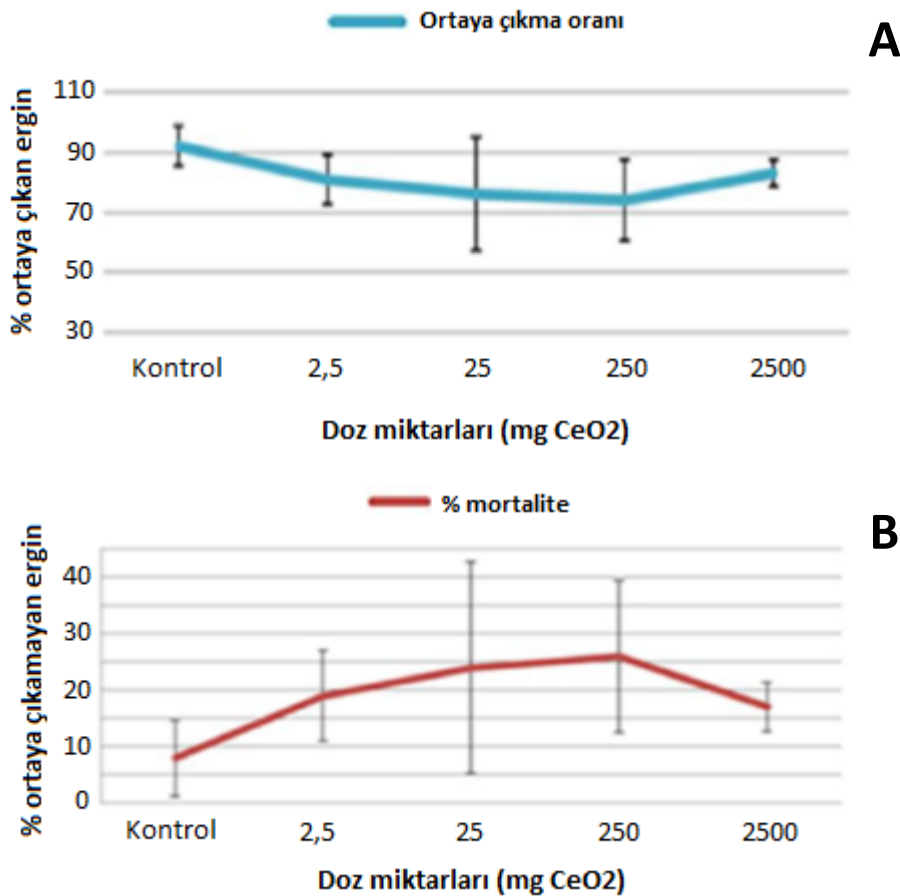
Larvalar sedimente sokulduktan 10 gün sonra midgeler ortaya çıkmaya başlamıştır ve son ergin midge 22. günde ortaya çıkmıştır. Çalışma, kontrol grubu içindeki son erginin ortaya çıkmasından beş gün sonra, yani 27. günde sona erdirilmiştir. Yaşam döngüsü son nokta analizi, kontrolde (23 örnek) ortalama 15 gün içerisinde en fazla sayıda midgenin ortaya çıktığını göstermiştir (Çizelge 2.7, Şekil 2.12). Ortaya çıkma

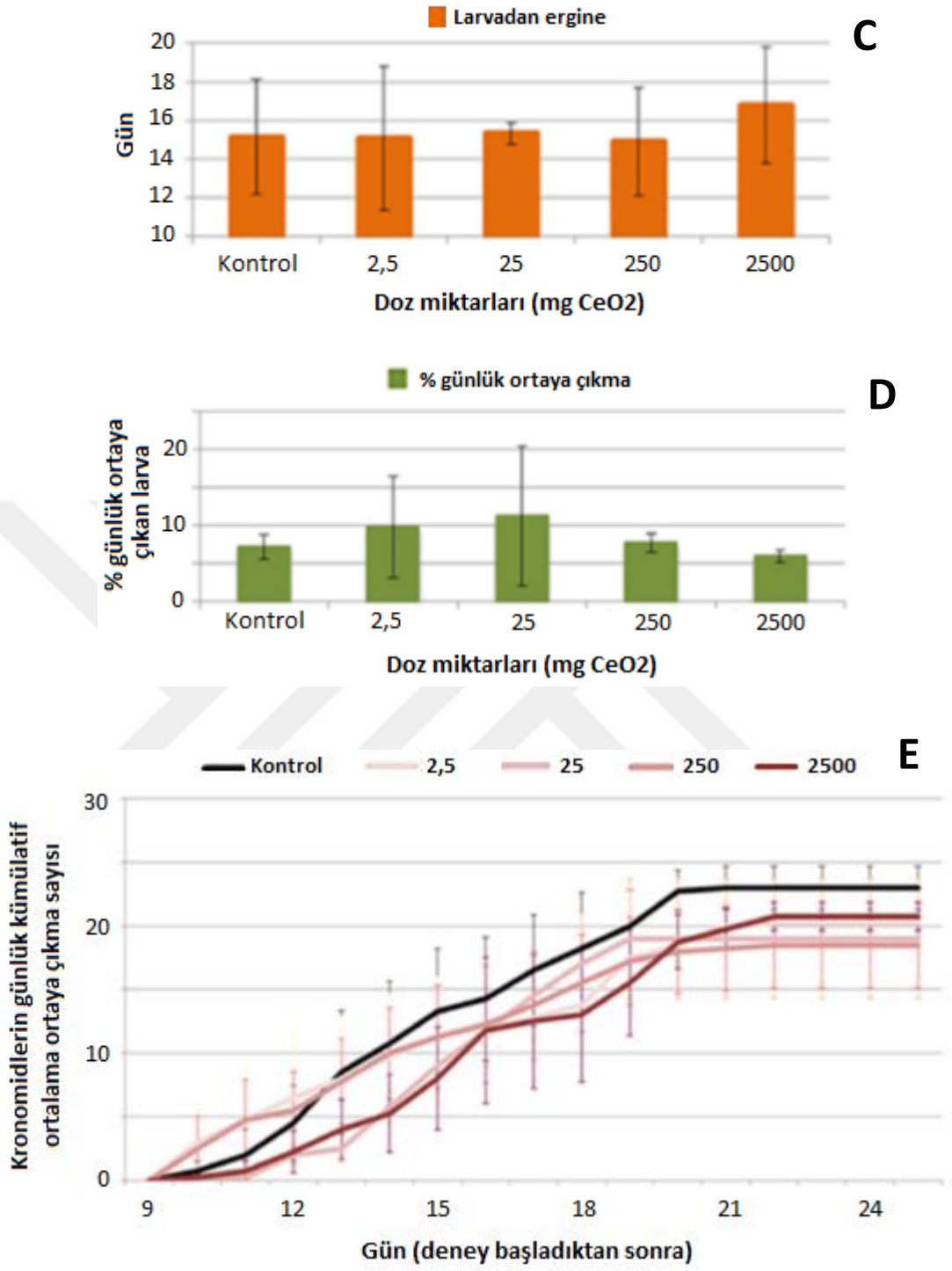
oranı, ortalama %76 ile %92 arasında değişmekte olup, gelişim hızı günlük ortalama %5,96 ile %11,2 arasında değişmektedir. Tek-yön ANOVA analizi, hem dozlanmış numuneler ve kontrol grubu arasında hem de dozlanmış numunelerin birbiri arasında anlamlı bir fark göstermemiştir.

Çizelge 2.7 : Nano-CeO<sub>2</sub>'lere maruz kalan *Chironomus riparius*'ta yaşam döngüsü parametreleri.

Parametreler	Kontrol	2,5	25	250	2500
ER±SD (%)	92±13,47	81±16,12	76±37,66	74±27,03	83±8,87
M±SD (%)	8±13,46	19±16,12	24±37,66	26±27,03	17±8,87
DT±SD (d)	15,15±2,97	15,08±3,74	15,32±0,57	14,90±2,79	16,77±2,99
DR±SD (%)	7,17±1,62	9,77±6,68	11,2±9,2	7,67±1,2	5,96±0,85

ER: Ortaya çıkma oranı, M: Mortalite, DT: Gelişim süresi, DR: Gelişim hızı, SD: Standart sapma





Şekil 2.12 : Nano-CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalan *Chironomus riparius*'taki yaşam döngüsü parametreleri: A: Ortaya çıkma oranı, B: Mortalite, C: Gelişim süresi, D: Gelişim hızı, E: ergin midgelerin kümülatif günlük ortaya çıkması.

### 2.3.4 Oksidatif Stres

Larvada ölçülen protein miktarı, ortalama 0,81 ila 1,20 mg/ml arasında değişmektedir. Ölçülen oksidatif stres parametre değerleri, numunelerdeki toplam protein konsantrasyonu ile ilişkili olup MDA konsantrasyonu, ortalama 14,07 ile 23,16 nmol/mg arasında değişirken, SOD aktivitesi ortalama 38,68 ila 54,41 protein/mg arasında değişmektedir (Çizelge 2.8).

Post-hoc Dunnett prosedürünü izleyen tek yönlü ANOVA analizi, oksidatif stres verileri için larva numunelerinin birbiri arasında ve numuneler ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark göstermemiştir.

Çizelge 2.8 : Nano-CeO<sub>2</sub>'lere maruz kalan *Chironomus riparius*'ta oksidatif stres parametreleri.

Parametreler	Kontrol	2,5	25	250	2500
<b>Proteinler</b> (mg protein/ml)	1,063±0,05	1,17±0,020	1,20±0,14	1,16±0,17	0,81±0,24
<b>MDA</b> konsantrasyonu (nmol/mg protein)	16,08±2,19	16,08±5,32	20,62±8,43	23,16±7,61	14,07±2,60
<b>SOD</b> (aktivite/mg protein)	49,90±4,68	36,68±13,20	40,39±11,41	40,02±12,58	54,41±13,71

### 2.3.5 Genotoksisite

Larvaların, farklı nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonlarına maruz kaldıktan sonra gözlemlenen genotoksik etkileri Çizelge 2.9'da sunulmuştur.



Çizelge 2.9 : *Chironomus riparius* dördüncü instar larvalarında nano-CeO<sub>2</sub>'nin genotoksik etkisi.

Komet Sınıfı						
Numuneler	0	1	2	3	4	Toplam Komet Skoru
NC	86,1±0,34	13,9±0,20	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	13,9±0,61 <sup>†</sup>
PC	46,4±1,02	23,3±0,35	16,4±0,95	8,2±0,42	5,7±1,2	103,5±0,8*
2.5	82,4±0,60	17,6±0,12	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	17,6±0,47 <sup>†</sup>
25	83,9±0,30	6,5±1,20	3,2±0,32	6,4±0,80	0,00±0,00	32,1±0,64 <sup>†</sup>
250	47,8±0,43	39,1±0,17	13,1±0,24	0,00±0,00	0,00±0,00	65,3±0,40 <sup>†</sup>
2500	38,5±0,60	15,4±0,82	15,3±0,42	23,1±0,70	7,7±0,41	146,1±1,02 <sup>†</sup>
NC: Negatif Kontrol; PC: Pozitif Kontrol, 100mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> * p < 0,05 negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında † p < 0,05 pozitif kontrol grubuna göre						

25, 250 ve 2.500 mg/kg konsantrasyonları, toplam komet puanlarında (sırasıyla 32,1, 65,3 ve 146,1) uygun negatif kontrole (13,9) kıyasla doza bağlı anlamlı bir artış göstermiştir. En düşük (2,5 mg/kg) konsantrasyona sahip numune, negatif kontrole ve test edilen diğer nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonlarına kıyasla anlamlı bir şekilde daha düşük toplam komet skoru göstermiştir. Konsantrasyona bağlı değişen sonuçlar elde edilmiştir.

Pozitif kontrole göre ortaya çıkan DNA hasarları, negatif kontrolden istatistiksel olarak farklı sonuçlar vermiştir. 2.500 mg konsantrasyonun, diğer gruplarla karşılaştırıldığında çok daha yüksek DNA hasarı oluşturduğu gözlemlenmiştir.

## 2.4 Değerlendirme

Yapılan tüm çalışmaların sonucunda, ICP-MS analizi, sediment içerisindeki nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonu ile larvalar tarafından alınan miktar arasında doğru orantı olduğunu göstermiştir. Sedimentteki konsantrasyon artışıyla birlikte larvalar

tarafından alınan miktar da artmıştır ve kontrol grubunda CeO<sub>2</sub> miktarı 12 mg/kg CeO<sub>2</sub> vücut ağırlığıyken en yüksek dozda 29.100 mg/kg vücut ağırlığına kadar ulaşmıştır. Kronomid larvaların, önemli miktarda nano-CeO<sub>2</sub>'yi vücutlarında biriktirme kabiliyetinin olduğu ICP-MS çalışmasıyla kanıtlanmıştır. Bour ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada, 1 mg/L nano-CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalan, kronomid larvaların ortalama 282 mg/kg vücut ağırlığında nano-CeO<sub>2</sub> biriktirdikleri raporlanmıştır [78].

Larvalardan midgelerin deney boyunca ortaya çıkma oranı, günlük ortaya çıkma oranı, ölüm oranı, gelişim hızı ve oranı başlıkları altında larvalardan midgelere (böcek formu) yaşam döngüsü incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkma oranı, ortalama %76 ile %92 arasında değişmekte olup, gelişim hızı günlük ortalama %5,96 ile %11,2 arasında değişmektedir. Kontrol grubuna göre parametreler arası sapmalar olmakla birlikte *Chironomus riparius*'larda belirgin bir mortalite gözlemlenmemiştir.

Oksidatif stres verileri ile yapılan istatistiksel çalışma sonucunda larva numunelerinin birbiri arasında ve numuneler ile kontrol grubu arasında önemli bir fark gözlemlenmemiştir. Maruziyet sonucunda *Chironomus riparius*'ların oksidatif stres datalarında sapmalar saptanmıştır. Bu sonuçlar literatürdeki benzer çalışmalarla da uyusmaktadır. Garanda ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tatlı su amfipodu (*Gammarus roeseli*) [95] üzerinde nano-CeO<sub>2</sub>'nin toksik etkileri oksidatif stres parametreleri ele alınarak incelenmiştir ve tez kapsamında yapılan çalışmalara benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada, nano-CeO<sub>2</sub>'nin zaman ve konsantrasyon etkileri, bu tez kapsamında da olduğu gibi oksidatif stres değerlendirmelerinin yanında genotoksisite deneylerin sonuçlarıyla birleştirilerek vurgulanmıştır.

Genotoksisite çalışması sonucunda ise nano-CeO<sub>2</sub>'nin *Chironomus riparius*'lar üzerinde subletal (öldürücü olmayan toksik etki) etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Nano-CeO<sub>2</sub>'nin subletal etkisi 25 mg/kg konsantrasyon gözlemlenmeye başlanmış olup, konsantrasyon arttıkça etkisi kademeli olarak artmaya devam etmiştir. Tez kapsamında yapılan, genotoksisite analizinin sonuçları, nano-CeO<sub>2</sub>'nin, *Chironomus riparius*'un dördüncü instar larvalarında doza bağlı olarak DNA hasarına neden olduğunu göstermektedir. Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da benzer sonuçlar raporlamaktadır. *Chironomus riparius*, 15 ve 30 nm boyuttaki iki farklı nano-CeO<sub>2</sub>'ye

1 mg/L konsantrasyonda maruz bırakılan çalışmada, daha küçük boyutlu nano-CeO<sub>2</sub>'nin daha fazla DNA hasarına neden olduğu belirtilmiştir [122].

Sonuç olarak, nano-CeO<sub>2</sub>'nin tatlı su ortamında yaşayan kronomidler üzerindeki etkisinin incelendiği bu çalışmada maruziyetin önemli bir risk teşkil etmediği sonucuna varılmıştır. Bu çalışma, nano-CeO<sub>2</sub>'nin doğada mevcut olan miktardan önemli ölçüde daha yüksek olan 2500 mg/kg sediment konsantrasyonunda bile kronomidler için öldürücü etkisinin olmadığını göstermektedir. Nano-CeO<sub>2</sub>'nin kronomidler üzerinde elde edilen en önemli subletal toksik etkisi 25 mg/kg konsantrasyonlarda ortaya çıkmaya başlayan ve artan konsantrasyonlarda artarak devam eden DNA hasarıdır. Bununla birlikte, Gottschalk ve arkadaşlarının yaptığı Danimarka çevresindeki nanomalzemelerin akış ve konsantrasyon miktarını modelleme çalışmasına göre 25 mg/kg konsantrasyon, yakılan atık kütlelerinde tahmin edilen en yüksek miktar olan 0,1 mg/kg konsantrasyondan neredeyse 250 kat ve hatta tahmin edilen en düşük ortalama konsantrasyondan 125.000 kat daha yüksektir [104]. Ancak son çalışmalar, nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonlarının bu çalışmada tahmin edilenden daha yüksek olabileceğini ve su ortamlarına yıllık nano-CeO<sub>2</sub> girişinin yüzey sularında 0,1 µg/L civarında ve sediment ortamlarında 10 ile 100 µg/kg arasında olabileceğini tahmin etmektedir [102]. Bu verilere, tezde ICP-MS sonuçları ile elde edilen kronomidlerin nano-CeO<sub>2</sub>'yi vücutlarında biriktirdiği gerçeğini de eklersek, bu birikimin sonucunda besin zincirindeki daha ilerideki organizmalara trofik transfer yoluyla risk oluşturabileceği sonucuna varılmıştır.



### 3. NANO CeO<sub>2</sub>'NİN TATLI SU MİDYELERİ ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİ

#### 3.1 Çalışmanın Amacı

Günümüzde pek çok alanda kullanımını artan nano-CeO<sub>2</sub>'nin, çevreye etkisinin araştırılabilmesi için bu nanomalzemeler OECD öncelik listesine dahil edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında, bir tür tatlı su midyesi olan *Unio crassus* üzerindeki nano-CeO<sub>2</sub>'nin toksik etkisi incelenmiştir. Nano-CeO<sub>2</sub>'nin tatlı su midyeleri üzerinde neden olabileceği maksimum hasarın belirlenebilmesi için çalışma yüksek doz aralıklarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L konsantrasyonlarında nano-CeO<sub>2</sub>/su kullanılmıştır.

Bu çalışmasının temel amacı bir tür tatlı su midyesi olan *Unio crassus* üzerindeki nano-CeO<sub>2</sub>'nin belirlenen kısa süreli iki zaman (48 saat ve 7 gün) aralığında maruziyet sonucu oluşan toksik etkilerin incelenmesidir. Bu temel amaç doğrultusunda belirlenen alt hedefler aşağıda sıralanmıştır.

1. Nanoparçacık özelliklerinin modern analitik yöntemlerle incelenmesi (kristal yapısı, morfolojik özellikleri, nanoparçacık boyutu ve ortam içinde (sediment ve su) kümelenmesinin özellikleri/davranışları, spesifik yüzey analizi, yüzey kimyası, hidrodinamik çap, polidispersite ve zeta potansiyel değerleri)
2. Nano-CeO<sub>2</sub>'nin toksik etkilerinin araştırılabilmesi için uygun test düzeneğinin kurulması ve nano CeO<sub>2</sub>'ye maruz bırakma koşullarının belirlenmesi
3. Model organizma üzerinde maruziyet sonucu oluşabilecek anormalliklerin saptanması için midyelerin ağırlık ve boyut ölçümlerinin yapılması
4. Nano-CeO<sub>2</sub>'nin toplam hemosit sayısı üzerine etkilerin incelenmesi
5. Biyokimyasal analizler yapılarak oksidatif stres parametrelerin hesaplanması
6. Deney düzeneğinde kullanılan akvaryumlara ait su numuneleri içindeki nano-CeO<sub>2</sub>'nin davranışlarının analizleri (çözünübilirlik, dağılım, çökelti oluşturma potansiyeli, hidrodinamik çap, miktar analizleri)

## 3.2 Materyal ve Yöntem

### 3.2.1 Test Maddesi: Nano CeO<sub>2</sub>

Ticari partikül çapı <25 nm olan CeO<sub>2</sub> (Seryum (IV) Oksit) NP'ler (ürün numarası 544841) Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Çalışmalara başlamadan önce CeO<sub>2</sub> NP'ler tamamen karakterize edilmiş ve sonuçları tezin önceki bölümünde rapor edilmiştir.

### 3.2.2 Test Organizması: Tatlı Su Midyesi (*Unio crassus*)

Bu çalışmada kullanılan test hayvanı tatlı su midyeleridir. Midyeler doğal ortamlarından akvaryum ortamına alışabilmeleri için su dolu akvaryumlarda iki hafta bekletilmişlerdir. İki haftanın sonunda akvaryum ortamına alışan midyeler deney aşaması için hazır hale gelmişlerdir.



Şekil 3.1 : Deney çalışmasında kullanılan tatlı su midyeleri.

### 3.2.3 Deney Tasarımı ve Nano CeO<sub>2</sub>'ye Maruz Bırakma

Bu çalışma için 4 adet akvaryum hazırlanmıştır ve her bir akvaryuma 10 L su eklenmiştir. Akvaryumlardaki, kontrol grubuna 15 diğer gruplara ise 30'ar adet olmak üzere toplam 105 adet midye konulmuştur. Her akvaryuma sırası ile 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L nano-CeO<sub>2</sub>'ler eklenmiştir. Son akvaryum ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Deney grupları aşağıdaki gibi adlandırılmıştır.

1. Kontrol grup (C)
2. Deney Grupları (E)
  - a. E<sub>10</sub>: 10 mg/L
  - b. E<sub>25</sub>: 25 mg/L
  - c. E<sub>50</sub>: 50 mg/L

Bu çalışmada iki aşamalı deney yapılmıştır. Birinci aşamanın deney süresi 2 gün (48 saat) olarak ikinci aşamanın deney süresi bir hafta (7 gün) olarak belirlenmiştir. Midyeler her 24 saatte bir gözlemlenmiştir. Toplamda geçen 7 günlük sürede iki adet ölüm gözlemlenmiştir. Deney protokolü aşağıda özetlenmiştir.

Çizelge 3.1 : Deney protokolü.

Midye Numune Alma Süresi (saat)	Örnek Sayısı				
Konsantrasyon miktarı (mg/L)	Kontrol	10	25	50	Midye sayısı
0	15	-	-	-	15
48	-	15	15	15	45
168 (7 gün)	-	15	15	15	45
				<b>Toplam:</b>	105

Deney kapsamında yapılan çalışmalar aşağıda açıklanmıştır.

#### Deney 1. Gün

Nano-CeO<sub>2</sub> suda çözünmediğinden akvaryum içinde malzemenin maksimum miktarda dağılımını sağlayabilmek için dozlama miktarları 5 mg/L olacak şekilde bölünmüş ve

midyelerin yerleştirildiği akvaryumlardan bir beher yardımıyla su alınıp 5 mg/L nano-CeO<sub>2</sub> ekleyerek 20 dk sonikatörde bekletilmiştir. Sonrasında nano-CeO<sub>2</sub>'nin iyice dağıldığı bu nano-CeO<sub>2</sub>/su karışımı (şekil 3.2) ilgili akvaryuma eklenmiştir. Toplamda üç akvaryumuma sırası ile 10 mg/L, 25 mg/L ve 50 mg/L olacak şekilde nano-CeO<sub>2</sub> eklenmiştir. şekil 3.3'te dozlama sonrası akvaryumların görüntüleri verilmiştir.



şekil 3.2 : Sonike edilmiş nano-CeO<sub>2</sub>/Su karışımı.





Şekil 3.3 : İlk gün sağdan sola; kontrol, 10 mg/L, 25 mg/L ve 50 mg/L nano CeO<sub>2</sub> ile dozlanmış akvaryum görüntüleri.

### **Deney 2. Gün**

Deney boyunca her 24 saatte bir midyeler kontrol edilmiştir. Midyelerin kabukları el yardımıyla uyarılarak midyelerin canlılığı test edilmiştir. Midyeler cam baget gibi bir alet ile uyarılarak, midyelerin kabukları açılmaya çalışılmış ve böylece canlılıkları tespit edilmiş, eğer kabuklar açılıyorsa ölü, açılmaya çalışıldığında zorlanıyor ve tekrar kapanıyorsa canlı olduğu anlaşılmıştır. Yapılan canlılık tayininden sonra ölü bireyler kaydedilmiştir.

48 saat sonra nano-CeO<sub>2</sub>'ler dibe çökmüş midyelerin üzerinde birikmiştir. Birikmeyi önlemek için belli periyotlarda spatula yardımı ile akvaryumlardaki su karıştırılmıştır. 48 saat sonra en yüksek doz yoğunluğundaki akvaryumdaki suyun en bulanık olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 3.4'te akvaryumların 48 saat sonraki durumu fotoğraflanmıştır.

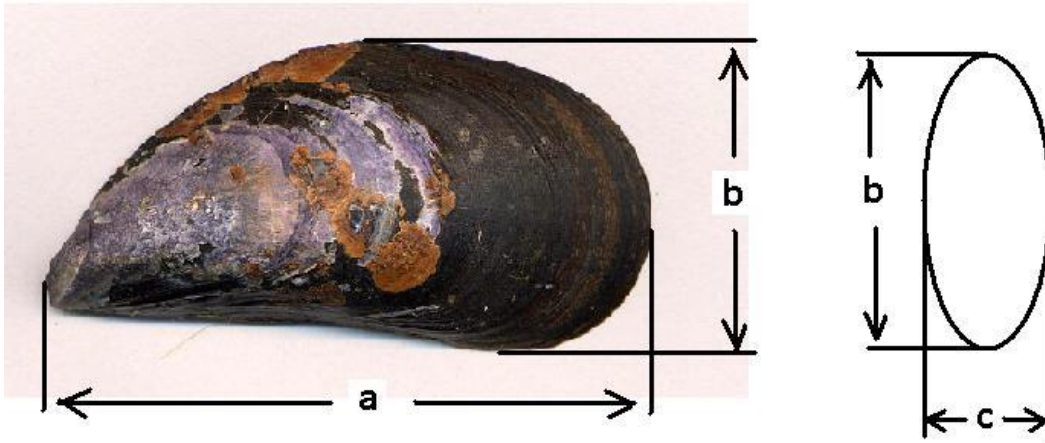


Şekil 3.4 : 48 saat sonra akvaryumların görüntüsü.

48 saat sonunda akvaryumlardan 15'er midye alınmıştır. Alınan midye örneklerine sırasıyla; toplam boy ve ağırlık ölçümü, hemolemfte hücre sayımı (hemosit sayısı/ml), histopatolojik analizler ve biyokimyasal analizler yapılmıştır.

### 3.2.3.1 Midye Ölçümleri

Deney başlatıldıktan 48 saat sonra her akvaryumdan 15'er tane midye alınmıştır. Öncelikle tüm midyelerin ağırlık, uzunluk, yükseklik ve kalınlık tayini yapılmıştır. Her midyenin önce kâğıt havlu ile üzerindeki fazla sular alınmış, sonrasında Sartorius, TE313S marka terazi ile ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Kumpas ile de yükseklik, uzunluk ve kalınlık parametreleri tayin edilmiştir.



Şekil 3.5 : Midye ölçümleri; a) Uzunluk b) Yükseklik c) Kalınlık.

### 3.2.3.2 Hemolemf Alımı ve Toplam Hemosit Sayısının Hesaplanması

Tüm midyelerden tek kullanımlık enjektör ile mikroskop altında hücre sayımları yapılabilmesi için hemolemf sıvısı alımı yapılmıştır. Midyelerinin umbo kısmına yakın bir bölgesinden 2,5 ml'lik enjektör yardımıyla hemolemf sıvısı alınmış 1:1 oranında %4'lük formaldehitte sulandırılmıştır (%4'lük formaldehit; 96 ml distile su ve 4 ml formaldehit karışımı). Sonrasında ise, mikroskop altında hemolemf sıvısındaki hücre sayımı yapılarak sonuçlar üç tekrarlı, THC/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.6 : Hemolemf sıvısının alınma görüntüsü.

### 3.2.3.3 Midyelerden Dokuların Çıkarılması

Midyelerin hemolemleri alındıktan sonra midyeler spatula yardımıyla açılarak diseksiyon aşamasına geçilmiştir. Diseksiyon işlemi iki temel analiz için yapılmıştır. Örneklerin bir kısmı biyokimya çalışmaları diğer kısmı ise histopatoloji çalışması için ayrılmıştır.

### Biyokimya Çalışmaları İçin Numune Alınması

Biyokimya için ayrılan örneklerin dokularındaki biyo-belirteçlerin tespiti için numuneler ligament ve ayak kısımları hariç alınıp alüminyum folyoya sarılmıştır.

Numuneler parametre ölçümlerinin yapılacağı zamana kadar bekleyebilmesi için -80°C’de derin dondurucuda muhafaza edilmeye başlanmıştır.



Şekil 3.7 : Midye doku örnekleri a) açılmış midye, b) parçalara ayrılmış midye dokuları, c) alüminyum folyoya sarılmış doku numuneleri.

### Histopatoloji Çalışmaları İçin Numune Alınması

Deney süreleri sonunda buz anestezisi altında dissekte edilen örneklerde ligament ve ayak kısmı hariç midye dokuları alınmış ve kasetlere yerleştirilip Davidson solüsyonuna (330 ml %95’lik etil alkol, 220 ml formaldehit, 115 ml glasiyal asetik asit, 335 ml distile su/ya da çeşme suyu) konulmuştur. Örnekler 48 saat sonra %70’lik etil alkole aktarılmıştır [113]. Dokular daha sonra doku takibinin gerçekleştirilmesi amacıyla plastik kasetlere küçültülerek alınmıştır. Doku takibine kadar plastik kasetlerde %70’lik etanol içinde bekletilmiştir.



Şekil 3.8 : Histopatoloji çalışması için kasetlere konulan doku örneği.

### **Deney 7. Gün**

Çalışmanın ikinci kısmı için kalan midyeler düzenli olarak kontrol edilerek 7 gün boyunca gözlem yapılmıştır. 7 günün sonunda deney sonlandırılmıştır. Nano CeO<sub>2</sub>'lerin daha uzun süreli etkisinin gözlemlenebilmesi için çalışmanın birinci kısmı olan 48 saat sonraki yapılan çalışmalar yedinci günün sonunda tekrarlanmıştır.

Yapılan canlılık tayininden sonra ölü bireyler kaydedilmiştir. Toplamda geçen 7 günlük sürede iki adet ölü midye tespit edilmiştir.



Şekil 3.9 : Yedinci gün çalışma başlangıcındaki deney düzeneği.



Şekil 3.10 : Yedinci gün tüm midyeler alındıktan sonraki deney düzeneği.



Şekil 3.11 : Midyelerin diseksiyon sonrası iç organ morfolojisi görüntüleri.

### 3.2.3.4 Histopatoloji Çalışması

#### a) Numune Alınması

Deney süreleri tamamlandıktan sonra akvaryumdan alınan örnekler “Midyelerden dokuların çıkarılması” başlığı altında anlatılan metot ile hazırlanmış ve doku takibine kadar plastik kasetlerde %70’lik etanol içinde bekletilmiştir.

#### b) Doku Takibinin Gerçekleştirilmesi

Yüzde 70’lik etanol içerisinde bekleyen dokular dehidrasyon amaçlı olarak sırasıyla her birinde ikişer saat kalacak şekilde %70, 80, 90, 96 ve absöü etil alkol serilerine maruz bırakılmışlardır. Daha sonra alkolün uzaklaştırılması ve parlatma işlemi için 2 saat süre ile ksilenen geçirilerek; 56-58°C’de ksilenli parafin ve parafinde ikişer saat bekletilip gömülmüşlerdir. Gömmek için özel kalıplar içerisinde sıvı parafin doldurularak doku parçaları yerleştirilmiştir. Parafin bloklar kesim öncesinde buzdolabında saklanmıştır [114].

### **c) Parafin Bloklardan Doku Kesitlerinin Alınması**

Parafin bloklardan histolojik inceleme için, rotary ThermoShandon mikrotom ile 5-6 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Daha sonra kesitler ısıtılmış su banyosunda lam üzerine yerleştirilmiştir. Lamalar 50-60°C'ye ayarlanmış etüvde bir gece kurutularak parafinli kesitlerin lama iyice yapışması sağlanmıştır. Lamalar daha sonra Presnell ve Schreibman [115] prosedürlerine göre Hematoksilen ve Eozinle boyanmıştır. Hematoksilen ve Eozin ile boyanan dokular Kanada Balsamı ile yapıştırılarak sabit preparat haline getirilmiştir [114].

### **d) Histolojik Preparatların İncelenmesi**

Histolojik preparatlar/dokular ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Dokuların ışık mikroskobu ile incelenmesi, değerlendirilmesi ve görüntülenmesi için histoloji atlasından faydalanılmıştır [116].

## **3.2.3.5 Biyokimyasal Analizler: Biyo-belirteç Deneyleri**

### **a) Numune Alınması**

Biyokimya için ayrılan örneklerin dokularındaki biyo-belirteçlerin tespiti için numuneler ligament ve ayak kısımları hariç alınıp alüminyum folyoya sarılmıştır. Dokular her birini temsil edecek şekilde diseksiyon yapıldıktan sonra yaklaşık 300 mg doku alüminyum folyoya sarılarak -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

### **b) Doku Numunelerinin Homojenizasyonu**

300 mg doku üzerine 1.200 µL tampon eklenerek doku yaş ağırlığının 4 katı ağırlıkla tamponda homojenize edilmiştir. Çalışmada 300 mg doku kullanıldığından homojenat 1/5 (w/v) oranında olmaktadır (300 mg+1.200 µL = 1.500, 1.500/300=5). Homojenizasyon tamponu, (0,1 M potasyum fosfat, k-fosfat tamponu) (pH=7,4) soğukla daha iyi uyumlu olması ve fizyolojik deneylerde tercih edilmesi nedeniyle sodyum fosfat yerine kullanılmıştır. Genel doku homojenizasyonu için 800 ml ve pH ayarı yapılmış tampon üzerine; 0,15 M KCl, (MA=74,553), 1 mM EDTA (MA=292,24) ve 1 mM DTT (1,4-dithiothreitol) (MA=144,15) eklenmiştir. MDA çalışması genel doku homojenizasyonu dışında tutulmuştur.



Numunelerde kümelenmenin önlenmesi için ince uçlu sonikatör yuvarlak dipli eppendorf tüpüne daldırılarak sonikasyon uygulanmıştır. Homojenat, 4°C’de, soğutmalı santrifüjde 20 dk santrifüj edilerek süpernatant alınmış ve saklanmıştır.

Biyokimyasal analiz çalışmasında mikropılaka okuyucusu olarak Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Ana Bilim Dalı’nda bulunan Molecular Devices Spectramax minimax i3 microplate reader cihazı kullanılmıştır.

### **3.2.3.5.1. Toplam Antioksidan Statüsü (TAS)**

TAS ölçümleri RELASSAY® MARKA TAS KİTİ kullanılarak EREL metodu ile yapılmıştır. ABTS radikal katyonunun ölçülmesiyle total antioksidan kapasite doğrudan ölçülmüştür [117]. Üretici firmanın Toplam Antioksidan Statüsü (TAS) Kiti ile elde edilen değerler mikropılaka okuyucu ile tespit edilmiştir. Absorbans ölçümleri 660 nm dalga boyu altında yapılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak mmol/L biriminde hesaplanmıştır.

$$\text{Sonuç [mmol/L]} = \frac{\Delta\text{Abs H}_2\text{O} - \Delta\text{Abs Numune}}{\Delta\text{Abs H}_2\text{O} - \Delta\text{Abs Standart}} \quad (3.1)$$

### **3.2.3.5.2. Redükte Glutasyon (GSH)**

GSH, dithionitrobenzoik asit (DTNB, Ellman’s reagent) ile reaksiyona girerek GSSG’yi (okside glutasyon) oluşturur böylelikle total GSH (GSH + GSSG) ölçülebilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında total GSH (GSH + GSSG) değeri ölçülmüştür. 100 µL homojenat alınarak, spektrofotometrede 340 nm dalga boyundaki değerler okunmuştur. Bu çalışmada Molar Extinction Coefficient  $\epsilon_{412} = 13 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  olup homojenat 1/5 oranında dilüte edilmiştir.

### **3.2.3.5.3. Total Protein**

Bu çalışma kapsamında total protein seviyelerinin ölçülmesi için Bovine Serum Albumin Protein Standardı (BSA, SIGMA) kullanılmıştır. 2,0 mg/ml standard distile su içinde hazırlanmıştır. Blank, standard ve örneklerden 20 µL alınıp, Bradford reaktifinden de 200 µL alınarak toplam 220 µL hacimde numuneler hazırlanmıştır. Absorbans değerleri 595 nm’de okunmuştur. Homojenat 1/5 dilüsyonda olup, ilk protein ölçümleri 1/10 homojenat dilüsyonunda; toplam dilüsyon  $1/5 \times 1/10 = 1/50$ ;

ikinci tekrarlar da ise 1/5 ve tekrar 1/5 toplam 1/25 dilüsyonda 15 dakika bekletilerek değerler okunmuştur. Protein standart eğrisine karşı bilinmeyen protein miktarları hesaplanmıştır. Bu çalışma için Bradford (1976) metodu kullanılmıştır [118].

#### 3.2.3.5.4. Glutasyon S-transferaz (GST) aktivitesi

Potasyum fosfat tamponu 0,1 M pH 6,5 ve CDNB (2,4-dinitrobenzene, MA=202,55) 5 ml %96'lık etil alkol içinde 0,0195 g, 0,019 mmol/ml (19 mM) çözülmüştür.

Redükte glutasyon (GSH, MW=307,32) 20 ml distile su içinde 0,0123 g çözümlenip, 0,002 mmol/ml, 2 mM, 2°- 8°C'de saklanmıştır. Stok çözelti, küçük porsiyonlarda -20°C'de saklanmıştır. GSH'nin 20 ml'lik çözeltisine 20 ml tampon eklenmiştir. GST tayini, Okay ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı Habig ve arkadaşlarının (1974) metodunun modifikasyonuna göre yapılmıştır [119].

Homojenat süpernatanı 10 µL, 200 µl karışım (önceden hazırlanan ½ dilüe GSH çözeltisi, fosfat tamponunda), 10 µl CDNB reaktifi karıştırılmıştır. İki dk vortekslendikten sonra 344 nm'de okuma yapılmıştır. CDNB için  $\epsilon_{340} = 9,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (9,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, 0,0096 µM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Unit ak (µmol/ml):  $\Delta A \times 0,00415$ . Ölçümler aşağıda verilen formüle göre hesaplanmaktadır.

$$\text{GST} \left( \frac{\text{birim}}{\text{ml}} \right) = \left[ \frac{(A_2 - A_1)}{(\epsilon_{340}) \times (l)} \right] \times \left( \frac{V_{\text{Top.}}}{V_{\text{örnek}}} \right) \times (D.F.) \quad (3.2)$$

D.F. : Eğer varsa örnek için dilüsyon faktörü

GST : Spesifik Aktivite

#### 3.2.3.5.5. İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products - AOPP)

Bu çalışmada, AOPP ölçümü için Witko Sarsat yöntemi kullanılmıştır. Asidik koşullar altında AOPP'nin oksidasyonunun spektrofotometrik tayini yapılmıştır [120].

1/5'lik homojenatan doğrudan 50 µL alınarak 340 nm'de spektrofotometrede karşılık gelen değerler okunmuştur (Molar Extinction Coefficient  $\epsilon_{340} = 26 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Chloramine-T (SIGMA) standard eğrisine karşı bilinmeyen miktarlar hesaplanmıştır. Numune 50, 1,16 M KI 10, glasiyal asetik asit 20 µL eklenmiştir. KI eklendikten sonra

iki dakika vortekslenmiş ve asit eklendikten sonra çökme olmaması için hızlıca vorteksleyip değerler hemen okunmuştur (Standard Stok Chloramine-T çözeltisi 100 µM, chloramine-T, MW= 281,69).

### **3.2.3.6 Su Analizi Çalışmaları**

#### **Dinamik Işık Saçılma Spektroskopisi (DLS)**

Dinamik Işık Saçılma Spektroskopisi (DLS), seyreltik çözelti içerisindeki küçük parçacıklardan saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi temeline dayanan bir metottur. Çalışma sırasında akvaryumlardan hem 48 saat sonrası hem de 7 gün sonrası su numuneleri alınmıştır. Alınan su numunelerinden DLS metottu kullanılarak CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların su içerisindeki hidrodinamik çapları ve polidispersiteleri ölçülmüştür. Farklı süre ve farklı konsantrasyonlardaki numunelerden alınan değerler karşılaştırılmıştır. CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların ortalama hidrodinamik yarıçap değerlerinin hesaplanması için 1 saat boyunca her 5 dakikada bir ölçüm alınmıştır. Ölçüm için Malvern ZetaNano ZS cihazı kullanılmıştır. Çalışma, 25°C’de, 633 nm dalga boyunda ve 5mW He-Ne lazer kaynağı kullanılarak yapılmıştır.

#### **Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi Analizi (ICP-MS)**

Akvaryumlardan 48 saat sonrası ve 7 gün sonrası alınan su numunelerindeki nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonunun belirlenebilmesi için ICP-MS analizi yapılmıştır. Analiz yöntemi olarak EPA METHOD 6020B kullanılmıştır [121].

### **3.2.4 İstatistik Analizler**

Farklı nano-CeO<sub>2</sub> maruziyet konsantrasyonlarındaki midye numunelerinin biyokimyasal parametreleri arasında maruziyet konsantrasyonu ve zamana bağlı olarak fark oluşup oluşmadığı ikili gruplarda T-testi, ikiden fazla olan gruplarda ise non-parametrik Kruskal Wallis H yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Anlamlılık seviyesi 0,05 olarak belirlenmiştir. Grupların normallikleri ve homojen dağılım gösterip göstermedikleri incelenmiş, normal dağılım göstermedikleri için non-parametrik yöntemle karar verilmiştir.

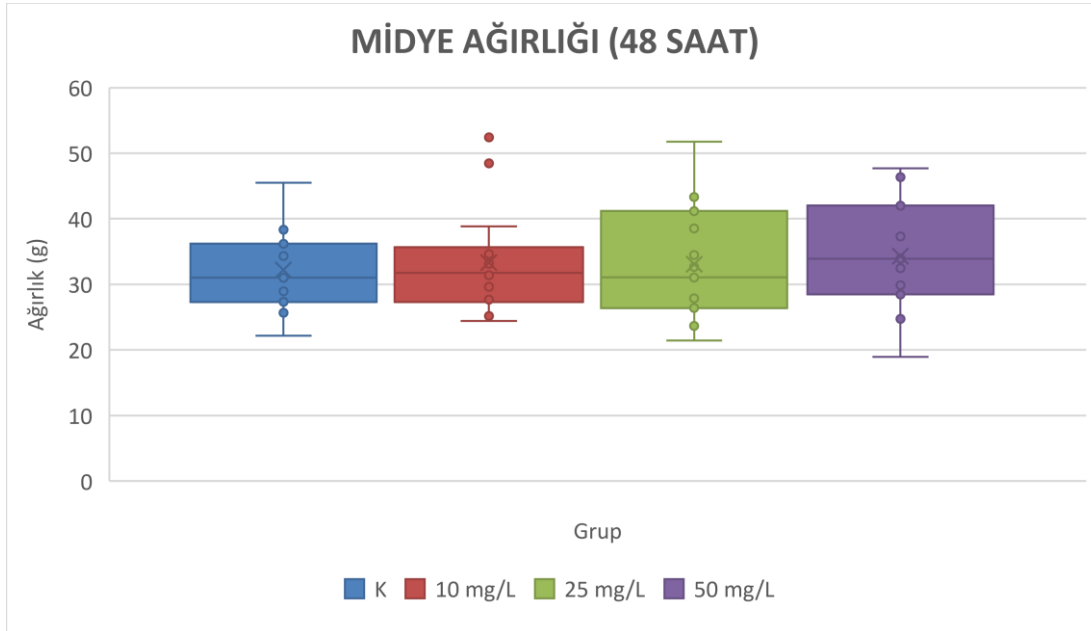
### 3.3 Bulgular

#### 3.3.1 Midye Ölçümleri

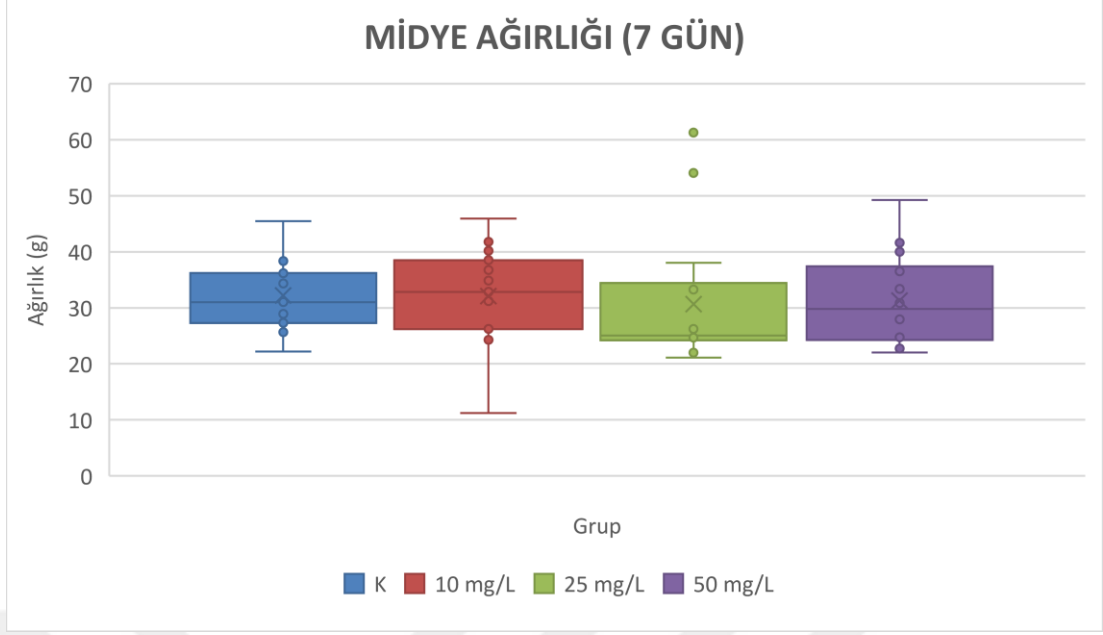
Deney sonlandırıldıktan sonra ilk olarak midyelerin ağırlığı, uzunluğu, yüksekliği ve kalınlığı ölçülmüştür. Bu ölçümlerin verileri aşağıda sunulmuştur. Nano-CeO<sub>2</sub> maruziyeti sonrası her iki süre aralığında da midyelerde boyutsal ve ağırlık anlamında kontrol grubu ile istatistiksel olarak kıyaslandığında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Tüm midyeler benzer özelliklere sahiptir.

Çizelge 3.2 : Ortalama midye ağırlık değerleri.

Ortalama	Ağırlık (g)	
	48 saat	7 gün
K	32,19 ± 6,21	32,19 ± 6,21
10 mg/L CeO <sub>2</sub>	33,32 ± 10,15	32,11 ± 8,56
25 mg/L CeO <sub>2</sub>	33,09 ± 8,96	30,65 ± 12,35
50 mg/L CeO <sub>2</sub>	34,3 ± 8,66	31,3 ± 8,11



Şekil 3.12 : 48 saatlik deney kapsamındaki midye ağırlık grafiği.



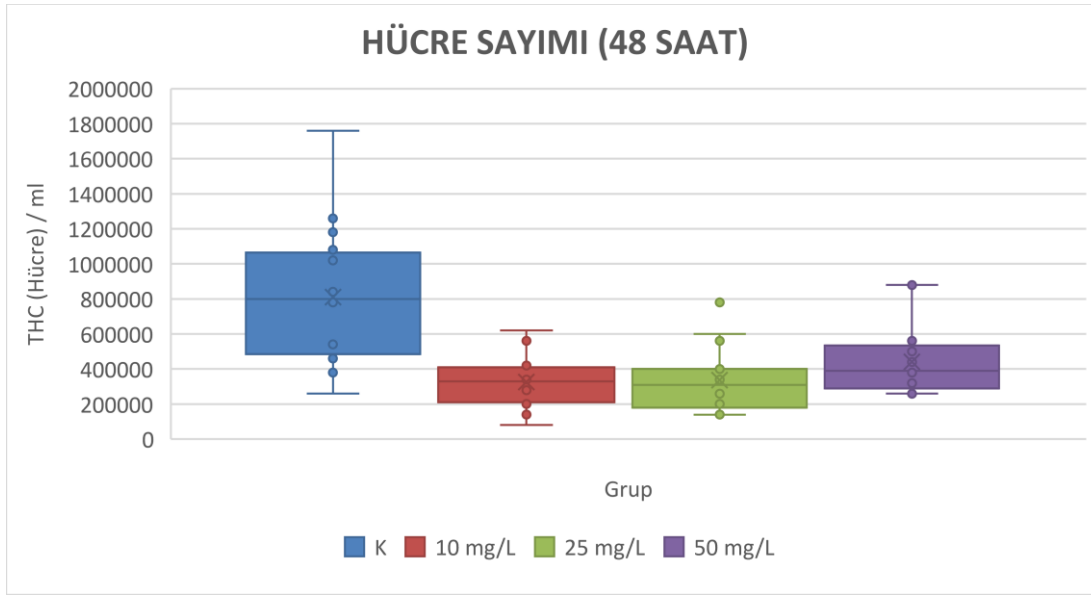
Şekil 3.13 : 7 günlük deney kapsamındaki midye ağırlık grafiği.

### 3.3.2 Hemolemf Alımı ve Toplam Hemosit Sayısının Hesaplanması

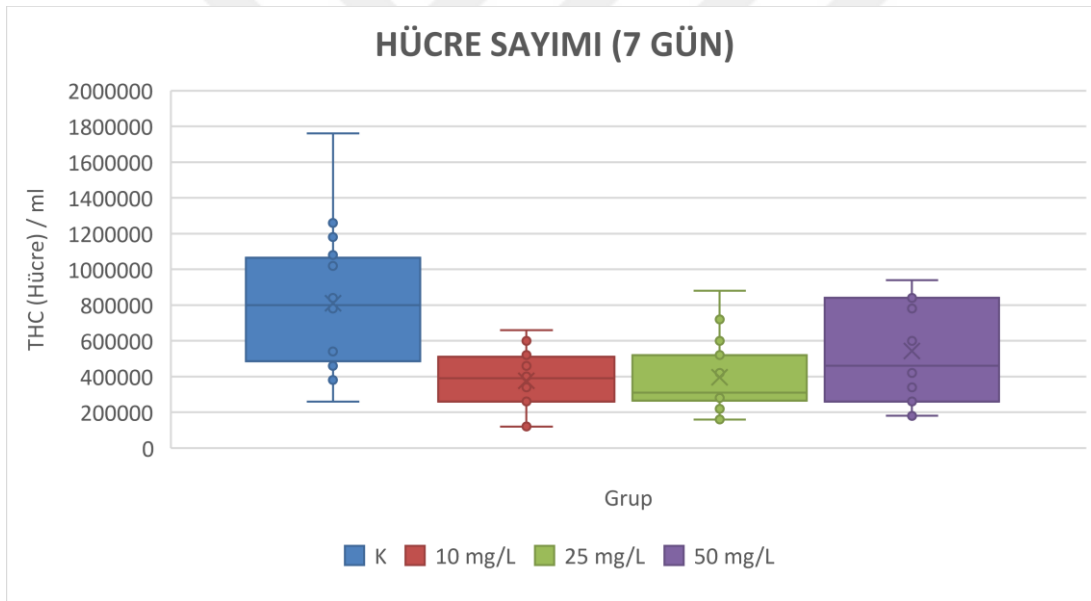
Işık mikroskobu altında hemosit sayımı sonucunda elde edilen THC (hücre)/ml değerleri Çizelge 3.3'te sunulmuştur. Maruziyet sonrası değerlerde kontrol gruba kıyasla önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Midyelerin hemosit değeri, 10 mg/L CeO<sub>2</sub> dozda en düşük değere sahiptir. Deney süresinin artması ile hemosit değerlerinde kısmi bir artış gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.3 : Hücre sayımı değerleri.

Ortalama	THC (hücre/ml)	
	48 saat	7 gün
K	810 000 ± 377 219	810 000 ± 377219
10 mg/L CeO <sub>2</sub>	325 000 ± 136 401	377 000 ±159 905
25 mg/L CeO <sub>2</sub>	337 000 ± 181 256	396 000 ± 195 809
50 mg/L CeO <sub>2</sub>	442 000 ± 185 688	543 000 ± 283 021



Şekil 3.14 : 48 saatlik deney kapsamındaki hücre sayısı.



Şekil 3.15 : 7 günlük deney kapsamındaki hücre sayısı.

### 3.3.3 Histolojik Bulgular

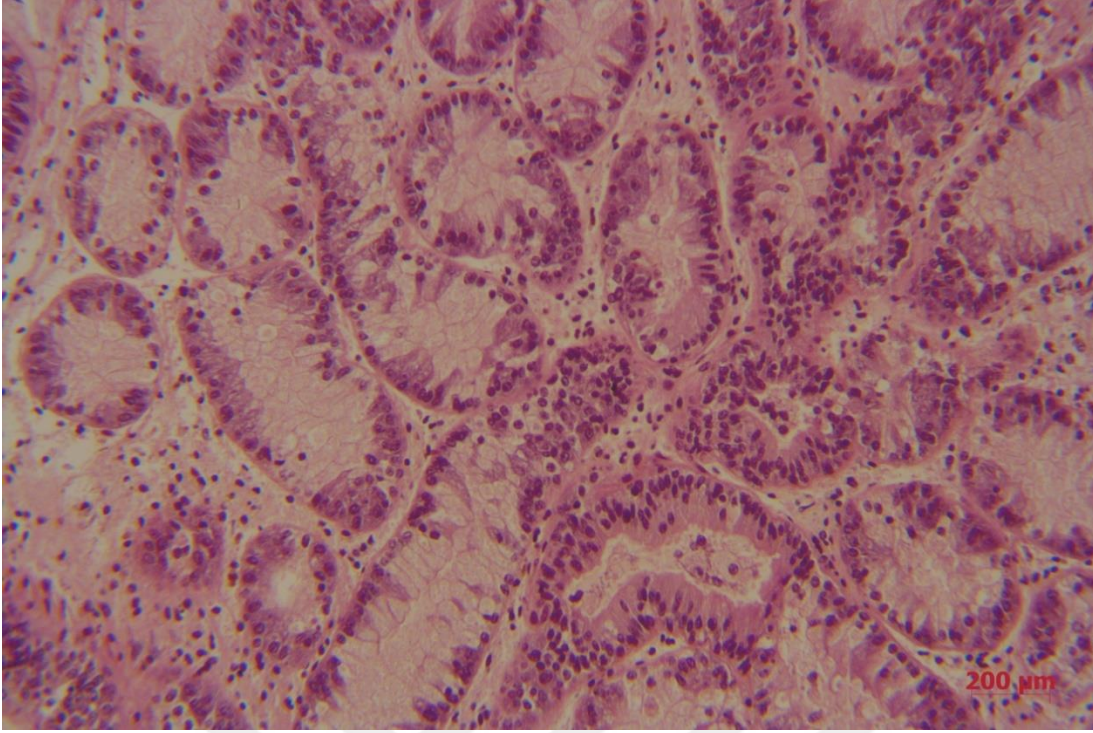
Üçüncü aşama olarak histopatoloji çalışması yapılmıştır. Çalışmada 48 saat ve 7 gün süre ile 10, 25 ve 50 mg/L  $CeO_2$ 'ye maruz kalan tatlı su midyelerinin dokuları alınarak histopatolojik olarak incelenmiştir. Işık mikroskopunda yapılan inceleme sonucunda her iki örneklem süresinde kontrol grubu ve 10 mg/L ait midyelerin tüm dokularında herhangi bir histolojik bulguya rastlanmamıştır. 25 ve 50 mg/L'ye maruz kalan

midyelerin gonadlar (ovaryum ve testisler), kas ve manto dokusunda da örneklem zamanlarında da herhangi bir histopatolojik bulgu saptanmamıştır. Histopatolojik bulgulara ilişkin sonuçlar Çizelge 3.4'te özetlenmiştir. Verilere göre, bulgular deney süresi ile birlikte artmaktadır. En büyük hasar yedinci gün sonunda solungaçlarda lipofuscin birikimi ve sindirim bezinde tubul dejenerasyon olarak gözlemlenmiştir. Sindirim bezindeki tubul dejenerasyon 25 mg/L dozda 48 saat sonunda başlamış olup artan doz ve süre ile artmaya devam etmiştir. Doku hasarlarına ait görüntüler Şekil 3.16-3.19'da verilmiştir.

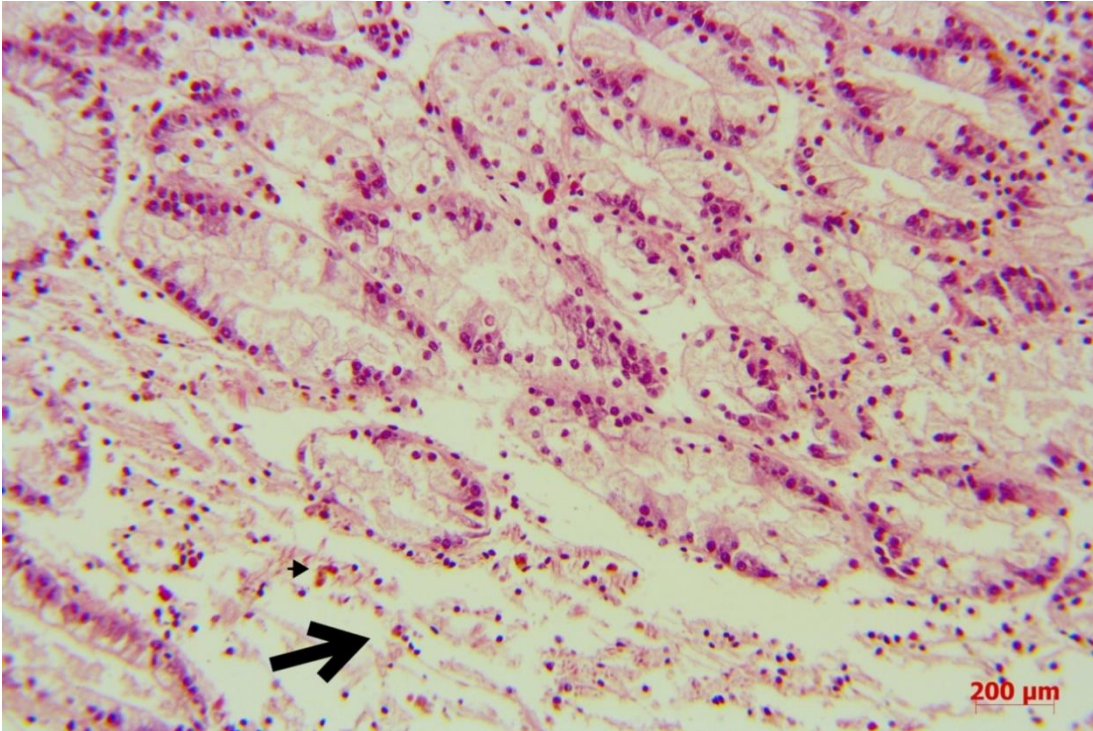
Çizelge 3.4 : CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalan tatlı su midyelerindeki histopatolojik bulgular.

Dokular	Histopatolojik Bulgular	Kontrol (%)		10 mg/L CeO <sub>2</sub>		25 mg/L CeO <sub>2</sub>		50 mg/L CeO <sub>2</sub>	
		48h	7d	48h	7d	48h	7d	48h	7d
Solungaç	Lipofuscin birikimi	-	-	-	-	-	-	-	+++
	Hemositik infiltrasyon	-	-	-	-	-	-	-	+
	Hemolenfatik sinus genişlemesi	-	-	-	-	-	-	+	+
Sindirim bezi	Hemositik infiltrasyon	-	-	-	-	-	-	+	+
	Lipofuscin birikimi	-	-	-	-	-	-	+	+
	Tubul dejenerasyonu	-	-	-	-	+	++	++	+++

\*Kısaltmalar: (-) = histopatolojik bulgu yok; (+) = %<20 alanda histopatoloji; (++) =% 20–60 alanda histopatoloji; (+++) =% >60 alanda histopatoloji

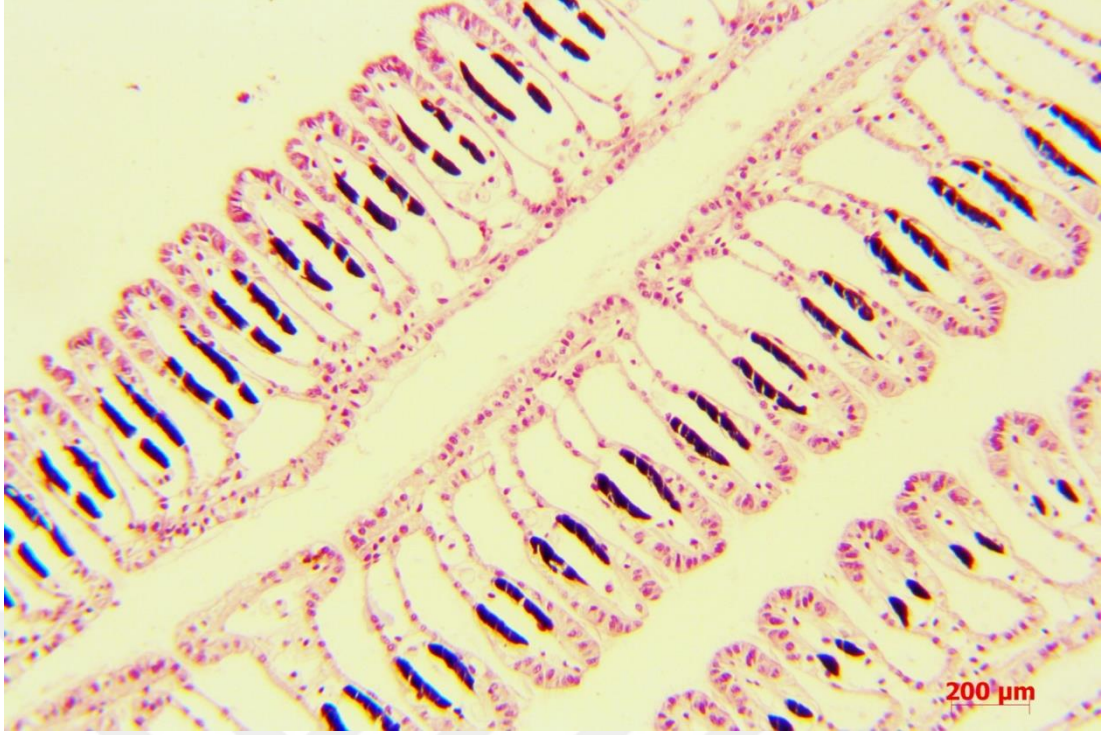


Şekil 3.16 : Kontrol grubuna ait sindirim bezi.

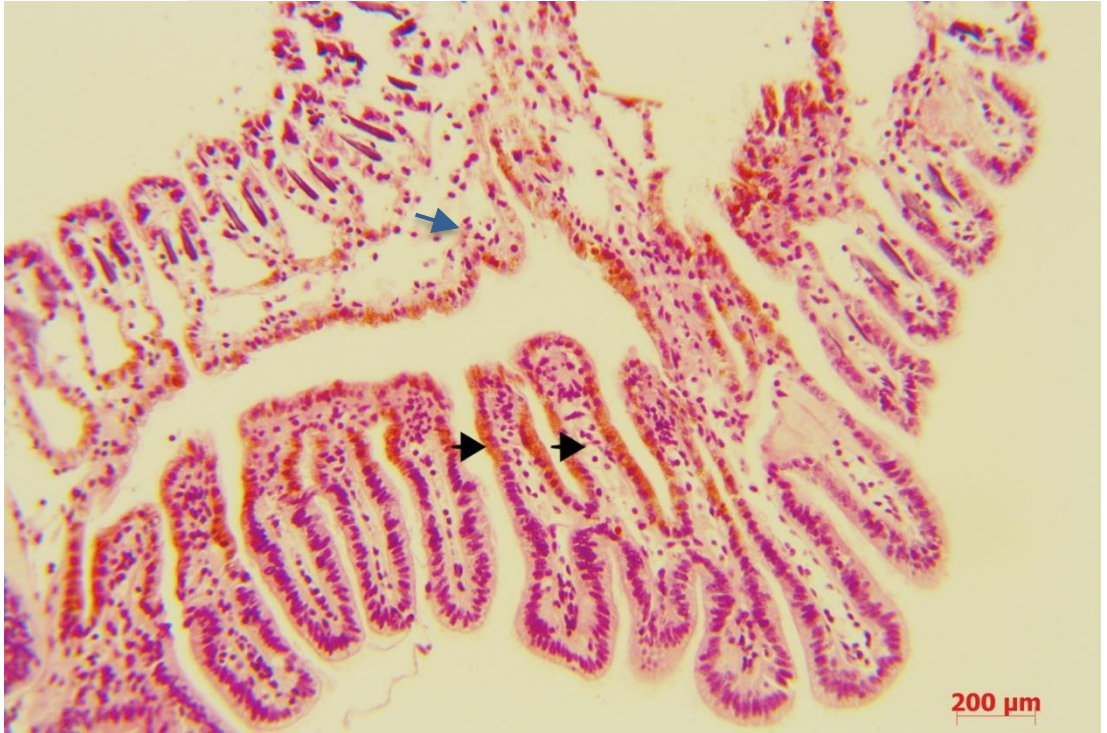


Şekil 3.17 : 50 mg/L nano CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalan tatlı su midyelerinin sindirim bezinde lipofuscin (küçük ok) ve tubul dejenerasyonu (büyük ok).





Şekil 3.18 : Kontrol grubuna ait solungaç dokusu.



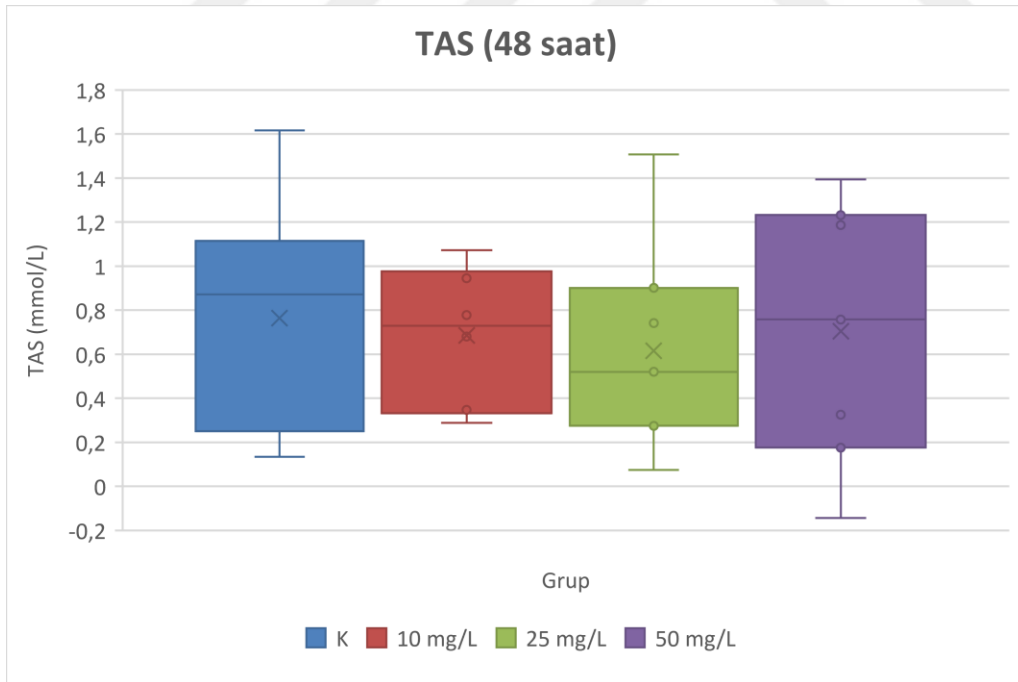
Şekil 3.19 : 7 gün süre ile 50 mg/L nano-CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalan tatlı su midyelerinin solungaçlarında lipofuscin (siyah ok) ve hemolenfatik sinüs genişlemesi (mavi ok).

### 3.3.4 Biyokimyasal Analiz Sonuçları

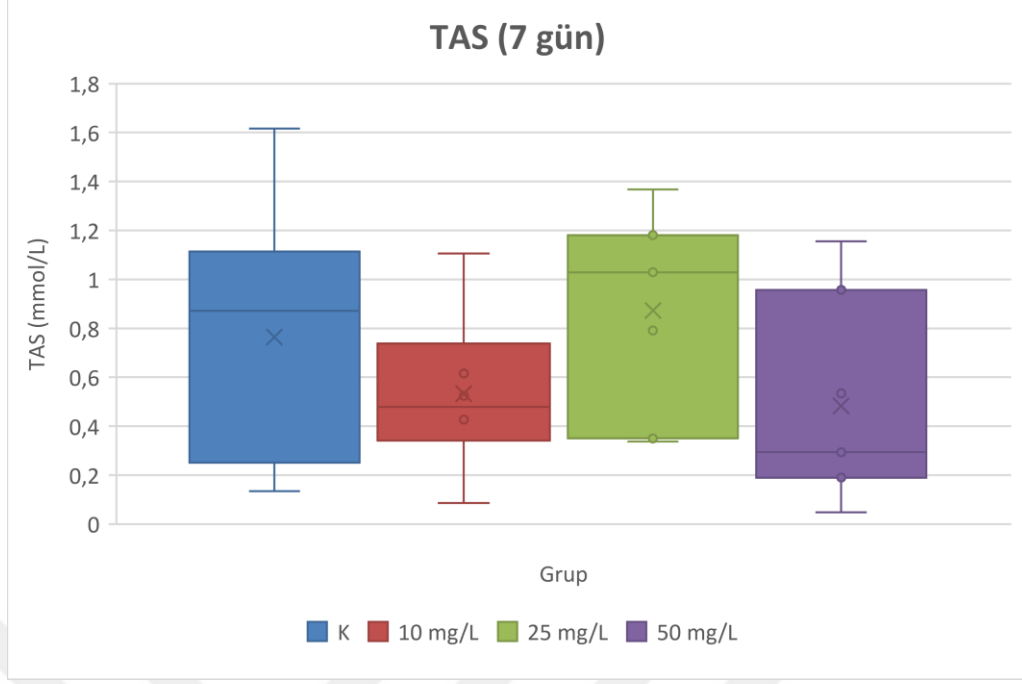
Biyokimya çalışması için ligament ve ayak kısımları hariç alınan dokular her birini ayrı ayrı temsil edecek şekilde diseksiyon yapıldıktan sonra yaklaşık 300 mg olarak alüminyum folyoya sarılıp  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda saklanmıştır. Doku numunelerinin homojenizasyonu sağlandıktan sonra Molecular Devices Spectramax minimax i3 microplate reader cihazı kullanılarak ölçümler yapılmış ve biyokimyasal analiz verileri elde edilmiştir. Yapılan çalışmaların verileri aşağıda raporlanmıştır.

#### 3.3.4.1 Toplam Antioksidan Statüsü (TAS)

Midyelerin 48 saat ve 7 gün sonra elde edilen TAS verileri Çizelge 3.5'te verilmiştir. Kontrol grubuna göre dozlanmış numunelerde TAS değerinde genel olarak azalma saptanmıştır. Kontrol grubunun ortalama TAS değeri  $0,76 \pm 0,22$  mmol/L olup en düşük veri 7 günün sonunda 50 mg/L dozlamaya sonrasındaki midyelerden  $0,48 \pm 0,16$  mmol/L olarak elde edilmiştir. Veriler Şekil 3.20 ve 3.21'de gösterilmiştir. Genel olarak nano-CeO<sub>2</sub> maruziyetinin midyelerin TAS verilerinde küçük sapmalara neden olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3.20 : 48 saat sonraki TAS verilerinin karşılaştırılması.



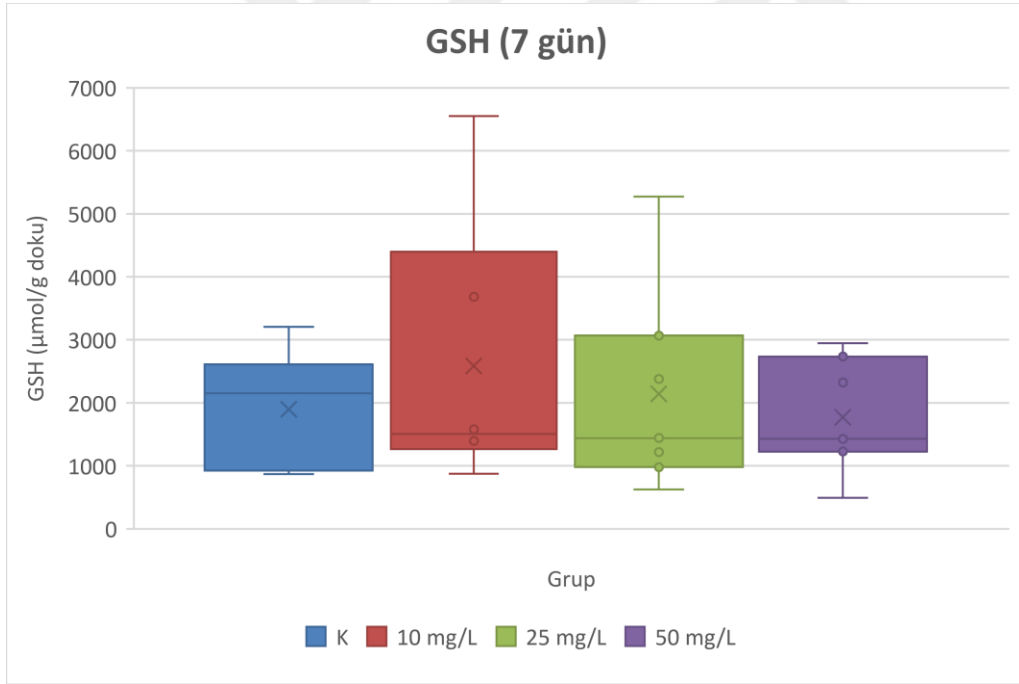
Şekil 3.21 : 7 gün sonundaki TAS verilerinin karşılaştırılması.

### 3.3.4.2 Redükte Glutasyon

Midyelerden 48 saat ve 7 gün sonra elde edilen ortalama GSH verileri Çizelge 3.5'te sunulmuştur. Kısa zamanlı (48 saat) dozlama verilerinde istikrarlı bir artış ya da azalış saptanmamıştır. Kontrol grubuna göre dozlanmış numunelerde elde edilen ortalama GSH değerinde genel olarak dalgalanmalar gözlemlenmiştir. Daha uzun zamanlı (7 gün) süren dozlama çalışmasında ise midyelerden elde edilen GSH verilerinin maruziyet konsantrasyonu arttıkça azaldığı saptanmıştır. GSH verileri Şekil 3.22 ve 3.23'te gösterilmiş olup özellikle 7 gün sonuçlarında GSH verilerinin maruziyet konsantrasyonu arttıkça azaldığı sonuçlarda da resmedilmiştir



Şekil 3.22 : 48 saat sonundaki GSH verilerinin karşılaştırılması.



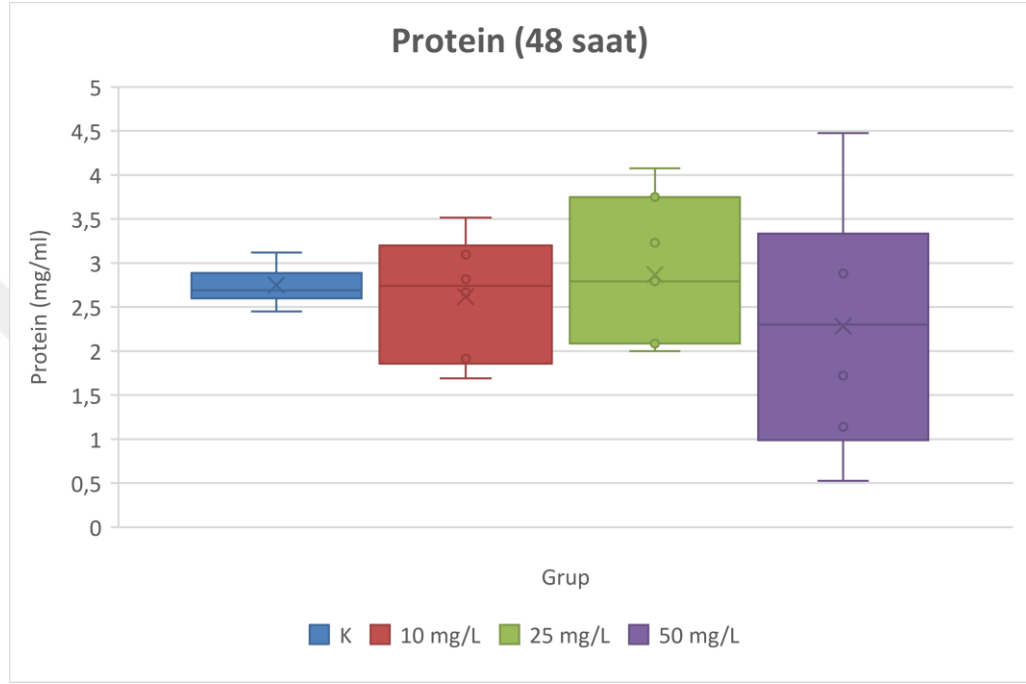
Şekil 3.23 : 7 gün sonundaki GSH verilerinin karşılaştırılması.

### 3.3.4.3 Toplam Protein

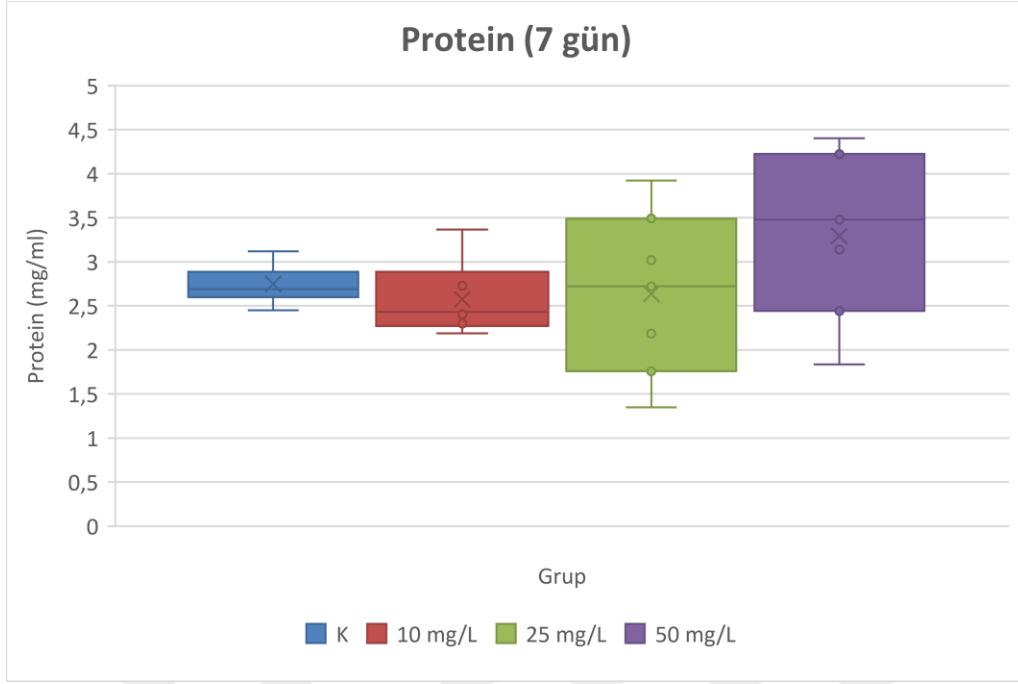
Midyelerden 48 saat ve 7 gün sonra elde edilen ortalama toplam protein verileri Çizelge 3.5'te sunulmuştur. Hem kısa zamanlı (48 saat) dozlama verilerinde hem de uzun zamanlı (7 gün) dozlama verilerinde kontrol grubuna göre elde edilen ortalama

total protein değerlerinde genel olarak dalgalanmalar gözlemlenmiştir. Veriler Şekil 3.24 ve 3.25'te gösterilmiş olup grafikler bu verileri doğrulamaktadır.

Kontrol grubunun ortalama total protein değeri  $2,75 \pm 0,09$  mg/ml olarak saptanmıştır. Kontrol gruba göre en farklı değer 50 mg/L dozlanan midyelerin 7. günün sonundaki ortalama protein değerinde  $3,29 \pm 0,35$  mg/ml olarak belirlenmiştir.



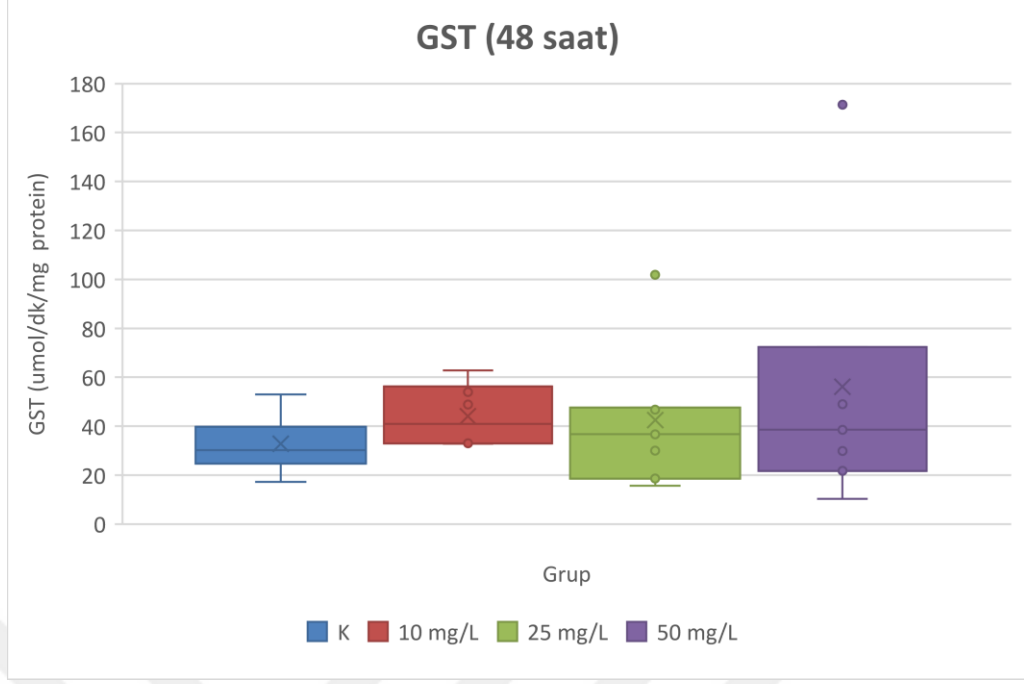
Şekil 3.24 : 48 saat sonundaki toplam protein verilerinin karşılaştırılması.



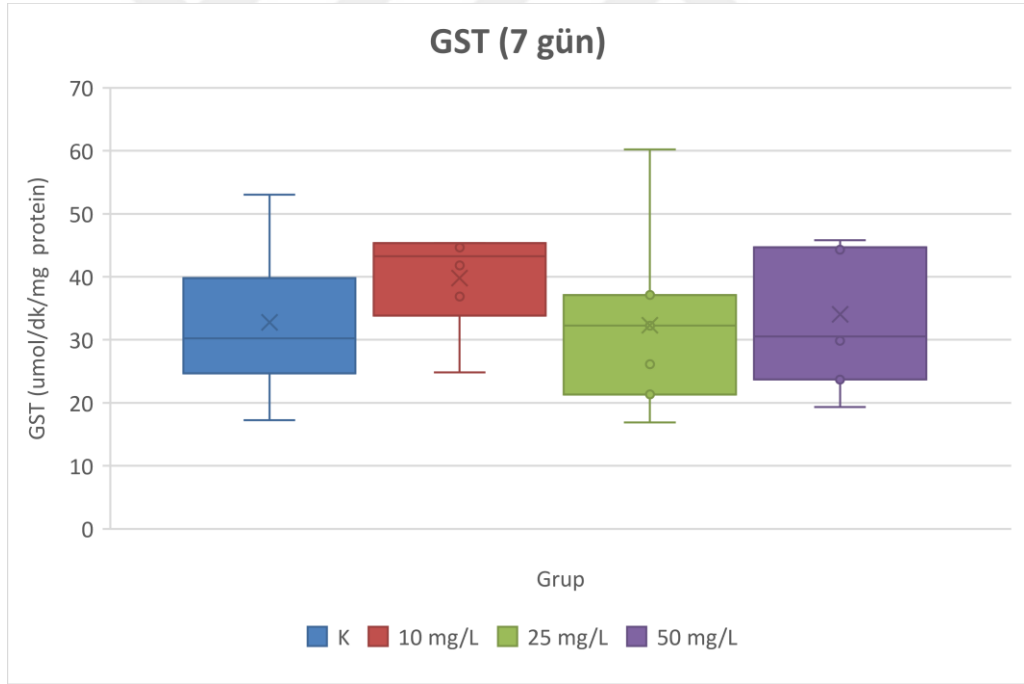
Şekil 3.25 : 7 gün sonundaki toplam protein verilerinin karşılaştırılması.

#### 3.3.4.4 Glutasyon S-transferaz (GST) Aktivitesi

Midyelerden 48 saat ve 7 gün sonra elde edilen ortalama GST verileri Çizelge 3.5'te verilmiştir. Kontrol grubuna göre dozlanmış numunelerde elde edilen ortalama GST değerlerinde genel olarak dalgalanmalar gözlemlenmiştir. Kısa süreli (48 saat) dozlama çalışmasında midyelerden elde edilen GST verilerinin maruziyet konsantrasyonunun artışıyla genel olarak arttığı saptanmıştır. Kontrol grubunun ortalama GST değeri  $32,78 \pm 4,78$  umol/dk/mg protein olup, en yüksek GST değeri 48 saat süren çalışmada 50 mg/L dozlanan midyelerden  $56,17 \pm 20,62$  umol/dk/mg protein olarak elde edilmiştir. 7 gün süren çalışmada ise elde edilen verilerde kontrol gruba göre önce bir artış daha sonra azalış saptanmıştır. Bu çalışmada en yüksek değer  $39,81 \pm 3,27$  umol/dk/mg protein olarak 10 mg/L dozlanan midyelerden elde edilmiştir. Bu sonuçlar midyelerin GST verilerinin kısa vadede daha çok etkilendiğini zamanla normal değerlerine yakınlaştığını göstermektedir. Verilere ait grafikler Şekil 3.26 ve 3.27'de sunulmuştur.



Şekil 3.26 : 48 saat sonundaki GST verilerinin karşılaştırılması.

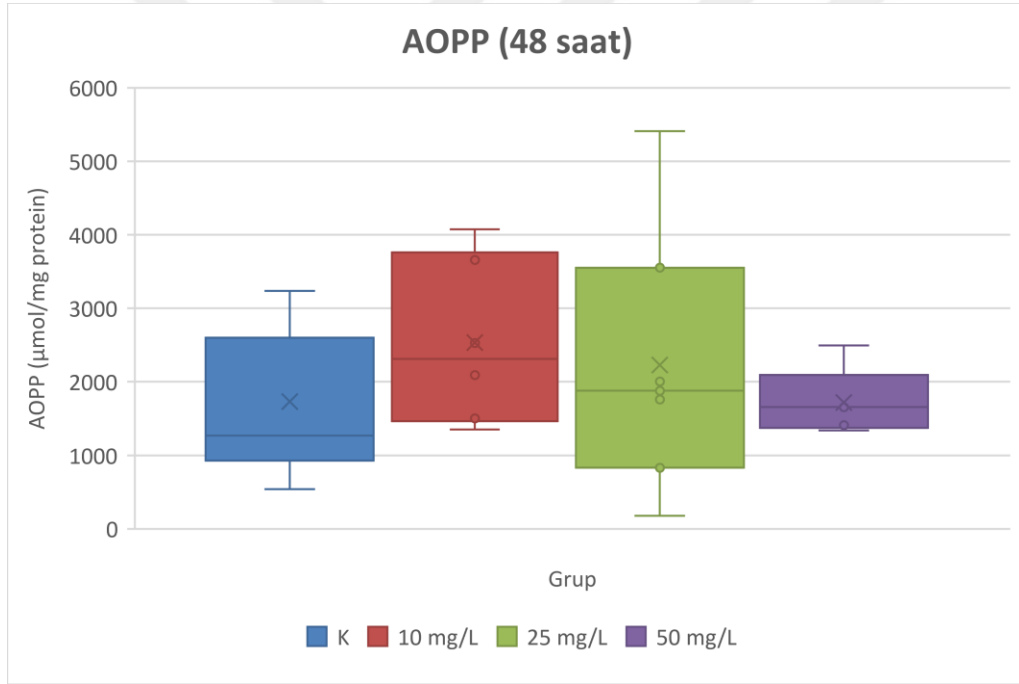


Şekil 3.27 : 7 gün sonundaki GST verilerinin karşılaştırılması.

### 3.3.4.5 İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products - AOPP)

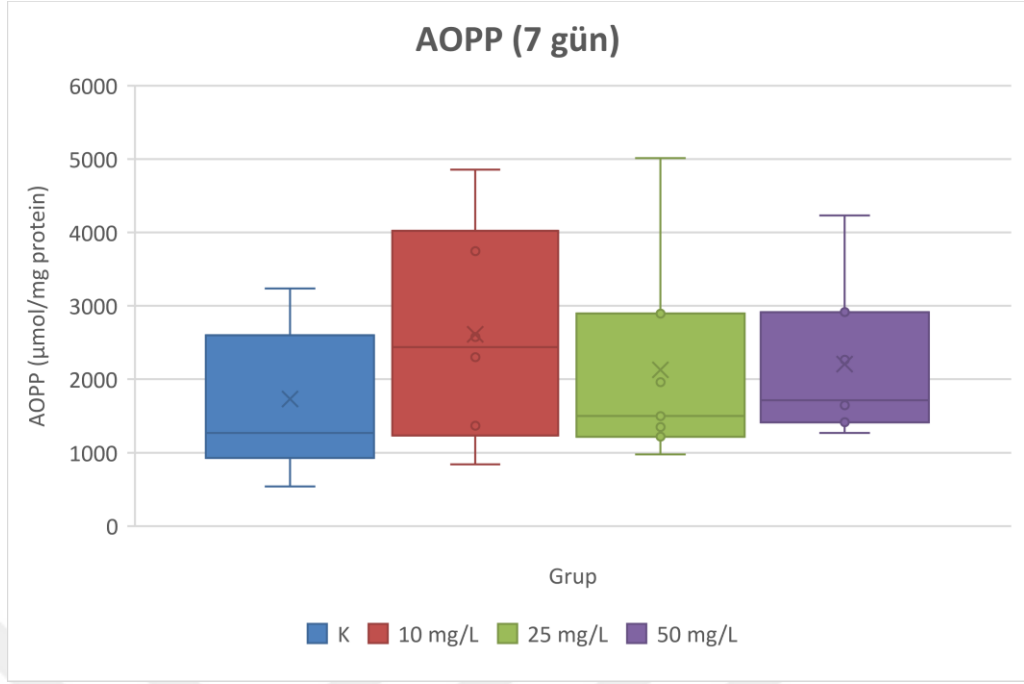
Midyelerden 48 saat ve 7 gün sonra elde edilen ortalama AOPP verileri Çizelge 3.5'te verilmiştir. Kontrol grubuna göre dozlanmış numunelerde elde edilen ortalama AOPP

değerlerinde genel olarak bir artış gözlemlenmiştir. Kısa süreli (48 saat) dozlama çalışmasında midyelerden elde edilen AOPP verilerinin önce bir artış daha sonra azalış gösterdiği saptanmıştır. Kontrol grubunun ortalama AOPP değeri  $1729,36 \pm 403,67$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein olup, en yüksek AOPP değeri 48 saat süren çalışmada 10 mg/L dozlanan midyelerden  $2533,50 \pm 457,69$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  olarak, 7 gün süren çalışmada ise en yüksek veri yine 10 mg/L dozlanan midyelerden  $2613,67 \pm 608,08$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar midyelerin AOPP verilerinin daha düşük dozlamada daha yüksek değere ulaştığını ve uzun süreli maruziyetin kısa süreli maruziyete göre daha yüksek AOPP değerine neden olduğunu göstermektedir. Verilerin sonuçları Şekil 3.28 ve 3.29’da sunulmuştur. Hesaplamalar yapılırken anormal değerde olmaları nedeniyle 48 saat süren çalışmadaki 50 mg/L dozlanan midyelerden 6 ve 11 nolu veriler çıkarılmıştır.



Şekil 3.28 : 48 saat sonundaki AOPP verilerinin karşılaştırılması.





Şekil 3.29 : 7 gün sonundaki AOPP verilerinin karşılaştırılması.

Çizelge 3.5 : Biyokimyasal analiz sonuçları.

	48 saat				7 gün		
	C	10 mg/L CeO <sub>2</sub>	25 mg/L CeO <sub>2</sub>	50 mg/L CeO <sub>2</sub>	10 mg/L CeO <sub>2</sub>	25 mg/L CeO <sub>2</sub>	50 mg/L CeO <sub>2</sub>
<b>TAS</b> (mmol/L)	0,76 ± 0,22	0,69 ± 0,13	0,62 ± 0,18	0,70 ± 0,23	0,53 ± 0,14	0,87 ± 0,15	0,48 ± 0,16
<b>GSH</b> (µmole/g tissue)	1900,23 ± 369,23	1944,77 ± 274,93	2334,98 ± 486,24	2245,53 ± 469,33	2585,79 ± 887,21	2140,64 ± 611,71	1768,41 ± 343,42
<b>GST</b> (umol/dk/mg protein)	32,78 ± 4,78	44,11 ± 5,30	42,48 ± 10,97	56,17 ± 20,62	39,81 ± 3,27	32,32 ± 5,34	34,03 ± 4,11
<b>Protein</b> (mg/ml)	2,75 ± 0,09	2,62 ± 0,28	2,87 ± 0,32	2,23 ± 0,50	2,57 ± 0,18	2,64 ± 0,35	3,29 ± 0,35
<b>AOPP</b> (µmol/mg protein)	1729,36 ± 403,67	2533,50 ± 457,69	2230,61 ± 661,86	1717,33 ± 206,11	2613,67 ± 608,08	2130,24 ± 536,68	2207,63 ± 398,52

### 3.3.5 Su Analizi Sonuçları

#### 3.3.5.1 CeO<sub>2</sub> Nanoparçacıkların Dispersiyonu ve Parçacık Boyutu Analizi

Akvaryumlardan alınan su numuneleri içindeki CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların ortalama hidrodinamik çaplarının ve polidispersite değerlerinin zamanla değişimi Çizelge 3.6'da verilmiştir. Sonuçlar CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların su içinde oldukça kısmı bir çözünme gösterdiğini, genel olarak yoğun topaklanma gösterdiğini kanıtlamaktadır.

Çizelge 3.6 : Farklı konsantrasyonlardaki su numuneleri içindeki CeO<sub>2</sub> nanoparçacıkların ortalama hidrodinamik çapları ve polidispersite değerlerinin zamanla değişimi.

Numune alım süresi	DLS Deney süresi (dk)	Konsantrasyon miktarı (mg/L)		
		10	25	50
		Hidrodinamik çap dH (nm)		
48 saat	5	787,6	624,5	604,4
	10	799,6	657,8	727,9
	15	897,2	622,9	715,9
	20	713,5	699,7	679,5
	25	656,4	724,3	735,4
	30	744,3	814,9	641,5
	35	735,6	788,4	684,3
	40	818,2	601,9	618,2
	45	762,3	644,4	572,3
	50	812,5	714,3	697,3
	55	798,3	777,3	734,3
	60	812,2	735,2	644,9

Numune alım süresi	DLS Deney süresi (dk)	Konsantrasyon miktarı (mg/L)		
		10	25	50
		Polidispersite		
48 saat	5	0,732	0,697	0,682
	10	0,707	0,715	0,645
	15	0,743	0,628	0,621
	20	0,767	0,686	0,694
	25	0,779	0,760	0,709
	30	0,699	0,654	0,764
	35	0,632	0,689	0,631
	40	0,632	0,697	0,682
	45	0,707	0,715	0,645
	50	0,743	0,628	0,621
	55	0,667	0,686	0,794
	60	0,679	0,660	0,709

Numune alım süresi	DLS Deney süresi (dk)	Konsantrasyon miktarı (mg/L)		
		10	25	50
		Hidrodinamik çap dH (nm)		
7 gün	5	787,6	624,5	342,0
	10	440,6	553,8	376,4
	15	397,2	322,0	325,2
	20	313,4	364,7	376,3
	25	357,2	412,3	309,7
	30	344,3	373,3	362,7
	35	393,6	274,4	298,7
	40	418,2	336,3	375,7
	45	452,3	291,7	321,4
	50	465,5	282,4	336,1
	55	391,3	290,3	277,5
	60	374,8	301,2	351,2

Numune alım süresi	DLS Deney süresi (dk)	Konsantrasyon miktarı (mg/L)		
		10	25	50
		Polidispersite		
7 gün	5	0,774	0,666	0,452
	10	0,456	0,491	0,490
	15	0,502	0,400	0,433
	20	0,546	0,383	0,485
	25	0,534	0,440	0,476
	30	0,432	0,397	0,482
	35	0,507	0,415	0,445
	40	0,443	0,528	0,621
	45	0,467	0,386	0,494
	50	0,479	0,360	0,509
	55	0,599	0,454	0,464
	60	0,632	0,489	0,531

### 3.3.5.2 Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) ile CeO<sub>2</sub> Konsantrasyon Tayini

Her konsantrasyon için akvaryumlardan 48 saat sonrası ve 7 gün sonrası alınan su numunelerindeki nano CeO<sub>2</sub> konsantrasyonunun belirlenebilmesi için EPA metod 6020B analiz yöntemi kullanılarak elde edilen ICP-MS sonuçları Çizelge 3.7'de raporlanmıştır. Analizde kullanılan Ce için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,15 µg/L ve 0,5 µg/L'dir.

Sonuçlar genel olarak göstermektedir ki hem deney süresi hem de seryum konsantrasyonu arttıkça su numuneleri içindeki seryum miktarı da genel olarak artmaktadır.

Çizelge 3.7 : Farklı konsantrasyonlardaki su numuneleri içindeki nano CeO<sub>2</sub> miktarları.

Numune (CeO <sub>2</sub> /Su) (mg/L)		Ce (µg/L)
Su	48 saat Kontrol	0,55
	48 saat 10 mg/L CeO <sub>2</sub>	21,6
	48 saat 25 mg/L CeO <sub>2</sub>	16,96
	48 saat 50 mg/L CeO <sub>2</sub>	273,24
	7 gün Kontrol	0,94
	7 gün 10 mg/L CeO <sub>2</sub>	378,3
	7 gün 25mg/L CeO <sub>2</sub>	1133,3
	7 gün 50 mg/L CeO <sub>2</sub>	3955,8

### 3.4 Değerlendirme

Tezin bu bölümünde ilk olarak deney çalışmasında kullanılan tüm midyelerin maruziyet sebebi ile oluşabilecek anormalliklerin saptanabilmesi için ağırlık ve boyut ölçümleri yapılmış kontrol grup ile dozlanan grup midyeleri arasında ağırlık ve boyut olarak önemli bir fark gözlemlenmemiştir. Yaklaşık olarak tüm midyeler benzer ağırlık ve boyuta sahiptir. Ayrıca deney süresi boyunca önemli bir ölüm gözlemlenmemiştir. Sendra ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, farklı fiziko-kimyasal özelliklere (boyut, şekil, zeta-potansiyeli ve Ce<sup>+3</sup>/Ce<sup>+4</sup> oranı) sahip iki farklı nano-CeO<sub>2</sub>'nin toksik etkileri raporlanmıştır. Bu iki farklı nano-CeO<sub>2</sub>'nin incelendiği çalışmada, bu tez kapsamında kullanılan midye türüne benzer *Mytilus galloprovincialis* isimli midye türü kullanılmıştır. Nano-CeO<sub>2</sub>'lerin hem nötr yüzey

yüklü hem de iyi şekillendirilmiş formlarında ciddi toksik özellikler göstermediği bu çalışmada da raporlanmıştır [97].

İkinci olarak midyelerden hemolemf alımı yapıp ışık mikroskobu altında hemosit sayımı gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla dozlanmış numunelerde THC (hücre/ml) değerlerinde oldukça düşüş gözlemlenmiştir. THC (hücre/ml) değerleri kontrol grubun değerinin yarısından bile düşüktür. Elde edilen sonuçlar istatistiki bakımdan anlamlı olup dozlanmış numunelerde kontrol gruba kıyasla düşük THC sayımı elde edilmesi hücrelerin nano-CeO<sub>2</sub>'den etkilendiğini göstermektedir.

Histopatoloji çalışmasının sonuçlarına göre, nano-CeO<sub>2</sub>'lerin subletal etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Sudaki nano-CeO<sub>2</sub>'lerin konsantrasyonu ile doku hasarı miktarı arasında pozitif bir korelasyon olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle yüksek dozlarda sindirim bezi ve solungaçlarda histolojik olarak bazı doku hasarlarına neden olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen bu sonuçlar literatür ile paralellik göstermiştir. Nano-CeO<sub>2</sub>'nin *in vivo* toksik etkileri üzerine Augustea ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 96 saat boyunca 100 µg/L CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalan deniz midyesi *Mytilus galloprovincialis*'in dokularında (solungaçlar, sindirim bezi) farklı seviyelerde hasar tespit edilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada nano-CeO<sub>2</sub>'nin toksik etkilerini belirlemek için, geniş bir konsantrasyon aralığında 48 saatlik embriyo-toksisite testi de yapılmıştır. Nano-CeO<sub>2</sub> maruziyeti sonucunda, normal embriyo gelişiminde küçük bir miktar sapma tespit edilmiştir [94].

Biyokimyasal analiz dataları ile yapılan istatistiksel çalışma sonucunda midye numunelerinin birbiri arasında ve numuneler ile kontrol grubu arasında önemli bir fark gözlemlenmemiştir. Maruziyet sonucunda biyo-belirteç analizinde önemli bir değişiklik tespit edilmemekle birlikte dozlanmış numunelerin ikili karşılaştırmalarda oksidasyon stres parametrelerinde sapmalar olduğu raporlanmıştır. Elde edilen bulgular istatistiki olarak anlamlı düzeyde değildir. Ancak, bu sonuçlar literatürdeki benzer çalışmalarla uyumaktadır. Garanda ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada zebra midyesi (*Dreissena polymorpha*) [95], Vanessa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise tatlı su tarağı (*Corbicula fluminea*) [99] deney hayvanı olarak seçilmiştir. Her iki çalışmada da nano-CeO<sub>2</sub>'nin oksidatif stres parametreleri üzerine sapmalara sebep olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmalarda, nano-CeO<sub>2</sub>'nin zaman ve konsantrasyon

etkileri, bu tez kapsamında da olduğu gibi biyo-belirteç değerlendirmelerinin yanında hemolemf ve histolojik vb. deneylerin sonuçlarıyla birleştirilerek vurgulanmıştır.

Su analizi kapsamında yapılan DLS alışması sonucunda, CeO<sub>2</sub> nano parçacıkların su içinde kısmi bir çözünme gösterdiği, genel olarak yoğun bir şekilde topaklanarak çöktüğü sonucuna varılmıştır. ICP-MS analizinde ise hem deney süresinin hem de seryum konsantrasyonunun artması ile su numuneleri içindeki seryum miktarı da artmaktadır. Bu iki analiz, akvaryum görsellerinde de gözle görülen midye üzerinde topaklanarak biriken nano-CeO<sub>2</sub> parçacıklarını ve 48 saat ile 7 gün sonrasında bile gözle görülen su bulanıklığının nedeninin tüm nano-CeO<sub>2</sub> topaklarının çökmediği bir miktarının ise su içinde tutunabildiğini kanıtlamaktadır.

Tezin bu bölümünde yapılan deneylerin sonucunda, nano-CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalmanın akut maruziyet sırasında midyeler için biyolojik risk oluşturmadığı; ancak midyelerin çok yüksek doz nano-CeO<sub>2</sub>'ye maruz bırakıldığı bu çalışmada özellikle sindirim bezi ve solungaçlarda histolojik olarak bazı doku hasarlarına neden olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu tez çalışması tatlı su ortamlarında var olan nano-CeO<sub>2</sub> miktarına göre daha yüksek oranlarında maruziyetin özellikle histolojik açıdan doku hasarı oluşturduğunu, daha düşük dozlarda etki göstermeyeceğini kanıtlayarak da artan nano-CeO<sub>2</sub> kullanımı ve sucul ekosisteme hızlı sedimentasyonu nedeniyle gelecekte midyelerin ekosistemdeki konumundan dolayı, besin ağının diğer organizmalarına trofik transfer yoluyla bir risk oluşturabileceği göstermektedir.





#### 4. DEĞERLENDİRME ve TARTIŞMA

Yapılan çalışmalar sonucunda mühendislik ürünü nanoparçacıkların (MNP'ler) doğal su ortamında biriktiği bilinmektedir. Her geçen gün, MNP'lerin kullanımının artması ile de sudaki bu birikim oranı artmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında da MNP'lerden önemli biri olan nano-CeO<sub>2</sub>'nin tatlı su ortamında birikmesi sonucu zarar görebilecek olan iki tatlı su canlısı ele alınmıştır. Öncelikle su dibinde oluşan sediment ortamında yaşayan *Chironomus riparius* larvaların doğal şartlarda maksimum miktarda olabilecek konsantrasyon miktarı ele alınarak belirlenen en düşük doz ve yüksek doz etkilerini incelemek için belirlenen en yüksek doz ve ara dozlarda eklenerek farklı nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonlarına maruziyeti incelenmiş, daha sonra ise yine bir tatlı su hayvanı olan tatlı su midyelerin yüksek dozdaki nano-CeO<sub>2</sub>'ye maruziyetleri araştırılmıştır. Sonuç olarak ise, nano-CeO<sub>2</sub>'nin hem kronomidler hem de midyeler için kısa vadede ciddi bir risk teşkil etmediği sonucuna varılmıştır. Ancak, nano-CeO<sub>2</sub>'nin tatlı su dibinde ciddi birikimiyle birlikte hayvanların vücutlarında da biriktiği gözlemlenmiştir. Bu birikim sonucunda besin zincirindeki daha ilerideki organizmalara trofik transfer yoluyla risk oluşturabileceğini kanaatine varılmıştır. Tez kapsamında nano-CeO<sub>2</sub>'nin hem kronomidler hem de midyeler için kısa vadedeki toksik etkileri araştırılmıştır. Ancak daha uzun vadeli etkileri henüz araştırılmamıştır. Hayvanların vücutlarında nano-CeO<sub>2</sub>'nin biriktiğinin bilinmesi nedeniyle uzun vadede toksik etki yaratabileceği düşünülmektedir ve uzun vadeli etkileri ileride çalışılması gereken önemli bir araştırma konusudur.

MNP'lerin kuantum boyut etkisi ve sahip oldukları geniş yüzey alanı/hacim oranı sebebiyle sıra dışı ve yığın formuna göre farklı özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Bu özelliklere toksik etkileri de dahildir. Başka bir deyişle, aynı malzemenin farklı nano şekil ve boyuttaki formları hem birbirlerinden hem de yığın formdaki halinden farklı toksik özelliklere sahiptir. Bu sebeple MNP'lerin toksikolojisi önemli ve geniş bir araştırma alanı oluşturmaktadır. MNP'lerin aynı malzemedan bile olsa her bir formu farklı toksik etki yaratacağından yapılacak çalışmanın başında kullanılacak MNP'nin ayrıntılı karakterizasyonun yapılması büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle

bu tez çalışması kapsamında kullanılan MNP (nano-CeO<sub>2</sub>) çok detaylı bir şekilde farklı yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir. Bu çalışma kapsamında kullanılan nano-CeO<sub>2</sub>'nin partikül boyutu ortalama  $25 \pm 1.8$  nm'dir. Partikül boyutları 23 ile 29 nm arasında değişebilmektedir. Nano-CeO<sub>2</sub>'nin şekli ise tam bir küre değil, köşeli bir forma sahiptir. Kristal yapısı yüzey merkezli kübik yapıda başka bir deyişle florit yapıdadır. Suda çözünmeyen CeO<sub>2</sub> moleküllerinin su içerisinde solvasyon kuvvetlerin de etkisiyle sıvı moleküllerinin etrafında adsorplanarak ince bir tabaka oluşturduğu bu nedenle hidrodinamik çap denilen kuru ortama göre farklı bir çap boyutuna sahip olduğu bilinmektedir. Nano-CeO<sub>2</sub>'lerin hidrodinamik çapı kuru ortamdaki çapına göre çok daha yüksek değerlere sahiptir. Ayrıca nano-CeO<sub>2</sub>'nin hem sıvı hem de kuru ortamda birbirlerine tutunma, topaklanma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. BET sonuçlarına göre CeO<sub>2</sub>'nin özgül yüzey alanı 42,602 m<sup>2</sup>/g ve gözenek yarıçapı 107,5 nm'dir. Bu değerler CeO<sub>2</sub> topaklarının yüzey alanı ve gözenek yarıçapının değerleri olup sediment çalışmasında SEM ile elde ettiğimiz silika parçacıklarına tutunan CeO<sub>2</sub> topak görüntüleri ile uyumlu sonuçlar göstermektedir. Su ortamında da akvaryum içinde gözle görülen, ICP-MS ve DLS verileri ile de doğrulanan, nano-CeO<sub>2</sub>'nin topaklanma eğiliminde olduğudur.

Sendraa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, farklı fiziko-kimyasal özelliklere (boyut, şekil, zeta-potansiyeli ve Ce<sup>+3</sup>/Ce<sup>+4</sup> oranı) sahip iki farklı nano-CeO<sub>2</sub>'nin toksik etkileri raporlanmıştır. Bu iki farklı nano-CeO<sub>2</sub>'nin incelendiği çalışmada, bu tez kapsamında kullanılan midye türüne benzer *Mytilus galloprovincialis* isimli midye türü kullanılmıştır. Aynı deney koşullarında plazma sıvısındaki biyo-moleküllerde farklı davranışlar sergilediği belirtilmiştir. Negatif yüklü ve yuvarlak şekilli nano-CeO<sub>2</sub>'lerin stres biyo-belirtecinde (LMS) ve immünolojik parametrelerde (ROS ve fagositoz kapasitesi) daha yüksek değişikliklere neden olduğu raporlanmıştır. Nano-CeO<sub>2</sub>'lerin nötr yüzey yüklü ve iyi şekillendirilmiş formlarında ciddi toksik özellikler göstermediği tespit edilmiştir [97].

Bu konuyla ilgili David ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada ise, nano ve yığın formdaki nano-CeO<sub>2</sub>'nin deniz mikrokabuğu, *Artemia salina*, üzerindeki etkisinin araştırmıştır. CeO<sub>2</sub>'nin boyutları  $15 \pm 3,5$  (nano) ve  $582 \pm 50$  nm (yığın) olarak bildirilmiştir. CeO<sub>2</sub> partiküllerinin her iki boyutu da *Artemia salina*'nın yumurtadan çıkma oranını azaltmıştır. Nano CeO<sub>2</sub>'nin yığın CeO<sub>2</sub> ile karşılaştırıldığında *Artemia*

*salina* için daha toksik olduğu tespit edilmiştir. Nano CeO<sub>2</sub>, *Artemia salina* üzerinde yığın formdan daha yüksek oksidatif strese (ROS) sebep olmuştur. Antioksidan aktivitesindeki azalma, hücrelerdeki oksidatif streste bir artış olduğunu göstermiştir. Nano ve yığın CeO<sub>2</sub> partiküllerine maruz kalma sonucunda yüksek asetilkolinesteraz aktivitesi (AChE) gözlenmiştir. Konsantrasyon ve partikül boyutu arttıkça CeO<sub>2</sub> partiküllerinin alımı ve birikimi de artmıştır. Bu nedenle, sonuçlar nano-CeO<sub>2</sub>'nin yığın partiküllere kıyasla *Artemia salina* için daha toksik olduğunu ortaya koymuştur [98]. Sonuç olarak, nano-CeO<sub>2</sub>'nin farklı formları farklı toksik sonuçlar doğurabileceğinden çalışmalarda karakterizasyon kısmı oldukça önem taşımaktadır. Bu sebeple bu tez kapsamında karakterizasyon çalışmasına oldukça önem verilmiştir.

Literatürde, nano-CeO<sub>2</sub>'nin etkileri üzerine çelişkili çalışmalar bulunmaktadır. Bazı çalışmalar nano-CeO<sub>2</sub>'nin antioksidan olduğunu belirtirken bazı çalışmalar ise Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretimini tetikleyici etken madde olduğunu rapor etmiştir. Nano-CeO<sub>2</sub>'nin kancalı kurtların yaşam sürelerini azalttığı, sıçanların karaciğerlerinde hasara sebep olduğu, akciğer dokuları gibi çeşitli insan kas dokularında ortalama bir toksiklik sergilediği raporlanmıştır [79]. Nano-CeO<sub>2</sub>'nin sahip olduğu serya döngüsünün bu çelişkili durumun sebebi olduğu ve Ce<sup>3+</sup>/Ce<sup>4+</sup> oranındaki değişimin bu zıt davranışlara neden olduğu düşünülmektedir. Ancak nano-CeO<sub>2</sub>'nin hangi formunun nasıl özellik gösterdiği net olarak bilinmemektedir. Bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmakla birlikte bu tez kapsamında yapılan çalışmalar literatüre bu noktada katkı sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında, kronomid larvaların, önemli miktarda nano-CeO<sub>2</sub>'yi vücutlarında biriktirme kabiliyetinin olduğu ICP-MS çalışmasıyla kanıtlanmıştır. Yapılan çalışma, bu açıdan pek çok çalışma ile uyumaktadır. Kronomid larvaların, nanopartikülleri biriktirme kabiliyetinin olduğu kanıtlanmıştır. Bu çalışmada, kronomid larvaları nano-CeO<sub>2</sub>'yi maruz kaldığı konsantrasyonun 10 katından daha fazla miktarda vücutlarında biriktirdikleri raporlanmıştır. Bour ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar da benzer sonuçlar göstermektedir. Bu çalışmada, 1 mg/L nano-CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalan, kronomid larvaların ortalama 282 mg/kg vücut ağırlığında nano-CeO<sub>2</sub> biriktirdikleri raporlanmıştır [78].

Tez kapsamında yapılan, genotoksisite analizinin sonuçları, nano-CeO<sub>2</sub>'nin, *Chironomus riparius*'un dördüncü instar larvalarında doza bağlı olarak DNA hasarına

neden olduğunu göstermektedir. Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da benzer sonuçlar raporlamaktadır. *Chironomus riparius*, 15 ve 30 nm boyuttaki iki farklı nano-CeO<sub>2</sub>'ye 1 mg/L konsantrasyonda maruz bırakılan çalışmada, daha küçük boyutlu nano-CeO<sub>2</sub>'nin daha fazla DNA hasarına neden olduğu belirtilmiştir [122]. Boyut etkisinin de araştırıldığı bu çalışmada her iki boyutta da DNA hasarı gözlemlenmiş, boyut azaldıkça toksik etkinin arttığı sonucuna varılmıştır. Bu tez kapsamında kullanılan nano-CeO<sub>2</sub> ise 25 nm olup artan konsantrasyon değerleri ile artan DNA hasarı gözlemlenmiştir.

Tez kapsamında elde edilen histolojik bulgular da literatür ile paralel sonuçlar göstermiştir. Histopatoloji çalışmasının sonuçlarına göre, nano-CeO<sub>2</sub>'nin midyeler üzerinde subletal etkisi olduğu, nano-CeO<sub>2</sub>'nin konsantrasyonundaki artış ile doku hasarı arasında pozitif bir korelasyon olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle yüksek dozlarda sindirim bezi ve solungaçlarda yüksek doku hasarları gözlemlenmiştir. Nano-CeO<sub>2</sub>'nin *in vivo* toksik etkileri üzerine yapılan bir çalışmada, 96 saat boyunca 100µg/L CeO<sub>2</sub>'ye maruz kalan midyelerin dokularında (solungaçlar, sindirim bezi) farklı seviyelerde patolojik etkiler tespit edilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada nano-CeO<sub>2</sub>'nin toksik etkilerini belirlemek için, geniş bir konsantrasyon aralığında 48 saatlik embriyo-toksisite testi de yapılmıştır. Nano-CeO<sub>2</sub> maruziyeti sonucunda, normal embriyo gelişiminde küçük bir miktar sapma tespit edilmiştir [94].

Çalışma kapsamında elde edilen biyokimyasal analiz sonuçları hem kronomid larva hem de midye numunelerinin birbiri arasında ve numuneler ile kontrol grubu arasında önemli bir fark göstermemiştir. Sadece oksidatif stres parametrelerinin ikili karşılaştırmaları sonucu sapmalar olduğu raporlanmıştır. Bu sonuçlar literatürdeki benzer çalışmalarla uyumaktadır. Bu çalışmalara tatlı su amfipodu (*Gammarus roeseli*) ve zebra midyesi (*Dreissena polymorpha*) [80] üzerinde yapılan çalışma ve tatlı su tarağı (*Corbicula fluminea*) [99] üzerine yapılan çalışma örnek olarak verilebilmektedir. Her iki çalışmada da nano-CeO<sub>2</sub>'nin oksidatif stres parametreleri üzerine sapmalara sebep olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmalarda, nano-CeO<sub>2</sub>'nin zaman ve konsantrasyon etkileri, bu tez kapsamında da olduğu gibi biyo-belirteç değerlendirmelerinin yanında genotoksisite, hemolemf, histolojik vb. deneylerin sonuçlarıyla birleştirilerek vurgulanmıştır.

Nano partiküller, tatlı su ortamlarında dibe çökerek doğrudan bentik organizmaları etkilemektedir. Bu sebeple, bu tez çalışmasında *Chironomus riparius* ve *Unio crassus* test organizmaları olarak seçilmiştir. Bu iki canlı da nano partikülleri vücutlarında biriktirebildikleri için doğal indikatörlerdir; bu nedenle nano partiküllerin toksik etkilerinin çalışılması için seçilecek en uygun tatlı su canlılarındandırlar.

Ayrıca, kronomidlerin yaşam döngüsünün sadece 21-22 gün olması da nano malzemelerin öldürücü etkilerinin araştırılması çalışmaları için kronomidleri uygun test organizması yapmaktadır. Bu tez kapsamında da nano-CeO<sub>2</sub>'nin kronomidlerin yaşam döngüsü parametreleri üzerindeki etkisi incelenmiş ve yüksek dozlarda bile öldürücü bir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır. Sineklerde mortalite oranı kontrol grubuna kıyasla bir miktar artmış olma bile ortaya çıkma oranı, gelişim süresi ve hızında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

Sonuç olarak, nano-CeO<sub>2</sub>'nin kronomid larva (*Chironomid Riparius*) ve tatlı su midyesi (*Unio crauses*) üzerindeki toksik etkilerinin araştırıldığı bu tez çalışmasında her iki tatlı su canlısı için de nano-CeO<sub>2</sub>'ye maruziyetin büyük bir risk teşkil etmediğini sonucuna varılmıştır. Ancak bu çalışma, kronomid larvaların önemli miktarda nano-CeO<sub>2</sub>'yi vücutlarında biriktirebildiklerini doğrulamaktadır. Her geçen gün artan nano-CeO<sub>2</sub> kullanımı ile de bu parçacıkların tatlı su ortamlarına hızlıca ulaştığı; su diplerinde ve sediment ortamlarında biriktiği de bilinmektedir. Sucul ekosistemde her geçen gün artan nano-CeO<sub>2</sub> konsantrasyonu nedeniyle de kronomid ve midyelerde bu nanoparçacığın birikiminin de artacağı tahmin edilmektedir. Bu sebeple bu tez çalışması ile ileri vadede besin zincirindeki daha ilerideki organizmalara trofik (beslenme basamağı) transfer yoluyla nano-CeO<sub>2</sub>'nin risk oluşturabileceği sonucuna varılmıştır.

Ayrıca, nano parçacıkların, sucul ortamdaki toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmaların henüz yeterli düzeyde olmadığı ve bu alanda literatürdeki bilgilerin sınırlı olduğu bilinmektedir. Nano parçacıkların çevreye etkileri hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez kapsamında da nano-CeO<sub>2</sub>'nin ayrıntılı karakterizasyonun yapılması ve iki tatlı su organizması üzerindeki ekotoksikoloji çalışmalarının yapılmasıyla bu alanda literatürde var olan açığın doldurulmasına katkı sağlanmıştır.

## KAYNAKLAR

- [1] **Feynman, R.**, (1960) There's plenty of room at the bottom, *Engineering and Science*, 23(5), 22-36.
- [2] **Taniguchi, N.**, (1974) On the basic concept of nanotechnology, *International Conference on Production Engineering ICPE*, Tokyo, Japonya, 26-29 Ağustos.
- [3] **Ju-Nam, Y., Lead, J. R.**, (2008) Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications, *Sci. Total Environ.*, 400(1-3), 396-414.
- [4] <[https://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/review\\_2012\\_en.htm](https://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/review_2012_en.htm)>, alındığı tarih: 24.05.2021
- [5] **Sharma, Y. C., Srivastava, V., Singh, V. K., Kaul, S. N., Weng, C. H.**, (2009) Nano-adsorbents for the removal of metallic pollutants from water and wastewater, *Environ. Technol.*, 30(6), 583-609.
- [6] **Mahapatra, A., Mishra, B. G., Hota, G.**, (2011) Synthesis of ultra-fine  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> fibers via electrospinning method, *Ceram. Int.*, 37(7), 2329-2333.
- [7] **Bora, B., Aomoa, N., Bordoloi, R. K., Srivastava, D. N., Bhuyan, H., Das, A. K., Kakati, M.** (2012) Free-flowing, transparent  $\Gamma$ -alumina nanoparticles synthesized by a supersonic thermal plasma expansion process, *Curr. Appl. Phys.*, 12(3), 880-884.
- [8] **Zeng, W. M., Gao, L., Guo, J. K.**, (1998) A new sol-gel route using inorganic salt for synthesizing Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopowders, *Nanostruct. Mater.*, 10(4), 543-550.
- [9] **Lee, C. J., Kim, D. W., Lee, T. J., Choi, Y. C., Park, Y. S., Lee, Y. H., Choi, W. B., Lee, N. S., Park, G. S., Kim, J. M.**, (1999) Synthesis of aligned carbon nanotubes using thermal chemical vapor deposition, *Chem. Phys. Lett.*, 312(5-6), 461-468.
- [10] **Journet, C., Maser, W. K., Bernier, P., Loiseau, A., de la Chapelle, M. L., Lefrant, S., Deniard, P., Lee, R., Fischer, J. E.**, (1997) Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique, *Nature*, 388, 756-758.
- [11] **Shawky, A., Yasuda, S., Murakoshi, K.**, (2012) Room-temperature synthesis of single-wall carbon nanotubes by an electrochemical process, *Carbon*, 50(11), 4184-4191.
- [12] **Jayakumar, G., Albert I. A. A., Dhayal R.**, (2017) Particle size effect on the properties of cerium oxide (CeO<sub>2</sub>) nanoparticles synthesized by hydrothermal method, *Mechanics, Materials Science&Engineering Journal*, 9(1),

- [13] **Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J.**, (2005) Nano-toxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Environ. Health Perspect.*, 113(7), 823-839.
- [14] **Mayer, K. U., Blowes, D. W., Frind, E. O.**, (2001) Reactive transport modeling of an in situ reactive barrier for the treatment of hexavalent chromium and trichloroethylene in groundwater, *Water Resour. Res.*, 37(12), 3091-3103.
- [15] **Tratnyek, P. G., Johnson, R. L.**, (2006) Nanotechnologies for environmental cleanup, *Nano Today*, 1(2), 44-48.
- [16] **Delgado, G. C.**, (2010) Economics and governance of nanomaterials: Potential and risks, *Technol. Soc.*, 32(2), 137-144.
- [17] **Maynard, A., Michelson, E.**, (2006) The nanotechnology consumer products inventory, Woodrow Wilson International Center for Scholars, USA.
- [18] **Kempa, K., Kimball, B., Rybczynski, J., Huang, Z. P., Wu, P. F., Steeves, D., Sennett, M., Giersig, M., Rao, D. V. G. L. N., Carnahan, D. L., Wang, D. Z., Lao, J. Y., Li, W. Z., Ren, Z. F.**, (2003) Photonic crystals based on periodic arrays of aligned carbon nanotubes, *Nano Lett.*, 3(1), 13-18.
- [19] **Kudo, N., Shimazaki, Y., Ohkita, H., Ohoka, M., Ito, S.**, (2007) Organic-inorganic hybrid solar cells based on conducting polymer and SnO<sub>2</sub> nanoparticles chemically modified with a fullerene derivative, *Solar Energy Mater. Solar Cells*, 91(13), 1243-1247.
- [20] **Biswas, P., Wu, C. Y.**, (2005) Nanoparticles and the environment, *J. Air. Waste Manag. Assoc.*, 55(6), 708-746.
- [21] **Ge, J., Huynh, T., Hu, Y., Yin, Y.**, (2008) Hierarchical magnetite/silica nanoassemblies as magnetically recoverable catalyst-supports, *Nano Lett.*, 8(3), 931-934.
- [22] **Sun, C., Sze, R., Zhang, M.**, (2006) Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI, *J. Biomed Mater. Res. A*, 78(3), 550-557.
- [23] **Hu, J. D., Li, Y. X., Cheng, C. M., Chai, M. X., Feng, X. P., Zhou, X. Z., Gu, Z. Y.**, (2006) Preparation and synergetic polishing of CeO<sub>2</sub>-ZrO<sub>2</sub> mixed oxide, *J. Inorg. Chem.*, 22 (7), 1354.
- [24] <<https://nanoteknoloji.org/>> alındığı tarih: 28.05.2021.
- [25] **Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G. V., Jolivet, J.-P., Wiesner, M. R.**, (2009) Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective, *Nat. Nanotechnol.*, 4, 634-641.
- [26] **Jiang, W., Mashayekhi, H., Xing, B.**, (2009) Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles, *Environ. Poll.*, 157(5), 1619-1625.
- [27] **Hobson, D.W., Guy, R.C.**, (2014) Nanotoxicology, *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, 434-436.

- [28] **Huang, Y.W., Cambre, M., Lee, H.J.,** (2017) The toxicity of nanoparticles depends on multiple molecular and physicochemical mechanisms, *Int J Mol Sci*, 18(12), 2702.
- [29] **Meng, H., Chen, Z., Xing, G., Yuan, H., Chen, C., Zhao, F., Zhang, C., Zhao, Y.,** (2007) Ultrahigh reactivity provokes nanotoxicity: explanation of oral toxicity of nano-copper particles, *Toxicol. Lett.*, 175(1-3), 102-110.
- [30] **Franklin, N. M., Rogers, N. J., Apte, S. C., Batley, G. E., Gadd, G. E., Casey, P. S.,** (2007) Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility, *Environ. Sci. Technol.*, 41(24), 8484-8490.
- [31] **Sayes, C. M., Reed, K. L., Warheit, D. B.,** (2007) Assessing toxicity of fine and nanoparticles: Comparing *in vitro* measurements to *in vivo* pulmonary toxicity profiles, *Toxicol. Sci.*, 97(1), 163-180.
- [32] **Ijima, S.,** (1991) Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature*, 354, 56-58.
- [33] **Davoren, M., Herzog, E., Casey, A., Cottineau, B., Chambers, G., Byrne, H. J., Lyng, F. M.,** (2007) *In vitro* toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells, *Toxicology in Vitro*, 21(3), 438-448.
- [34] **Choudhary, V., Gupta, A.,** *Polymer/Carbon nanotube nanocomposites*, Centre for Polymer Science and Engineering, Indian Institute of Technology Delhi, India, 2011.
- [35] **Foldvari, M., Bagonluri, M.,** (2008) Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. drug delivery and biocompatibility issues, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, 4(3), 183-200.
- [36] **Yun, Y., Dong, Z., Shanov, V., Heineman, W. R., Halsall, H. B., Bhattacharya, A., Conforti, L., Narayan, R. K., Ball, W. S., Schulz, M. J.,** (2007) Nanotube electrodes and biosensors, *Nano Today*, 2, 30.
- [37] **Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, Y., Asakura, M., Kasai, T., Takaya, M., Toya, T., Koda, S., Nagano, K., Arito, H., Fukushima, S.,** (2010) Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male fischer 344 rats, *Ind. Health*, 48(6), 783-795.
- [38] **Kobayashi, N., Naya, M., Mizuno, K., Yamamoto, K., Ema, M., Nakanishi, J.,** (2011) Pulmonary and systemic responses of highly pure and well-dispersed single-wall carbon nanotubes after intratracheal instillation in rats, *Inhal. Toxicol.*, 23(13), 814-828.
- [39] **Lam, C., James, J. T., McCluskey, R., Arepalli, S., Hunter, R. L.,** (2006) A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks, *Crit. Rev. Toxicol.*, 36(3), 189-217.
- [40] **Magrez, A., Kasas, S., Salicio, V., Pasquier, N., Seo, J. W., Celio, M., Catsicas, S., Schwaller, B., Forró, L.,** (2006) Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials, *Nano Lett.*, 6, 1121-1125.



- [41] **Tian, F., Cui, D., Schwarz, H., Estrada, G. G., Kobayashi, H.,** (2006) Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts, *Toxicol. in Vitro*, 20(7), 1202-1212.
- [42] **Zhu, Y., Zhao, Q., Li, Y., Cai, X., Li, W.,** (2006) The interaction and toxicity of multi-walled carbon nanotubes with *Stylomytilus mytilus*, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 6(5), 1357-1364.
- [43] **Cheng, J., Chan, C. M., Veca, L. M., Poon, W. L., Chan, P. K., Qu, L., Sun, Y.-P., Cheng, S. H.,** (2009) Acute and long-term effects after single loading of functionalized multi-walled carbon nanotubes into zebrafish (*Danio rerio*), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 235(2), 216-225.
- [44] **Serpone, N., Salinaro, A., Emeline, A.,** (2001) Deleterious effects of sunscreen titanium dioxide nanoparticles on DNA: efforts to limit DNA damage by particle surface modification, *SPIE. Int. Soc. Opt. Eng.*, 86.
- [45] **Parkin, I. P., Palgrave, R. G.,** (2005) Self-cleaning coatings, *J. Mater. Chem.*, 15, 1689.
- [46] **Long, T. C., Saleh, N., Tilton, R. D., Lowry, G. V., Veronesi, B.,** (2006) Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): Implications for nanoparticle neurotoxicity, *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40(14), 4346-4352.
- [47] **Hu, X., Cook, S., Wang, P., Hwang, H.-M.,** (2009) In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles, *Sci. Total Environ.*, 407(8), 3070-3072.
- [48] **Wang, J., Zhou, G., Chen, C., Yu, H., Wang, T., Ma, Y., Jia, G., Gao, Y., Li, B., Sun, J., Li, Y., Jiao, F., Zhao, Y., Chao, Z.,** (2007) Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration, *Toxicol. Lett.*, 168(2), 176-185.
- [49] **Lovern, S. B., Klaper, R.,** (2006) *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25(4), 1132-1137.
- [50] **Reijnders, L.,** (2008) Hazard reduction in nanotechnology, *J. Ind. Ecol.*, 12(3), 297-306.
- [51] **Musee, N., Oberholster, P. J., Sikhwivhilu, L., Botha, A.-M.,** (2010) The effects of engineered nanoparticles on survival, reproduction, and behaviour of freshwater snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805), *Chemosphere*, 81(10), 1196-1203.
- [52] **Sadiq, I. M., Dalai, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A.,** (2011) Ecotoxicity study of titania (TiO<sub>2</sub>) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 74(5), 1180-1187.
- [53] **Seitz, F., Rosenfeldt, R. R., Schneider, S., Schulz, R., Bundschuh, M.,** (2014) Size-, surface- and crystalline structure composition-related effects of titanium dioxide nanoparticles during their aquatic life cycle, *Sci. Total Environ.*, 493, 891-897.

- [54] **Clemente, Z., Castro, V. L. S. S., Moura, M. A. M., Jonsson, C. M., Fraceto, L. F.,** (2014) Toxicity assessment of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in zebrafish embryos under different exposure conditions, *Aquat. Toxicol.*, 147, 129-139.
- [55] **Sayes, C. M., Wahi, R., Kurian, P. A., Liu, Y., West, J. L., Ausman, K. D., Warheit, D. B., Colvin, V. L.,** (2006) Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells, *Toxicol. Sci.*, 92(1), 174-185.
- [56] **Bosetti, M., Massè, A., Tobin, E., Cannas, M.,** (2002) Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity, *Biomaterials*, 23(3), 887-892.
- [57] **Lam, P. K., Chan, E. S. Y., Ho, W. S., Liew, C. T.,** (2004) In vitro cytotoxicity testing of a nanocrystalline silver dressing (acticoat) on cultured keratinocytes, *Br. J. Biomed. Sci.*, 61(3), 125-127.
- [58] **Samberg, M. E., Oldenburg, S. J., Monteiro-Riviere, N. A.,** (2010) Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro, *Environ. Health Perspect.*, 118(3), 407-413.
- [59] **Vannini, C., Domingo, G., Onelli, E., De Mattia, F., Bruni, I., Marsoni, M., Bracale, M.,** (2014) Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings, *J. Plant Physiol.*, 171(13), 1142-1148.
- [60] **Han, X., Geller, B., Moniz, K., Das, P., Chippindale, A. K., Walker, V. K.,** (2014) Monitoring the developmental impact of copper and silver nanoparticle exposure in drosophila and their microbiomes, *Sci. Total Environ.*, 487, 822-829.
- [61] **Jeon, H. J., Yi, S.-C., Oh, S.-G.,** (2003) Preparation and antibacterial effects of Ag-SiO<sub>2</sub> thin films by sol-gel method, *Biomaterials*, 24(27), 4921-4928.
- [62] **Massarsky, A., Labarre, J., Trudeau, V. L., Moon, T. W.,** (2014) Silver nanoparticles stimulate glycogenolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes, *Aquat. Toxicol.*, 147, 68-75.
- [63] **Fajardo, C., Saccà, M. L., Costa, G., Nande, M., Martin, M.,** (2014) Impact of Ag and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on soil organisms: in vitro and soil experiments, *Sci. Total Environ.*, 473-474, 254-261.
- [64] **Katuli, K. K., Massarsky, A., Hadadi, A., Pourmehran, Z.,** (2014) Silver nanoparticles inhibit the gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and erythrocyte AChE activities and induce the stress response in adult zebrafish (*Danio rerio*), *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 106, 173-180.
- [65] **Ahn, J. M., Eom, H.-J., Yang, X., Meyer, J. N., Choi, J.,** (2014) Comparative toxicity of silver nanoparticles on oxidative stress and DNA damage in the nematode, *Caenorhabditis elegans*, *Chemosphere*, 108, 343-352.
- [66] **Huang, Z., Zheng, X., Yan, D., Yin, G., Liao, X., Kang, Y., Yao, Y., Huang, D., Hao, B.,** (2008) Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria, *Langmuir.*, 24(8), 4140-4144.

- [67] Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N., (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel, *Science*, 311(5761), 622-627.
- [68] Nations, S., Long, M., Wages, M., Canas, J., Maul, J. D., Theodorakis, C., Cobb, G. P., (2011) Effects of ZnO nanomaterials on *xenopus laevis* growth and development, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 74(2), 203-210.
- [69] Zhu, X., Zhu, L., Duan, Z., Qi, R., Li, Y., Lang, Y., (2008) Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to zebrafish (*danio rerio*) early developmental stage, *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.*, 43(3), 278.
- [70] Fine, J. M., Gordon, T., Chen, L. C., Kinney, P., Falcone, G., Beckett, W. S., (1997) Metal fume fever: Characterization of clinical and plasma IL-6 responses in controlled human exposures to zinc oxide fume at and below the threshold limit value, *J. Occup. Environ. Med.*, 39(8), 722-726.
- [71] Brunner, T. J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R. N., Limbach, L. K., Bruinink, A., Stark, W. J., (2006) In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility, *Environ. Sci. Technol.*, 40(14), 4374-4381.
- [72] Chen, T. H., Lin, C.-C., Meng, P.-J., (2014) Zinc oxide nanoparticles alter hatching and larval locomotor activity in zebrafish (*danio rerio*), *J. Hazard. Mater.*, 277, 134-140.
- [73] Seker, S., Elçin, A. E., Yumak, T., Smağ, A., Elçin, Y. M., (2014) In vitro cytotoxicity of hydrothermally synthesized ZnO nanoparticles on human periodontal ligament fibroblast and mouse dermal fibroblast cells, *Toxicol. in Vitro*, 28(8), 1349-1358.
- [74] Karlsson, H. L., Gustafsson, J., Cronholm, P., Möller, L., (2009) Size dependent toxicity of metal oxide particles: comparison between nano- and micrometer size, *Toxicol. Lett.*, 188(2), 112-118.
- [75] Bregoli, L., Chiarini, F., Gambarelli, A., Sighinolfi, G., Gatti, A. M., Santi, P., Martelli, A. M., Cocco, L., (2009) Toxicity of antimony trioxide nanoparticles on human hematopoietic progenitor cells and comparison to cell lines, *Toxicology*, 262(2), 121-129.
- [76] Pradhan, A., Seena, S., Pascoal, C., Cássio, F., (2012) Copper oxide nanoparticles can induce toxicity to the freshwater shredder *Allogamus ligonifer*, *Chemosphere*, 89(9), 1142-1150.
- [77] Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G., Wang, T., Yuan, H., Ye, C., Zhao, F., Chai, Z., Zhu, C., Fag, X., Ma, B., Wan, L., (2006) Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo, *Toxicology Letters*, 163(2), 109-120.
- [78] Bour, A., Mouchet, F., Cadarsi, S., Silvestre, J., Baqué, D., Gauthier, L., Pinelli, E., (2017) CeO<sub>2</sub> nanoparticle fate in environmental conditions and toxicity on a freshwater predator species: a microcosm study, *Environmental Science and Pollution Research*, 24(20), 17081-17089.

- [79] **Jessica T. D., Yuji A.**, (2015) Environmental geochemistry of cerium: applications and toxicology of cerium oxide nanoparticles, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12(2),1253-1278.
- [80] **Weeks, M.E.**, (1932) The discovery of the elements. XVI. The rare earth elements, *J. Chem. Educ.*, 9(10),1751.
- [81] **Hedrick, J.B.**, (2004) *Rare Earths. Minerals Yearbook. Vol I. Metals and Minerals*, US Geological Survey, US Department of the Interior, Reston, VA, USA, 2004.
- [82] **Clark, A. H., Beyer, K. A., Hayama, S., Hyde, T. I., Sankar, G.**, (2019) Unusual redox behavior of ceria and its interaction with hydrogen, *Chem. Mater.*, 31(18), 7744–7751.
- [83] **Pirmohamed, T., Dowding, J. M., Singh, S., Wasserman, B., Heckert, E., Karakoti, A. S., King, J. S., Seal, S., Self, W. T.**, (2010) Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity, *Chem. Commun.*, 46(16), 2736-2738.
- [84] **Evans, W.J.**, (2000) Perspectives in reductive lanthanide chemistry, *Coord. Chem. Rev.*, 206-207, 263–283.
- [85] **Helen C. A.**, *Chemistry of the f-Block Elements (Advanced Chemistry Texts)*, CRC Press, 2001.
- [86] **Jakupec, M. A., Unfried, P., Keppler, B. K.**, (2005) Pharmacological properties of cerium compounds, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 153, 101-111.
- [87] **Reinhardt, K., Winkler, H.**, *Cerium Mischmetal, Cerium Alloys, and Cerium Compounds*, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 285-300, 2002.
- [88] **Malavasi L., Fisher C. A. J., Islam M. S.**, (2010) Oxide-ion and proton conducting electrolyte materials for clean energy applications: structural and mechanistic features, *Chemical Society Reviews*, 39(11): 4370-4387.
- [89] **Gorte R.J., Vohs J.M.**, (2009) Nanostructured anodes for solid oxide fuel cells, *Current Opinion on Colloid and Interface Science*, 14(4), 236-244.
- [90] **Kilbourn, B.**, *Cerium and Cerium Compounds*, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley and Sons, Inc., New York, USA, 2003.
- [91] **Primo A., Marino T., Corma A., Molinari R., García H.**, (2011) Efficient visible-light photocatalytic water splitting by minute amounts of gold supported on nanoparticulate CeO<sub>2</sub> obtained by a biopolymer templating method, *Journal of American Chemical Society*, 133, 6930-6933.
- [92] **Tang Z., Zhang Y., Xu Y.**, (2011) A facile and high-yield approach to synthesize one-dimensional CeO<sub>2</sub> nanotubes with well-shaped hollow interior as a photocatalyst for degradation of toxic pollutants, *RSC Advances*, 1, 1772-1777.

- [93] Bour, A., Mouchet, F., Verneuil, L., Evariste, L., Silvestre, J., Pinelli, E., Gauthier, L., (2015) Toxicity of CeO<sub>2</sub> nanoparticles at different trophic levels-effects on diatoms, chironomids and amphibians, *Chemosphere*, 120, 230-236.
- [94] Augustea, M., Balbia, T., Montagnaa, M., Fabbria, R., Sendrab, M., Blascob, J., Canesia, L., (2019) In vivo immunomodulatory and antioxidant properties of nanoceria (nCeO<sub>2</sub>) in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 219, 95-102.
- [95] Garauda, M., Trappa, J., Devina, S., Cossu-Leguillea, C., Pain-Devina, S., Feltena, V., Giamberinia, L., (2015) Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO<sub>2</sub>) sublethal effects on two freshwater invertebrates, *Dreissena polymorpha* and *Gammarus roeseli*, *Aquatic Toxicology*, 158, 63-74.
- [96] Maël, G., Mélanie, A., Simon, D., Vincent, F., Christophe, P., Sandrine, P-D., Olivier, P., François, R., Bénédicte, S., Laure, G., (2016) Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*, *Nanotoxicology*, 10(7), 935-944.
- [97] Sendraa, M., Vollandaa, M., Balbib, T., Fabbrib, R., Yestec, M. P., Gaticac, J.M., Canesib, L., Blascoa, J., (2018) Cytotoxicity of CeO<sub>2</sub> nanoparticles using in vitro assay with *Mytilus galloprovincialis* hemocytes: Relevance of zeta potential, shape and biocorona formation, *Aquatic Toxicology*, 200, 13-20.
- [98] Einstein, M. D. S. D., Madhav, M. R., Suresh, K. R. S., Bhuvaneshwari, M., Swathy, J. S., Amitava, M., Chandrasekaran, N., (2017) Toxicity, uptake, and accumulation of nano and bulk cerium oxide particles in *Artemia salina*, *Environ Sci Pollut Res Int.*, 24(31), 24187-24200.
- [99] Vanessa, K-D., Carole, C-L., Sandrine, P-D., Cécile, S., Carole, B., Bénédicte, S., Catherine, M., Simon, D., Laure, G., (2018) Genotoxicity and physiological effects of CeO<sub>2</sub> NPs on a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*), *Aquatic Toxicology*, 198, 141-148.
- [100] Savić-Zdravković, D., Milošević, D., Uluer, E., Duran, H., Matić, S., Stanić, S., Vidmar, J., Ščančar, J., Dikić, D., Jovanović, B., (2019) A multiparametric approach to cerium oxide nanoparticle toxicity assessment in non-biting midges, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(1), 131-140.
- [101] Milani, Z.M., Charbgo, F., Darroudi, M., (2017) Impact of physicochemical properties of cerium oxide nanoparticles on their toxicity effects, *Ceramics Int.*, 43(17), 14572-14581.
- [102] Wang, Y., Nowack, B., (2018) Dynamic probabilistic material flow analysis of nano-SiO<sub>2</sub>, nano iron oxides, nano-CeO<sub>2</sub>, nano-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and quantum dots in seven European regions, *Environ Pollut.*, 235, 589-601.
- [103] Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., (2013) Global life cycle releases of engineered nanomaterials, *J Nanopart Res.*, 15(6), 1692.

- [104] **Gottschalk, F., Lassen, C., Kjoelholt, J., Christensen, F., Nowack, B.,** (2015) Modeling flows and concentrations of nine engineered nanomaterials in the Danish environment, *Int J Environ Res Public Health.*, 12(5), 5581-5602.
- [105] **Lead, J.R., Batley, G.E., Alvarez, P.J., Croteau, M.N., Handy, R.D., McLaughlin, M.J., Judy, J.D., Schirmer, K.,** (2018) Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects-An updated review, *Environ Toxicol Chem.*, 37(8), 2029-2063.
- [106] **Milošević, D., Simić, V., Stojković, M., Čerba, D., Mančev, D., Petrović, A., Paunović, M.,** (2013) Spatio-temporal pattern of the chironomidae community: toward the use of non-biting midges in bioassessment programs, *Aquat Ecol.*, 47, 37-55.
- [107] **Joshi, M., Bhattacharyya, A., Wazed, A. S.,** (2008) Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles, *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 33(3), 304-317.
- [108] **OECD,** Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment, 2004.
- [109] **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.,** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.
- [110] **Ohkawa, H., Nobuko, O., Kunio, Y.,** (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358.
- [111] **Flohé, L., Ötting, F.,** (1984) Superoxide dismutase assays, *Methods Enzymol.*, 105, 93-104.
- [112] **Bernabò, P., Gaglio, M., Bellamoli, F., Viero, G., Lencioni, V.,** (2017) DNA damage and translational response during detoxification from copper exposure in a wild population of *Chironomus riparius*, *Chemosphere.*, 173, 235-244.
- [113] **Bell, T. A., Lightner, D. V.,** *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*, The World Aquaculture Society, (Sf. 115), USA, (1988).
- [114] **Luna, L. G.,** *Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, McGraw-Hill Book Company, (Sf. 258), USA, (1968).
- [115] **Presnell, J. K., Schreibman, M. P.,** *Humason's Animal Tissue Techniques*. Baltimore, The John Hopkins University Press, (1997).
- [116] **McElwain, A., Bullard, S. A.,** (2014) Histological atlas of freshwater mussels (*Bivalvia, unionidae*): *Villosa nebulose* (ambleminae: lampsilin), *Fusconaria cerina* (ambleminae: pleurobemini) and *Strophitus cannasaugaensis* (unioninae: anodontini), *Malacologia*, 57(1), 99-239.
- [117] **Erel, O.,** (2004) A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation, *Clin Biochem.*, 37(4), 277-285.

- [118] **Bradford, M. M.**, (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- [119] **Okay, O. S., Karacık, B., Güngördü, A., Yılmaz, A., Koyunbaba, N. C., Yakan, S. D., Henkelmann, B., Schramm, K.-W., Ozmen, M.**, (2017) Monitoring of organic pollutants in marine environment by semipermeable membrane devices and mussels: accumulation and biochemical responses, *Environ Sci Pollut Res Int.*, 24(23), 19114-19125.
- [120] **Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillere-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B.**, (1996), Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney Int.*, 49(5), 1304-1313.
- [121] <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/6020b>>, alındığı tarih: 05.06.2021.
- [122] **Lee, S. W., Choi, J.**, (2009) Multi-level ecotoxicity assay on the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera, Chironomidae) exposed to octachlorostyrene, *Environ Toxicol Pharmacol.*, 28(2), 269-274.