

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANOPARTİKÜLLERİN ÇEVREYE OLAN
TOKSİSİTELERİ



Nefise ERDİNÇMER

Ekim, 2015
İZMİR

NANOPARTİKÜLLERİN ÇEVREYE OLAN TOKSİSİTELERİ

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Çevresel Yerbilimleri Anabilim Dalı

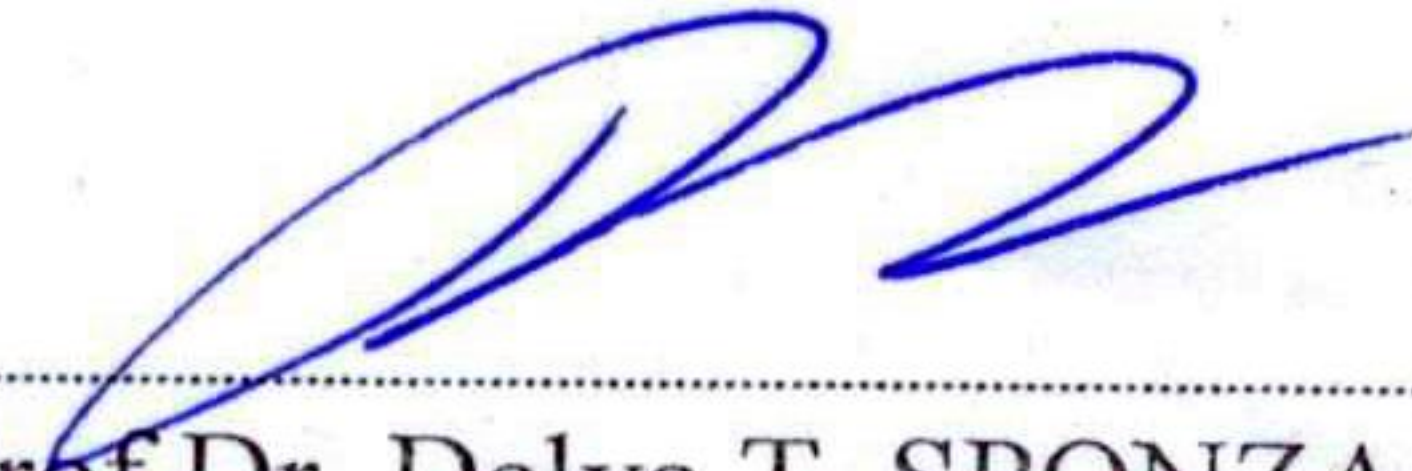
Nefise ERDİNÇMER

Ekim, 2015

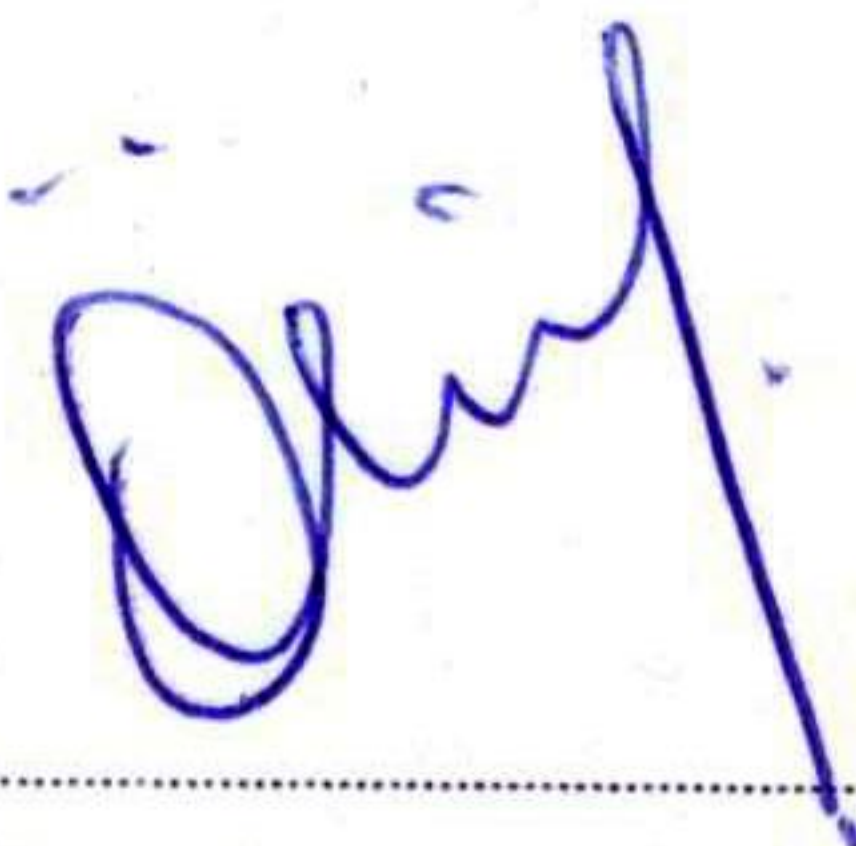
İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

NEFİSE ERDİNÇMER, tarafından PROF.DR. DELYA T. SPONZA yönetiminde hazırlanan “NANOPARTİKÜLLERİN ÇEVREYE OLAN TOKSİSİTELERİ” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof.Dr. Delya T. SPONZA

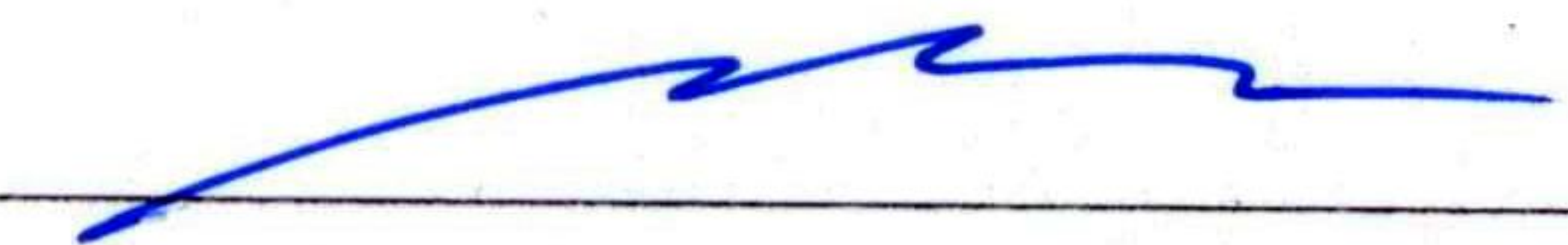
Yönetici


Prof. Dr. A. Aydan Özkütük

Jüri Üyesi


Prof. Dr. Döğen YASAR

Jüri Üyesi


Prof.Dr. Ayşe OKUR

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren danışmanım Prof.Dr. Delia T. SPONZA'ya teşekkür ederim.

KB.FEN 019 no'lu 'Nanopartiküllerin Çevreye Toksisiteleri' konulu projeyi destekleyen D.E.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine ve '2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt içi Yüksek Lisans Programı' ile beni maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İstatistik analizlerinde bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Kağan TELEK'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca her anımda sabırla yanımda olup bana destek olan Aileme, Ekin ERGİN'e, Çağlar ULUSOY'a, Merve BALABAN'a, Pelin ALİCANOĞLU'na ve Cansu DOĞAN'a çok teşekkür ederim.

Nefise ERDİNÇMER

NANOPARTİKÜLLERİN ÇEVREYE OLAN TOKSİSİTELERİ

ÖZ

Boyutları 1 – 100 nm arasında olan nanopartiküller son yıllarda tekstil, kozmetik, ilaç ve endüstriyel atıksuların arıtımı gibi bir çok alanda çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin yaygın bir şekilde kullanılması ve üretimi sonucunda doğada önemli miktarda birikim meydana gelmekte ve ekosistemde toksisitelere neden olmaktadır. Nanopartiküllerin olası toksisitesi hakkında bilgi oldukça kısıtlıdır. Nanopartiküllerin canlılar üzerindeki toksik etkisini araştırmak için çok sık kullanılan nanopartiküllerden nano-çinko oksit, nano-silisyum dioksit, nano-seryum dioksit, nano-alüminyum oksit, nano-hafniyum ve nano-tantalyum oksit olmak üzere altı farklı nanopartikül ile çalışılmıştır. Nanopartiküllerin farklı trofik seviyelerindeki toksik etkisini araştırmak için dokuz farklı akut toksisite testi (bakteri – *Escherichia coli* (gram negatif bakteri) ; bakteri – *Bacillus cereus* (gram pozitif bakteri) ; bakteri – *Vibrio fischeri* (biyoluminesans bakteri) ; metan Archae Bakterisi ; maya – *Candida albicans* ; küf – *Aspergillus niger* ; alg – *Chlorella sp.* ; Crustacea – *Daphnia magna* ; lepistes - *Poecillia reticula*) yapılmıştır. Genel olarak olarak çalışılan nanopartiküller arasında toksisitesi en yüksek nanopartikül nano-çinko oksit ; toksisitesi en az olan nanopartikül nano-hafniyum oksittir. Akut toksisitesi çalışılan organizmalar arasında en hassas canlı alg – *Chlorella sp.* ; en dirençli canlı ise lepistes – *Poecillia reticula*'dır.

Anahtar kelimeler: Nano-çinko oksit, nano-silisyum dioksit, nano-seryum dioksit, nano-alüminyum oksit, nano-hafniyum, nano-tantalyum oksit, akut toksisite, beslenme seviyesi, canlı.

ENVIRONMENTAL TOXICITY OF NANOPARTICULES

ABSTRACT

In recent years, nanoparticles that have size of 1-100 nm is widely used for textile, pharmacy, cosmetic and treatment of industrial wastewater. Producing and using of nanoparticles widely, causes important accumulation in nature and toxicity on ecosystem. Knowledge of potential toxicity of nanoparticles is limited. In this study, six different nanoparticles nano-zinc oxide, nano-silicon dioxide, nano-cerium oxide, nano-aluminum oxide, nano-hafnium oxide, and nano-tantalum oxide which used commonly, were studied to investigate toxic impacts on organisms. We studied nine different acute toxicity test (bacteria – *Escherichia coli* (gram negative bacteria) ; bacteria – *Bacillus cereus* (gram positive bacteria) ; bacteria – *Vibrio fischeri* (bioluminescences bacteria) ; methane Archae Bacteria ; yeast – *Candida albicans* ; mold – *Aspergillus niger* ; algae – *Chlorella sp.* ; Crustacea – *Daphnia magna* ; lepidoptera - *Poecillia reticula*) for the effect of nanoparticles to different trophic levels. In general, the most toxic nanoparticle is nano-zinc oxide and the least toxic nanoparticle is nano-hafnium oxide. Among the used organisms in acute toxicity test; the most sensitive organism is algae- *Chlorella sp* ; the most resistant organism is fish- *Poecillia reticula*.

Keywords: Nano-zinc oxide, nano-silicon dioxide, nano-cerium oxide, nano-aluminum oxide, nano-hafnium oxide, nano-tantalum oxide, acute toxicity, trophic levels, organisms.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZ	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
TABLolar LİSTESİ	xxiii
BÖLÜM BİR – GİRİŞ	1
1.1 Giriş	1
1.2 Çalışmanın Amacı	1
1.3 Çalışmanın Getireceği Yenilikler	2
BÖLÜM İKİ – LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 Nanopartiküllerin Kullanım Alanları	4
2.2 Nanopartiküllerin Toksisitesi	6
2.3 Nanopartiküllerin Toksisite Mekanizmaları.....	10
BÖLÜM ÜÇ – MATERYAL VE METOT	14
3.1 Akut Toksisite Testlerinde Kullanılan Nanopartiküller	14
3.1.1 Nanopartiküllerin Konsantrasyon Aralıklarının Seçimi	14
3.1.2 Nanopartiküllerin Çözeltilerinin Hazırlanması	15
3.2 Akut Toksisite Testlerinde Kullanılan Organizmalar	16
3.2.1 Kullanılan Organizmaların Alındıkları Yerler.....	16
3.2.2 Kullanılan Organizmaların Çoğaltılması.....	16

3.3 Akut Toksisite Testlerinin Yöntemleri.....	18
3.3.1 Bakteri (<i>Escherichia coli</i> ve <i>Bacillus cereus</i>) Akut Toksisite Testi.....	18
3.3.2 Bakteri (<i>Vibrio fischeri</i>) Biyoluminesans Değerine Göre Akut Toksisite Testi	18
3.3.3 Anaerobik Bakteri Kullanılarak Metan Gazı Ölçümlerine Dayalı Toksisite Testi (ATA-Anaerobik Toksisite Testi).....	19
3.3.4 Maya (<i>Candida albicans</i>) ve Küf (<i>Aspergillus niger</i>) Akut Toksisite Testi	20
3.3.5 Alg (<i>Chlorella sp.</i>) Akut Toksisite Testi	21
3.3.6 Su Piresi (<i>Daphnia magna</i>) Akut Toksisite Testi.....	22
3.3.7 Balık (Iepistes – <i>Poecillia reticula</i>) Akut Toksisite Testi	22
3.3.8 Biyoayrışabilirlik Testi	23
3.3.9 Biyoakümülyasyon Testi	24
3.4 İstatistiksel Analizler.....	26
BÖLÜM DÖRT – DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	27
4.1 Nano-CeO ₂ ile Yapılan Akut Toksisite Çalışmaları.....	27
4.1.1 Bakteri (<i>Escherichia coli</i> ve <i>Bacillus cereus</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	27
4.1.2 Bakteri (<i>Vibrio fischeri</i>) Biyoluminesans Değerine Göre Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	34
4.1.3 Anaerobik Bakteri Kullanılarak Metan Gazı Ölçümlerine Dayalı Toksisite Testi (ATA-Anaerobik Toksisite Testi) Sonuçları	37
4.1.4 Maya (<i>Candida albicans</i>) ve Küf (<i>Aspergillus niger</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	39
4.1.5 Alg (<i>Chlorella sp.</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	44
4.1.6 Su Piresi (<i>Daphnia magna</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları	48
4.1.7 Balık (Iepistes – <i>Poecillia reticula</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları	51
4.1.8 Biyoayrışabilirlik Testi Sonuçları.....	53
4.1.9 Biyoakümülyasyon Testi Sonuçları.....	55

4.1.10 Nano-CeO ₂ 'in Farklı Trofik Seviyelerindeki EC ₅₀ Değerlerinin Karşılaştırılması.....	58
4.2 Nano-ZnO ile Yapılan Akut Toksisite Çalışmaları.....	59
4.2.1 Bakteri (<i>Escherichia coli</i> ve <i>Bacillus cereus</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	59
4.2.2 Bakteri (<i>Vibrio fischeri</i>) Biyoluminesans Değerine Göre Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	66
4.2.3 Anaerobik Bakteri Kullanılarak Metan Gazı Ölçümlerine Dayalı Toksisite Testi (ATA-Anaerobik Toksisite Testi) Sonuçları	69
4.2.4 Maya (<i>Candida albicans</i>) ve Küf (<i>Aspergillus niger</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	71
4.2.5 Alg (<i>Chlorella sp.</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	76
4.2.6 Su Piresi (<i>Daphnia magna</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları	79
4.2.7 Balık (Iepistes – <i>Poecillia reticula</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları	82
4.2.8 Biyoayrışabilirlik Testi Sonuçları.....	84
4.2.9 Biyoakümülyasyon Testi Sonuçları.....	86
4.2.10 Nano-ZnO'in Farklı Trofik Seviyelerindeki EC ₅₀ Değerlerinin Karşılaştırılması.....	89
4.3 Nano-Al ₂ O ₃ ile Yapılan Akut Toksisite Çalışmaları.....	90
4.3.1 Bakteri (<i>Escherichia coli</i> ve <i>Bacillus cereus</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	90
4.3.2 Bakteri (<i>Vibrio fischeri</i>) Biyoluminesans Değerine Göre Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	97
4.3.3 Anaerobik Bakteri Kullanılarak Metan Gazı Ölçümlerine Dayalı Toksisite Testi (ATA-Anaerobik Toksisite Testi) Sonuçları	99
4.3.4 Maya (<i>Candida albicans</i>) ve Küf (<i>Aspergillus niger</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	101
4.3.5 Alg (<i>Chlorella sp.</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	106
4.3.6 Su Piresi (<i>Daphnia magna</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları	110
4.3.7 Balık (Iepistes – <i>Poecillia reticula</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları	112
4.3.8 Biyoayrışabilirlik Testi Sonuçları.....	114

4.3.9 Biyoakümülyasyon Testi Sonuçları.....	116
4.3.10 Nano-Al ₂ O ₃ 'in Farklı Trofik Seviyelerindeki EC ₅₀ Değerlerinin Karşılaştıırılması.....	119
4.4 Nano-HfO ₂ ile Yapılan Akut Toksisite alışmaları.....	120
4.3.1 Bakteri (<i>Escherichia coli</i> ve <i>Bacillus cereus</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	120
4.3.2 Bakteri (<i>Vibrio fischeri</i>) Biyoluminesans Değerine Göre Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	126
4.3.3 Anaerobik Bakteri Kullanılarak Metan Gazı Ölçümlerine Dayalı Toksisite Testi (ATA-Anaerobik Toksisite Testi) Sonuçları	128
4.3.4 Maya (<i>Candida albicans</i>) ve Küf (<i>Aspergillus niger</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	130
4.3.5 Alg (<i>Chlorella sp.</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	135
4.3.6 Su Piresi (<i>Daphnia magna</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları	138
4.3.7 Balık (Iepistes – <i>Poecillia reticula</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları	140
4.3.8 Biyoayırışabilirlik Testi Sonuçları.....	142
4.3.9 Biyoakümülyasyon Testi Sonuçları.....	144
4.3.10 Nano-HfO ₂ 'in Farklı Trofik Seviyelerindeki EC ₅₀ Değerlerinin Karşılaştıırılması.....	147
4.5 Nano-Ta ₂ O ₅ ile Yapılan Akut Toksisite alışmaları	148
4.5.1 Bakteri (<i>Escherichia coli</i> ve <i>Bacillus cereus</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	148
4.5.2 Bakteri (<i>Vibrio fischeri</i>) Biyoluminesans Değerine Göre Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	154
4.5.3 Anaerobik Bakteri Kullanılarak Metan Gazı Ölçümlerine Dayalı Toksisite Testi (ATA-Anaerobik Toksisite Testi) Sonuçları	174
4.5.4 Maya (<i>Candida albicans</i>) ve Küf (<i>Aspergillus niger</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	158
4.5.5 Alg (<i>Chlorella sp.</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	163
4.5.6 Su Piresi (<i>Daphnia magna</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları	165
4.5.7 Balık (Iepistes – <i>Poecillia reticula</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları	168

4.5.8 Biyoayrışabilirlik Testi Sonuçları.....	170
4.5.9 Biyoakümülyasyon Testi Sonuçları.....	172
4.5.10 Nano-Ta ₂ O ₅ 'in Farklı Trofik Seviyelerindeki EC ₅₀ Değerlerinin Karşılaştırılması.....	175
4.6 Nano-SiO ₂ ile Yapılan Akut Toksisite Çalışmaları.....	176
4.6.1 Bakteri (<i>Escherichia coli</i> ve <i>Bacillus cereus</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	176
4.6.2 Bakteri (<i>Vibrio fischeri</i>) Biyoluminesans Değerine Göre Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	182
4.6.3 Anaerobik Bakteri Kullanılarak Metan Gazı Ölçümlerine Dayalı Toksisite Testi (ATA-Anaerobik Toksisite Testi) Sonuçları	184
4.6.4 Maya (<i>Candida albicans</i>) ve Küf (<i>Aspergillus niger</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	186
4.6.5 Alg (<i>Chlorella sp.</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları.....	191
4.6.6 Su Piresi (<i>Daphnia magna</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları	194
4.6.7 Balık (Iepistes – <i>Poecillia reticula</i>) Akut Toksisite Testi Sonuçları	196
4.6.8 Biyoayrışabilirlik Testi Sonuçları.....	199
4.6.9 Biyoakümülyasyon Testi Sonuçları.....	200
4.6.10 Nano-SiO ₂ 'in Farklı Trofik Seviyelerindeki EC ₅₀ Değerlerinin Karşılaştırılması.....	204
BÖLÜM BEŞ – SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	205
KAYNAKLAR	207
EKLER.....	219

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 3.1 Microthox cihazı	19
Şekil 3.2 Metan gazı ölçüm düzeneği	20
Şekil 3.3 Alg kültürü	22
Şekil 3.4 Biyoayrışabilirlik testi deney düzeneği.....	23
Şekil 3.5 Potasyum hidrojen ftalat ($C_8H_5KO_4$) kalibrasyon grafiği.....	24
Şekil 3.6 Biyokümülyasyon testi deney düzeneği	25
Şekil 4.1 Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Escherichia coli</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 42,2 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=28,9 mg/l)	28
Şekil 4.2 <i>E.coli</i> 'nin ANOVA testi sonuçları.....	29
Şekil 4.3 Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Bacillus cereus</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 18,5 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=15,1 mg/l)	30
Şekil 4.4 <i>B.cereus</i> 'un ANOVA testi sonuçları.....	31
Şekil 4.5 (a): Artan nano-CeO ₂ dozlarına karşı <i>Escherichia coli</i> bakteri sayılarının değişimi ; (b): Artan nano-CeO ₂ dozlarına karşı <i>Bacillus cereus</i> bakteri sayılarının değişimi.....	32
Şekil 4.6 <i>Escherichia coli</i> ve <i>Bacillus cereus</i> bakterisinin Gram boyama sonucu görüntüleri (A: Kontrol grubundaki <i>E.coli</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; B: nano-CeO ₂ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan <i>E.coli</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; C: Kontrol grubundaki <i>B.cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; D: nano-CeO ₂ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan <i>B.cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu)	33
Şekil 4.7 Nano-CeO ₂ 'in artan konsantrasyonlarına karşı yüzde inhibisyon değerleri (EC ₅₀ Değeri=39,973 mg/l)	35
Şekil 4.8 <i>Vibrio fischeri</i> bakterisinin ANOVA testi sonuçları.....	36

Şekil 4.9 Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 58,5 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 43,2 mg/l).....	38
Şekil 4.10 Anaerobik metan Archae bakterilerinin ANOVA testi sonuçları	38
Şekil 4.11 Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Candida albicans</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₄₀ değeri= 91,4 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=87,6 mg/l)	40
Şekil 4.12 <i>C.albicans</i> ’ın ANOVA testi sonuçları	41
Şekil 4.13 Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Aspergillus niger</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 43,8 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=31,2 mg/l)	42
Şekil 4.14 <i>A.niger</i> ’in ANOVA testi sonuçları	43
Şekil 4.15 (a): Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Candida albicans</i> maya hücrelerinin sayılarının değişimi (b): artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Aspergillus niger</i> küf hücrelerinin sayılarının değişimi	44
Şekil 4.16 Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Chlorella sp</i> ’nin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 12,07 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=8,1 mg/l ; 72 saat sonucu EC ₅₀ değeri=7,35 mg/l). 46	46
Şekil 4.17 <i>Chlorella sp.</i> ’nin ANOVA testi sonuçları	47
Şekil 4.18 Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Daphnia magna</i> ’ların yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 70,9 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=20,8 mg/l).....	49
Şekil 4.19 <i>Daphnia magna</i> ’nın ANOVA testi sonuçları	50
Şekil 4.20 Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı lepistes - <i>Poecilia reticula</i> ’lerin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 505,1 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=334,7 mg/l)	52
Şekil 4.21 Lepistes – <i>Poecilia reticula</i> ’nın ANOVA testi sonuçları..	53
Şekil 4.22 10 ve 100 mg/l nano-CeO ₂ konsantrasyonlarının 28 günlük % biyoayrışabilirlik değerleri	54
Şekil 4.23 Biyoayrışabilirlik testi’nin ANOVA testi sonuçları)	55

Şekil 4.24 (a): 10 mg/l nano-CeO ₂ in günlere göre In(Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri (C _f =2,2 mg/l) (b): 100 mg/l nano-CeO ₂ in günlere göre In(Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri (C _f =4,38 mg/l)	56
Şekil 4.25 Biyoakümülyasyon testi'nin ANOVA testi sonuçları (10 mg/l ve 100 mg/l için)	58
Şekil 4.26 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı <i>Escherichia coli</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 15,6 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 12,9 mg/l)	60
Şekil 4.27 <i>E.coli</i> 'nin ANOVA testi sonuçları	61
Şekil 4.28 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı <i>Bacillus cereus</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 31,8 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 22,8 mg/l)	62
Şekil 4.29 <i>B.cereus</i> 'un ANOVA testi sonuçları	63
Şekil 4.30 (a): Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı <i>Escherichia coli</i> bakteri sayılarının değışimi ; (b): artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı <i>Bacillus cereus</i> bakteri sayılarının değışimi	64
Şekil 4.31 <i>Escherichia coli</i> ve <i>Bacillus cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu görüntüleri (A: Kontrol grubundaki <i>E.coli</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; B: nano-ZnO nanopartikülüne 48 saat maruz kalan <i>E.coli</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; C: Kontrol grubundaki <i>B.cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; D: nano-ZnO nanopartikülüne 48 saat maruz kalan <i>B.cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu)	65
Şekil 4.32 Nano-ZnO'in artan konsantrasyonlarına karşı yüzde inhibisyon değerleri (EC ₅₀ değeri=16,097 mg/l)	67
Şekil 4.33 <i>Vibrio fischeri</i> bakterisinin ANOVA testi sonuçları	68
Şekil 4.34 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₇₀ değeri= 50,01 mg/l; 48 saat sonucu EC ₇₀ değeri= 34,99 mg/l)	70
Şekil 4.35 Anaerobik metan Archae bakterilerinin ANOVA testi sonuçları	70

Şekil 4.36 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı <i>Candida albicans</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 4.0 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 2.9 mg/l)	72
Şekil 4.37 <i>C.albicans</i> ’ın ANOVA testi sonuçları	73
Şekil 4.38 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı <i>Aspergillus niger</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu İnhibisyon Yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 25,9 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 13,9 mg/l)	74
Şekil 4.39 <i>A.niger</i> ’in ANOVA testi sonuçları	75
Şekil 4.40 (a): Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı <i>Candida albicans</i> maya hücrelerinin sayılarının değişimi ; (b): Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı <i>Aspergillus niger</i> küf hücrelerinin sayılarının değişimi	76
Şekil 4.41 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı <i>Chlorella sp</i> ’nin yüzde inhibisyon değerleri(24 saat sonucu EC ₈₀ değeri= 3,03 mg/l; 48 saat sonucu EC ₈₀ değeri=1,6 mg/l ; 72 saat sonucu EC ₈₅ değeri=0,93 mg/l). 78	78
Şekil 4.42 <i>Chlorella sp.</i> ’nin ANOVA testi sonuçları	79
Şekil 4.43 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı <i>Daphnia magna</i> ’ların yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 41,4 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=21,8 mg/l).....	81
Şekil 4.44 <i>Daphnia magna</i> ’nın ANOVA testi sonuçları	81
Şekil 4.45 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı lepestes - <i>Poecillia reticula</i> ’lerin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 352,2 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=324,3 mg/l)	83
Şekil 4.46 Lepistes – <i>Poecillia reticula</i> ’nın ANOVA testi sonuçları	84
Şekil 4.47 10 ve 100 mg/l nano-ZnO konsantrasyonlarının 28 günlük % biyoayrışabilirlik değerleri	85
Şekil 4.48 Biyoayrışabilirlik testi’nin ANOVA testi sonuçları	86
Şekil 4.49 (a): 10 mg/l nano-ZnO in günlere göre İn(Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri (C _f =2,2 mg/l) ; (b): 100 mg/l nano-ZnO in günlere göre İn(Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri (C _f =4,38 mg/l)	87

Şekil 4.50 Biyoakümülyasyon testi'nin ANOVA testi sonuçları (10 mg/l ve 100 mg/l için)	89
Şekil 4.51 Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı <i>Escherichia coli</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 39,9 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 26,9 mg/l)	91
Şekil 4.52 <i>E.coli</i> 'nin ANOVA testi sonuçları.....	92
Şekil 4.53 Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı <i>Bacillus cereus</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 40,9 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 15,22 mg/l)	93
Şekil 4.54 <i>B.cereus</i> 'un ANOVA testi sonuçları.....	94
Şekil 4.55 (a): Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı <i>Escherichia coli</i> bakteri sayılarının değışimi ; (b): artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı <i>Bacillus cereus</i> bakteri sayılarının değışimi	95
Şekil 4.56 <i>Escherichia coli</i> ve <i>Bacillus cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu görüntüleri (A: Kontrol grubundaki <i>E.coli</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; B: nano-Al ₂ O ₃ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan <i>E.coli</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; C: Kontrol grubundaki <i>B.cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; D: nano-Al ₂ O ₃ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan <i>B.cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu).....	96
Şekil 4.57 Nano-Al ₂ O ₃ 'in artan konsantrasyonlarına karşı % inhibisyon değerleri (EC ₅₀ değeri=28,806 mg/l).....	98
Şekil 4.58 <i>Vibrio fischeri</i> bakterisinin ANOVA testi sonuçları.....	99
Şekil 4.59 Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₃₀ değeri= 96,83 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 43,2 mg/l).....	100
Şekil 4.60 Anaerobik metan Archae bakterilerinin ANOVA testi sonuçları.....	101
Şekil 4.61 Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı <i>Candida albicans</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 93,1 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 72,7 mg/l)	103
Şekil 4.62 <i>C.albicans</i> 'ın ANOVA testi sonuçları	103

Şekil 4.63 Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı <i>Aspergillus niger</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 59,2 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 26,9 mg/l)	104
Şekil 4.64 <i>A.niger</i> 'in ANOVA testi sonuçları	105
Şekil 4.65 (a): Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı <i>Candida albicans</i> maya hücrelerinin sayılarının değişimi (b): artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı <i>Aspergillus niger</i> küf hücrelerinin sayılarının değişimi	106
Şekil 4.66 Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı <i>Chlorella sp</i> 'nin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₃₀ değeri= 2,9 mg/l; 48 saat sonucu EC ₄₀ değeri=3,5 mg/l; 72 saat sonucu EC ₅₀ değeri=4,07 mg/l)	108
Şekil 4.67 <i>Chlorella sp.</i> 'nin ANOVA testi sonuçları	109
Şekil 4.68 Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı <i>Daphnia magna</i> 'ların yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 36,13 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=23,37 mg/l).....	111
Şekil 4.69 <i>Daphnia magna</i> 'nın ANOVA testi sonuçları	112
Şekil 4.70 Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı lepestes - <i>Poecillia reticula</i> 'lerin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₂₀ değeri= 849,8 mg/l; 48 saat sonucu EC ₂₀ değeri=771,3 mg/l)	113
Şekil 4.71 Lepistes – <i>Poecillia reticula</i> 'nın ANOVA testi sonuçlar..	114
Şekil 4.72 10 ve 100 mg/l nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarının 28 günlük % biyoayrışabilirlik değerleri	115
Şekil 4.73 Biyoayrışabilirlik testi'nin ANOVA testi sonuçları	116
Şekil 4.74 (a): 10 mg/l nano-Al ₂ O ₃ in günlere göre In(Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri (C _f =2,1 mg/l) ; (b): 100 mg/l nano-Al ₂ O ₃ in günlere göre In(Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri (C _f =3,9 mg/l)	117
Şekil 4.75 Biyoakümülyasyon testi'nin ANOVA testi sonuçları (10 mg/l ve 100 mg/l için)	119

Şekil 4.76 Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Escherichia coli</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 59,4 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=30,9 mg/l)	122
Şekil 4.77 <i>E.coli</i> 'nin ANOVA testi sonuçları.....	122
Şekil 4.78 Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Bacillus cereus</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 29,6 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 16,7 mg/l)	124
Şekil 4.79 <i>B.cereus</i> 'un ANOVA testi sonuçları.....	124
Şekil 4.80 (a): Artan nano-HfO ₂ dozlarına karşı <i>Escherichia coli</i> bakteri sayılarının değişimi ; (b): artan nano-HfO ₂ dozlarına karşı <i>Bacillus cereus</i> bakteri sayılarının değişimi	125
Şekil 4.81 <i>Escherichia coli</i> ve <i>Bacillus cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu görüntüleri (A: Kontrol grubundaki <i>E.coli</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; C: nano-HfO ₂ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan <i>E.coli</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; B: Kontrol grubundaki <i>B.cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; D: nano-HfO ₂ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan <i>B.cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu).....	126
Şekil 4.82 Nano-HfO ₂ 'in artan konsantrasyonlarına karşı % inhibisyon değerleri (EC ₅₀ değeri=46,35 mg/l).....	127
Şekil 4.83 <i>Vibrio fischeri</i> bakterisinin ANOVA testi sonuçları.....	128
Şekil 4.84 Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₃₀ değeri= 34,97 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 13,55 mg/l).....	129
Şekil 4.85 Anaerobik metan Archae bakterilerinin ANOVA testi sonuçları.....	130
Şekil 4.86 Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Candida albicans</i> maya kolonilerinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 41,1 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 19,7 mg/l)	132
Şekil 4.87 <i>C.albicans</i> 'ın ANOVA testi sonuçları	132
Şekil 4.88 Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Aspergillus niger</i> küf kolonilerinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 27,8 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 18,4 mg/l)	134

Şekil 4.89 <i>A.niger</i> 'in ANOVA testi sonuçları	134
Şekil 4.90(a) Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Candida albicans</i> maya hücrelerinin sayılarının değişimi ; (b): Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Aspergillus niger</i> küf hücrelerinin sayılarının değişimi	135
Şekil 4.91 Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Chlorella sp.</i> 'nin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 4,57 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=3,8 mg/l ; 72 saat sonucu EC ₅₀ değeri=2,94 mg/l)	137
Şekil 4.92 <i>Chlorella sp.</i> 'nin ANOVA testi sonuçları	137
Şekil 4.93 Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Daphnia magna</i> 'ların yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 63,49 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=50,18 mg/l).....	139
Şekil 4.94 <i>Daphnia magna</i> 'nın ANOVA testi sonuçları	140
Şekil 4.95 Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı lepistes - <i>Poecillia reticula</i> 'lerin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₂₀ değeri= 849,8 mg/l; 48 saat sonucu EC ₃₀ değeri=790,3 mg/l)	141
Şekil 4.96 Lepistes – <i>Poecillia reticula</i> 'nın ANOVA testi sonuçları	142
Şekil 4.97 10 ve 100 mg/l nano-HfO ₂ konsantrasyonlarının 28 günlük % biyoayrışabilirlik değerleri	143
Şekil 4.98 Biyoayrışabilirlik testi'nin ANOVA testi sonuçları	144
Şekil 4.99 (a): 10 mg/l nano-HfO ₂ in günlere göre In(Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri (C _f =2,5 mg/l) ; (a): 100 mg/l nano-HfO ₂ in günlere göre In(Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri (C _f =4,7 mg/l)	145
Şekil 4.100 Biyoakümülyasyon testi'nin ANOVA testi sonuçları (10 mg/l ve 100 mg/l için)	147
Şekil 4.101 Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı <i>Escherichia coli</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 26,1 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=18,6 mg/l)	149
Şekil 4.102 <i>E.coli</i> 'nin ANOVA testi sonuçları.....	150

Şekil 4.103 Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı <i>Bacillus cereus</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 26,9 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=14,8 mg/l)	151
Şekil 4.104 <i>B.cereus</i> 'un ANOVA testi sonuçları.....	152
Şekil 4.105 (a): Artan nano-Ta ₂ O ₅ dozlarına karşı <i>Escherichia coli</i> bakteri sayılarının değişimi (b): artan nano-Ta ₂ O ₅ dozlarına karşı <i>Bacillus cereus</i> bakteri sayılarının değişimi	152
Şekil 4.106 <i>Escherichia coli</i> ve <i>Bacillus cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu görüntüleri (A: Kontrol grubundaki <i>E.coli</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; B: nano-Ta ₂ O ₅ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan <i>E.coli</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; C: Kontrol grubundaki <i>B.cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; D: nano- Ta ₂ O ₅ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan <i>B.cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu).....	153
Şekil 4.107 nano-Ta ₂ O ₅ 'in artan konsantrasyonlarına karşı % inhibisyon değerleri (EC ₅₀ değeri=31,457 mg/l).....	155
Şekil 4.108 <i>Vibrio fischeri</i> bakterisinin ANOVA testi sonuçları.....	155
Şekil 4.109 Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₆₀ değeri= 29,6 mg/l; 48 saat sonucu EC ₇₀ değeri= 93,1 mg/l).....	157
Şekil 4.110 Anaerobik metan Archae bakterilerinin ANOVA testi sonuçları	157
Şekil 4.111 Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı <i>Candida albicans</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 71,5 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=53,2 mg/l)	159
Şekil 4.112 <i>C.albicans</i> 'ın ANOVA testi sonuçları	160
Şekil 4.113 Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı <i>Aspergillus niger</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 29,3 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=21,5 mg/l)	161
Şekil 4.114 (a): Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı <i>Candida albicans</i> maya hücrelerinin sayılarının değişimi ; (b): artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı <i>Aspergillus niger</i> küf hücrelerinin sayılarının değişimi	162
Şekil 4.115 <i>A.niger</i> 'in ANOVA testi sonuçları	163

Şekil 4.116 Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı <i>Chlorella sp.</i> 'nin yüzde inhibisyon değerleri(24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 3,9 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=3,2 mg/l ; 72 saat sonucu EC ₅₀ değeri=2,4 mg/l).	165
Şekil 4.117 <i>Chlorella sp.</i> 'nin ANOVA testi sonuçları	165
Şekil 4.118 Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı <i>Daphnia magna</i> 'ların yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 29,7 mg/l; 48 saat sonucu EC ₇₀ değeri=36,7 mg/l).....	167
Şekil 4.119 <i>Daphnia magna</i> 'nın ANOVA testi sonuçları	167
Şekil 4.120 Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı <i>Poecillia reticula</i> 'lerin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₃₀ değeri= 790,3 mg/l; 48 saat sonucu EC ₃₀ değeri=505,8 mg/l)	169
Şekil 4.121 <i>Poecillia reticula</i> 'nın ANOVA testi sonuçları	169
Şekil 4.122 10 ve 100 mg/l nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarının 28 günlük % biyoayrışabilirlik değerleri	171
Şekil 4.123 Biyoayrışabilirlik testi'nin ANOVA testi sonuçları	171
Şekil 4.124 (a): 10 mg/l nano-Ta ₂ O ₅ in günlere göre In(Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri (C _f =1,5 mg/l) ; (b): 100 mg/l nano-Ta ₂ O ₅ in günlere göre In(Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri (C _f =4,02 mg/l)	173
Şekil 4.125 Biyoakümüülasyon testi'nin ANOVA testi sonuçları (10 mg/l ve 100 mg/l için)	175
Şekil 4.126 Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Escherichia coli</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 27,2 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 16,7 mg/l)	177
Şekil 4.127 <i>E.coli</i> 'nin ANOVA testi sonuçları.....	178
Şekil 4.128 Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Bacillus cereus</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 39,9 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 20,9 mg/l)	179
Şekil 4.129 <i>B.cereus</i> 'un ANOVA testi sonuçları.....	180
Şekil 4.130 (a): Artan nano-SiO ₂ dozlarına karşı <i>Escherichia coli</i> bakteri sayılarının değişimi ; (b): artan nano-SiO ₂ dozlarına karşı <i>Bacillus cereus</i> bakteri sayılarının değişimi	180

Şekil 4.131 <i>Escherichia coli</i> ve <i>Bacillus cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu görüntüleri (A: Kontrol grubundaki <i>E.coli</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; B: nano-SiO ₂ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan <i>E.coli</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; C: Kontrol grubundaki <i>B.cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu ; D: nano-SiO ₂ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan <i>B.cereus</i> bakterisinin gram boyama sonucu).....	181
Şekil 4.132 nano-SiO ₂ 'in artan konsantrasyonlarına karşı % inhibisyon değerleri (EC ₅₀ değeri=60,4 mg/l).....	183
Şekil 4.133 <i>Vibrio fischeri</i> bakterisinin ANOVA testi sonuçları.....	184
Şekil 4.134 Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₈₀ değeri= 84,6 mg/l; 48 saat sonucu EC ₈₀ değeri= 48,1 mg/l).....	185
Şekil 4.135 Anaerobik metan Archae bakterilerinin ANOVA testi sonuçları.....	186
Şekil 4.136 Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Candida albicans</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 92,7 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 67,2 mg/l).....	188
Şekil 4.137 <i>C.albicans</i> 'in ANOVA testi sonuçları.....	188
Şekil 4.138 Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Aspergillus niger</i> bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 18,03 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 14,6 mg/l).....	190
Şekil 4.139 (a): Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Candida albicans</i> maya hücrelerinin sayılarının değişimi ; (b): artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Aspergillus niger</i> küf hücrelerinin sayılarının değişimi.....	190
Şekil 4.140 <i>A.niger</i> 'in ANOVA testi sonuçları.....	191
Şekil 4.141 Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Chlorella sp</i> 'nin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₆₀ değeri= 2,5 mg/l; 48 saat sonucu EC ₆₀ değeri=1,9 mg/l ; 72 saat sonucu EC ₆₀ değeri=1,04 mg/l).....	193
Şekil 4.142 <i>Chlorella sp.</i> 'nin ANOVA testi sonuçları.....	193
Şekil 4.143 Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı <i>Daphnia magna</i> 'ların yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri= 36,7 mg/l; 48 saat sonucu EC ₈₀ değeri=40,76 mg/l).....	195

Şekil 4.144 <i>Daphnia magna</i> 'nın ANOVA testi sonuçları	196
Şekil 4.145 Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı lepistes - <i>Poecillia reticula</i> 'lerin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC ₅₀ değeri=716,4 mg/l; 48 saat sonucu EC ₅₀ değeri=433,1 mg/l)	198
Şekil 4.146 Lepistes – <i>Poecillia reticula</i> 'nın ANOVA testi sonuçları	198
Şekil 4.147 10 ve 100 mg/l nano-SiO ₂ konsantrasyonlarının 28 günlük % biyoayrışabilirlik değerleri	200
Şekil 4.148 Biyoayrışabilirlik testi'nin ANOVA testi sonuçları	200
Şekil 4.149 (a): 10 mg/l nano-SiO ₂ in günlere göre In(Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri (C _f =2,1 mg/l) ; (b): 100 mg/l nano-SiO ₂ in günlere göre In(Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri (C _f =4,4 mg/l)	201
Şekil 4.150 Biyoakümülyasyon testi'nin ANOVA testi sonuçları (10 mg/l ve 100 mg/l için)	203

TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1 Kullanılan nanopartiküllerin boyutları.....	14
Tablo 3.2 Kullanılan nanopartikül konsantrasyonları.....	15
Tablo 3.3 Makronutrient ve mikronutrient Çözeltisi..	21
Tablo 3.4 <i>Daphnia magna</i> için besi ortamı (Sentetik seyreltme suyu).....	22
Tablo 3.5 Biyoakümülyasyon faktörünün hesaplanması..	26
Tablo 4.1 Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu canlı <i>Escherichia coli</i> bakterilerinin sayıları..	27
Tablo 4.2 Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Bacillus cereus</i> bakterilerinin sayıları..	29
Tablo 4.3 30 dakika sonucu nano-CeO ₂ nanopartikülünün artan konsantrasyonlarına karşı <i>Vibrio fischeri</i> – biyoluminesans bakterisinin yüzde inhibisyon değerleri.....	35
Tablo 4.4 Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu metan gazı miktarı ve inhibisyon yüzdesi.....	37
Tablo 4.5 Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Candida albicans</i> - maya kolonilerinin sayıları.....	40
Tablo 4.6 Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Aspergillus niger</i> - küf kolonilerinin sayıları..	42
Tablo 4.7 Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Chlorella sp</i> - alg hücresi sayıları.....	45
Tablo 4.8 Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Daphnia magna</i> - su piresi sayıları..	48
Tablo 4.9 Artan nano-CeO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu lepistes - <i>Poecillia reticula</i> sayıları..	52
Tablo 4.10 28 gün boyunca nano-CeO ₂ 'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonları için % biyoayrışabilirlik değerleri.....	54
Tablo 4.11 28 gün boyunca nano-CeO ₂ 'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları.....	57
Tablo 4.12 Nano-CeO ₂ 'in farklı trofik seviyelerindeki EC ₅₀ değerleri..	59

Tablo 4.13 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu canlı <i>Escherichia coli</i> bakterilerinin sayıları..	60
Tablo 4.14 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Bacillus cereus</i> bakterilerinin sayıları..	62
Tablo 4.15 30 dakika sonucu Nano-ZnO nanopartikülünün artan konsantrasyonlarına karşı <i>Vibrio fischeri</i> – biyoluminesans bakterisinin yüzde inhibisyon değerleri.....	67
Tablo 4.16 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu metan gazı miktarı ve inhibisyon yüzdesi.....	69
Tablo 4.17 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Candida albicans</i> maya kolonilerinin sayıları..	72
Tablo 4.18 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Aspergillus niger</i> - küf kolonilerinin sayıları..	74
Tablo 4.19 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Chlorella sp.</i> - alg hücresi sayıları..	77
Tablo 4.20 Artan nano-ZnO Konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Daphnia magna</i> - su piresi sayıları..	80
Tablo 4.21 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu lepestes - <i>Poecillia reticula</i> sayıları..	83
Tablo 4.22 28 gün boyunca nano-ZnO'nin 10 ve 100 mg/l konsantrasyonları için yüzde biyoayrışabilirlik değerleri ..	85
Tablo 4.23 28 gün boyunca nano-ZnO'nin 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları.....	88
Tablo 4.24 Nano-ZnO'nin farklı trofik seviyelerindeki EC ₅₀ değerleri.....	90
Tablo 4.25 Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Escherichia coli</i> bakterilerinin sayıları..	91
Tablo 4.26 Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Bacillus cereus</i> bakterilerinin sayıları.....	93
Tablo 4.27 30 dakika sonucu nano-Al ₂ O ₃ nanopartikülünün artan konsantrasyonlarına karşı <i>Vibrio fischeri</i> – biyoluminesans bakterisinin % inhibisyon değerleri.....	98

Tablo 4.28 Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu metan gazı miktarı ve inhibisyon yüzdesi.....	100
Tablo 4.29 Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Candida albicans</i> maya kolonilerinin sayıları..	102
Tablo 4.30 Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Aspergillus niger</i> - küf kolonilerinin sayıları..	104
Tablo 4.31 Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Chlorella sp</i> - alg hücresi sayıları..	107
Tablo 4.32 Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Daphnia magna</i> - su piresi sayıları..	110
Tablo 4.33 Artan nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu lepestes - <i>Poecillia reticula</i> sayıları.....	113
Tablo 4.34 28 gün boyunca nano-Al ₂ O ₃ 'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonları için % biyoayrışabilirlik değerleri.....	115
Tablo 4.35 28 gün boyunca nano-Al ₂ O ₃ 'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları.....	118
Tablo 4.36 Nano-Al ₂ O ₃ 'in farklı trofik seviyelerindeki EC ₅₀ değerleri..	120
Tablo 4.37 Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Escherichia coli</i> bakterilerinin sayıları..	121
Tablo 4.38 Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Bacillus cereus</i> bakterilerinin sayıları..	123
Tablo 4.39 30 dakika sonucu Nano-HfO ₂ nanopartikülünün artan konsantrasyonlarına karşı <i>Vibrio fischeri</i> – biyoluminesans bakterisinin % inhibisyon değerleri.....	127
Tablo 4.40 Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu metan gazı miktarı ve inhibisyon yüzdesi.....	129
Tablo 4.41 Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Candida albicans</i> maya kolonilerinin sayıları..	131
Tablo 4.42 Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Aspergillus niger</i> - küf kolonilerinin sayıları..	133

Tablo 4.43 Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Chlorella sp.</i> - alg hücresi sayıları..	136
Tablo 4.44 Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Daphnia manga</i> - su piresi sayıları..	138
Tablo 4.45 Artan nano-HfO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu lepestes - <i>Poecillia reticula</i> sayıları.....	141
Tablo 4.46 28 gün boyunca nano-HfO ₂ 'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonları için % biyoayrışabilirlik değerleri.....	143
Tablo 4.47 28 gün boyunca nano-HfO ₂ 'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları.....	146
Tablo 4.48 Nano-HfO ₂ 'in farklı trofik seviyelerindeki EC ₅₀ değerleri.....	148
Tablo 4.49 Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Escherichia coli</i> bakterilerinin sayıları ..	149
Tablo 4.50 Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Bacillus cereus</i> bakterilerinin sayıları.....	151
Tablo 4.51 30 dakika sonucu nano-Ta ₂ O ₅ nanopartikülünün artan konsantrasyonlarına karşı <i>Vibrio fischeri</i> – biyoluminesans bakterisinin % inhibisyon değerleri.....	154
Tablo 4.52 Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu metan gazı miktarı ve inhibisyon yüzdesi.....	156
Tablo 4.53 Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Candida albicans</i> maya kolonilerinin sayıları..	158
Tablo 4.54 Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Aspergillus niger</i> küf kolonilerinin sayıları..	161
Tablo 4.55 Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Chlorella sp</i> - alg Hücresi sayıları.....	164
Tablo 4.56 Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Daphnia manga</i> - su piresi sayıları..	166
Tablo 4.57 Artan nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu lepestes – <i>Poecillia reticula</i> sayıları..	168

Tablo 4.58 28 gün boyunca nano-Ta ₂ O ₅ 'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonları için % biyoayrışabilirlik değerleri..	170
Tablo 4.59 28 gün boyunca nano-Ta ₂ O ₅ 'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları..	174
Tablo 4.60 Nano-Ta ₂ O ₅ 'in farklı trofik seviyelerindeki EC ₅₀ değerleri.	176
Tablo 4.61 Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Escherichia coli</i> bakterilerinin sayıları..	177
Tablo 4.62 Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Bacillus cereus</i> bakterilerinin sayıları..	179
Tablo 4.63 30 dakika sonucu nano-SiO ₂ nanopartikülünün artan konsantrasyonlarına karşı <i>Vibrio fischeri</i> – biyoluminesans bakterisinin % inhibisyon değerleri	183
Tablo 4.64 Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu metan gazı miktarı ve inhibisyon yüzdesi.....	185
Tablo 4.65 Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Candida albicans</i> maya kolonilerinin sayılar..	187
Tablo 4.66 Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Aspergillus niger</i> küf kolonilerinin sayıları.	189
Tablo 4.67 Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Chlorella sp</i> - alg hücresi sayıları..	192
Tablo 4.68 Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu <i>Daphnia magna</i> - su piresi sayıları..	195
Tablo 4.69 Artan nano-SiO ₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu lepidistes - <i>Poecillia reticula</i> sayıları.	197
Tablo 4.70 28 gün boyunca nano-SiO ₂ 'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonları için % biyoayrışabilirlik değerleri..	199
Tablo 4.71 28 gün boyunca nano-SiO ₂ 'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları..	202
Tablo 4.72 Nano-SiO ₂ 'in farklı trofik seviyelerindeki EC ₅₀ değerleri..	204

BÖLÜM BİR

GİRİŞ

1.1 Giriş

Nanopartiküller (NP) genel olarak 1-100 nm arasında boyuta sahip yapılardır. Doğada yaygın halde bulunmaktadır. Farklı büyüklüklerde, farklı yapılarda, tek elementli ya da çok elementli yapıda, farklı şekil ve biçimlerde veya istenilen şekillerde oluşturulabilirler. Nanopartiküller son derece kullanışlı olmalarından dolayı yoğun olarak üretilmektedirler. Özel olarak üretilen nano-metal oksitlere (NMO) örnek olarak titanyum dioksit (TiO_2) ve çinko oksiti (ZnO) gösterebiliriz. Bunlar nano boyutlarda saydamdırlar, güneşin ultraviyole ışınlarını çekip geri yansıtma özelliklerinden dolayı güneş kremlerinde kullanılmaktadırlar. NP'ler geniş kullanım potansiyeline sahiptir: kısa dönemde kozmetiklerde, tekstilde ve boyalarda, uzun dönemde ise ilaçları vücudun istenen yerine göndermek için ilaç sevk sistemlerinde kullanılmaktadır (Kahru ve ark., 2010). Ayrıca endüstriyel atıksuların arıtımında NMO'ler oldukça yaygın kullanılmaktadır (Chen ve ark., 2012 ; Zhou ve ark., 2012). Bu yaygın olarak üretim ve kullanım doğada nanopartiküllerin yoğun olarak birikimi anlamına gelmektedir. Bu birikiminin çevreye olan toksisitesi hakkında bilgi oldukça kısıtlıdır.

1.2 Çalışmanın Amaç ve Kapsamı

Endüstriyel atıksu arıtımında yaygın bir şekilde kullanılan NMO'lerin akut toksisitelerini saptamak için yapılan çalışmalarda sadece bir iki canlı türünün kullanıldığı, kapsamlı bir şekilde aynı anda farklı trofik seviyelere olan etkilerinin incelenmediği, tüm biyoassaylerde kullanılan çoklu toksisite testlerin kullanılmadığı, toplu istatistiksel analizlerin yapılmadığı, NMO'lerin hassas ve dirençli oldukları türlere olan toksisitelerinde istatistiksel olarak belirtilen hassasiyet ve mukavemetin anlamlı olup olmadığının araştırılmadığı görülmektedir.

Bu çalışmanın amacı, literatürde akut toksisiteleri çok fazla çalışılmayan NMO'lerin artan konsantrasyonlarda (0,01 mg/l – 1000 mg/l) 9 farklı beslenme seviyesine sahip canlılarda, beslenme seviyesinin en altındaki canlılardan başlayarak (bakteri – *Escherichia coli* (gram negatif bakteri) ; bakteri – *Bacillus cereus* (gram pozitif bakteri) ; bakteri – *Vibrio fischeri* (biyoluminesans bakteri) ; metan Archae Bakterisi ; maya – *Candida albicans* ; küf – *Aspergillus niger* ; alg – *Chlorella sp.* ; Crustacea – *Daphnia magna* ; lepidoptera - *Poecillia reticula*) akut toksisitelerinin; inhibisyonları, ölümleri, biyoayrışabilirlikleri ve biyoakümülyasyonlarının baz alınarak aynı anda hesaplanmasıdır. Bazı canlılarda akut toksisiteleri EC₅₀ değeri canlıların % 50'sini etkileyen ; öldüren ; inhibe eden nanopartikül konsantrasyonları cinsinden hesaplanmıştır.

1.3 Çalışmanın Getireceği Yenilikler

Endüstriyel atıksu arıtımında yaygın bir şekilde kullanılan NMO'lerin akut toksisitelerini saptamak için yapılan çalışmalarda sadece bir iki canlı türünün kullanıldığı, kapsamlı bir şekilde aynı anda farklı trofik seviyelere olan etkisinin incelenmediği tespit edilmiştir. Tüm biyoassaylerde kullanılan çoklu toksisite testlerin kullanılmadığı, toplu istatistiksel analizlerin yapılmadığı, NMO'lerin (nano-Ta₂O₅, nano-HfO₂, nano-CeO₂, nano-ZnO, nano-SiO₂, nano-Al₂O₃) hassas ve dirençli oldukları türlere olan toksisitelerinde istatistiksel olarak belirtilen hassasiyet ve mukavemetin anlamlı olup olmadığının araştırılmadığı görülmektedir.

6 ayrı farklı NMO (nano- Ta₂O₅, nano-HfO₂, nano-CeO₂, nano-ZnO, nano-SiO₂, nano-Al₂O₃) kullanılarak 6 farklı beslenme (trofik) seviyesine olan etkileri şimdiye kadar olan çalışmalarda rastlanmamıştır. Yukarıda ifade edilen NMO'lerden özellikle nano-HfO₂ ve nano-Ta₂O₅'in bakteri – *Escherichia coli* (gram negatif bakteri) ; bakteri – *Bacillus cereus* (gram pozitif bakteri) ; bakteri – *Vibrio fischeri* (biyoluminesans bakterisi) ; metan Archae Bakterisi ; maya – *Candida albicans* ; küf – *Aspergillus niger* ; alg – *Chlorella sp.* ; Crustacea – *Daphnia magna* ; balık – lepidoptera - *Poecillia reticula*'ya olan akut toksisiteleri ile ilgili çalışmalar oldukça kısıtlıdır.

Bu çalışmada, nanopartiküllerin akut toksisite dozlari saptandıktan sonra evre mühendisliğinde yaygın bir kullanım alanı bulan NP'lerin alıcı ortama verildiğinde inhibisyon veya toksisite oluşturmadan kullanılabilmeleri için limit dozları saptanmıştır. Tüm kullanılan NMO'ler (nano- Ta₂O₅, nano-HfO₂, nano-CeO₂, nano-ZnO, nano-SiO₂, nano-Al₂O₃) için en hassas ve en dirençli türler tespit edilmiştir. NP'lerin ayrıca biyoak m lasyonları, biyoayrışabilirlikleri incelenmiş, toksisite sonuçları her bir NMO için istatiks l olarak değerlendirilmiştir. Mikroorganizmalar arasındaki ilişkiler ile hassasiyet ve direncin anlamlı olup olmadığı araştırılmıştır.



BÖLÜM İKİ

LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

NMO'ler kolaylıkla sentezlenebilmeleri ve kimyasal açıdan kolaylıkla modifiye edilebilmeleri nedeniyle tüketim ürünlerinde, endüstriyel ürünlerde, makine sanayinde, askeri uygulamalarda, tıpta ve atıksu arıtımında geniş ölçüde kullanılmaktadır (Atlı-Şekeroğlu, 2013). Özellikle NP'lerin kullanıldığı atıksu arıtma teknolojilerinin gelişmesi dünya çapında gittikçe artan su kirliliği problemine alternatif bir çözüm olarak görülmektedir. Bir dizi arıtma teknolojileri arasında nanosorbent ve fotokatalist olarak metal-oksit nanomateryali kullanma uygulamaları atıksu arıtmasında önerilmektedir (Xu ve ark., 2012). Atıksu arıtımında bol miktarda kullanılan NMO'lerden en çok çalışılanları TiO_2 , ZnO , CuO , SiO_2 , Fe_3O_4 , Al_2O_3 'dır. Bu çalışmalara örnek olarak ağır metallerin arıtımında Liang ve ark., (2004) 2 mg/l nano- TiO_2 kullanarak anerobik koşullarda 15,3 mg/g Zn ve 7,9 mg/g Cd arıtımını sağlamışlardır ancak bu TiO_2 dozunun bir sonraki anreobik kademedede aktif çamur mikrorganizmaları üzerine inhibisyon yaptığını saptamışlardır. Hua ve ark., (2012) yaptıkları çalışmada 3 mg/l nano- ZnO kullanarak 6.7 mg/g Pb^{2+} 'nın adsorpsiyon ile giderildiğini ancak bir sonraki biyolojik kademedede kullanılan nano- ZnO dozunun denitrifikasyon bakterilerine toksik etki yaptığını saptanmıştır. Zelmanov ve Semiat (2008) yaptıkları çalışmada 80,100, 110, 120 ve 200 mg/l nano- Fe_3O_2 kullanarak bir endüstri atıksuyunda fenol giderimini araştırmışlardır. 200 mg/l nano- Fe_3O_2 ile 20 dakika sonunda %95 fenol verimi elde etmişlerdir. Ancak kullanılan bu nano- Fe_3O_2 'in dozunun biyolojik sistemlerdeki mikrorganizmalarının %90'nını öldürdüklerini saptanmıştır. Zhou ve ark., (2012) tarafından yapılan çalışmada ACF-NanoHFO (Aktifleştirilmiş karbon fiber- nano hidrate ferrik oksit)'ın oda koşullarında maksimum fosfor adsorbsiyon kapasitesi 18,86 mg P/g olarak bulunmuştur. Kumar ve ark., (2013) tarafından yapılan çalışmada sulu çözeltideki hekzavalan krom ve malaşit yeşili oksalatını gidermek için NMO'lerden ZnO ve SnO_2 adsorbent olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmaların sonunda sulu çözeltilerden ağır metal ve boya gideriminde NMO'lerden ZnO ve SnO_2 düşük maliyetli adsorbent olarak kullanılması bir alternatif olabilir.

NP'lerin boyutları azaldıkça, yüzeylerinin hacimlerine olan oranı da artar. Özgül yüzey alanı, yüzey alanın stabilizasyonu, NP'lerin topolojisi (pürüzsüzlük) ve destek malzemeye ara yüzey gibi özelliklerle ilgili olduğu gibi, asıl olarak katalitik reaktivite ve diğer benzer özelliklerle (örn. sensörler) de ilgilidir. Buna verilebilecek iyi örnekler, özellikle son teknoloji katalizörlerin aktivitesiyle karşılaştırma yapıldığında, büyük yüzey alanı ve büyük destek porozitenin, üstün katalitik aktiviteye neden olduğu soy metallerle dayalı katalizörlerdir. Bu özellikten ayrıca NMO katalizörlerde de yararlanılmaktadır (Örneğin otomotiv sektörü için seryum oksit katalizörleri). Nano-CeO₂ parçacıkları dizel eksozunu temizlemek ve yakıt etkinliğini artırmak amacıyla yakıt katılmaktadır. Eksozdan havaya kaçan nano-CeO₂ parçacıkları ciğer hücrelerine zarar vermektedir (Türk Sanayicileri ve İş Adamları Derneği [TÜSİAD], 2008). Ayrıca nano-CeO₂ gibi bazı yarı iletken NMO'ler endüstriyel atıksulardaki bazı kirleticileri arıtmak için son yıllarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Sulu çözeltideki asetilsalisik asit (ASA) 'nın degradasyonu için katalitik ozonizasyonda Fe₃O₄@SiO₂@CeO₂@ katalisti (Fe₃O₄ manyetik çekirdek etrafında silika orta tabaka ve CeO₂ ise dış tabakadadır.) kullanılmıştır ve 60 dakikada % 81 giderim verimi ile ASA arıtılmıştır (Dai ve ark., 2014).

Nano-Tantalyum oksit (nano-Ta₂O₅)'in endüstride kullanım alanlarına baktığımızda ; Sunessh ve ark., (2013) 'nin kandaki serumda glukoz seviyesini ölçmek için THNS (Ta₂O₅ Honeycomb Nanostructure) sensör olarak kullanılmıştır. Lin ve ark., (2013)'nin yaptıkları çalışmada ise metanolün sulu çözeltisinden hidrojen üretimi için fotokatalitik testler uygulanmıştır ve HSTaO (Hollow spherical Tantalum Oxide)'nin kütle halinde(bulk) Ta₂O₅'den daha yüksek fotokatalitik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Cong ve ark., (2012) kirlenmiş sudan görünür ışıktaki enerji elde etmek için kobalt nitrat içine dope edilmiş nano-Ta₂O₅ kullanılmışlardır. Enerji sektöründe nano-Ta₂O₅ içeren çok sayıda fotokatalist günümüzde kullanılmaktadır.

Nano-tantalyum oksit (Ta_2O_5), ve nano-hafnium oksit (HfO_2) son yıllarda nano- SiO_2 yerine yüksek potasyum kaynaklı hammadde kaynakları olarak elektrik üretiminde ve onu depolamada, ayrıca da biosensör yapımında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Lee ve ark., 2012). Nano- HfO_2 dielektrik bariyerlerinde kullanılmakta olup immersiyeon yağı üretiminde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Field ve ark., 2011). Bu tür endüstrilerin atıksuları ile nano- HfO_2 'in alıcı sucul ekosistemlerde süspanse halde bulundukları belirtilmiştir (Baek ve ark., 2011). Bu nanopartikülü içeren atıksuların ekosistemi olumsuz şekilde etkileceği aşıkardır.

2.2 Nanopartiküllerin Toksisitesi

NMO'ler kullanılarak endüstriyel atıksuların arıtımı oldukça yaygındır. Ancak bu nanoteknolojilerin insan sağlığına ve çevreye etkileri son yıllarda çok tartışılan bir konudur. ABD'de Ulusal Nanoteknoloji Adımı önerisiyle 11 Şubat 2009 tarihinde kabul edilen (H.R. 554) yasayla nanoteknolojilerin tehlikelerinin saptanması ve düzenlenmesi için çalışmalar başlatıldı. NP gümüş ve iyonları, çamaşır makineleri, terletmeyen kumaşlar, gıda depolanması gibi antimikrobiyal, antibakteriyel olarak birçok üründe kullanılıyor. Gümüşün yıkama suyuna karışması söz konusudur. Yararlı mikroorganizmaları, mantarları ve bakterileri yok ederek ekosistemi bozabilir. Kasım 2006'da, Amerikan Çevre koruma Ajansı (EPA) NP gümüşün böcek öldürücü olarak kullanılmasını kontrol altına aldı. Çalışmalarda karbon nanotüplerin geri dönülmez akciğer hasarı yarattığı saptandı. Nano- CeO_2 parçacıkları dizel eksozunu temizlemek ve yakıt etkinliğini artırmak amacıyla yakıt katılmaktadır. Eksoztan havaya kaçan nano- CeO_2 parçacıkları ciğer hücrelerine zarar veriyor. Güvenilir nanoteknolojiler ve nanoteknolojilerin güvenilirliği arttırmak için kullanımı önümüzdeki yılların en önemli arge ve inovasyon konuları olmaya adaydır (TÜSİAD, 2008). Dünya genelinde nanotoksikoloji alanında yeterince uzman bulunmamakta ve bilgi eksikliği nedeniyle bu konuda büyük belirsizlikler bulunmaktadır. Bazı otoriteler tarafından sunulan raporlarda bu boşluğa dikkat çekilmiş ve nanomalzemelerin insan sağlığı ve çevre için risklerinin belirlenerek kontrollü olarak kullanılmasına yönelik araştırmaların gerekliliği vurgulanmıştır. Bu gereklilikten dolayı da çevresel toksikoloji alanına gelecekte daha fazla yatırım yapılacağı ileri sürülmektedir (Atlı-Şekeroğlu, 2013).

Atıksu arıtma tesislerinde yaygın bir şekilde kullanıma sahip NMO'lerin çevreye olan toksisiteleri hakkında yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. NMO'lerden nano-TiO₂ ekotoksitesitesi en çok çalışılan NP'dür (Cattaneo ve ark., 2009; Kahru ve Dubourguier, 2010). TiO₂'in tatlı su omurgasızlarından *Daphnia magna* 'ya olan toksisitesi araştırıldığında 48 sonunda EC₅₀ değerinin 5,5 mg/l ile 20000 mg/l arasında değiştiği görülmektedir (Lovern ve Klaper, 2006; Heinlaan ve ark., 2008). Sadiq ve ark., (2011) tarafından yapılan çalışmada tatlı su ekosisteminden izole edilen iki farklı mikroalgin (*Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.*) üzerine etkisi incelenmiştir. 72 saat sonra EC₅₀ değerinin *Chlorella sp.* için 16,12 mg/l ; *Scenedesmus sp.* için ise 21,2 mg/l olarak bulunmuştur. Heinlaan ve ark. (2008) nano-ZnO, nano- TiO₂ ve nano-CuO ile yaptıkları akut toksisite çalışmalarında 20 g/l gibi yüksek TiO₂ konsantrasyonlarının *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* ve *Daphnia magna*'ya toksik olmadıklarını saptamışlardır. 0,5-1,5 mg/l nano-ZnO'nin *V. fishceri* , *D. magna* ve *T. platyurus*' a olan akut toksisitelerinde EC₅₀ değerinin sırasıyla 1,9; 3,2; ve 0,18 mg/l oldukları saptanmıştır. 0,5-1,5 mg/l nano-CuO'nin *V. fishceri* , *D. magna* ve *T. platyurus*' a olan akut toksisitelerinde EC₅₀ değerinin sırasıyla 79, 2,2, ve 2,1 mg/l oldukları saptanmıştır. Baek ve An (2011) tarafından yapılan araştırmada nano- ZnO 'in gram(+) bakteri olan *Bacillus subtilis* ve gram(-) bakteri olan *Escherichia coli* 'ye olan toksisiteleri incelenmiştir. Nano- ZnO 'in *E. coli* 'deki EC₅₀ değeri 115,7 mg/l , *B. subtilis*' deki EC₅₀ değeri ise 85,8 mg/l olarak belirlenmiştir. Jiang ve ark., (2009) nano-SiO₂'in *E. coli* ve *Bacillus subtilis* üzerine toksik etkisini araştırmışlar. 2 saat boyunca nano-SiO₂'e maruz kalan bakteri kültürlerinde ; *B.subtilis* için % 40 ; *E.coli* için % 58 oranında ölüm oranı gözlenmiştir. Chang ve ark., (2014)'nın tantalyum oksitin antibakteriyel özelliklerini *Staphylococcus aureus* ve *Actinobacillus actinomycetemcomitans* olmak üzere gram pozitif ve gram negatif iki farklı bakteri ile çalışmışlar. Amorf tantalyum oksit nanopartikülün *S.aureus* ve *A.actinomycetemcomitans* bakterilerine karşı iyi bir antimikrobiyal performans gösterdiğini rapor etmişler. Fajardo ve ark., (2014) nano-Al₂O₃'ün toprak organizmalarından *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas stutzeri* üzerine etkisini araştırmışlar. 5 mg/l konsantrasyonuna kadar nano-Al₂O₃'in toksik etki göstermediğini fakat yapılan moleküler testlerinde oksidatif stres savunma sisteminin göstergesi olan katB gen ekspresyonunun arttığını rapor etmişler. Pasquet ve ark.,

(2014) nano-ZnO'nin 5 mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlar ve 24 saat sonucunda *E. coli* için minimum bakteriyosidal konsantrasyonunu (MBC) 1,44 mg/l olarak bulmuşlardır. Gram pozitif bakteri olarak *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* çalışılmış, *S.aureus* için 24 saat sonunda MBC değeri 1,72 mg/l *P.aeruginosa* için 1,81 mg/l olarak saptanmıştır. Dasari ve ark., (2013) nano-ZnO'nin *E.coli*'ye olan toksisitesi çalışmışlar ve 30 dakika boyunca 0,01 ; 0,25 ; 0,5 ; 2,5 ; 5; 7,5 mg/l nano-ZnO'e maruz bırakılan *E.coli*'nin LC₅₀ değerini (Lethal Concentration/Öldürücü Doz) 0,048 mg/l olarak saptamışlardır. Krishnamoorthy ve ark., (2014) *E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* ve *Bacillus subtilis* gibi patojen bakterilerin nano-CeO₂'e karşı minimum inhibisyon konsantrasyonunu (MIC) araştırmışlardır. *E.coli* için MIC değeri 16 µg/ml iken *B.subtilis* için MIC değeri 4 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu tez çalışmasında *E.coli*'nin % 50'sini etkileyen doz 48 saat için 28,9 mg/l ; *B.cereus*'un % 50'sini etkileyen doz 48 saat için 15,1 mg/l olarak tespit edilmişti. Kasemets ve ark., (2009) tarafından yapılan çalışmada ZnO, CuO ve TiO₂ nanopartiküllerin maya -*Saccharomyces cerevisiae* üzerine toksisitesi araştırılmıştır. Nano-TiO₂ 20000 mg/l'de bile toksik olmadığı, nano-ZnO'nin 24 saat sonunda EC₅₀ değerinin 131 – 158 mg/l olduğu, nano-CuO 'in ise 8 saat sonunda EC₅₀ değerinin 20,7 – 1297 mg/l olduğu bulunmuştur.

En çok kullanılan NMO'lerin atıksu arıtma tesisindeki mikroorganizmalara etkisine baktığımızda; Choi ve Hu (2008) yaptıkları araştırmada , gümüş NP'ün (0,17 mg/l) nitrifikasyon bakterilerinin respirasyonunun inhibisyonunu indüklediğini ; Ganesh ve ark., (2010) atıksu arıtma tesisinde 10 mg/l bakır NP'ün amonyak okside eden bakterilerin respirasyonunu inhibe etmediğini bulmuşlardır. Özellikle biyolojik fosfor gideriminde kısa süreli ZnO NP'üne maruz kalınması atıksudaki nutrient giderimin negatif yönde etkilemektedir (Zheng ve ark., 2011). NMO'lerden nano-Al₂O₃ ile yapılan çalışmalarda 1-50 mg/l Al₂O₃ nanopartikülün aktif çamur sisteminde hem kısa hem uzun maruz kalma sürelerinde negatif bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. 1-50 mg/l nano-Al₂O₃ kısa süre maruz kalma sürelerinde biyolojik nitrojen ve fosfor giderimde bir etkisi olmadığı halde, uzun süreli maruz kalma süresi 50 mg/l'yi geçtikten sonra atıksuyun nitrojen giderimi artmaktadır

(Chen ve ark., 2012). NMO'lerin canlı bünyesindeki biyoakümüle olup olmadığı çalışmaları oldukça kısıtlıdır. Hao ve ark., (2013) tarafından yapılan çalışmada ZnO nanopartikülünün *Cyprinus carpio* üzerindeki biyoakümüleyasyonu incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, 30 günlük maruz kalma süresinden sonra 50 mg/l nano-ZnO'ın balığın dokularında önemli derecede akümüle olduğu bulunmuştur.

Nano-Tantalyum oksit (Ta_2O_5) ; nano-Hafniyum oksit (HfO_2) ; nano-Seryum oksit (CeO_2) gibi nanopartiküller ile ilgili toksisite çalışmaları ise oldukça kısıtlıdır. Garcia ve ark., (2012) yaptıkları toksisite çalışmalarında 0,64 mg/ml CeO_2 'in ve 1,12 mg/ml TiO_2 'in atıksu içerisinde bulunan heterotrofik organizmaları, amonyak okside eden bakterileri, termofilik ve mezofilik anaerobik bakterileri inhibe ettiğini saptamışlardır. NMO'lerden nano- CeO_2 , biyoluminesans bakterisi olan *Vibrio fischeri* ve su piresi *Daphnia magna* üzerine etkisi Garcia ve ark., (2011) tarafından çalışılmıştır. Nano- CeO_2 'in *Vibrio fischeri* üzerine inhibisyonu % 80'den fazla (0,064 mg/ml) olarak bulunmuştur. *Daphnia magna* üzerine olan etkisine bakıldığında nano- CeO_2 'in, LC_{50} değerleri 0,012 mg/ml'dir.

Oh ve ark., (2011) tarafından yapılan çalışmada tomografi cihazında bilgisayar destekli X-ray analizleri için nano- Ta_2O_5 kullanmışlardır. Tıp cihazları üreten endüstrilerde ve medikal tıp endüstrilerinde nano- Ta_2O_5 'in yoğun olarak kullanıldığı belirtilmiştir. İnsanlarda yapılan toksisite çalışmalarında Ta_2O_5 'nin toksik etki yapmadığı gözlenmiştir. Ancak bu NMO'ın ekotoksikolojisi hakkında literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Field ve ark., (2011) tarafından konsantrasyonları 0 to 2,5 mg /ml arasında değişen nano- HfO_2 nano partikülleri kullanmışlardır. Metanojenik bakteriler ile HaCaT hücrelerinde yaptıkları sitotoksisite testlerinde 2200 mg/l nano- HfO_2 konsantrasyonunda - canlı hücrelerde % 50 inhibisyon ve 300 mg/l nano- HfO_2 konsantrasyonunda mitokondrilerde % 50 inhibisyon saptamışlardır. Garcia-Saucedo ve ark., (2011) nano- HfO_2 ve nano- CeO_2 nanopartiküllerin ökaryotik canlı model organizması olarak *Saccharomyces cerevisiae* üzerine yaptıkları akut toksisite çalışmalarında 1000 mg/l üstündeki nano- HfO_2 konsantrasyonlarının toksik olmadığı saptanmıştır.

Binaeian ve ark., (2013)'nın nano-ZnO ve nano-SiO₂ ile çalışmaları verilebilir *Vibrio fischeri* bakterisine 30 dakika maruz bıraktıktan sonra ölçtükleri luminesans değerlerine göre nano-ZnO nano-SiO₂'e göre daha yüksek toksisite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Nano-SiO₂ için tespit ettikleri EC₂₀ değeri 26,98 mg/l'dir. Van Hoecke ve ark., (2008) *Pseudokirchneriella subcapitata* ile yaptıkları toksisite çalışmalarında 72 saat sonucu EC₂₀ değerini 3,9 mg/l olarak rapor etmişlerdir. Pakrashi ve ark., (2013) nano-Al₂O₃ maruz kalan alg hücrelerinin sitotoksitesini incelemişler. 24 saat sonucunda 1; 0,5 ve 0,05 mg/l konsantrasyonlarında hücre canlılığının % 18'e düştüğü ve membran hasarının ise 1 mg/l için % 16,3 olduğunu ; 72 saat sonucunda ise toksik etki arttığını, hücre canlılığının % 5,3'e düştüğünü ve membran hasarı 1 mg/l için % 17,5'e yükseldiğini rapor etmişler. Franklin ve ark., (2007) *Pseudokirchneriella subcapitata* ile çalışmış ve 72 saat sonucunda nano-ZnO için IC₅₀ değerini 0,06 mg/l olarak saptamışlar ve bu değer tez çalışmasında 72 saat sonucu saptanan EC₈₅ değerine yakın bir değerdir.

Mu ve ark., (2011) tarafından nano-Al₂O₃, nano-SiO₂ ve nano-ZnO'in aktif çamur sisteminde anaerobik arıtıma olan etkisini çalışılmış ve 6 mg/ g-AKM ; 30 mg/g-AKM ; 150 mg/g-AKM dozlarındaki nano-Al₂O₃'in metan gazı üretimine toksik etki yaratmadığını rapor etmişler. Nyugen ve ark., (2015) nano-CeO₂ ve nano-ZnO'in biyogaz üretimindeki toksisitesini araştırmışlar. 10 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda metan bakterilerine olan inhibisyonu 24 saat sonucu 34,8 mg/l olarak bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında 24 saat için bulunan EC₅₀ değeri 21,12 mg/l olarak saptanan nano-ZnO konsantrasyonu ile yakın bir sonuç olduğu görülmektedir.

2.3 Nanopartiküllerin Toksisite Mekanizmaları

NP'lerin canlılar üzerindeki toksisite mekanizmaları hakkında bilgi oldukça sınırlıdır. Son yıllarda bu konu üzerine uzmanlaşan araştırmacılar bir çok organizmaya karşı olası toksisite mekanizmalarını açıklamışlardır. En sık kullanılan nano-ZnO nanopartikülü bakteriler üzerine yüksek toksisite yaratmaktadır (*E.coli* için LC₅₀ değeri: 0,048 mg/l ; Dasari ve ark., 2013). Nano-ZnO'in bakteri üzerindeki olası toksisite mekanizmasını Li ve ark., (2011) açıklamışlardır. Yüksek nano-ZnO konsantrasyonunda Zn²⁺ bakteri hücresine bağlanıp hücre içerisine beslenme vakuolü

yolu ile girmekte ve daha sonrasında hücreyi ozmotik şoka uğrattı (yoğun Zn^{+2} içeren çözelti sitoplazma sıvısında sitoplazmadaki su moleküllerinin yerini alarak ozmotik bir basınç oluşturmaktadır) hücrenin fizyolojik fonksiyonlara hasar verdiğini rapor etmiştir. Nanopartikül ve canlı hücre [hücre duvarı ya da Crustacea (*D.magna*) mide ortamı] arasındaki etkileşim ile birlikte biyoassay ortamında bir çok değişiklikler meydana geliyor. Örneğin metalin çözünürlüğü artıyor ya da ROS (Reactive Oxygen Species/Reaktif Oksijen Türleri) hücre membranında hasarlar meydana getiriyor (Heinlaan ve ark., 2008). Thill ve ark., (2006) nano-CeO₂'in *E.coli* üzerine toksisitesini çalışmış ve *E.coli*'ye olası toksisite mekanizmasını açıklamışlar. Nanopartikül hücre membranının dış yüzeyine absorbe olduğunda, membranın viskozitesini modifiye ettiğini, hücre zarında bulunan iyon pompalarını bozduğunu ve böylece hücrenin transport mekanizmasını tamamen bozduğunu ileri sürmektedirler. Manier ve ark., (2013) nano-CeO₂'in ekotoksitesini tatlı su algleri üzerine çalışmıştır. Sitoplazma sıvısının akış hızını ölçme analizlerine göre artan nano-CeO₂ konsantrasyonları karşısında alg hücrelerinin daha çok kompleks hücrelerinin oranı artmıştır. Kompleks hücreyi; hücrenin morfolojik modifikasyonları, nano-CeO₂ ve hücre ile olan etkileşimleri ya da hücre içerisine nanopartikülün alınması olarak açıklamışlardır. Nano-CeO₂ ile alg hücreleri arasındaki yakın adhezyon ; hücre membran bütünlüğünü bozma gibi fiziksel etkilere sebep olabilir ya da indirekt olarak alg büyümesi için gerekli olan yeterli ışık alımını ve alg hücresinin içine nutrient alımını engelleyebilir (Manier ve ark., 2013).

Jiang ve ark., (2009) nanopartikülün hücre yüzeyine nasıl bağlandığını araştırmışlar. Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik, hidrofobik ve reseptor-ligand etkileşimleri gibi bir çok olası mekanizma ile bu bağlantının gerçekleşebileceğini rapor etmişlerdir. Bakteri yüzeyi negatif yüklüdür (*B.subtilis* için -32,3 mV ; *E.coli* için -7,20 mV). nano-Al₂O₃ ve nano-SiO₂ yüzeyi pozitif yüklü (nano-Al₂O₃ +30 mV ; nano-SiO₂ ise +35 mV) iken nano-TiO₂ ve nano-ZnO negatif yüklüdür (nano-TiO₂ - 21 mV ; nano-ZnO -5 mV). Pozitif yüklü bu nanopartiküller (nano-Al₂O₃ ve nano-SiO₂) negatif yüklü bakteri yüzeyine bu şekilde bağlanıyor olabilir. Negatif yüklü nanopartiküllerin bakteri yüzeyine nasıl bağlandığını ise alıcı-ligand bağlarla etkileşimlerin dominant olmasıyla açıklamaktadırlar. Nano-ZnO'nun gram negatif

bakteri - *E.coli*'ye, gram pozitif bakteri – *B.cereus*'dan daha çok toksik etki göstermesini Pasquet ve ark., (2014) araştırmışlar. Gram pozitif bakterilerin peptidoglikan tabakası nano-ZnO'in hücre yüzeyine bağlanmasını teşvik ettiğini ancak gram negatif bakterinin ise bu bağlanmaya karşı direnç gösterdiğini ve hücre duvarı hasarına neden olduğunu açıklamışlardır. Dutta ve ark., (2010) gram negatif bakterinin hücre duvar yapısındaki lipid tabakasının ROS üretimine daha hassas olduğunu tespit etmişlerdir.

Bing ve ark., (2014) nano-SiO₂'in hidrofobik özelliğinden dolayı, farklı konsantrasyonlarına maruz kalan *D.magna*'nın bu nanopartikülü kolaylıkla absorbe edebildiğini tespit etmişlerdir. Süzerek beslenen *D.magna* nanopartikülü bünyesine kolaylıkla alır ve bu nanopartiküller midesinde birikir. Nano-ZnO iyonuna (Zn⁺²) maruz kalan *D.magna* ile yapılan toksigenomik çalışmalarda dış iskeletenin yapımında yer alan ve deri değiştirme esnasında salgılanan kitinaz enzimin regülasyonunu etkilediğini ve bu bağışıklık sisteminin baskılanmasını indüklediğini saptamışlardır (Heinlaan ve ark., 2008). Santo ve ark., (2014) yaptıkları araştırmalarda in vivo ortamda nano-ZnO'e maruz kalan *D.magna*'nın birincil toksisite nedeni olarak epitelyum hücreler ve onların hücreler arası bağlantılarında hücresel dejenerasyonlar olduğunu saptamışlardır. Hücre nanopartikülü hücre içine membranı parçalamadan endositik yolk ile içerisine alır ve nano-ZnO hücre içerisine girdiğinde çinko iyonlarını salıp bir çok hücresel hasarlara (sitoplazmik matriksde vakuolizasyon, mitokondriyal bozunma, oksidatif stres vb.) sebep olmaktadır.

Fajardo ve ark., (2014)'nın yaptığı çalışmada nano-Al₂O₃'in sitotoksik etkisine bakılırken, nanopartikülün bakteri üzerindeki toksik etkisi hala tam olarak açıklanamamakla birlikte bazı hipotezler öne sürülmektedir. Bunlara örnek olarak nanopartiküllerin ışığa olan hassasiyetleri ve spesifik dalga boylarında ROS (Reactive Oxygen Species/Reaktif Oksijen Türleri) üretimi verilmektedir. Garcia-Saucedo ve ark., (2011) nano-HfO₂'in maya-*Saccharomyces cerevisiae* üzerine toksisitesini araştırmışlar. Nano-HfO₂ konsantrasyonu 1000 mg/l'ye kadar çıkarıldığında, maya hücrelerinin O₂ alımına karşı toksik olmadığı saptanmıştır.

Nanopartikülün olası toksisite mekanizmalarından biri nano-HfO₂'e maruz kalan maya hücrelerinin O₂ tüketimini indüklemesidir. Binaeian ve Soroushnia (2013) tarafından yapılan çalışmada ise, saptadığımız EC₅₀ değerine yakın bir sonuç rapor etmişlerdir ; 30 dakikalık maruz kalma süresinden sonra nano-ZnO'nin *V.fischeri* bakterisi için EC₅₀ değeri 10,24 mg/l'dir. Bunun nedeni ; bakterinin karşılaştığı çevresel etkiler (pH, sıcaklık, seyreltme çözeltilerindeki katyon ve anyonlar) ile Microtox cihazından kaynaklanan belirsizlik ölçümü ve bakterinin saklanması ile ilgili bazı genetiksel özellikler olabilir.



BÖLÜM ÜÇ

MATERYAL VE METOT

3.1 Akut Toksisite Testlerinde Kullanılan Nanopartiküller

Nanopartiküllerin çevreye olan toksisitesi 6 farklı nanopartikülle çalışılmıştır. Bu nanopartiküller nano-CeO₂ (abcr, AB249225, Lot:1266155) ; nano-ZnO (abcr, AB249229, Lot:1235097) ; nano-Al₂O₃ (abcr, AB249221, Lot:1235095) ; nano-SiO₂ (Sigma-Aldrich, 637238, Lot:MKBL8542V) ; nano-HfO₂ (Sigma-Aldrich, 202118, Lot:MKBH3310V) ; nano-Ta₂O₅ (Sigma-Aldrich, 303518, Lot:MKB3486V)'dir. Tablo 3.1'de bu nanopartiküllerin boyutları yer almaktadır.

Tablo 3.1 Kullanılan nanopartiküllerin boyutları

Nanopartiküllerin Boyutları	
Nano-CeO ₂	15-30 nm
Nano-ZnO	10-30 nm
Nano-Al ₂ O ₃	< 50 nm
Nano-HfO ₂	5-7 nm
Nano-Ta ₂ O ₅	95-110 nm
Nano-SiO ₂	10-20 nm

3.1.1 Nanopartiküllerin Konsantrasyon Aralıklarının Seçimi

Literatürde yapılan çalışmalar dikkate alındığında akut toksisite testlerinde kullanılan nanopartiküllerin (nano- Ta₂O₅, nano-HfO₂, nano-CeO₂, nano-ZnO nano-SiO₂, nano-Al₂O₃) konsantrasyon aralıkları Tablo 3.2'de yer almaktadır. Canlının gelişmişlik seviyesine ve hassasiyetine göre değişen bu konsantrasyon aralıkları literatür araştırmaları sonucu tespit edilen toksisite çalışmalarına göre düzenlenmiştir. Balık akut toksisite çalışmaları literatür araştırmasında tespit edilememiş ve canlının nanopartiküle karşı toksisite cevabına göre bu doz 1000 mg/l'ye kadar çıkarılmıştır.

Tablo 3.2 Kullanılan nanopartikül konsantrasyonları

Akut Toksisite Testlerinde Kullanılan Nanopartikül Konsantrasyonları		
Organizmalar	Konsantrasyonlar	Referanslar
Bakteri- <i>E.coli</i>	1 – 10 – 50 – 100 mg/l	Krishnamoorthy ve ark. (2014) ; Thill ve ark. (2006)
Bakteri- <i>B.cereus</i>	1 – 10 – 50 – 100 mg/l	Jiang ve ark. (2009) ; Kahru ve ark. (2008) ; Baek ve An (2011)
Bakteri- <i>V.fischeri</i>	3,125 – 6,25 – 12,5 – 25 – 50 – 100 mg/l	Binaeian ve Soroushnia (2013) ; Mortimer ve ark. (2008)
Bakteri-Metan Archae	1 – 5 – 10 – 25 – 50 – 100 mg/l	Nyugen ve ark. (2015) ; Luna-delRisco ve ark. (2011) ; Mu ve ark. (2011)
Maya- <i>C.albicans</i>	1 – 10 – 50 – 100 mg/l	Kasemets ve ark. (2009) ; Liposvsky ve ark. (2011)
Küf- <i>A.niger</i>	1 – 10 – 50 – 100 mg/l	Kasemets ve ark. (2009)
Alg- <i>Chlorella sp.</i>	0,01 – 0,05 – 0,5 – 1 – 5 mg/l	Ji ve ark. (2011) ; Aruoja ve ark. (2009) ; Pakrashi ve ark. (2013)
Crustacea- <i>D.magna</i>	0,01 – 0,05 – 0,5 – 0,7 – 1 – 3 – 5 – 7 – 10 – 20 – 50 – 100 mg/l	Zhu ve ark. (2009) ; Santo ve ark. (2014)
Balık - <i>Iepistes</i> - <i>Poecilia reticula</i>	1 – 10 – 50 – 100 – 200 – 300 – 500 – 750 – 1000 mg/l	-

3.1.2 Nanopartiküllerin Çözeltilerinin Hazırlanması

Kullanılan tüm nanopartiküllerin (nano- Ta_2O_5 , nano- HfO_2 , nano- CeO_2 , nano- ZnO nano- SiO_2 , nano- Al_2O_3) stok çözeltileri (100 mg/l) deiyonize saf su ile hazırlanıp, 1 saat boyunca 30°C’de sonikatör (Bandelin Sonorex – RK 510H)’de karıştırılıp akut toksisite testlerinde kullanıldı. Manyetik karıştırıcı ve sonikatörde aynı anda nanopartikül çözeltileri 2-3 saat karıştırıldı ve ölçümlerin sonuçları aynı çıktı. Akut toksisite deneyleri öncesi hazırlanan nanopartikül çözeltileri buzdolabında 48 saatten fazla bekletilmemiştir.

3.2 Akut Toksisite Testlerinde Kullanılan Organizmalar

3.2.1 Kullanılan Organizmaların Alındıkları Yerler

Bu çalışmada 6 farklı beslenme seviyesini temsil eden 4 adet bakteri, 1 adet maya, 1 adet küf, 1 adet alg, 1 adet Crustacea, 1 adet balık kullanıldı. Bunlar ; bakteri (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Vibrio fischeri*, ve Metan Archae Bakterileri), alg (*Chlorella sp.*) maya (*Candida sp.*), küf (*Aspergillus sp.*), kabuklu - su piresi (*Daphnia magna*) ve balık (Iepistes - *Poecillia reticula*) 'dir.

Bakteri [*Escherichia coli* - ATCC 3509 (RSHM NO: 5010) ve *Bacillus cereus* - RSKK 11015 (NTC 9946)] , maya (*Candida albicans* ATCC 628) ve küf (*Aspergillus niger*) kültürleri Türkiye Halk Sağlığı kurumundan liyofilize kültürleri satın alındı. Alg - *Chlorella sp.* Gölcük Gölünden (Ödemiş) alınan su örneklerinden izole edildi ve çoğaltılıp kültürü yapıldı. Biyoluminesans bakterisi – *Vibrio fischeri* Hach-Lange firmasından liyofilize kültür olarak alındı. Su piresi – *Daphnia magna* ve balık – Iepistes - *Poecillia reticula* özel bir akvaryumcudan satın alındı.

3.2.2 Kullanılan Organizmaların Çoğaltılması

Halk Sağlığı laboratuvarından liyofilize şeklinde alınan *Escherichia coli* - ATCC 3509 (RSHM NO: 5010) ve *Bacillus cereus* - RSKK 11015 (NTC 9946) bakterileri öncelikle canlandırmak için steril nutrient broth üzerine kuru bakteri kültürünün tamamı ilave edilip 4 saat 35 °C'de bekletildi. 4 saatlik inkübasyonun sonunda *E.coli* Endo Agar üzerine , *B.cereus* MYP (Mannitol-Egg Yolk Polymyxine) Agar üzerine ekimi yapıldı (MYP Agar Bileşimi : beef ekstrakt: 1 gr ; kazein: 10 gr ; D- Mannitol: 10 gr ; NaCl: 10 gr ; Fenol Red: 0,025 gr ; Agar: 15 gr ; Polimiksin B: 1 ml Egg Yolk Emülsiyonu: 10 ml). Üreyen canlı kolonilerden akut toksisite testleri yapıldı. Her hafta *E.coli* ve *B.cereus* bakterilerinin yeni ortama pasajı mutlaka yapılarak ve *E.coli* ve *B.cereus* bakteri kültürleri taze tutuldu. Bakteri akut toksisite testi için kullanılan *E.coli* ve *B.cereus* kültürleri logaritmik safhalarında nanopartiküle maruz bırakıldı.

Mikrotox deneyi için kullanılan biyoluminesans bakterisi – *Vibrio fischeri* (LCK 491 – LUMISTox Hach Lange) Hach Lange firmasından satın alınıp -18°C’de muhafaza edildi. Deney öncesi 15°C’lik inkübasyon bloğunda Reaktivasyon Çözeltisinden (LCX 047 DIN EN ISO 11348-3) 1 ml ilave edilip 30 dakika boyunca bakterinin aktifleşmesi beklenip deney başlatıldı. ATA (Anaerobik Toksisite Testi) testinden kullanılan anaerobik bakterileri Pakmaya fabrikasından tedarik edildi.

Halk Sağlığı laboratuvarından liyofilize şeklinde alınan maya *Candida albicans* - ATCC 628 maya ve *Aspergillus niger* küf kültürünü canlandırmak için steril nutrient broth üzerine kuru maya ve küf kültürünün tamamı ilave edilip 4 saat 30°C’de bekletildi. 4 saatlik inkübasyonun sonunda Potato Dextrose Agar’a ekimi yapıldı. Üreyen canlı kolonilerden akut toksisite testleri yapıldı. Her hafta *C.albicans* ve *A.niger*’in yeni ortama pasajı mutlaka yapıp ve *C.albicans* ve *A.niger* kültürleri taze tutuldu. Maya ve küf toksisite testleri için kullanılan *C.albicans* ve *A.niger* kültürleri logaritmik safhalarında nanopartiküle maruz bırakıldı.

Alg – *Chlorella sp.* Gölçük Gölünden (Ödemiş) alınan su örneklerinden izole edildi. Işıklandırılması ve havalandırılması günün her saati kesintisiz çalışan alg kültürü her hafta makronutrient ve mikronutrient çözeltisi (Tablo 3.3)’nden 1 litre için 1’er ml ortama eklenip alg kültürü taze tutuldu.

Su piresi – *Daphnia magna* özel bir akvaryumcudan satın alınıp kültürü laboratuvar koşullarında çoğaltıldı. *Daphnia* kültürü için NaHCO₃: 64,75 mg/l ; KCl: 5,75 mg/l ; MgSO₄·7H₂O: 123,25 mg/l ; CaCl₂·7H₂O: 294 mg/l mineral ortam (Tablo 3.4) hazırlanıp akvaryumun sürekli havalandırılması sağlandı. *Daphnia magna*’nın beslenmesi için haftada bir kuru maya kültürü ve 250 ml alg kültürü ilave edildi. *Daphnia magna* akut toksisite testinde 24 saatlik yeni doğan genç daphnidler kullanıldı. Balık lepistes - *Poecilia reticula* özel bir akvaryumcudan satın alınıp akvaryum ortamında 1 hafta boyunca aklime edildi. 1 haftanın sonunda akvaryumdaki balık ölümleri % 10’u geçmediyse akvaryumdaki balıklar akut toksisite testlerinde kullanıldı.

3.3 Akut Toksisite Testlerinin Yöntemleri

3.3.1 Bakteri (*Escherichia coli* ve *Bacillus cereus*) Akut Toksisite Testi

Bakteri akut toksisite testlerinde kullanılacak nanopartikül çözeltileri bakteri akut toksisite testi öncesi 1 – 10 – 50 – 100 mg/l stok çözeltileri hazırlanıp sonikatörde karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra her bir konsantrasyon için tüplere 5 ml nanopartikül çözeltisi kontrol grubuna ise steril saf su ilave edildi. Logaritmik fazında olan *E.coli* ve *B.cereus* kültürlerinden her bir tüpe eşit hacimde (1 ml) bakteri ekimi biyogüvenlik kabini (Nüve – MN120)’nde yapıldı. Bakteri kültürü ve nanopartikül 24 ve 48 saat için 2 seri olmak üzere maruz bırakıldı. İnkübasyon sonunda kontrol grubu ; 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nanopartikül içeren bakteri kültürlerinden 1 ml alınarak % 0,9 salin içeren 9 ml’lik tüplerde seri sulandırma yapılmış ve her bir seyreltme tüpünden nutrient agar üzerine seyreltme plaka yöntemine göre 1 ml ekimler yapılmıştır. 24 saat sonucunda nutrient agar plaklarında üreyen koloniler not edilmiş, kontrol grubuna kıyasla ölen bakteriler hesaplanmıştır.

3.3.2 Bakteri (*Vibrio fischeri*) Biyoluminesans Değerine Göre Akut Toksisite Testi

Artan dozlarda NP’ler içeren örnekler öncelikle 9000 devirde 15 dakika santrifüj yapıldı. Behere alınan örnekte pH ayarlaması yapıldı (WTW, 330i). pH değeri 5,5 - 8,5 arasında 0,1 N NaOH veya HCl ile pH 7’ye ayarlandı. Bütün seyreltme işlemleri 15°C’lik inkübasyon bloğunda yapılmıştır. 100 mg/l’lik stok çözeltiler 1/1, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 oranında seyreltilmiş ve bakteriler için osmotik basıncın sağlanması için her bir seyreltilmiş örneğe % 2 (w/v)’lik NaCl’den 1,5 ml ilave edilmiştir. Kontrol numunesi olarak A1 bölmesine 1,5 ml % 2’lik NaCl çözeltisinden ilave edildi. Derin dondurucuda (-18 °C) korunan bakteri kültürü (LCK 491 – LUMISTox Hach Lange) alınarak üzerine 1 ml aktivasyon çözeltisi (LCX 047 DIN EN ISO 11348-3) yavaşça ilave edilip ve 30 dakika bekletildi. 15 dakikalık inkübasyondan sonra 0,25 ml luminesans bakteri 12,5 ml dilüsyon çözeltisi (LCK048 - DIN EN ISO 11348-3) konup, 15°C’lik inkübasyon bloğunun B ve C bölmelerine 0,5 ml bakteri ilave edildi.



Şekil 3.1 Microtox cihazı

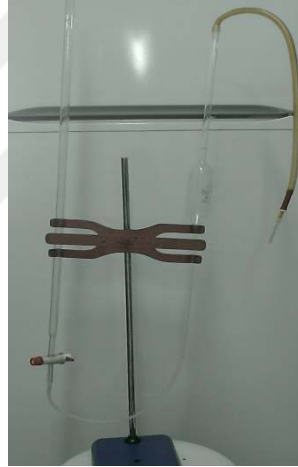
Microtox cihazı (LUMIStox 300 - Hach Lange)'nda başlangıç kültürün luminesans değeri okunmuş ve üzerine 0,5 ml yukarıda seyreltme yapılan nanopartikül çözeltileri ilave edilmiştir. 5. dakika, 15 dakika ve 30 dakika sonunda LU (luminesans) değerleri okunmuştur (DIN/EN ISO 11348-3). Yüzde inhibisyona karşı yüzde konsantrasyon değerleri azalan LU değerlerine göre HACH Lange LUMISsoft IV programında hesaplanıp, her bir nanopartikül için EC_{50} değerleri tespit etmiştir.

3.3.3 Anaerobik Bakteri Kullanılarak Metan Gazı Ölçümlerine Dayalı Toksisite Testi (ATA-Anaerobik Toksisite Testi)

Anaerobik toksisite testi (ATA) Owen ve ark. (1979) tarafından tanımlanan 150 ml hacmindeki amber şişelerde 35°C'de test edildi. Steril 5 litrelik cam balona Vanderbilt Mineral Ortamı ; 3000 mg/l glukoz-KOİ'si (5 litre için: 14,05 gr) ; 667 mg/l sodyum tiyoglukolat (5 litre için: 3,3 gr) (anaerobik ortamı sürdürmek için); 5000 mg/l $NaHCO_3$ (5 litre için: 25 gr) (nötral pH'yı sürdürmek için) ilave edildi. Vanderbilt mineral ortamı sentetik atıksuyun mineral kaynağı olarak kullanılmakta ve içerdiği inorganik kompozisyon : NH_4Cl 400 mg/l ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 400 mg/l ; KCl 400 mg/l ; $Na_2S \cdot 9H_2O$ 300 mg/l ; $(NH_4)HPO_4$ 80 mg/l ; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 50 mg/l ; $FeCl_3 \cdot 4H_2O$ 40 mg/l; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 10 mg/l; KI 10 mg/l; $(NaPO_3)_6$ 10 mg/l ; L-cysteine 10 mg/l ; $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,5 mg/l ; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,5 mg/l ; $CuCl_2$ 0,5 mg/l ;

NH_4VO_3 0,5 mg/l ; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg/l ; H_3BO_3 0,5 mg/l ; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg/l ; $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg/l ; Na_2SeO_3 0,5 mg/l (Speece, 1996).

NP'lerin anaerobik bakterileri üzerindeki olası toksisitesi için her bir NP'ün 1 mg/l ; 5 mg/l ; 10 mg/l ; 250 mg/l ; 50 mg/l ; 100 mg/l olacak şekilde tartımları alınıp şişelere ilave edildi. 5 litrelik karışımdan her bir şişeye 75 ml dağıtıldı ve sonikatörde 1 saat karıştırıldı. Karışımdan sonra anaerobik çamurdan 40 mg/l-AKM olacak şekilde 2,8 ml her bir şişeye ilave edildi ve şişelerin ağızları kauçuk tıpa ile kapatıldı. Kontrol grubuna nanopartikül ilavesi yapılmazken, 24 ve 48 saat olmak üzere 2 seri ekimler yapıldı. İnkübasyon süresinden sonra metan gazı ölçümleri yapıldı (Şekil 3.2). % 3'lük NaOH çözeltisi metan gazından CO_2 çıkarmak için kullanıldı (Razo-Flores ve ark., 1997). Kontrol grubuna kıyasla azalan metan gazı miktarları not edilip inhibisyon hesaplandı.



Şekil 3.2 Metan gazı ölçüm düzeneği

3.3.4 Maya (*Candida albicans*) ve Küf (*Aspergillus niger*) Akut Toksisite Testi

Maya ve küf akut toksisite testlerinde kullanılacak NP çözeltileri akut toksisite testi öncesi 1 – 10 – 50 – 100 mg/l stok çözeltileri hazırlanıp sonikatörde karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra her bir konsantrasyon için tüplere 5 ml NP çözeltisi kontrol grubuna ise steril saf su ilave edildi. Logaritmik fazında olan *C.albicans* ve *A.niger* kültürlerinden her bir tüpe eşit hacimde (1 ml) maya ve küf ekimi biyogüvenlik kabini (Nüve – MN120)'nde yapıldı. Maya - küf kültürleri ve NP 24 ve 48 saat için 2 seri olmak üzere maruz bırakıldı. İnkübasyon sonunda kontrol grubu ;

1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l NP içeren maya ve küf kültürlerinden 1 ml alınarak % 0,9 salin içeren 9 ml'lik tüplerde seri sulandırma yapılmış ve her bir seyreltme tüpünden potato dextrose agar üzerine seyreltme plaka yöntemine göre 1 ml ekimler yapılmıştır. Nutrient agar plaklarında üreyen koloniler not edilmiş, kontrol grubuna kıyasla ölen mantar hesaplanmıştır.

3.3.5 Alg (*Chlorella sp.*) Akut Toksisite Testi

Gölcük Gölünden (Ödemiş) izole edilen alg kültürü her hafta makronutrient ve mikronutrient çözeltisi (Tablo 3.3)'nden 1 litre için 1'er ml ortama eklenerek kültürü taze tutuldu. NP çözeltilerinin 0,01 mg/l ; 0,25 mg/l ; 0,5 mg/l ; 0,5 mg/l ; 1 mg/l ve 5 mg/l stok çözeltileri hazırlanıp sonikatörde 1 saat boyunca karıştırıldı. 24, 48 ve 72 saat için 3 seri 50 ml'lik NP çözeltileri steril erlenlere yerleştirildi.

Tablo 3.3 Makronutrient ve mikronutrient Çözeltisi

Makronutrient Çözeltisi		Mikronutrient Çözeltisi	
Kimyasalın Adı	Miktar	Kimyasalın Adı	Miktar
NaNO ₃	12,75 g/l	H ₃ BO ₃	97,76 mg/l
MgCl ₂ .6H ₂ O	6,082 g/l	MnCl ₂ .4H ₂ O	207,690 mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,205 g/l	ZnCl ₂	1,635 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,35 g/l	FeCl ₃ .6H ₂ O	79,88 mg/l
K ₂ HPO ₄	0,522 g/l	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,714 mg/l
NaHCO ₃	7,5 g/l	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	3,63 mg/l
		CuCl ₂ .2H ₂ O	0,006 mg/l
		Na ₂ EDTA.2H ₂ O	150 mg/l

Her bir konsantrasyon için ve kontrol grubu olarak saf suyun bulunduğu erlenlere eşit miktarda 5 ml alg kültürü ilave edildi (Başlangıçtaki ortalama alg sayısı: 29 adet Alg/10 µl). 24, 48 ve 72 saat nanopartikülün artan konsantrasyonlarına maruz kalan alg hücreleri inkübasyon süreleri bittikten sonra 50 ml'lik falcon tüplerde santrifüj edildi. Dibe çöken alg hücrelerinin sayımı 3 seri olarak yapıldı (Olympus, BX51). İnhibisyon yüzdesini hesaplamak için $[(1 - N/N_0) \times 100]$ formülünden yararlanıldı (N: Nanopartiküle maruz kalan alg hücresinin sayısı/10 µl ; N₀: Kontrol grubundaki alg hücresinin sayısı/10 µl) (Gong ve ark., 2011).



Şekil 3.3 Alg kültürü

3.3.6 Su Piresi (*Daphnia magna*) Akut Toksisite Testi

24 saatte doğmuş *Daphnia magna*'lar toksisite testinde kullanılır. Test için kullanılan *Daphnia magna*' lar besi ortamı (Tablo 3.4) 100 ml'lik beherlere 70 ml ilave edilir, 30 ml ise NP çözeltisi konulur (ph 7 ± 0.1 , $t=20\pm 2^{\circ}\text{C}$, çözülmüş oksijen konsantrasyonu 4-6 mg/l) (WTW, 330i). NP'lerin 100 mg/l'lik stok çözeltileri seyreltme öncesi 1 saat sonikatörde 30°C 'de karıştırılır ve farklı konsantrasyonlardaki çözeltilere *Daphnia magna*'lar ilave edilir. Daha sonra akut toksisitenin hesaplanması için 24 ve 48 saat boyunca *Daphnia magna*'ların canlı ve ölüm oranları kaydedilir (OECD 202, 2004).

Tablo 3.4 *Daphnia magna* için besi ortamı (Sentetik seyreltme suyu)

STOK ÇÖZELTİ	
Kimyasalın Adı	1 litre suya konulacak miktar
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11,76 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,93 g
NaHCO_3	2,59 g
KCl	0,23 g

3.3.7 Balık (*lepistes - Poecillia reticula*) Akut Toksisite Testi

Balık olarak kullanılan lepistes - *Poecillia reticula* (erkek) test balıkları özel bir akvaryumcudan satın alındıktan sonra bulunduğu suyun sıcaklığı 20°C ye en az 48 saat (2 gün) süre ile adapte edilir. Test balıklarının deneylerden önce 1 hafta süre ile bekletme havuzlarında bekletilir. Bekletme sırasında balıkların havuz içindeki ölüm

oranı %10'u aşmaması sağlanır. Test balıklarının bekletilmesi sırasında uygun kuru yem ile beslenir. Tercihen genç balıklara verilen küçük tane boyutlu yem kullanılır.

Sentetik seyreltme suyu (Tablo 3.4) 25 ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi (11,76 g/l), 25 ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi (4,93 g/l), 25 ml KCl çözeltisi (0,23 g/l) ve 25 ml NaHCO_3 çözeltisi (2,59 g/l) olarak hazırlanır. Hacim deiyonize su ile 2 litreye tamamlanır ve test balıklarından 5 adet lepestes - *Poecillia reticula* ilave edilir. Suyun pH'sı $7 \pm 0,2$, çözülmüş oksijen 4–6 mg/l olacak şekilde ayarlanır. 24 ve 48 saat sonunda balık ölümleri kaydedilir (OECD 203, 1992).

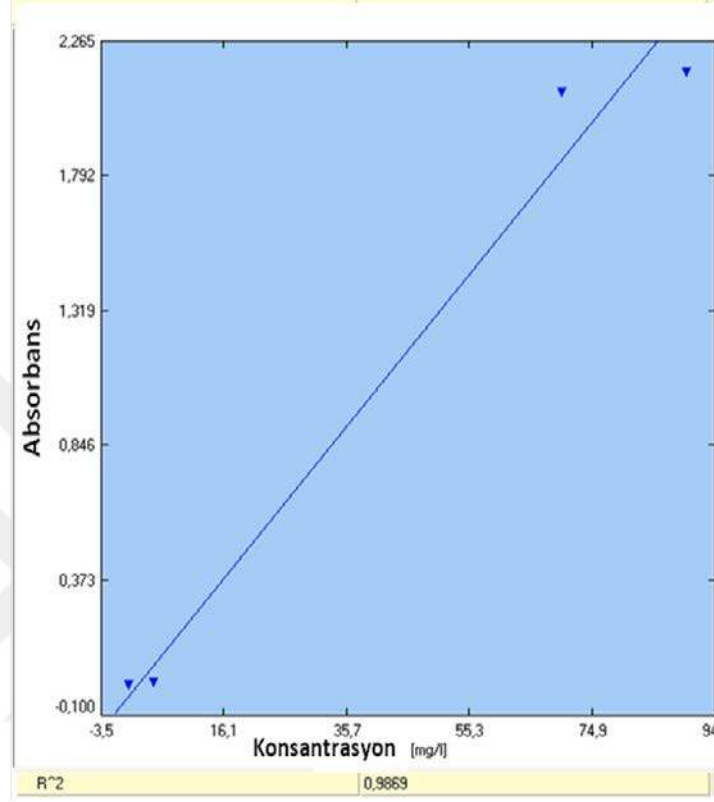
3.3.8 Biyoayrışabilirlik Testi

Biyoayrışabilirlik testi aktif çamur mikroorganizmaları tarafından 10 ve 100 mg/l NP çözeltilerinin başlangıç KOİ miktarından zamana bağlı giderimlerinin hesaplandığı bir yöntemdir (OECD 301, 1992). 2 litrelik cam beherler kullanıldı (Şekil 3.4). Başlangıç KOİ'sini 10 ve 100 mg/l'ye ayarlamak için glukoz kullanıldı (10 mg/l-KOİ için: 0,1 g ; 100 mg/l-KOİ için: 0,5 g). 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında NP'ler ilave edildi (İlave öncesi NP çözeltileri 1 saat sonikatörde karıştırıldı). Suyun pH'sı 7'ye (1 N NaOH ve 1 N HCl ile), çözülmüş oksijen konsantrasyonu 4 mg/l (Çözeltiyi havalandırarak)'ye ayarlandı. 2 litrelik beherin için 30 mg/l-AKM olacak şekilde aktif çamur ilave edildi ve deney başlatıldı.



Şekil 3.4 Biyoayrışabilirlik testi deney düzeneği

T=0’da başlangıç KOİ’leri ölçölüp ; 5. , 10. , 15. , 20. , 28. Günlerde KOİ ölçümleri spektrofotometrede yapıldı. Spektrofotometre (T+80 UV/VIS)’de ölçülen KOİ için kullanılan potasyum hidrojen ftalat ($C_8H_5KO_4$) çözeltisinin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.5’te verilmiştir.



Şekil 3.5 Potasyum hidrojen ftalat ($C_8H_5KO_4$) kalibrasyon grafiği

3.3.9 Biyoakümülyasyon Testi

Biyoakümülyasyon testi 28 gün boyunca 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarındaki NP’ün balık bünyesine akümülyasyonun hesaplandığı bir yöntemdir (OECD 305, 2012). Deney iki aşamada yapılmaktadır. İlk aşamada numunede bulunan kirleticinin balık tarafından alınımı 28 günlük inkübasyon süresinde belirli boyutlardaki akvaryumda izlenir. Bu akvaryumları 10 litre seyreltme suyu ile doldurup pH’sını 6,8-8,5 arasında, çözünmüş oksijen değerini 2-3 mg/l arasında olacak şekilde havalandırması yapılır. İlk 28 günlük periyotta nanopartikül konsantrasyonları 10 – 100 mg/l olacak şekilde 2 farklı akvaryum ayarlanır (Şekil 3.6). Pakmaya’dan alınan aktif çamur örneğinden 1000 ml’de 30 mg/l AKM olacak şekilde aerobik çamur

konur ve akvaryuma 10 adet erkek balık eklenir. Bu süre içinde azalan KOİ konsantrasyonu 0,5,10,15. ve 28. günlerde ölçümleri yapılır. İkinci aşamada ise kirleticinin balıktan temiz sıvıya verilmesi yani salınımı ayrı bir akvaryumda saptanır. Önce 10 adet balık kirleticinin değişik nanopartikül konsantrasyonlarında 28 gün bekletilir ve balıktan suya geçen kirletici konsantrasyonunun KOİ ölçümleri yapılarak kaydedilir. Daha sonra balıklar nanopartikül içermeyen temiz su ile doldurulmuş akvaryumlara konur. Ayrıca bu uygulamaların dışında bir adet kontrol grubu yapılır.



Şekil 3.6 Biyoakümülayon testi deney düzeneği

BCF hesaplamasında kullanılan C_f değeri 28 günlük periyotta sudan balığa geçen NP konsantrasyonun logaritmalarının 14. gündeki $\ln KOİ$ değeridir. C_w değeri ise balıktan suya geçen NP konsantrasyonun logaritmalarının son gün değerinin ilk gün değerinden çıkarılmasıyla bulunur. k_1 (kirletici alım hızı) ve k_2 değerleri hesaplanır $[(NP'ün \text{ balık bünyesine alım hızı } (k_1)(gün^{-1}) - \text{ Balıktaki kirletici konsantrasyonunun temiz suya salınım hızı } (k_2) (gün^{-1})]$. BCF hesaplaması Tablo 3.5'te yer almaktadır.

Tablo 3.5 Biyoakümülayon faktörünün hesaplanması

$k_1 = \frac{C_f \times k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 \times t})} \text{ (gün}^{-1}\text{)}$	BCF= k_1 / k_2
$K_2 = \frac{\ln(C_{f1} / C_{f2})}{t_2 - t_1} \text{ (gün}^{-1}\text{)}$	

3.4 İstatistiksel Analizler

NP'lerin canlılar üzerindeki toksisitesi ; artan dozlara karşı canlı üzerindeki inhibisyonun zamana ve doza bağılı olup olmadığı istatistik analizleriyle araştırıldı. JMP (10) programı kullanılarak yapılan ANOVA testlerinde ; zaman ve inhibisyon değişkenleri arasındaki ilişkiler çoklu regresyon analizleriyle irdelendi. r^2 ve p (< 0,05) değerleri bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki istatistiksel anlamlılığı ifade etmek için kullanıldı.

BÖLÜM DÖRT

DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Nano-CeO₂ ile Yapılan Akut Toksisite Çalışmaları

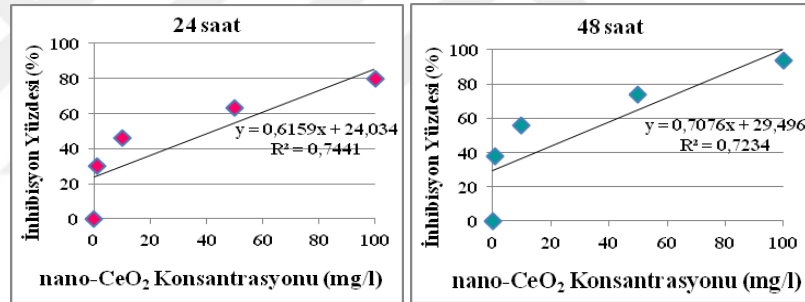
4.1.1 Bakteri (*Escherichia coli* – *Bacillus cereus*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano-CeO₂ NP'ünün bakteri üzerine akut toksisitesi iki farklı bakteri ile çalışılmıştır. Bu bakteriler gram negatif özelliğe sahip olan *Escherichia coli* bakterisi ile gram pozitif özelliğe sahip *Bacillus cereus* bakterisidir. Tablo 4.1'de artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu canlı kalan *E.coli* bakterisinin sayıları gösterilmektedir. Kontrol grubundaki bakteri sayıları başlangıçta 10 adet/koloni iken 24 saat sonucunda sayıları 200000 ; 205000 ; 201000 adet koloni/1 ml'ye yükselmiştir (Tablo 4.1). 24 saat sonunda 1 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonunda bakteri sayıları 140000 ; 141000 ; 142000 adet koloni/ml'ye düşmüştür. Nanopartikül miktarı 10 mg/l'den 100 mg/l'ye arttıkça kontrole göre nanopartikülün *E.coli* üzerine inhibisyonu artmış, canlı bakteri sayıları 41000 ; 42000 ; 40000 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.1). 48 saat sonucunda kontrol grubundaki bakteri sayıları 210000 ; 212000 ; 208000 adet/ml iken 1 mg/l nano-CeO₂'e maruz kalan *E.coli* kolonileri 133000 ; 134000 ; 132000 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.1). İnhibisyon % 30,2'den % 36,6'e yükselmiştir. Nano-CeO₂ dozu 100 mg/l'ye çıkarıldığında ise, kontrole kıyasla inhibisyon % 93,8 olarak gerçekleşmiş, *E.coli* kolonilerinin büyük bir kısmı ölmüştür.

Tablo 4.1 Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu canlı *Escherichia coli* bakterilerinin sayıları

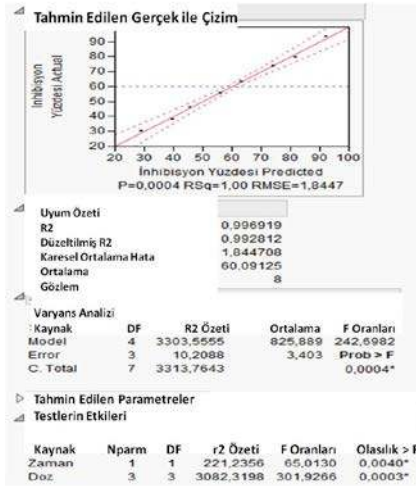
nano-CeO ₂	CANLI <i>E.coli</i> BAKTERİ SAYILARI (adet koloni /ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	200000	205000	201000	202000	210000	212000	208000	210000
1 mg / l	140000	141000	142000	141000	133000	134000	132000	133000
10 mg / l	109000	110000	108000	109000	93000	92000	94000	93000
50 mg / l	76000	77000	75000	76000	56000	55000	57000	56000
100 mg / l	41000	42000	40000	41000	13000	12000	14000	13000

24 saat sonucunda nano-CeO₂ dozu 1 mg/l'den 100 mg/l'e çıkarıldığında inhibisyon yüzdesi % 30,2'den % 79,7'ye yükselmiştir. *E.coli* bakterisinin % 50'sini öldüren doz, EC₅₀ değeri 24 saat için 42,2 mg/l olarak grafikten hesaplanmıştır (Şekil 4.1). 48 saat sonunda ise nano-CeO₂'nin *E.coli*'ye olan inhibisyonu artmış ; 1 mg/l'den 100 mg/l'ye artan konsantrasyonda *E.coli*'nin inhibisyon yüzdesi % 36,6'dan % 93,8' e çıkmıştır. 48 saat sonucunda *E.coli*'nin % 50'sini öldüren doz, EC₅₀ değeri 28,9 mg/l'dir (Şekil 4.1). 24 saat sonucu ile kıyasladığımızda *E.coli* ile nano-CeO₂ naopartikülünün maruz kalma süresi arttıkça bakterinin nanopartiküle hassasiyeti artmakta, *E.coli*'nin % 50'sini öldüren nano-CeO₂ konsantrasyonun 42,2 mg/l'den 28,9 mg/l'ye düştüğü saptanmıştır. Bu durum 48 saat sonucu inhibisyonun daha da arttığını göstermektedir. 24 saat sonunda *E.coli* daha yüksek nano-CeO₂ konsantrasyonlarını tolere edebilmekte, 48 saat sonunda ise akut toksisitesi artığından daha düşük nano-CeO₂ konsantrasyonlarını tolere edebilmektedir.



Şekil 4.1 Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı *Escherichia coli* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 42,2 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=28,9 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-CeO₂ konsantrasyonları ile *E.coli*'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,996). Test sonucu Şekil 4.2'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,004 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0003 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0004 < 0,05).



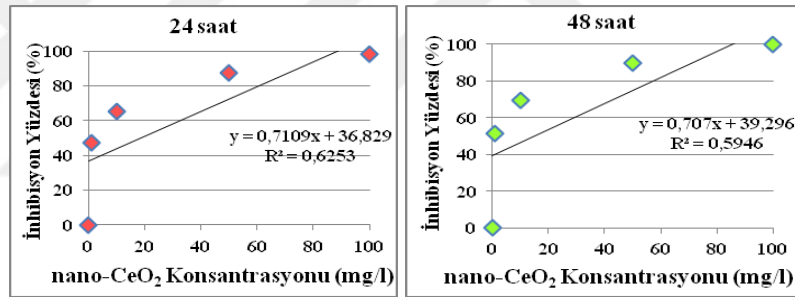
Şekil 4.2 *E.coli*'nin ANOVA testi sonuçları

Diğer akut toksisitesi çalışılan gram pozitif özelliğe sahip bakteri *Bacillus cereus*'un artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşın canlı *B.cereus* bakteri sayılarının 24 ve 48 saat sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir. 24 saat sonucunda kontrolde üreyen *B.cereus* kolonileri 40000 ; 41000 ; 39000 adet koloni/1ml iken, 1 mg/l nanopartikülüne maruz kaldığında bu sayı 21000 ; 20000 ; 20000 adet koloni/1ml'ye düşmektedir. 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonlarında kontrole kıyasla canlı bakteri sayıları gittikçe azalmaktadır (Tablo 4.2). 48 saat sonucunda ise kontrolde üreyen canlı bakteri sayıları 49000 ; 50000 ; 48000 adet koloni/1ml iken 50 mg/l nano-CeO₂ dozunda nanopartiküle maruz kalan *B.cereus* bakterisinin canlı hücre sayısı 5000 ; 6000 ; 4000 adet koloni/1ml'ye düşmekte (Tablo 4.2), 100 mg/l nanopartikül dozunda ise inhibisyon % 100 gerçekleşmektedir (Şekil 4.3).

Tablo 4.2 Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Bacillus cereus* bakterilerinin sayıları

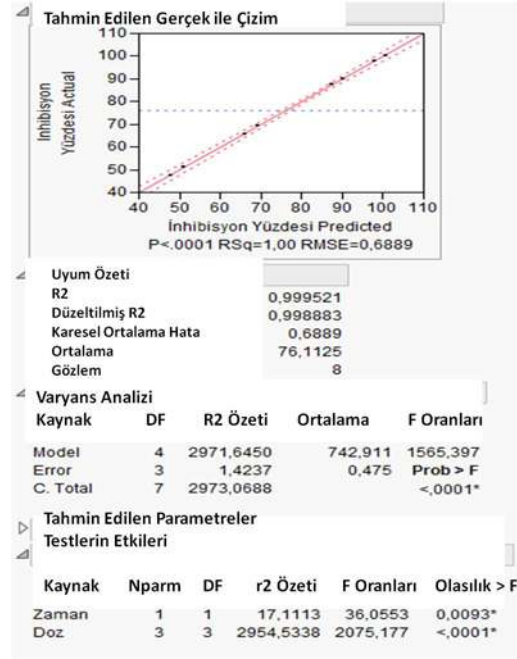
nano-CeO ₂	CANLI <i>B.cereus</i> BAKTERİ SAYILARI (adet koloni /ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	40000	41000	39000	40000	49000	50000	48000	49000
1 mg / l	21000	20000	22000	21000	24000	23000	25000	24000
10 mg / l	13000	12000	14000	13000	15000	16000	14000	15000
50 mg / l	6000	5000	4000	5000	5000	6000	4000	5000
100 mg / l	750	760	740	750	0	0	0	0

B.cereus bakterisinin artan nanopartikül dozlarına karşın 24 ve 48 saat sonundaki inhibisyon yüzdeleri incelendiğinde 24 saat sonunda 1 mg/l'de inhibisyon yüzdesi % 47,5 iken, 10 mg/l'de % 65,5 ; 50 mg/l'de % 87,5 ve 100 mg/l'de % 98,1'e yükselmiştir (Şekil 4.3). 48 saat sonunda ise inhibisyon yüzdeleri 1 mg/l için % 51,1 ; 10 mg/l için % 69,4 ; 50 mg/l için 89,9 ve maksimum doz olan 100 mg/l'de ise % 100'e çıkmıştır (Şekil 4.3). Şekil 2.'den hesaplanabilen *B.cereus* bakterisinin % 50'sine etki eden doz ; EC₅₀ değeri 24 saat için 18,5 mg/l ; 48 saat için 15,1 mg/l'dir. Bakterinin nanopartikülle maruz kaldığı süre arttıkça nano-CeO₂'in bakteriye olan akut toksisitesinin arttığı, bakterinin nanopartiküle olan hassasiyetinin arttığı ve daha düşük nano-CeO₂ konsantrasyonlarını tolere edebildiği saptanmıştır. Kısa temas sürelerinde bakteri daha yüksek nano-CeO₂ konsantrasyonlarında yaşayabilmekte, direnç gösterebilmekte, bu nedenle daha yüksek nano-CeO₂ konsantrasyonlarını tolere edebilmektedir.



Şekil 4.3 Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı *Bacillus cereus* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 18,5 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=15,1 mg/l)

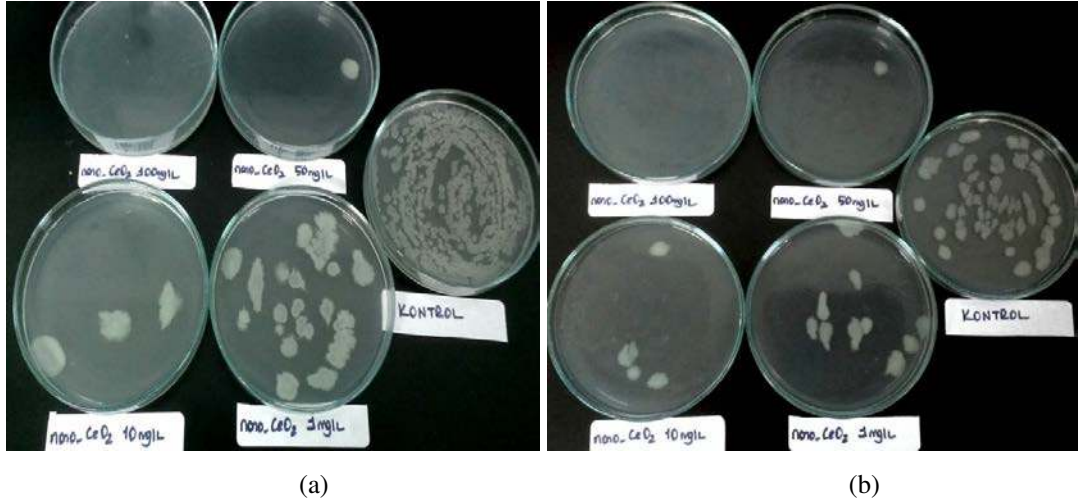
Yapılan ANOVA testinde artan nano-CeO₂ konsantrasyonları ile *B.cereus*'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,999). Test sonucu Şekil 4.4'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0093 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,000 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0001 < 0,05).



Şekil 4.4 *B.cereus*'un ANOVA testi sonuçları

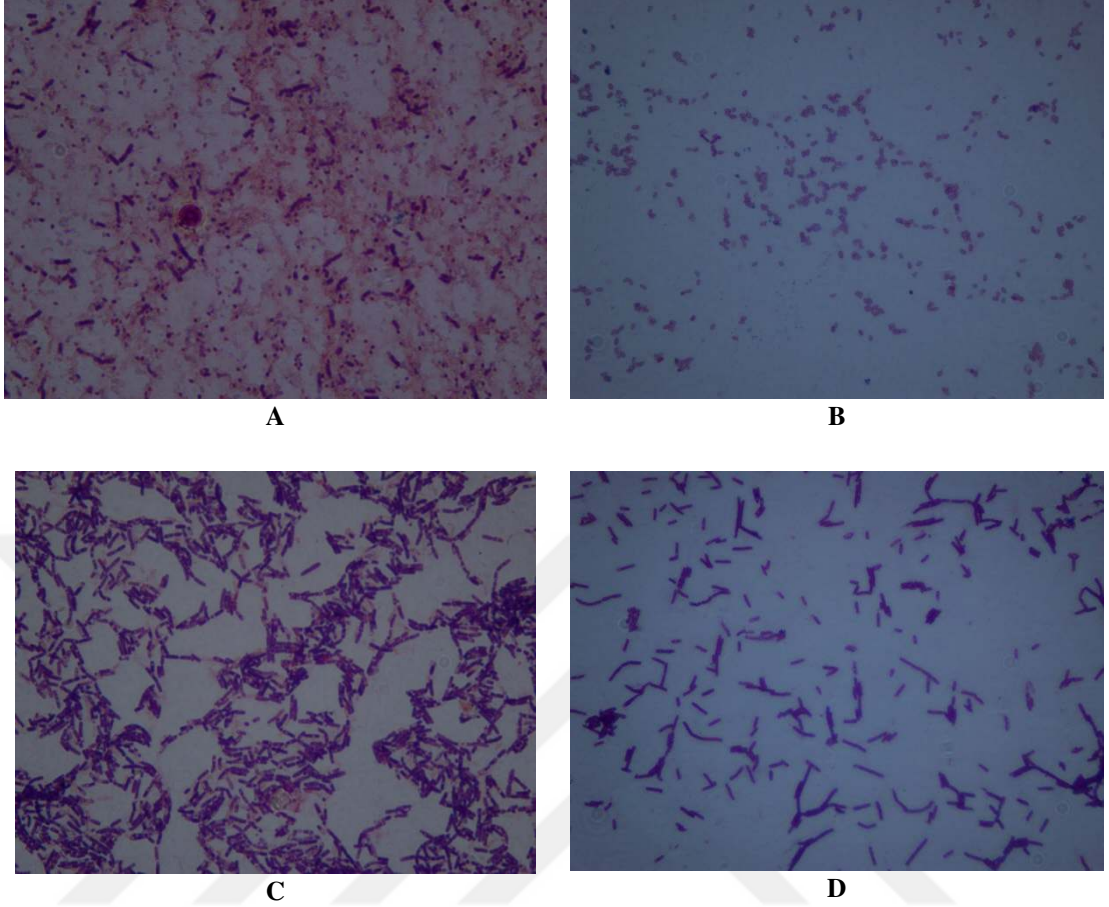
Nano-CeO₂ nanopartikülünün gram negatif bir bakteri olan *E.coli* ile gram pozitif bir bakteri olan *B.cereus*'a olan akut toksisiteyi kıyaslandığında ; *B.cereus*'un nano-CeO₂'e daha hassas olduğu düşük EC₅₀ değerleri (24 saat için EC₅₀ Değeri=18,5 mg/l ; 48 saat için EC₅₀ Değeri= 15,1 mg/l) ile *E.coli*'nin ise nano-CeO₂'in artan konsantrasyonlarına daha dirençli olduğu yüksek EC₅₀ değerleri ile (24 saat için EC₅₀ Değeri=42,2 mg/l ; 48 saat için EC₅₀ Değeri= 28,9 mg/l) görülmektedir.

Yapılan tez çalışmasında, Şekil 4.5(a)'da *E. coli* kolonilerinin nutrient agar ortamında artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarında kontrole kıyasla azaldığı görülmektedir. 48 saat sonucunda kontrol petrisinde *E.coli* kolonileri oldukça yoğun iken, 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l konsantrasyonlarında 48 saat nanopartiküle maruz kalan *E.coli* bakterisinin sayısı epey azalmıştır. Şekil 4.5(b)'de ise *B. cereus*'in nutrient agar ortamındaki koloni sayıları görülmektedir. 48 saat boyunca nano-CeO₂ nanopartikülünün 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l konsantrasyonlarına *B.cereus* kolonileri maruz kalmış ve nutrient agar ortamına pasajı yapıp canlı *B.cereus* kolonileri sayılmıştır. *Bacillus cereus* bakterisinin *Escherichia coli* bakterisinden daha hassas olduğu Şekil 4.5(a) ve Şekil 4.5(b)'den gözlemlenmektedir.



Şekil 4.5 (a): Artan nano-CeO₂ dozlarına karşı *Escherichia coli* bakteri sayılarının değişimi ; (b): Artan nano-CeO₂ dozlarına karşı *Bacillus cereus* bakteri sayılarının değişimi

Şekil 4.6'te *Escherichia coli* ve *Bacillus cereus* bakterilerinin gram boyama sonucu görüntüleri yer almaktadır. A ve B görüntüleri *E.coli* bakterisine ait olup ; A görüntüsü nanopartiküle hiç maruz kalmamış kontrol grubu bakteri kolonilerinin gram boyama sonucundaki görüntüsü, B ise maksimum doz olan 100 mg/l nanopartikül konsantrasyonuna 48 saat boyunca maruz kalmış bakteri kolonilerinin gram boyama sonucundaki görüntüsüdür. Kontrol grubunda *E.coli* kolonileri gram negatif çubuk bakteriler ile 100 mg/l nanopartiküle 48 saat boyunca maruz kalmış bakterilerinin gram boyama görüntüsü kıyaslandığında nanopartiküle maruz kalmış bakterilerinin şekillerinde deformasyonlar olduğu görülmektedir. Diğer gram pozitif özellikteki *Bacillus cereus* bakterisinin kontrol grubu ve 100 mg/l konsantrasyonunda 48 saat boyunca maruz kalmış grubu kıyaslandığında ; kontrol grubunda gram pozitif çubuk bakteriler nanopartiküle maruz kaldıktan sonra hücre uzunluk boyutunun arttığı (3,31 μ 'dan 3,38 μ 'a) görülmektedir.



Şekil 4.6 *Ecsherichia coli* ve *Bacillus cereus* bakterisinin gram boyama sonucu görüntüleri (A: Kontrol grubundaki *E.coli* bakterisinin gram boyama sonucu ; B: nano-CeO₂ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan *E.coli* bakterisinin gram boyama sonucu ; C: Kontrol grubundaki *B.cereus* bakterisinin gram boyama sonucu ; D: nano-CeO₂ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan *B.cereus* bakterisinin gram boyama sonucu)

Krishnamoorthy ve ark., (2014) *E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* ve *Bacillus subtilis* gibi patojen bakterilerin nano-CeO₂'e karşı minimum inhibisyon konsantrasyonunu (MIC) araştırmışlardır. *E.coli* için MIC değeri 16 µg/ml iken *B.subtilis* için MIC değeri 4 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu tez çalışmasında *E.coli*'nin % 50'sini etkileyen doz 48 saat için 28,9 mg/l ; *B.cereus*'un % 50'sini etkileyen doz 48 saat için 15,1 mg/l olarak tespit edilmiştir. Thill ve ark., (2006) bakteri hücre yüzeyine nanopartikül adsorbe olduğunda, 7 nm boyutundaki 30 mg/l nano-CeO₂ nanopartikülünün oksidatif reaksiyondan dolayı KNO₃ çözeltisinde *Ecsherichia coli*'ye karşı toksik olduğunu ve *E.coli* hücre kültürünün % 50'sini öldüren (EC₅₀ Değeri) dozun 9 mg/l olduğunu saptamışlardır. Yapılan tez

çalışmasıyla kıyaslandığında *E.coli* için saptanan EC₅₀ değerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Gram pozitif bir bakteri olan *Staphylococcus aureus* ile nano-CeO₂'in antibakteriyel etkisini çalışan Negahdary ve ark., (2012) 0,03 mM (0,05g) nano-CeO₂ nanopartikülünün bakteri üzerine en yüksek toksisite gösterdiğini; bakteri kültürünün tamamını inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Krishnamoorthy ve ark., (2014)'te yaptıkları çalışmada *B.cereus*'un daha hassas olduğunu ve minimum inhibisyon konsantrasyonu 4 µg/ml iken, *E.coli*'nin daha dirençli olduğunu ve minimum inhibisyon konsantrasyonunu 16 µg/ml olmuştur. Bu tez çalışmasında *E.coli* ve *B.cereus* olmak üzere iki farklı bakteri çalışılmış ve *E.coli*'ye kıyasla *B.cereus*'un 24 saat sonucunda düşük EC₅₀ değeri (18,5 mg/l) ile *B.cereus* daha hassas olduğu görülmüştür. Buna göre her iki çalışmada paralel sonuçlar elde edilmiştir.

Genelde NMO'lerin toksisitesine sebep olan faktörler ; boyut, çözünme, temas yolu, nanoyapısı vb.'dir. Toksikiteye neden olan mekanizmalar ise ; oksidatif stres, bağlantı etkileri, genotoksisite vb.'dir (Chang ve ark., 2012). NMO'lerden biri olan nano-CeO₂ için; seryum metallerin lantanit serisinin bir üyesidir ve yer kabuğunda nadir-toprak elementleri arasında en bol bulunan elementtir (Barnard, 2012). Seryum çok reaktiftir ve oksijen ligandı ile bağlandığında güçlü okside ajanı haline gelebilir (De Faria ve ark., 1994). Nano-CeO₂ nanopartikülünün toksisitesinin sebepleri oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin üretimi (Reactive oxygen species/ROS) ya da hücre membran hasarı olabilir (Leung ve ark., 2015). Krishnamoorthy ve ark. (2014)'nın nano-CeO₂'in *E.coli* ve *B.subtilis* üzerine yaptıkları deneysel çalışmalara göre ; toksisite mekanizması bakteri ve nano-CeO₂ arasında direk etkileşim sonucu oksidatif stres ile ROS oluşumu ve hücre membranının lizisi gibi olumsuz etkilerden kaynaklanmaktadır (Thill ve ark., 2006).

4.1.2 Bakteri (*Vibrio fischeri*) Biyoluminesans Değerine Göre Akut Toksikite Testi Sonuçları

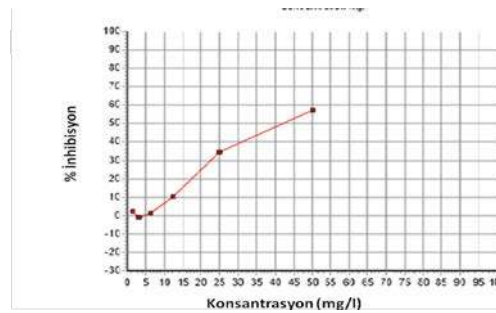
Nano-CeO₂'in artan konsantrasyonlarına karşı biyoluminesans bakterisi olan *Vibrio fischeri* 'nin luminesans değeri ölçülmüştür. *Vibrio fischeri* bakterisinin nano-CeO₂'e maruz kaldığı süre arttıkça, luminesans değerinin azaldığı ve toksisitenin arttığı görülmektedir. Mikrotox deneyi nano-CeO₂'in 100 mg/l stok çözeltisi

hazırlanmış, % 3'lük NaCl ile seyreltmeler yapılmış Lumistox 300 (Hach Lange) ile bakterinin luminesans değeri ölçülmüştür. Yapılan seyreltmelerin en düşüğü 3,125 mg/l'de ölçülen inhibisyon % 1,23 ; 6,25 mg/l nano-CeO₂ dozunda % 5,28 ; 12,5 mg/l 'de % 10,17 ; 25 mg/l'de % 34,17 ; 50 mg/l'de % 57,3 ; 100 mg/l nano-CeO₂ dozunda % 90,25 inhibisyon gerçekleşmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 30 dakika sonucu nano-CeO₂ nanopartikülünün artan konsantrasyonlarına karşı *Vibrio fischeri* – biyoluminesans bakterisinin yüzde inhibisyon değerleri

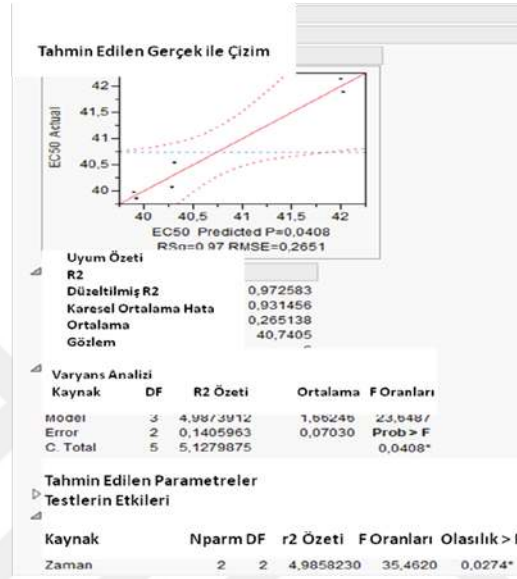
Nano-CeO ₂ Konsantrasyonları (mg/l)	% İnhibisyon
3,125 mg/l	1,23
6,25 mg/l	5,28
12,5 mg/l	10,17
25 mg/l	34,17
50 mg/l	57,35
100 mg/l	90,25

Şekil 4.7'de Mikrotox deneyinin sonucunda Lumistox 300 cihazından alınan grafik yer almaktadır. Nano-CeO₂ nanopartikülünün *Vibrio fischeri* bakterisinin % 50'sine etki eden dozu (EC₅₀ Değeri) 30 dakika sonucunda 39,973 mg/l olarak hesaplanmıştır. *Vibrio fischeri* biyoluminesans bakterisi nano-CeO₂'e 5 dakika maruz kaldığındaki EC₅₀ değeri 42,13 mg/l ; 15 dakika maruz kaldığındaki EC₅₀ değeri 40,07 mg/l'ye düşmüştür. Bakterinin nanopartiküle maruz kalma süresi arttıkça EC₅₀ değerinde bir azalma gözlenmiş ve bakterinin naopartiküle olan hassasiyeti artmıştır. Akut toksisitesi çalışılan diğer bakteri türleri *E.coli* ve *B.cereus*'a baktığımızda 24 saat için *E.coli*'nin EC₅₀ değeri ; 42,2 mg/l, *B.cereus*'un EC₅₀ değeri ; 15,1 mg/l olarak bulunmuştur. Biyoluminesasns bakterisi olan *Vibrio fischeri*'inin nano-CeO₂'e karşı çok daha hassas olduğu görülmektedir.



Şekil 4.7 Nano-CeO₂'in artan konsantrasyonlarına karşı yüzde inhibisyon değerleri (EC₅₀ değeri=39,973 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-CeO₂ konsantrasyonları ile *Vibrio fischeri* bakterisinin 5. ; 15. ve 30. dakikalarındaki EC₅₀ değerlerinin arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,972). Test sonucu Şekil 4.8’de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0057 < 0,05) değişkeninin EC₅₀ değerleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0408 < 0,05).



Şekil 4.8 *Vibrio fischeri* bakterisinin ANOVA testi sonuçları

Nano-CeO₂ ile yapılan literatür çalışmalarına baktığımızda Garcia ve ark., (2011) nano-CeO₂'in akut toksisitesini çalışmış ve biyoluminesans bakterisinin 30 dakika sonucunda EC₅₀ değerini 64 mg/l olarak rapor etmişlerdir. Bu tez çalışmalarında saptanan EC₅₀ değeri 39,973 mg/l olup, Garcia ve ark., (2011)'nin çalışmalarıyla (EC₅₀=64 mg/l) paralel olduğu görülmektedir. Sanchez ve ark., (2011) nano-CeO₂ için 15 dakika sonucunda *Vibrio fischeri* bakterisinin EC₅₀ değerini 21 mg/l olarak saptamışlardır. Bu tez çalışmasında ise bu deneyin sonucu 30 dakikada ölçülmüş ve Sanchez ve ark., (2011)'nin yaptıkları çalışma ile yakın sonuçlar elde edilmiştir. (30 dakika için EC₅₀ değeri 39,973 mg/l) (Şekil 4.7). Recillas ve ark., (2011) nano-CeO₂'in biyoluminesans bakterisi üzerine toksisitesini çalışmış ve 15 dakika maruz kalma süresinde IC₅₀ değerini 35,2 mg/l olarak saptamışlardır. Farklı sonuçlar nanopartiküllerin farklı hazırlanmalarından, *Vibrio fischeri* bakterisinin büyüme koşullarında, pH ve sıcaklık gibi farklı çevresel etkilerden kaynaklanmış olabilir. Sanchez ve ark., (2011) belirttiği gibi akut toksisite testlerinde kullanılan her bir

nanopartikül % 99.9 saf olmayıp, iyon kalıntıları gibi farklı bazı safsızlıkları da içermektedir.

4.1.3 Anaerobik Bakteri Kullanılarak Metan Gazı Ölçümlerine Dayalı Toksisite Testi (ATA-Anaerobik Toksisite Testi) Sonuçları

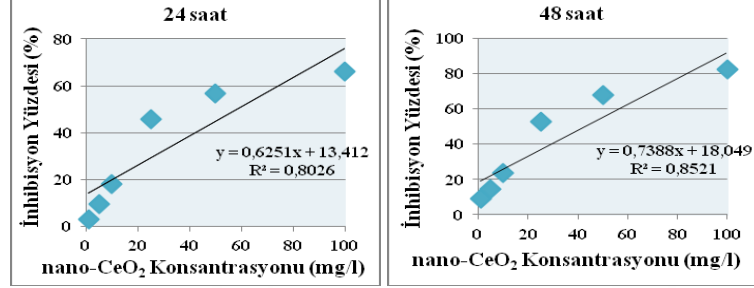
Nano-CeO₂ nanopartikülünün artan konsantrasyonlarının, anaerobik bakterilere toksik etki yapıp yapmadığı ATA-anaerobik toksisite testi ile incelenmiştir. 150 ml'lik steril kapaklı şişelerde artan nanopartikül konsantrasyonlarında metan gazı ölçümleri yapılmıştır. Kontrol grubunda sadece substrat olarak glukoz bulunurken, diğer şişelerde 1 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 mg/l nano-CeO₂ nanopartikülü konularak inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonucunda kontrol grubunda oluşan CH₄ gazı miktarı 18,7 ml iken , 1 mg/l nano-CeO₂ dozunda 18,1 ml ; 5 mg/l nano-CeO₂ dozunda 16,9 ml ; 10 mg/l nano-CeO₂ dozunda 15,3 ml ; 25 mg/l nano-CeO₂ dozunda 10,1 ml ; 50 mg/l konsantrasyonunda 8,1 ml ve 100 mg/l nano-CeO₂ dozunda metan gazı miktarı 6,3 ml'ye düşmüştür (Tablo 4.4). 48 saat sonucunda kontrol grubunda 19 ml CH₄ gazı oluşurken 1 mg/l ; 5 mg/l ; 10 mg/l ; 25 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-CeO₂ dozunda sırasıyla metan gazı miktarları 17,8 ml ; 16,3 ml ; 14,5 ml ; 9 ml ; 6,1 ml ; 3,4 ml'ye düşmüştür (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu metan gazı miktarı ve inhibisyon yüzdesi

nano-CeO ₂	24 saat sonucu		48 saat sonucu	
	Metan Gazı Miktarı (ml)	İnhibisyon Yüzdesi (%)	Metan Gazı Miktarı (ml)	İnhibisyon Yüzdesi (%)
Kontrol	18,7	0	19	0
1 mg / l	18,1	3,2	17,8	8,9
5 mg / l	16,9	9,6	16,3	14,2
10 mg / l	15,3	18,18	14,5	23,7
25 mg / l	10,1	45,9	9	52,6
50 mg / l	8,1	56,68	6,1	67,9
100 mg / l	6,3	66,3	3,4	82,1

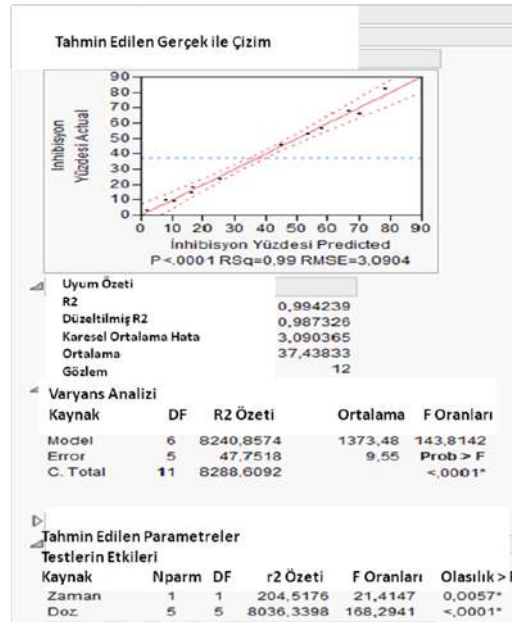
Şekil 4.9'da artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri yer almaktadır. Şekil 4.9'dan hesaplanabilen metan bakterilerinin % 50'sini inhibe eden EC₅₀ değeri 24 saat için 58,5 mg/l ; 48 saat için

43,2 mg/l'dir. 24 saat sonucunda 1 mg/l'den 100 mg/l'ye çıkan nanopartikül konsantrasyonu anaerobik bakterilerin metan üretimini etkilemiştir. inhibisyon oranı % 3,2'den % 66,3'a çıkmıştır (Tablo 4.4). 48 saat sonucunda ise bu inhibisyon artmış ve 1 mg/l için % 8,9 ; 10 mg/l için % 23,7 ; 50 mg/l için 52,6 ve 100 mg/l için % 82,1'e yükselmiştir.



Şekil 4.9 Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 58,5 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 43,2 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-CeO₂ konsantrasyonları ile anerobik metan Archae bakterilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,994). Test sonucu Şekil 4.10'da yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0057 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0001 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0001 < 0,05).



Şekil 4.10 Anaerobik metan Archae bakterilerinin ANOVA testi sonuçları

Nanopartiküllerin kullanımı gün geçtikçe artmakta ve bu nanopartiküller son olarak atıksu arıtma tesislerine giriş yaparak arıtma çamurlarında akümüle olmaktadır. Çamur çürütme prosesinde, biriken bu nanopartiküller inhibisyona sebep olmaktadır. Nguyen ve ark., (2015) nano-CeO₂'in biyogaz üretimi üzerine toksik etkisini araştırmışlar. 40 günlük inkübasyon periyodu sonucunda 100 , 500 ve 1000 mg/l nano-CeO₂ dozunun toplam biyogaz üretimi üzerine inhibisyon yüzdelerinin sırasıyla % 32,2 ; % 35,1 ve % 35,1 olarak saptamışlardır. Nanopartikül toksisitesini etkileyen boyut, yüzey karakteristiği, çözünme vb. birçok faktör bulunmaktadır (Liu ve ark., 2011). Thill ve ark., (2006) yaptıkları çalışmada nano-CeO₂ nanopartikülünün toksisite mekanizmasını, nano-CeO₂'in anaerobik Archae bakterisinin membran yüzeyine bağlandığında oluşturduğu oksidatif stres ile açıklamaktadırlar. Nguyen ve ark., (2015)'nin yaptıkları 40 günlük inkübasyon periyodunda bakterinin ortamda 10 mg/l nano-CeO₂ olduğunda ortama adaptasyon sağladığını belirtmelerine rağmen, bu tez çalışmasında metan bakterilerinin 24 ve 48 saat sonunda kullanılan nano-CeO₂ konsantrasyonuna bağlı olarak inhibe edildikleri saptanmıştır. Bizim çalışmamızda 24 saat sonucunda anaerobik Archae bakterisinin % 50'sini inhibe eden nano-CeO₂ dozu - EC₅₀ değeri: 58,5 mg/l ; 48 saat sonucunda % 50'sini inhibe eden nano-CeO₂ dozu - EC₅₀ değeri: 43,2 mg/l olarak bulunmuştur. Bunun nedeni çalışmamızda granül anaerobik Archae kullanılması, büyüme besiyerinin farklı olması, Archae türünün farklı olması ile açıklanabilir.

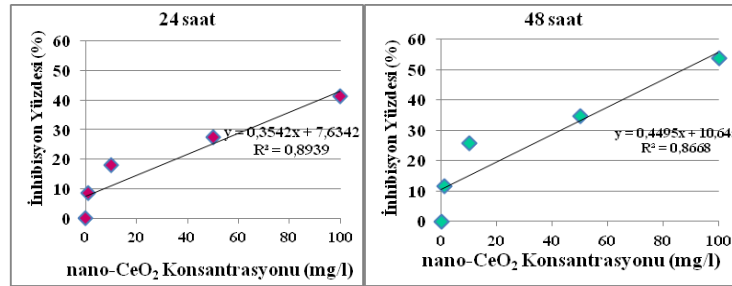
4.1.4 Maya (*Candida albicans*) - Küf (*Aspergillus niger*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano-CeO₂ nanopartikülünün akut toksisitesi maya (*Candida albicans*) ve küf (*Aspergillus niger*) olmak üzerine iki farklı organizma üzerinde çalışılmıştır. Tablo 4.5'de artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Candida albicans* maya kolonilerinin sayıları verilmektedir. Kontrol grubunda 24 saat sonucunda 128000 ; 127000 ; 129000 adet koloni/ml iken 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l konsantrasyonlarına maruz kalan maya kolonilerinde kontrole göre daha az inhibisyon gözlenmiştir (Tablo 4.5). 48 saat sonucunda ise kontrol grubunda 13000 ; 131000 ; 130000 adet koloni/ml iken maksimum doz 100 mg/l konsantrasyonunda canlı maya koloni sayıları 61000 ; 60000 ; 59000 adet koloni/ml'e düşmüştür (Tablo 4.5).

Tablo 4.5 Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Candida albicans* - maya kolonilerinin sayıları

nano-CeO ₂	CANLI <i>C.albicans</i> MAYA KOLONİSİ SAYILARI (adet koloni /ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAM A DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAM A DEĞER
Kontrol	128000	127000	129000	128000	130000	131000	129000	130000
1 mg / l	117000	117000	117000	117000	115000	116000	114000	115000
10 mg / l	105000	106000	104000	105000	98000	97000	96000	97000
50 mg / l	93000	92000	94000	93000	85000	86000	84000	85000
100 mg / l	75000	76000	74000	75000	61000	60000	59000	60000

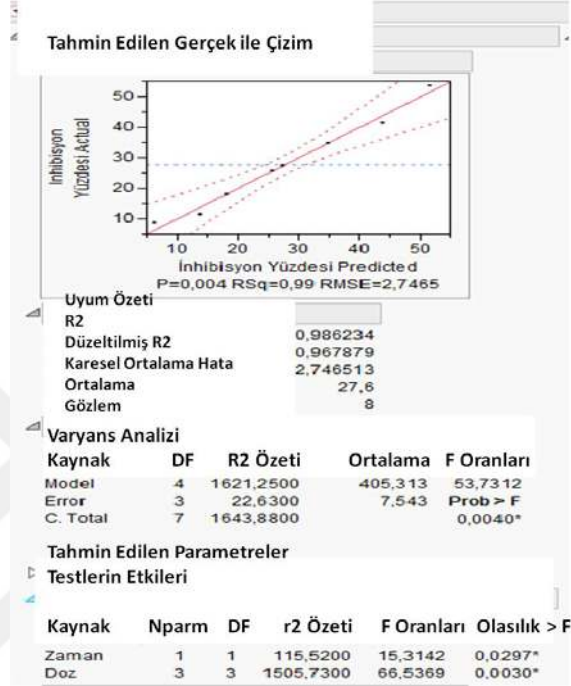
Şekil 4.11’de *Candida albicans* maya kolonilerinin 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerinde nano-CeO₂’in artan konsantrasyonlarına karşın kontrole göre yüzde inhibisyonları gösterilmektedir. 24 saat sonucunda 1 mg/l nano-CeO₂ dozunda yüzde inhibisyon % 8,6 ; 10 mg/l , 50 mg/l ve 100 mg/l dozunda ise sırasıyla yüzde inhibisyon % 17,9 ; % 27,3 ; % 41,4’tür. 48 saat sonucunda ise 1 mg/l dozunda % 8,6’dan % 11,5’a ; 10 mg/l dozunda % 17,9’dan %25,7’ye ; 50 mg/l dozunda % 27,3’ten % 34,6’ya ve 100mg/l nanopartikül dozunda inhibisyon % 41,4’ten % 53,8’e yükselmiştir. Şekil 4.11’den hesaplanabilen % 40’ını etkileyen EC₄₀ değeri 24 saat sonucunda 91,4 mg/l iken 48 saat sonucunda % 50’sini EC₅₀ 87,6 mg/l’a düşmüştür. Nano-CeO₂’e maruz kaldığı süre artıkça *Candida albicans* maya hücrelerinin hassasiyeti artmıştır. Ancak nano-CeO₂’in bakteriler üzerine inhibisyonu ile maya üzerine inhibisyonu kıyasladığımızda ; maya hücrelerinin nano-CeO₂’e karşı toleransının daha yüksek olduğunu bakterinin EC₅₀ değerlerine kıyasla daha yüksek EC₅₀ değerlerinden anlaşılmaktadır.



Şekil 4.11 Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı *Candida albicans* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₄₀ değeri= 91,4 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=87,6 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-CeO₂ konsantrasyonları ile *C.albicans*’nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu

saptanmıştır ($R=0,986$). Test sonucu Şekil 4.12’de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0297 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0030 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0040 < 0,05$).



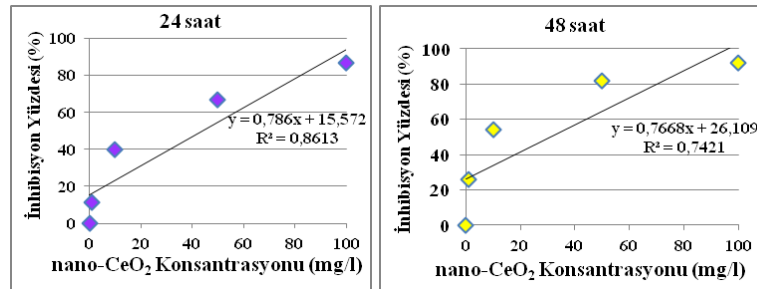
Şekil 4.12 *C.albicans*'ın ANOVA testi sonuçları

Akut toksisitesi çalışılan diğer mikroorganizma ise küf (*Aspergillus niger*) 'tür. Tablo 4.6'da artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Aspergillus niger* küf kolonilerinin sayıları verilmektedir. Kontrol grubunda 24 saat sonucunda *A.niger* kolonileri 45000 ; 44000 ; 46000 adet koloni/ml iken 1 mg/l nanopartikül dozuna maruz kalan küf kolonilerinin sayısı 41000 ; 40000 ; 39000 adet koloni/ml'ye, en yüksek nanopartikül dozu olan 100 mg/l nano-CeO₂'e maruz kalan *A.niger* kolonilerinin sayısı 6000 ; 6100 ; 5900 adet koloni/ml'e düşmüştür (Tablo 4.6). 48 saat sonucunda kontrol grubundaki küf kolonilerinin sayısı 51000 ; 50000 ; 49000 adet koloni/ml iken 10 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonunda kontrol grubuna kıyasla bu oran yaklaşık % 50 azalmış ve 23000 ; 22000 ; 24000 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.6).

Tablo 4.6 Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Aspergillus niger* - küf kolonilerinin sayıları

nano-CeO ₂	CANLI <i>A.niger</i> KÜF KOLONİSİ SAYILARI (adet koloni /ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	45000	44000	46000	45000	51000	50000	49000	50000
1 mg / l	41000	40000	39000	40000	37000	38000	36000	37000
10 mg / l	27000	28000	26000	27000	23000	22000	24000	23000
50 mg / l	15000	16000	14000	15000	9000	9000	9000	9000
100 mg / l	6000	6100	5900	6000	4000	4100	3900	4000

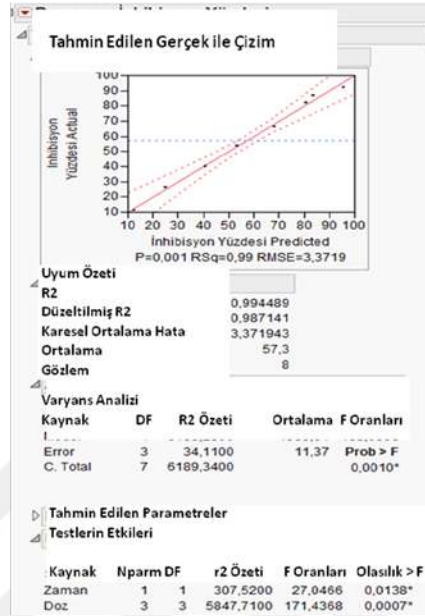
Şekil 4.13'te artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşın *A.niger* kolonilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki yüzde inhibisyonları görülmektedir. 1 mg/l konsantrasyonunda 24 saat sonucunda inhibisyon % 11,1 iken 48 saat sonucunda bu inhibisyon % 26'ya çıkmaktadır. 10 mg/l nano-CeO₂ dozu 24 saat sonucunda küf kolonilerinin % 40'nı inhibe ederken, 48 saat sonucunda % 54'ünü inhibe etmektedir. Nano-CeO₂ dozu 50 mg/l'den 100 mg/l'e çıkarıldığında inhibisyon 24 saat sonucunda % 86,7 ; 48 saat sonucunda inhibisyon % 92 olmaktadır. Şekil 4.13'den hesaplanabilen EC₅₀ değeri 24 saat sonucunda 43,9 mg/l iken 48 saat sonucunda 31,2 mg/l'a düşmüştür. Nano-CeO₂'e maruz kalan küf kolonileri konsantrasyon miktarları arttıkça inhibisyonları artmıştır, maruz kalma süreleri arttıkça küf kolonilerinin nanopartiküle olan hassasiyeti artmıştır.



Şekil 4.13 Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı *Aspergillus niger* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 43,8 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=31,2 mg/l)

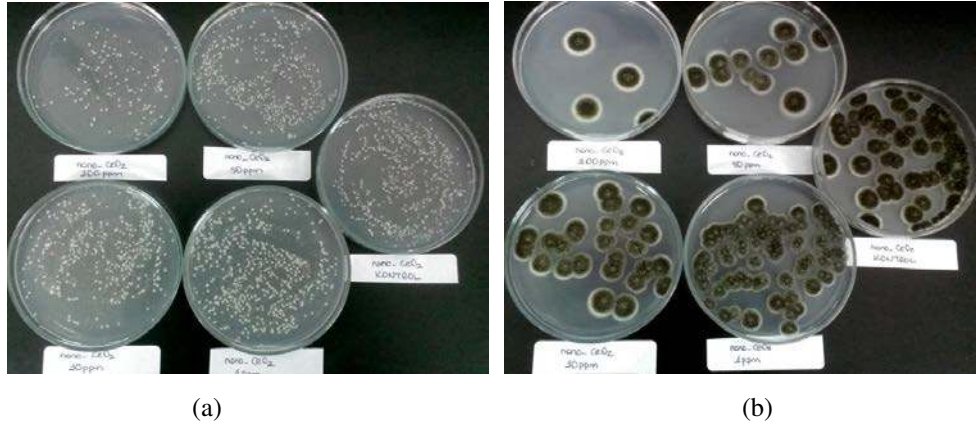
Yapılan ANOVA testinde artan nano-CeO₂ konsantrasyonları ile *A.niger*'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,994$). Test sonucu Şekil 4.14'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$

önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0138 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0007 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0010 < 0,05$).



Şekil 4.14 *A.niger*'in ANOVA testi sonuçları

Şekil 4.15(a)'da potato dextrose agarda *Candida albicans* kolonilerini görülmektedir. Kontrol petrisindeki maya kolonileri ile 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonlarındaki maya kolonilerini kıyasladığımızda inhibisyonun diğer bakteri türlerine kıyasla çok yüksek olmadığı görülmektedir [Şekil 4.15(a)]. 24 saat sonucunda 1 mg/l nanopartikül dozunda inhibisyon % 8,6 ; 48 saat sonucunda ise inhibisyon % 11,5'tir. 100 mg/l nanopartikül dozunda inhibisyon % 41,4'ten % 53,8'e yükselmektedir. Şekil 4.15(b)'de ise potato dextrose agarda *Aspergillus niger* kolonileri görülmektedir. Kontrol petrisindeki küf kolonilerini artan nanopartikül dozlarına maruz kalan küf kolonileri ile kıyasladığımızda 100 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonunda inhibisyonun yüksek olduğu (% 92) açıkça görülmektedir. *Aspergillus niger*, *Candida albicans*'a kıyasla nano-CeO₂'e daha hassas olduğu Resim 4.4 ve Resim 4.5 ile görülmektedir. Ayrıca EC₅₀ değerlerini kıyasladığımızda *A.niger*'in 48 saat sonucunda EC₅₀ değeri 31,2 mg/l iken *Candida albicans*'ın 48 saat sonucunda EC₅₀ değeri 87,6 mg/l'dir [Şekil 4.15(a) ve Şekil 4.15(a)].



Şekil 4.15 (a): Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı *Candida albicans* maya hücrelerinin sayılarının değişimi (b): Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı *Aspergillus niger* küf hücrelerinin sayılarının değişimi

Ağır metal, anti-kanser ilaçları, herbisit gibi kimyasalların toksikolojik değerlendirmesi için maya organizması sıkça kullanılmaktadır (Buschini ve ark., 2003 ; Cabral ve ark., 2003 ; Schmitt ve ark., 2004). Maya, moleküler biyoloji ve sitolojide tek hücreli ökaryotik model organizmaları arasında en çok çalışılmıştır. Çünkü hücresel yapısı ve fonksiyonel yapısı bitki ve hayvan hücreleri ile bir çok benzerlik taşımaktadır. Diğer bir avantajı ise kısa sürede ve kolay kültürü yapılabilmesidir. Nanopartiküllerin maya hücreleri üzerine akut toksisiteyi sitoplazma içinde gelişen hücre sitotoksitesisi ile açıklanabilir. Garcia-Saucedo ve ark., (2011) nano-CeO₂'in maya- *Saccharomyces cerevisiae* üzerine toksisitesini incelemiş ve 1000 mg/l konsantrasyonuna kadar *S.cerevisiae* hücreleri üzerine inhibisyon gözlememişlerdir. Fakat ortama dispersan ilave edildiğinde, nano-CeO₂'in 1000 mg/l dozunun *S.cerevisiae* hücrelerinin % 46,7'sini inhibe ettiği gözlenmiştir. Nano-CeO₂'in küf mantarlarına olan toksisitesi hakkında literatürde çalışma yer almamaktadır. Garcia-Saucedo ve ark., (2011) nano-CeO₂'e maruz kalan maya hücrelerinin membran hasarlarının arttırmadığını ; mayaların oksijen tüketimini tetiklediğini rapor etmişlerdir.

4.1.5 Alg (*Chlorella sp.*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

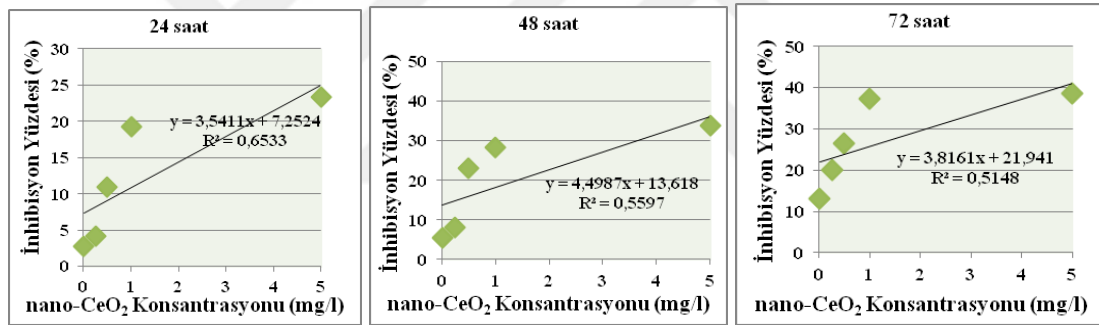
Nano-CeO₂ nanopartikülünün alg üzerine inhibisyonu *Chlorella sp.* türü ile çalışılmıştır. Yapılan toksisite çalışmasında artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına

(0,01 mg/l ; 0,25 mg/l ; 0,5 mg/l ; 1 mg/l ; 5 mg/l) karşı alg hücrelerinin 24 ; 48 ve 72 saat boyunca büyümelerine olan inhibisyon araştırılmıştır. Tablo 4.7’da artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı 24, 48 ve 72 saat sonunda 10 µl’deki alg hücrelerinin sayısı verilmiştir. Her bir konsantrasyon ve bekleme süresi 3 seri şeklinde çalışılmıştır. T=0’daki alg hücresi sayısı 60 adet alg/10 µl iken 24 saat inkübasyon periyodundan sonra kontrol grubundaki alg sayıları 70 ; 76 ; 73 adet alg / 10 µl iken 0,01 mg/l nano-CeO₂’e maruz kalmış alg hücrelerinin sayısı 70 ; 72 ; 71 adet alg/ 10 µl ; 0,25 mg/l nano-CeO₂’e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 69 ; 71 ; 70 adet alg/ 10 µl ; 0,5 mg/l nano-CeO₂’e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 66 ; 61 ; 68 adet alg/ 10 µl ; 1 mg/l nano-CeO₂’e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 58 ; 60 ; 59 adet alg/ 10 µl ; maksimum doz 5 mg/l nano-CeO₂’e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 57 ; 55 ; 56 adet alg/ 10 µl’e düşmüştür (Tablo 4.7). 48 saat sonunda kontrol grubundaki alg sayıları 71 ; 75 ; 76 adet alg/ 10 µl iken 0,01 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonunda alg sayısı 70 ; 71 ; 69 adet alg/ 10 µl ; 0,25 mg/l nano-CeO₂ dozunda 69 ; 67 ; 68 adet alg/ 10 µl ; 0,5 mg/l nano-CeO₂ dozunda alg sayısı 55 ; 57 ; 59 adet alg/ 10 µl ; 1 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonunda alg sayısı 51 ; 53 ; 55 adet alg/ 10 µl ve 5 mg/l nano-CeO₂ dozundaki alg sayıları 49 ; 51 ; 47 adet alg/ 10 µl’ye düşmüştür (Tablo 4.7). 72 saat sonunda kontrol grubundaki alg sayıları 72 ; 76 ; 77 adet alg/ 10 µl iken 0,01 mg/l konsantrasyonunda alg sayıları 69 ; 65 ; 61 adet alg/ 10 µl’ye ; 0,25 mg/l nano-CeO₂ dozunda 61 ; 59 ; 60 adet alg/ 10 µl’ye ; 0,5 mg/l’ de 56 ; 55 ; 54 adet alg/10 µl’ye ; 1 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonunda 49 ; 48 ; 44 adet alg/ 10 µl’ye ve 5 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonunda 47 ; 45 ; 46 adet alg/ 10 µl’ye düşmüştür (Tablo 4.7).

Tablo 4.7 Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Chlorella sp* - alg hücresi sayıları

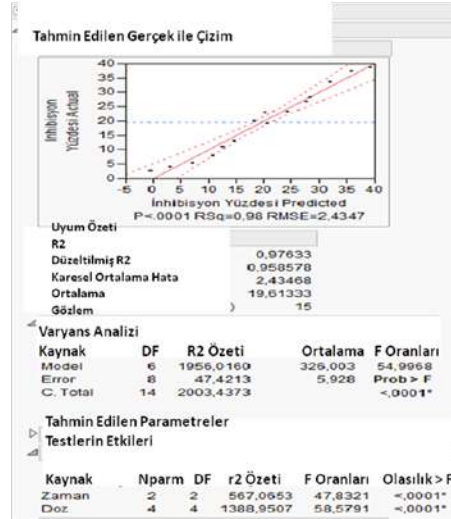
Nano-CeO ₂	ALG (<i>Chlorella sp.</i>) SAYILARI (adet Alg / 10 µl)											
	24 saat sonucu				48 saat sonucu				72 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama
Kontrol	70	76	73	73	71	75	76	74	72	76	77	75
0,01 mg / l	70	72	71	71	70	71	69	70	69	65	61	65
0,25 mg / l	69	71	70	70	69	67	68	68	61	59	60	60
0,5 mg / l	66	61	68	65	55	57	59	57	56	55	54	55
1 mg / l	58	60	59	59	51	53	55	53	49	48	44	47
5 mg / l	55	56	57	56	49	51	47	49	45	46	47	46

Şekil 4.16’da artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı *Chlorella sp.*’nin yüzde inhibisyon değerleri yer almaktadır. 24 saat sonucunda 0,01 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l ve 5 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonlarında inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 2,7 ; % 4,1 ; % 10,9 ; % 19,2 ; % 23,3’tür. 48 saat sonunda bu inhibisyon değerleri biraz daha artmış, sırasıyla % 5,4 ; % 8,1 ; % 22,9 ; % 28,4 ; % 33,7. 72 saat sonunda 0,01 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l ve 5 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonlarında inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 13 ; % 20 ; % 26,6 ; % 37,3 ; % 38,6’dır. Şekil 4.16’dan hesaplanabilen alg hücrelerinin % 50’sini inhibe eden doz EC₅₀ değeri 24 saat için 12,07 mg/l, 48 saat için 8,1 mg/l ve 72 saat için 7,35 mg/l nano-CeO₂’tir (Şekil 4.16). Yapılan tez çalışmasında nano-CeO₂ nanopartikülü alg-*Chlorella sp.* hücrelerine maruz kalma süreleri arttıkça büyümelerine olan inhibisyonu arttığı görülmektedir (Azalan EC₅₀ değerleri ; 24 sa EC₅₀ Değeri= 12,07 mg/l; 48 sa EC₅₀ Değeri=8,1 mg/l ; 72 sa EC₅₀ Değeri=7,35 mg/l).



Şekil 4.16 Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı *Chlorella sp.*’nin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 12,07 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=8,1 mg/l ; 72 saat sonucu EC₅₀ değeri=7,35 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-CeO₂ konsantrasyonları ile *Chlorella sp.*’nin 24 ; 48 ve 72 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,976). Test sonucu Şekil 4.17’de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0001 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0001 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0001 < 0,05).



Şekil 4.17 *Chlorella sp.*'nin ANOVA testi sonuçları

Manier ve ark., (2013) nano-CeO₂ nanopartikülünün tatlı su alg-*Pseudokirchnerella subcapitata*'ya olan toksisitesini araştırmışlar. Nano-CeO₂ nanopartikülünün 0,2 mg/l ve 25 mg/l arasındaki dozlarını çalışmışlar ve *Pseudokirchnerella subcapitata*'nın 72 saat sonucu EC₅₀ değerini 5,6 mg/l olarak saptamışlardır. Yapılan tez çalışmasında canlı türü farklı olmasına rağmen *Chlorella sp.* ile 0,01 mg/l ile 5 mg/l arasında çalışılmış ve 72 saat sonucu EC₅₀ değeri 7,35 mg/l bulunmuş ; *Pseudokirchnerella subcapitata* ile yapılan akut toksisite testine yakın sonuçlar vermiştir. Nano-CeO₂ nanopartikülünün alg üzerine kronik akut toksisite çalışmaları (3-4 ay ve 96 saat) De Jong ve ark., (1965), Bringmann ve Kuhn (1959) tarafından yapılmış ve *Chlorella vulgaris* ve *Scenedesmus quadricauda* için NOEC (No-Observed-Effect-Concentration) değeri 2 ve 0,15 mg/l olarak saptanmıştır. Van Hoecke ve ark., (2009) nano-CeO₂'in sudaki canlılara olan ekotoksitesini araştırmışlardır. *Pseudokirchnerella subcapitata* alg büyüme inhibisyon testi yapılmış ve 14 nm boyutundaki nano-CeO₂'in 72 saat sonucundaki EC₅₀ değeri 10,2 mg/l olarak saptanmıştır. Nano-CeO₂ nanopartikülünün algal hücrelere olan toksisite nedenlerine baktığımızda; Manier ve ark., (2013) E-SEM gözlemleri ve X-ray mikroanalizleri ile çalışmaları sonucunda nanopartikül ve algal hücreler arasındaki direkt etkileşimler sonucu alg büyümesindeki inhibisyonu açıklamışlardır. Roger ve ark., (2010) algal hücreler ile nano-CeO₂'in adezyonu hücre membranının bozulması gibi direk fiziksel etkileşimlerin toksisiteye neden olduğunu rapor etmişlerdir.

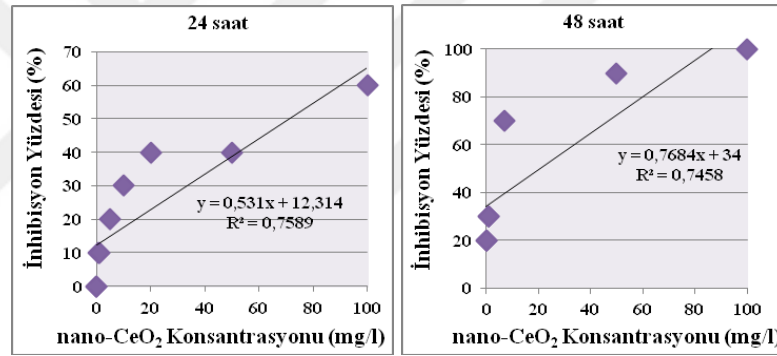
4.1.6 Su Piresi (*Daphnia magna*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Besin zincirinin önemli bir parçası olan *Daphnia magna* ile yapılan akut toksisite testi nano-CeO₂ nanopartikülünün artan dozlarının *Daphnia magna* üzerine inhibisyonuna dayanmaktadır. Deney ortamında nano-CeO₂'in değişen konsantrasyonları 100 ml olarak hazırlanıp, her bir konsantrasyon için 10 adet *D.magna* konulmuştur, ayrıca kontrol grubu olarak *D.magna*'nın mineral ortamını içeren 100 ml'lik ortama 10 adet *D.magna* konularak 24 ve 48 saat için ölüm olup olmadığı izlenmiştir. Tablo 4.8'de artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat sonucunda canlı ve ölen *D.magna* sayıları yer almaktadır. 24 saat sonunda 0,01 ; 0,05 ; 0,5 mg/l nano-CeO₂ *D.magna* üzerine toksik etki göstermezken, 0,7 mg/l konsantrasyonundan itibaren inhibisyon gerçekleşmeye başlamıştır (Tablo 4.8). 0,7 ve 1 mg/l nano-CeO₂ dozunda 1 adet *D.magna* ; 3 ve 5 mg/l'de 2 adet ; 7 ve 10 mg/l'de 3 adet ; 20 ve 50 mg/l'de 4 adet ; 100 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonunda 6 adet *D.magna* ölmüştür (Tablo 4.8). 48 saat sonucunda ölen *D.magna* sayıları artmıştır. 0,01 ; 0,05 ; 0,5 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonunda 2 adet ; 0,7 ve 1 mg/l'de 3 adet ; 3 mg/l'de 5 adet ; 5 ve 7 mg/l'de 7 adet ; 10 mg/l'de 8 adet ; 20 ve 50 mg/l'de 9 adet ; 100 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonunda ise inhibisyon % 100 gerçekleşmiş ve tüm *D.magna*'lar ölmüştür (Tablo 4.8).

Tablo 4.8 Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Daphnia magna* - su piresi sayıları

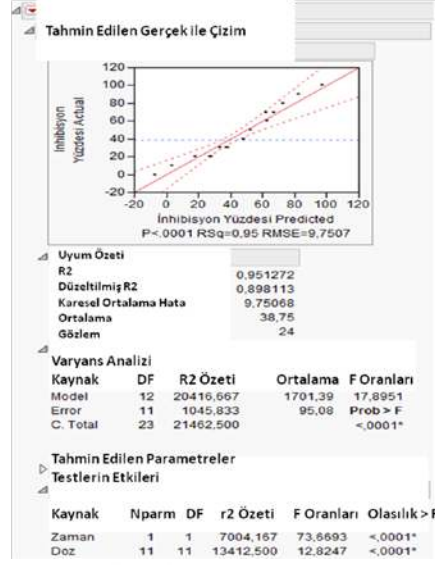
nano-CeO ₂ konsantrasyonu (mg/l)	24 saat sonucu		nano-CeO ₂ konsantrasyonu (mg/l)	48 saat sonucu	
	Canlı <i>Daphnia</i> sayısı	Ölen <i>Daphnia</i> sayısı		Canlı <i>Daphnia</i> sayısı	Ölen <i>Daphnia</i> sayısı
0,01	10	0	0,01	8	2
0,05	10	0	0,05	8	2
0,5	10	0	0,5	8	2
0,7	9	1	0,7	7	3
1	9	1	1	7	3
3	8	2	3	5	5
5	8	2	5	3	7
7	7	3	7	3	7
10	7	3	10	2	8
20	6	4	20	1	9
50	6	4	50	1	9
100	4	6	100	0	10

Şekil 4.18’de artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı *D.magna*’ların yüzde inhibisyonun grafiği bulunmaktadır. 0,01 ve 0,05 mg/l konsantrasyonlarında *D.magna*’lar inhibe olmamış, 0,7 mg/l nano-CeO₂ dozundan itibaren inhibisyon başlamıştır (Tablo 4.8). 7 ve 10 mg/l nano-CeO₂ dozunda inhibisyon % 30 iken ; 100 mg/l’ye çıkan nano-CeO₂ konsantrasyonu *D.magna*’lar üzerine % 60 inihisyon gerçekleştirmiştir (Tablo 4.8). 48 saat sonucunda *D.magna*’ların hassasiyeti artmıştır. 0,01 mg/l’de inhibisyon gerçekleşmeye başlamış, *D.magna*’ların % 20’si ölmüştür. 24 saat sonucunda 5 ve 7 mg/l dozunda inhibisyon sırasıyla % 20 ve % 30 iken ; 48 saat sonucunda aynı konsantrasyonlarda inhibisyon % 70’e çıkmıştır ve 100 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonunda inhibisyon % 100 gerçekleşmiştir (Tablo 4.8). Şekil 4.18’den hesaplanabilen *D.magna*’nın % 50’sini etkilen doz – EC₅₀ değeri: 24 saat için 70,9 mg/l; 48 saat için 20,8 mg/l’dir.



Şekil 4.18 Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı *Daphnia magna*’ların yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 70,9 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=20,8 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-CeO₂ konsantrasyonları ile *Daphnia magna*’nın 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,951). Test sonucu Şekil 4.19’da yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0001 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0001 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0001 < 0,05).



Şekil 4.19 *Daphnia magna*'nın ANOVA testi sonuçları

Nano-CeO₂ ile yapılan akut toksisite çalışmalarına baktığımızda Van Hoecke ve ark., (2009) nano-CeO₂'in sucul ortamdaki canlılar üzerine etkisini araştırmıştır. *D.magna* ile yaptıkları çalışmada ; 1000 mg/l'ye kadar *D.magna* üzerinde akut toksisite olmadığını ; ancak nano-CeO₂ dozu 5000 mg/l'ye çıkarıldığında % 7 , % 10 ve % 12 ölüm oranları gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Gaiser ve ark., (2011) nano-CeO₂'in *D.magna* üzerine etkisini çalışmışlar ve 0,01 ; 0,1 ; 1 ; ve 10 mg/l nano-CeO₂ dozlarının 24 saat sonucu akut toksisite yaratmadığını ancak 21 günlük kronik akut toksisite testinde 30 mg/l'den daha fazla nano-CeO₂'in toksik etki yarattığını bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında 0,01 mg/l ile 100 mg/l konsantrasyon aralıklarında çalışılmış ; 24 saat sonucunda *D.magna*'ların % 50'sini etkileyen EC₅₀ değeri 70,9 mg/l saptanmıştır, ancak Gaiser ve ark., (2011) daha düşük konsantrasyonlarda çalışmış ve akut toksisite gözlememiştir. Garcia ve ark., (2011) ve Sanchez ve ark., (2011) nano-CeO₂'in *D.magna* üzerine 48 saat sonucu LC₅₀ değerini 12 mg/l olarak saptamışlardır. Yapılan tez çalışmasıyla kıyaslandığında 48 saat sonucu *D.magna* için tespit edilen EC₅₀ değeri 20,8 mg/l iken Garcia ve ark., (2011) ve Sanchez ve ark., (2011)'nin bulduğu LC₅₀ değerini 12 mg/l'dir. Gaiser ve ark., (2009) tarafından yapılan çalışmada ; nano-CeO₂'in 0,01 µg/ml ile 10 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarında *D.magna* üzerine 96 saat sonucu toksik etki yaratmadığı gözlenmiştir. Yapılan tez çalışmasında 0,01 mg/l konsantrasyonunda inhibisyon gözlenmezken, 10 mg/l'ye çıkan nano-CeO₂ konsantrasyonda ise inhibisyon % 20 ile

% 30 arasında değişmektedir, yukarıdaki çalışmaya yakın sonuçlar görülmektedir. Jemec ve ark., (2012) nano-CeO₂ nanopartikülünün *Daphnia magna* üzerine etkisini araştırmışlar ve 48 saat sonucunda *D.magna* için LOEC (Lowest-Observed-Effect-Concentration) değerini 80 mg/l olarak bulmuşlardır. Nanopartikül çözeltilerinin farklı hazırlanış yöntemleri, nano-CeO₂'in farklı boyut ve kimyasal özellikleri, safsızlıkları, pH, tuzluluk ve sıcaklık gibi çevresel etkiler farklı EC₅₀ değerlerinin bulunmasına neden olmuş olabilir. Nano-CeO₂'in toksisiteye sebep olan faktörleri partikül boyutu ve çözünübilirliği olabilir. Örneğin Nano-CeO₂ partiküllerin belli bölgelerde akümüle olması, birleşmesi ve *D.magna*'nın bulunduğu ortamdaki besin maddeleri arasındaki etkileşimi partikülün toksisitesinde önemli bir rol oynamaktadır (Gaiser ve ark.. 2009).

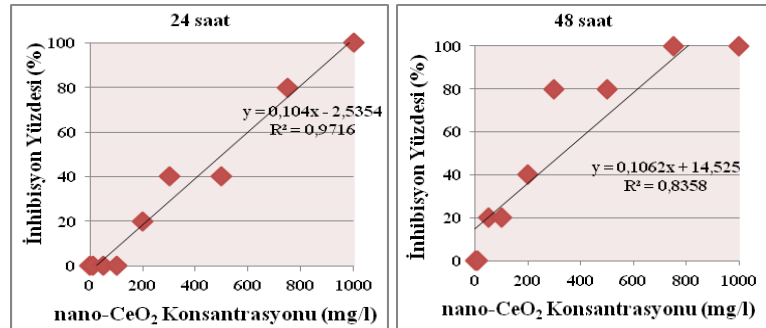
4.1.7 Balık (*Iepistes - Poecillia reticula*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano-CeO₂ nanopartikülünün artan konsantrasyonlarının balık üzerine inhibisyonu incelenmiştir. Balık olarak kullanılan *Iepistes - Poecillia reticula*'nin 24 ve 48 saat sonucu kontrole kıyasla canlı ve ölü sayıları Tablo 4.9'da yer almaktadır. Diğer yapılan akut toksisite testlerinden farklı olarak balık akut toksisite deneyinde daha yüksek konsantrasyonlar çalışılmıştır. 100 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonuna kadar kontrol grubuna kıyasla balık ölümleri 24 saat sonucunda gözlenmemiştir. Toksisite 200 mg/l'den sonra başlamış ; 200 mg/l'de 1 balık ölmüş ; 300 ve 500 mg/l nano-CeO₂ dozunda 2 balık ölmüş ; 1000 mg/l'ye çıkan nanopartikül dozunda kontrol grubuna kıyasla tüm balıklar inhibisyona uğramış hepsi ölmüştür (Tablo 4.9). 48 saat sonucunda 50 mg/l nano-CeO₂ dozuna kadar toksisite gözlenmemiş ve bu dozda 1 balık ölümü rapor edilmiştir (Tablo 4.9). 50 ve 100 mg/l'de 1 balık ölümü ; 200 mg/l'de 2 balık ölümü ; 300 mg/l'de 4 balık ölümü ve 750 ve 1000 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonunda balıkların tamamı inhibisyona uğramıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.9 Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu lepestes - *Poecillia reticula* sayıları

nano-CeO ₂ konsantrasyonu (mg/l)	Kontroldeki Balık Sayısı	24 saat sonucu		48 saat sonucu	
		Canlı Balık Sayısı	Ölü balık sayısı	Canlı Balık Sayısı	Ölü balık sayısı
1	5	5	0	5	0
10	5	5	0	5	0
50	5	5	0	4	1
100	5	5	0	4	1
200	5	4	1	3	2
300	5	3	2	1	4
500	5	3	2	1	4
750	5	1	4	0	5
1000	5	0	5	0	5

Şekil 4.20’de artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı lepestes - *Poecillia reticula*’lerin yüzde inhibisyonun grafiği yer almaktadır. 24 saat sonucunda 1 mg/l ile 100 mg/l arasındaki nano-CeO₂’in lepestes - *Poecillia reticula*’e karşı toksisitenin gerçekleşmediği , 200 mg/l’de % 20 inhibisyon ; 300 ve 500 mg/l’de % 40 inhibisyon ; 750 mg/l’de % 80 inhibisyon ve 1000 mg/l’de % 100 inhibisyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.20). 48 saat sonucunda 1 mg/l ve 10 mg/l nano-CeO₂ dozunda inhibisyon gerçekleşmiş ; 50 ve 100 mg/l ‘de % 20 inhibisyon ; 200 mg/l’de % 40 inhibisyon ; 300 ve 500 mg/l’de % 80 inhibisyon ; 750 ve 1000 mg/l’de % 100 gerçekleşmiş kontrol grubuna kıyasla tüm balıklar ölmüştür (Şekil 4.20). Nano-CeO₂ nanopartikülünün balıkların % 50’sine etki eden dozu (EC₅₀ Değeri) 24 saat sonucu EC₅₀ Değeri= 505,1 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ Değeri=334,7 mg/l Şekil 4.20’den hesaplanmıştır.



Şekil 4.20 Artan nano-CeO₂ konsantrasyonlarına karşı lepestes - *Poecillia reticula*’lerin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 505,1 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=334,7 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-CeO₂ konsantrasyonları ile lepestes – *Poecilia reticula* 'nın 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,962). Test sonucu Şekil 4.21'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0092 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0001 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0001 < 0,05).



Şekil 4.21 Lepistes – *Poecilia reticula*'nın ANOVA testi sonuçları

Nano-CeO₂'in lepestes - *Poecilia reticula* üzerine akut toksisitesinin çalışıldığı bir literatür saptanmamıştır.

4.1.8 Biyoayrışabilirlik Testi Sonuçları

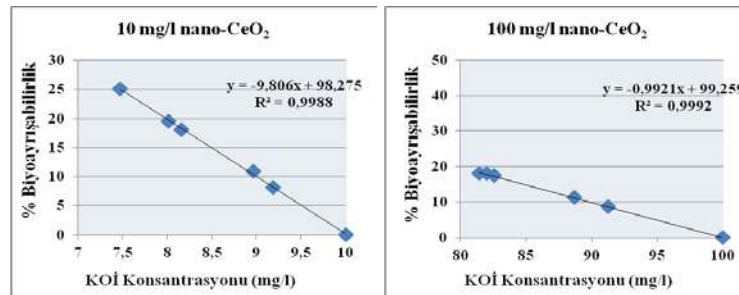
Bu bölümde Nano-CeO₂ nanopartikülünün canlı mikroorganizmalar kullanılarak biyoayrışabilirliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır, ayrıca alıcı ortama deşarj edildiğinde canlı ekosistem tarafından tolere edilebilmesi için hangi seyreltmede verilmesinin daha uygun olup olmadığı araştırılmıştır. Nano-CeO₂'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında % giderimleri 28 günlük süre boyunca belli zaman aralıklarında ölçülen KOİ değerleri ile hesaplanmıştır (Tablo 4.10). Başlangıç KOİ değerleri 10 ve 100 mg/l iken 5 ; 10 ; 15 ; 20 ve 28. günlerde azalan KOİ değerleri ölçülmüştür. t=0. günde KOİ değeri 10 mg/l iken 5. günde ölçülen KOİ 9,19 mg/l'e ; 10. günde ölçülen KOİ 8,97 mg/l ; 15. günde ölçülen KOİ 8,16 mg/l ; 20. günde

ölçülen KOİ 8,01 mg/l'ye 28. günün sonunda ölçülen KOİ ise 7,47 mg/l olarak ölçülmüştür (Tablo 4.10). t=0. günde KOİ değeri 100 mg/l iken ; 5. günde 91,26 mg/l ; 10. günde 88,7 mg/l ; 15.günde 82,59 mg/l ; 20. günde 81,99 mg/l ; 28. günün sonunda ise 81,43 mg/l olarak ölçülmüştür (Tablo 4.10). 28 gün boyunca aerobik ortamda aktif çamur mikroorganizmaları tarafından ortamdaki KOİ ayrıştırılmaktadır.

Tablo 4.10 28 gün boyunca nano-CeO₂'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonları için % biyoayrışabilirlik değerleri

Günler	10 mg/l nano-CeO ₂		100 mg/l nano-CeO ₂	
	KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	% Giderim	KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	% Giderim
t=0	10	0	100	0
t=5	9,19	8,1	91,26	8,74
t=10	8,97	10,9	88,7	11,3
t=15	8,16	18,1	82,59	17,41
t=20	8,01	19,5	81,99	18,01
t=28	7,47	25,1	81,43	18,57

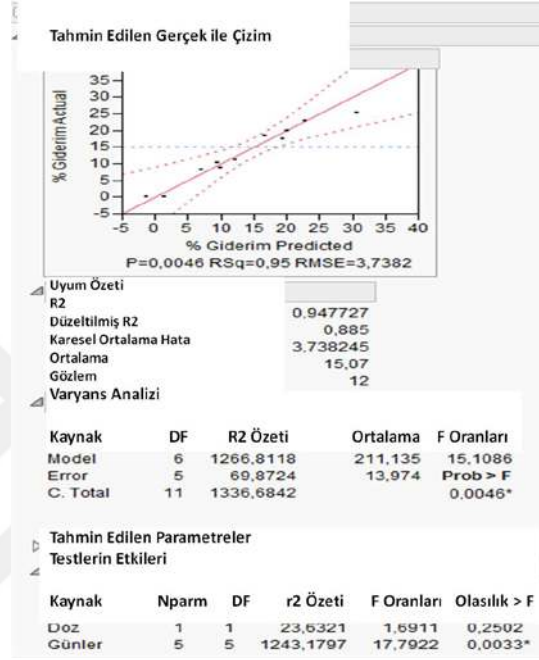
Şekil 4.22'de günlere karşı 10 mg/l ve 100 mg/l nano-CeO₂'in % biyoayrışabilirlik değerleri yer almaktadır. 10 mg/l başlangıç KOİ miktarı ortama konulan aerobik çamur bakteri tarafından ayrıştırıldığı için zaman arttıkça azalma gözlenmiştir. 5. günde % giderim % 8,1 iken ; 20. güne gelindiğinde % 19,5'e ; 28. günde % giderim % 25,1'a yükselmiştir. 100 mg/l başlangıç KOİ miktarı için 5. günde % giderim % 8,74 iken ; 20. güne gelindiğinde % 18,01'ye ; 28. günde % giderim % 18,57'ye yükselmiştir.



Şekil 4.22 10 ve 100 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonlarının 28 günlük % biyoayrışabilirlik değerleri

Yapılan ANOVA testinde artan nano-CeO₂ konsantrasyonları ile biyoayrışabilirlik testinin 10 ve 100 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonlarının günlere

karşı % giderimi arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,947$). Test sonucu Şekil 4.23'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda konsantrasyon ($P=0,2502 > 0,05$) değişkenin % giderime etkili olmadığı ; günler ($P=0,0033 < 0,05$) değişkeninin % giderim üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0046 < 0,05$).



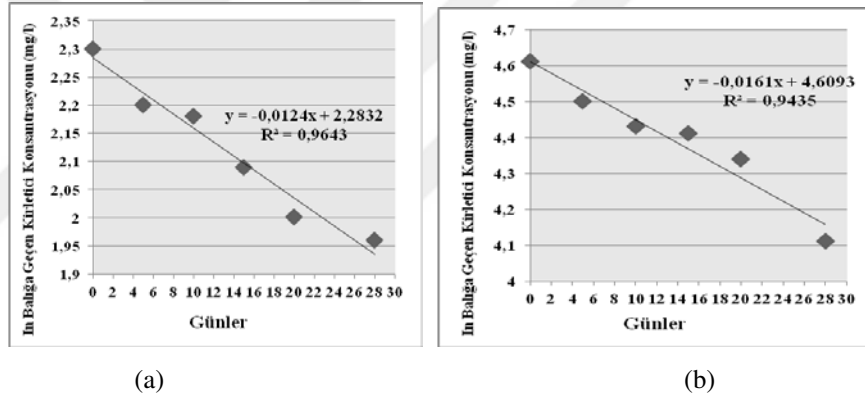
Şekil 4.23 Biyoayrışabilirlik testi'nin ANOVA testi sonuçları

Nano-CeO₂'in biyoayrışabilirliğini çalışmış bir literatür saptanmamıştır.

4.1.9 Biyoakümülyasyon Testi Sonuçları

Nano-CeO₂ nanopartikülünün farklı konsantrasyonlarının canlı organizmadaki salınım ve birikimin saptanması amaçlanmıştır. Canlı organizma olarak lepidotes - *Poecillia reticula* kullanılmış, 28 gün boyunca 10 ve 100 mg/l konsantrasyonundaki nanopartikülün KOİ değerleri ölçülmüş ve 28 günlük periyodun sonunda balıklar temiz suya alınıp, balıktan suya geçen KOİ değerleri 28 gün boyunca hesaplanmıştır. Tablo 4.11'de 28 gün boyunca nano-CeO₂'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları yer almaktadır. Biyoakümülyasyon faktörü (BCF) materyal metot bölümünde yer alan formüllere göre hesaplanır.

Tablo 4.11’de 10 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonunda 28 günlük periyotta sudan balığa geçen KOİ konsantrasyonları t=0. günde 10 mg/l iken 5. gün ; 10. gün ; 15. gün ; 20. gün ve 28. günde ölçülen KOİ değerleri sırasıyla 9,1 mg/l ; 8,9 mg/l ; 8,1 mg/l ; 7,4 mg/l ve 7,1 mg/l’dir. K₂ hesaplanmasında kullanılan C_{f1} (0. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması – lnKOİ=2,3 mg/l) ve C_{f2} (28. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması – lnKOİ=1,96 mg/l) değerleri Tablo 4.11’de yer almaktadır. Tablo 4.11.’deki formüllere göre k₂ değeri 5,9x10⁻³ gün⁻¹ olarak hesaplanır. K₁ hesaplamasında yer alan C_f değeri Şekil 4.24(a)’da yer alan grafikte 14. güne gelen lnKOİ 2,2 mg/l olarak bulunmaktadır ; C_w değeri ise balıktan suya geçen KOİ değerlerinin doğal logaritmalarından [C_w= C_{w2}-C_{w1} (mg/l) / (C_{w2}= 28.gün] (C_{w1}=0.gün)] 1,25 mg/l olarak hesaplandı. Materyal-metot bölümünde açıklanan formüle göre k₁ değeri 1,99x10⁻³ gün⁻¹ olarak hesaplanır. BCF değeri ise 0,33’tür.



Şekil 4.24 (a) : 10 mg/l nano-CeO₂ in günlere göre ln(Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri (C_f=2,2 mg/l) (b) : 100 mg/l nano-CeO₂ in günlere göre ln(Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri (C_f=4,38 mg/l)

100 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonunda 28 günlük periyotta sudan balığa geçen KOİ konsantrasyonları t=0. günde 10 mg/l iken 5. gün ; 10. gün ; 15. gün ; 20. gün ve 28. günde ölçülen KOİ değerleri sırasıyla 91 mg/l ; 84 mg/l ; 82 mg/l ; 77 mg/l ve 61 mg/l’dir. K₂ hesaplanmasında kullanılan C_{f1} (0. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması – lnKOİ=4,61 mg/l) ve C_{f2} (28. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması – lnKOİ=4,11 mg/l) değerleri Tablo 4.11’de yer almaktadır. Materyal metot bölümündeki formüllere göre k₂ değeri 4,2 gün⁻¹ olarak hesaplanır. K₁ hesaplamasında yer alan C_f değeri Şekil 4.24(b)’de yer alan grafikte 14. güne gelen lnKOİ 4,38 mg/l olarak bulunmaktadır ;

C_w değeri ise balıktan suya geçen KOİ değerlerinin doğal logaritmalarından [$C_w = C_{w2} - C_{w1}$ (mg/l) / ($C_{w2} = 28$.gün) ($C_{w1} = 0$.gün)] 1,47 mg/l olarak hesaplandı. Materyal-
metot bölümünde açıklanan formüle göre k_1 değeri 0,225 gün⁻¹ olarak hesaplanır. BCF değeri ise 38,13'tür.

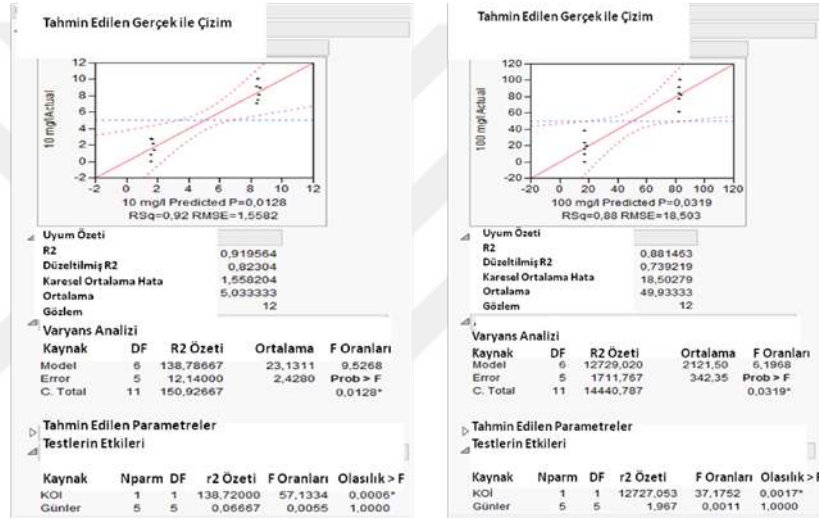
Tablo 4.11 28 gün boyunca nano-CeO₂'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları

10 mg/l nano-CeO ₂				
Günler	Numuneden Balığa Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)	Balıktan Suya Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)
t=0	10	2,30	0	0
t=5	9,1	2,20	0,8	-0,22
t=10	8,9	2,18	1,4	0,09
t=15	8,1	2,09	2,1	0,34
t=20	7,4	2,001	2,7	0,99
t=28	7,1	1,96	2,8	1,03
100 mg/l nano-CeO ₂				
Günler	Numuneden Balığa Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)	Balıktan Suya Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)
t=0	100	4,61	0	0
t=5	91	4,5	8,9	2,17
t=10	84	4,43	15,1	2,77
t=15	82	4,41	19,5	2,71
t=20	77	4,34	22,6	3,12
t=28	61	4,11	38,1	3,64

Lepistes - *Poecillia reticula* bünyesinde nanopartikülün akümüle olup olmadığına dayalı bu testte OECD'de yer alan kriter BCF eğer 10'dan küçük ise nanopartikül içeren örnek balık bünyesinde akümüle olmamıştır, eğer BCF değeri 10'dan büyük ise balık bünyesinde nanopartikülün akümüle olduğunu gösteriyor (OECD 305, 2012). 10 mg/l nano-CeO₂ için BCF değeri 0,33 ; 100 mg/l nano-CeO₂ için BCF değeri 38,13'tür. 10 mg/l nanopartikül konsantrasyonunda balık bünyesinde biyoakümüle olmadığı, 100 mg/l konsantrasyonunda ise biyakümüle olduğunu göstermektedir.

Yapılan ANOVA testinde artan nano-CeO₂ konsantrasyonları ile biyoakümüleasyon testinin 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarına günlere karşı sudan balığa geçen KOİ konsantrasyonu ile balıktan suya geçen KOİ konsantrasyonları arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (10 mg/l için: R=0,919 ; 100 mg/l için:

R=0,881). Test sonucu Şekil 4.25'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. 10 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonu için: yapılan varyans analizi sonucunda günler ($P=1,0000 > 0,05$) değişkeninin etkili olmadığı ve KOI (Sudan balığa geçen ve Balıktan suya geçen) ($P=0,0006 < 0,05$) değişkeninin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0128 < 0,05$). 100 mg/l nano-CeO₂ konsantrasyonu için: yapılan varyans analizi sonucunda günler ($P=1,0000 > 0,05$) değişkeninin etkili olmadığı ve KOI (Sudan balığa geçen ve Balıktan suya geçen) ($P=0,0017 < 0,05$) değişkeninin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0001 < 0,05$).



Şekil 4.25 Biyoakümülayon testi'nin ANOVA testi sonuçları (10 mg/l ve 100 mg/l için)

4.1.10 Nano-CeO₂'in Farklı Trofik Seviyelerindeki EC₅₀ Değerlerinin Karşılaştırılması

Nano-CeO₂'in prokaryot canlı olan ; bakteri (*Escherichia coli* ; *Bacillus cereus* ; *Vibrio fischeri* ; Metan Archae Bakterisi) , ökaryot canlı olan ; maya - (*Candida albicans*) ; küf - *Aspergillus niger* , alg (*Chlorella sp.*) , Crustacea (*Daphnia magna*) ve lepidistes - *Poecillia reticula* olmak üzere 6 farklı trofik seviye üzerine 9 farklı akut toksisite deneyi yapılmıştır. Farklı beslenme seviyelerindeki canlıların nano-CeO₂'e karşı farklı toksik cevapları oluşmuştur. Tablo 4.12'de yer alan EC₅₀ değerlerine göre ; en düşük EC₅₀ değerine (24 saat sonucu EC₅₀= 12,07 mg/l) sahip olan *Chlorella sp.* – alg nano-CeO₂'e en hassas organizmadır ($P=0,0001 < 0,05$). En yüksek EC₅₀

değerine sahip olan lepestes - *Poecillia reticula* (24 saat sonucu $EC_{50}=505,1\text{mg/l}$) nano-CeO₂'e en dirençli organizmadır ($P=0,0001 < 0,05$).

Tablo 4.12 Nano-CeO₂'in farklı trofik seviyelerindeki EC_{50} değerleri

	EC_{50} Değerleri (mg/l)			
	30 dakika sonucu	24 saat sonucu	48 saat sonucu	72 saat sonucu
Bakteri - <i>E.coli</i>	-	42,2	28,9	-
Bakteri - <i>B.cereus</i>	-	18,5	15,1	-
Bakteri - <i>V.fischeri</i>	39,973	-	-	-
Bakteri – Metan Archae	-	58,5	43,2	-
Maya – <i>C.albicans</i>	-	91,4 (EC_{40})	87,6	-
Küf – <i>A.niger</i>	-	43,8	31,2	-
Alg – <i>Chlorella sp.</i>	-	12,07	8,1	7,35
Crustacea – <i>D.magna</i>	-	70,9	20,8	-
Balık – lepestes - <i>Poecillia reticula</i>	-	505,1	334,7	-

4.2 Nano-ZnO ile Yapılan Akut Toksikite Çalışmaları

4.2.1 Bakteri (*Escherichia coli* – *Bacillus cereus*) Akut Toksikite Testi Sonuçları

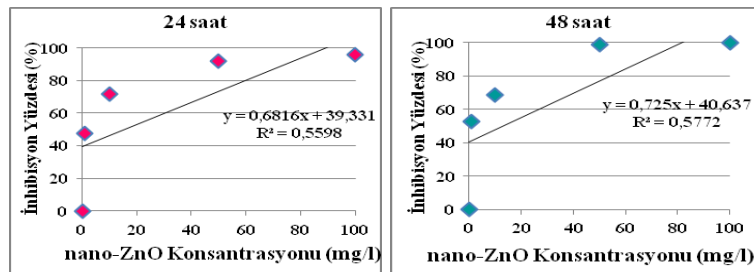
Nano-ZnO nanopartikülünün bakteri üzerine akut toksisitesi iki farklı bakteri ile çalışılmış olup ; bu bakteriler gram negatif özelliğe sahip olan *Escherichia coli* bakterisi ile gram pozitif özelliğe sahip *Bacillus cereus* bakterisidir. Tablo 4.13'de artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu canlı kalan *E.coli* bakterisinin sayıları yer almaktadır. Kontrol grubundaki bakteri sayıları başlangıçta 25 adet/koloni iken 24 saat sonucunda sayıları 85000 ; 85000 ; 84000 adet koloni/ml'ye yükselmiştir (Tablo 4.13). 24 saat sonunda 1 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda bakteri sayıları 44000 ; 43000 ; 45000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda 24000 ; 23000 ; 25000 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda 7000 ; 6000 ; 8000 adet koloni/ml'ye ve 100 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda 3500 ; 3000 ; 4000 ; 3500 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.13). 48 saat sonucunda nano-ZnO'in *E.coli* üzerine inhibisyonu artmış ; kontrol grubunda 87000 ; 89000 ; 91000 adet koloni/ml iken 1 mg/l nano-

ZnO konsantrasyonunda bu sayı neredeyse yarı yarıya düşmüş, 43000 ; 44000 ; 45000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda 28000 ; 27000 ; 29000 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l'de 10000 ; 11000 ; 9000 adet koloni/ml'ye ve 100 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda ise *E.coli*'nin tamamı inhibe olmuştur.

Tablo 4.13 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu canlı *Escherichia coli* bakterilerinin sayıları

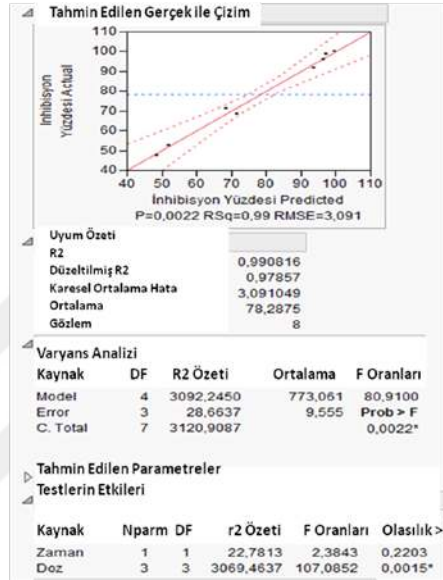
nano-ZnO	CANLI <i>E.coli</i> BAKTERİ SAYILARI (adet koloni /ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	85000	85000	82000	84000	87000	89000	91000	89000
1 mg / l	44000	43000	45000	44000	43000	44000	45000	44000
10 mg / l	24000	23000	25000	24000	28000	27000	29000	28000
50 mg / l	7000	6000	8000	7000	10000	11000	9000	10000
100 mg / l	3500	3000	4000	3500	0	0	0	0

Şekil 4.26'daki grafiklerde 24 ve 48 saat sonucu artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı *Escherichia coli* bakterisinin inhibisyon yüzdeleri yer almaktadır. 48 saat sonucunda *E.coli* bakterisi nano-ZnO'nun 50 ve 100 mg/l konsantrasyonlarına maruz kaldığında % 98 ve % 100 oranında inhibisyona uğramışlardır. 24 saat sonucunda minimum dozda (1 mg/l) inhibisyon oranı % 47,6 iken 48 saat sonucunda bu oran artmış % 52,6'ya ulaşmış, kontrol grubuna kıyasla neredeyse yarısı inhibe olmuştur (Şekil 4.26). *E.coli* bakterisinin % 50'sine etki eden doz – EC₅₀ değeri 24 saat için 15,6 mg/l ; 48 saat için 12,94 mg/l olarak Şekil 4.26'dan hesaplanmaktadır. Nano-ZnO'a ilk maruz kaldığı andan itibaren inhibisyona uğrayan *E.coli* bakterisinin 24 saat için EC₅₀ değeri ile 48 saat için EC₅₀ değeri birbirine yakındır.



Şekil 4.26 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı *Escherichia coli* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 15,6 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 12,9 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-ZnO konsantrasyonları ile *E.coli*'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,990$). Test sonucu Şekil 4.27'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,22 > 0,05$) değişkeninin etkili olmadığı ; konsantrasyon ($P=0,0015 < 0,05$) değişkeninin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0022 < 0,05$).



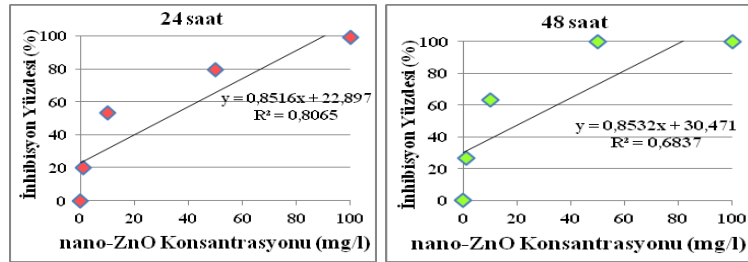
Şekil 4.27 *E.coli*'nin ANOVA testi sonuçları

Diğer akut toksisitesi çalışılan gram pozitif özelliğe sahip bakterisi *Bacillus cereus*'un artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı canlı *B. cereus* bakterisi sayılarının 24 ve 48 saat sonuçları Tablo 4.14'de verilmiştir. 24 saat sonucunda kontrolde üreyen *B.cereus* kolonileri 15000 ; 14000 ; 14900 adet koloni/ml iken, 1 mg/l nanopartikülüne maruz kaldığında bu sayı 11000 ; 12000 ; 13000 adet koloni/ml'ye düşmüştür. 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-ZnO konsantrasyonlarında kontrole kıyasla canlı bakteri sayıları gittikçe azalmakta ; 100 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda 150 ; 151 ; 149 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.14). 48 saat sonucunda ise kontrolde üreyen canlı bakteri sayıları 19000 ; 19500 ; 19200 adet koloni/ml iken 10 mg/l nano-ZnO dozunda nanopartiküle maruz kalan *B.cereus* bakterisinin canlı hücre sayısı 7000 ; 7100 ; 7200 adet koloni/ml'ye düşmekte, 50 mg/l ve 100 mg/l nanopartikül dozunda ise inhibisyon % 100 gerçekleşmektedir (Tablo 4.14).

Tablo 4.14 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Bacillus cereus* bakterilerinin sayıları

nano-ZnO	CANLI <i>B.cereus</i> BAKTERİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	15000	15100	14900	15000	19000	19500	19100	19200
1 mg / l	11000	12000	13000	12000	14000	14100	14200	14100
10 mg / l	7000	7100	6900	7000	7200	7100	7000	7100
50 mg / l	3100	3000	3200	3100	0	0	0	0
100 mg / l	150	151	149	150	0	0	0	0

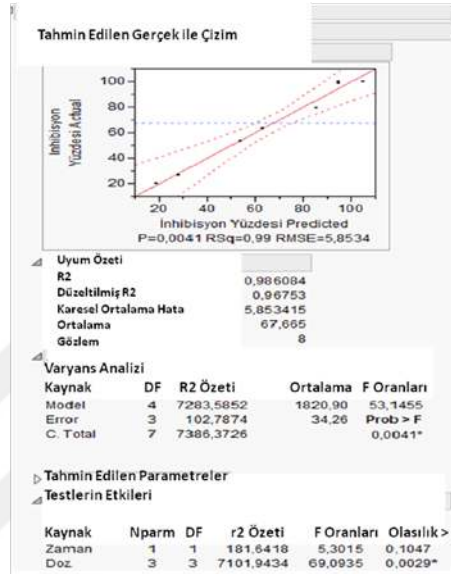
B.cereus bakterisinin artan nanopartikül dozlarına karşın 24 ve 48 saat sonundaki inhibisyon yüzdeleri Şekil 4.28’de grafik şeklinde gösterilmektedir. Nano-ZnO nanopartikülünün 24 saat sonucunda ; 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l dozlarında *B.cereus* bakterisine olan inhibisyon yüzdeleri sırasıyla ; % 20 ; % 53,3 ; % 79,3 ; % 99’dur. 24 saat sonucunda *B.cereus* bakterisinin kontrol grubuna kıyasla maksimum dozda (100 mg/l) hemen hemen tamamı inhibisyona uğramıştır. 48 saat sonucunda yukarıdaki dozlarda inhibisyon yüzdeleri sırasıyla ; % 26,7 ; % 63,02 ; % 100 ve % 100 olarak gerçekleşmiştir. 50 mg/l ve 100 mg/l nano-ZnO konsantrasyonlarında *B.cereus* bakterisine inhibisyon % 100 olarak gerçekleşmiş, kontrol grubuna kıyasla tüm bakteriler ölmüştür. Şekil 4.28’den hesaplanabilen *B.cereus* bakterisinin % 50’sini etkileyen doz ; EC₅₀ değeri 24 saat için 15,6 mg/l ; 48 saat için 22,8 mg/l nano-ZnO olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.28 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı *Bacillus cereus* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 31,8 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 22,8 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-ZnO konsantrasyonları ile *B.cereus*’nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu

saptanmıştır ($R=0,986$). Test sonucu Şekil 4.29’da yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,1047 > 0,05$) değişkeninin etkili olmadığı ; konsantrasyon ($P=0,0029 < 0,05$) değişkeninin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0041 < 0,05$).



Şekil 4.29 *B.cereus*'un ANOVA testi sonuçları

Nano-ZnO nanopartikülünün iki farklı bakteri ile yapılan akut toksisite çalışması kıyaslandığında ; *E.coli*'nin % 50'sini etkileyen doz - EC_{50} değeri - 24 saat için: 15,6 mg/l ; 48 saat için: 12,9 mg/l olarak hesaplanmıştır. *B.cereus* bakterisi için EC_{50} değerleri 24 saat için: 31,8 mg/l ; 48 saat için 22,8 mg/l olarak hesaplanmıştır. İki bakterinin EC_{50} değerlerini kıyasladığımızda *E.coli*'nin daha az dozlarda daha çok inhibisyona uğradığını düşük EC_{50} değerlerinden dolayı söyleyebiliriz. Gram negatif bakteri olan *E.coli*, gram pozitif bakteri olan *B.cereus* bakterisine oranla nano-ZnO nanopartikülüne karşı daha hassastır.

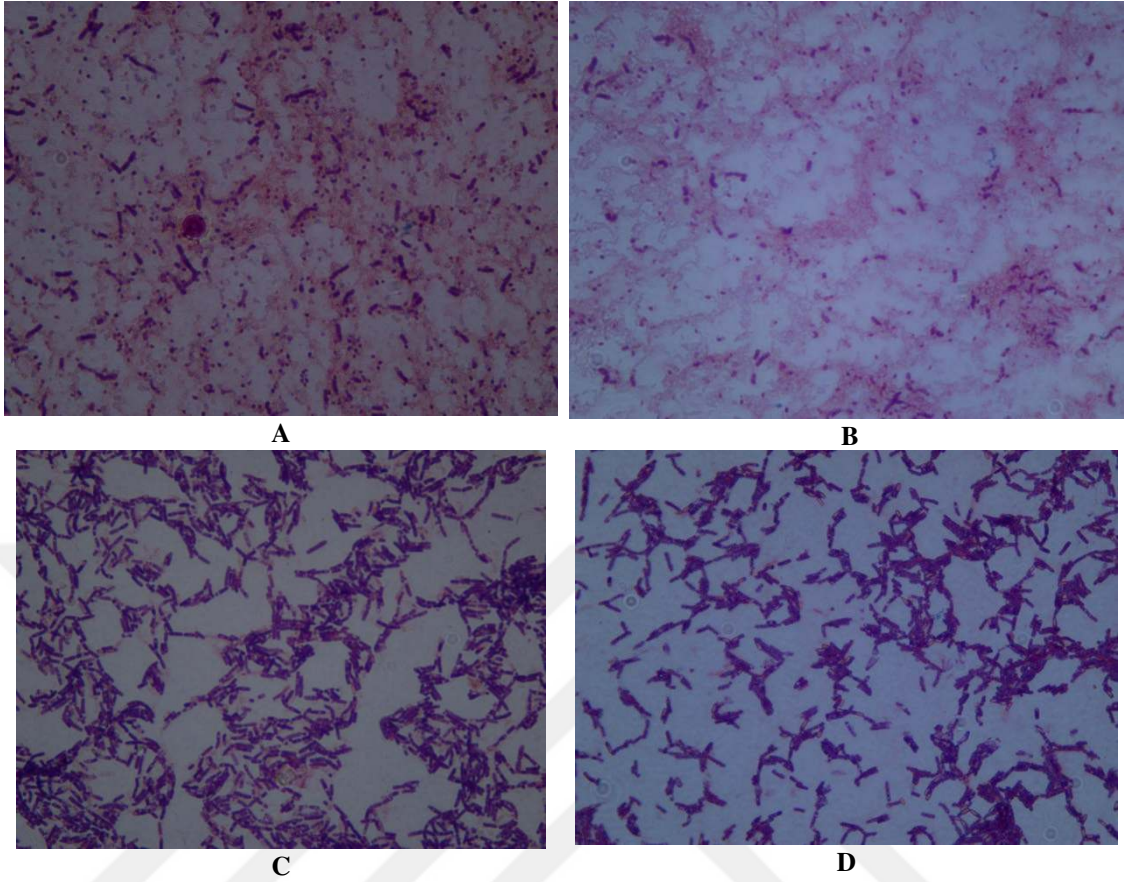
Şekil 4.30(a)'da *Escherichia coli* kolonilerinin nutrient agar ortamında artan nano-ZnO konsantrasyonlarında kontrole kıyasla azaldığı görülmektedir. 48 saat sonucunda kontrol petrisinde *E.coli* kolonileri oldukça yoğun iken, 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l konsantrasyonlarında 48 saat nanopartiküle maruz kalan *E.coli* bakterisinin sayısı epey azalmış ve 100 mg/l dozunda tamamı inhibisyona uğramıştır.

Şekil 4.30(b)'de ise *Bacillus cereus*'in nutrient agar ortamındaki koloni sayıları görülmektedir. 48 saat boyunca nano-ZnO nanopartikülünün 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l konsantrasyonlarına *B.cereus* kolonileri maruz kalmış ve nutrient agar ortamına pasajı yapıp canlı *B.cereus* kolonileri sayılmıştır. *B.cereus* bakterisi 50 mg/l ve 100 mg/l nano-ZnO konsantrasyonlarına 48 saat maruz kaldıktan sonra nutrient agar ortamına seyreltme plaka yöntemi ile pasajı yapılmış ve bakterilerin tamamı inhibisyona uğramıştır.



Şekil 4.30 (a): Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı *Escherichia coli* bakteri sayılarının değişimi ; (b): artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı *Bacillus cereus* bakteri sayılarının değişimi

Şekil 4.31'de *Escherichia coli* ve *Bacillus cereus* bakterilerinin gram boyama sonucu görüntüleri yer almaktadır. A ve B görüntüleri *E.coli* bakterisine ait olup ; A görüntüsü nanopartiküle hiç maruz kalmamış kontrol grubu bakteri kolonilerinin gram boyama sonucundaki görüntüsü B ise maksimum doz olan 100 mg/l nanopartikül konsantrasyonuna 48 saat boyunca maruz kalmış bakteri kolonilerinin gram boyama sonucundaki görüntüsüdür. Kontrol grubunda *E.coli* kolonileri gram negatif çubuk bakteriler ile 100 mg/l nanopartiküle 48 saat boyunca maruz kalmış bakterilerinin gram boyama görüntüsü kıyaslandığında nanopartiküle maruz kalmış bakterilerinin şekillerinde 0,1 µm büyümeler görülmektedir.



Şekil 4.31 *Escherichia coli* ve *Bacillus cereus* bakterisinin gram boyama sonucu görüntüleri (A: Kontrol grubundaki *E.coli* bakterisinin gram boyama sonucu ; B: nano-ZnO nanopartikülüne 48 saat maruz kalan *E.coli* bakterisinin gram boyama sonucu ; C: Kontrol grubundaki *B.cereus* bakterisinin gram boyama sonucu ; D: nano-ZnO nanopartikülüne 48 saat maruz kalan *B.cereus* bakterisinin gram boyama sonucu)

Baek ve An (2011) nano-ZnO nanopartikülünün *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*'e karşı toksisitesini çalışmışlar ; 24 saat sonucunda *E.coli* için EC_{50} değerini 115,7 mg/l, *B.subtilis* için EC_{50} değerini 85,8 mg/l olarak saptamıştır. Pasquet ve ark., (2014) nano-ZnO'nin 5 mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlar ve 24 saat sonucunda *Escherichia coli* için minimum bakteriyosidal konsantrasyonunu (MBC) 1,44 mg/l olarak bulmuşlardır. Gram pozitif bakteri olarak *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* çalışılmış, *S.aureus* için 24 saat sonunda MBC değeri 1,72 mg/l *P.aeruginosa* için 1,81 mg/l olarak saptanmıştır. Jiang ve ark., (2009) nano- Al_2O_3 , nano- SiO_2 , nano- TiO_2 ve nano-ZnO

nanopartiküllerinin *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* bakterisine olan toksisitesini çalışmışlardır. Nano-ZnO'in en çok toksik etki gösterdiğini ve 24 saat sonucu 20 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunun tüm bakterileri öldürdüğünü rapor etmişlerdir. Dasari ve ark., (2013) nano-ZnO'in *E.coli*'ye olan toksisitesi çalışmışlar ve 30 dakika boyunca 0,01 ; 0,25 ; 0,5 ; 2,5 ; 5; 7,5 mg/l nano-ZnO'e maruz bırakılan *E.coli*'nin LC₅₀ değerini (Lethal Concentration/Öldürücü Doz) 0,048 mg/l olarak saptamışlardır . Farklı EC₅₀ ve LC₅₀ değerleri nanopartikülün farklı kimyasal formları, agregasyonu ya da iyonik kompozisyonlarındaki farklılıklar nedeni ile olmuş olabilir.

Nano-ZnO'in *E.coli* ve *B.cereus*'a olası toksisite mekanizmalarına baktığımızda ; Kahru ve ark., (2008) yaptıkları çalışmada; nanopartiküllerin ışık altında ROS (Reactive Oxygen Species/Reaktif Oksijen Türleri) ve metal iyonu salınımı yaptıklarını saptamışlardır. Buna ek olarak biyotik ve abiyotik bir çok çevresel faktor nanopartikülün ROS üretimini etkilemektedir. Nanopartikülün toksisitesi, partikülün agregasyonu ve kimyasal stabilizasyonu gibi bir çok etkene bağlı olabilir (Auffan ve ark. 2009). Li ve ark., (2011) 5 farklı ortamda [(ultrasaf su, % 0,85 NaCl, Fosfat Tamponu (PBS), minimal Davis (MD) ve Luria-Bertani (LB)] nano-ZnO'in *E.coli*'ye karşı toksisite mekanizmalarını araştırmışlar ve serbest çinko iyonları ve çinko komplekslerinin toksisiteye neden olduğunu rapor etmişler.

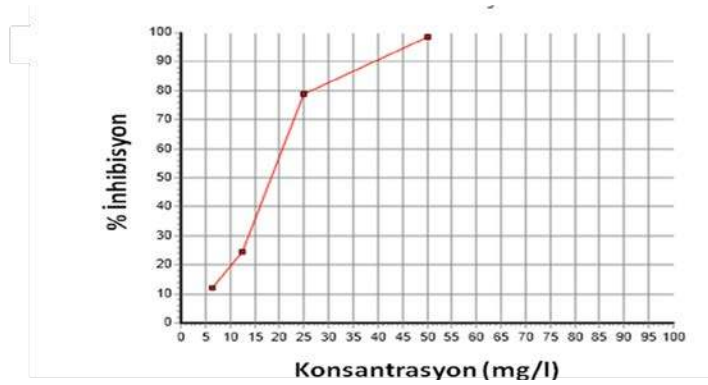
4.2.2 Bakteri (*Vibrio fischeri*) Biyoluminesans Değerine Göre Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano-ZnO'in artan konsantrasyonlarına karşı biyoluminesans bakterisi olan *Vibrio fischeri* 'nin luminesans değeri ölçülmüştür. *Vibrio fischeri* bakterisinin nano-ZnO'e maruz kaldığı süre arttıkça, luminesans değerinin azaldığı ve toksisitenin arttığı görülmektedir. Mikrotox deneyi nano-ZnO'in 100 mg/l stok çözeltisi hazırlanmış, % 3'lük NaCl ile seyreltmeler yapılmış Lumistox 300 (Hach Lange) ile bakterinin luminesans değeri ölçülmüştür. Yapılan seyreltmelerin en düşüğü 3,125 mg/l'de ölçülen inhibisyon % 7,16 ; 6,25 mg/l nano-ZnO dozunda % 11,91; 12,5 mg/l 'de % 24,39 ; 25 mg/l'de % 78,85 ; 50 mg/l'de % 98,40 ; 100 mg/l nano-ZnO dozunda % 99,99 inhibisyon gerçekleşmiştir (Tablo 4.15).

Tablo 4.15 30 dakika sonucu Nano-ZnO nanopartikülünün artan konsantrasyonlarına karşı *Vibrio fischeri* – biyoluminesans bakterisinin yüzde inhibisyon değerleri

Nano-ZnO Konsantrasyonları (mg/l)	% İnhibisyon
3,125 mg/l	7,16
6,25 mg/l	11,91
12,5 mg/l	24,39
25 mg/l	78,85
50 mg/l	98,40
100 mg/l	99,99

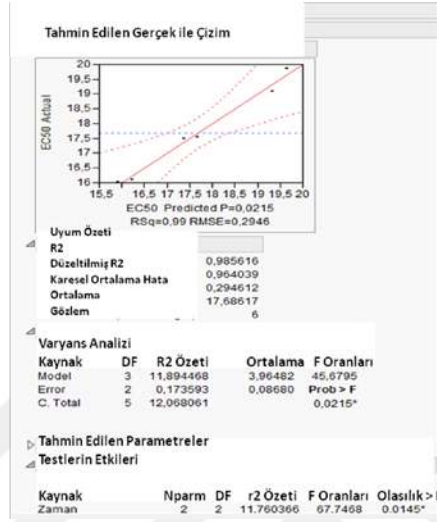
Şekil 4.32’de Mikrothox deneyinin sonucunda Lumistox 300 cihazından alınan grafik yer almaktadır. Nano-ZnO nanopartikülünün *Vibrio fischeri* bakterisinin % 50’sine etki eden dozu (EC_{50} Değeri) 30 dakika sonucunda 16,097 mg/l olarak hesaplanmıştır. *Vibrio fischeri* biyoluminesans bakterisi nano-ZnO’ye 5 dakika maruz kaldığındaki EC_{50} değeri 19,87 mg/l ; 15 dakika maruz kaldığındaki EC_{50} değeri 17,54 mg/l’ye düşmüştür. Bakterinin nanopartiküle maruz kalma süresi arttıkça EC_{50} değerinde bir azalma gözlenmiş ve bakterinin nanopartiküle olan hassasiyeti artmıştır. Akut toksisitesi çalışılan diğer bakteri türleri *E.coli* ve *B.cereus*’a baktığımızda 24 saat için *E.coli*’nin EC_{50} değeri ; 2,5 mg/l, *B.cereus*’un EC_{50} değeri ; 3 mg/l olarak bulunmuştur. *Vibrio fischeri* bakterisi için 30 dakika sonucu % 50’sini etkileyen dozu 16,097 mg/l iken 24 saat nano-ZnO nanopartikülüne maruz kalan bakterilerin daha düşük EC_{50} değerlerine sahip olduğu, maruziyet süresi arttıkça bakterinin hassasiyetinin arttığı saptanmıştır



Şekil 4.32 Nano-ZnO’ın artan konsantrasyonlarına karşı yüzde inhibisyon değerleri (EC_{50} değeri=16,097 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-ZnO konsantrasyonları ile *Vibrio fischeri* bakterisinin 5. ; 15. ve 30. dakikalarındaki EC_{50} değerlerinin arasındaki ilişkinin

lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,985$). Test sonucu Şekil 4.33'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0145 < 0,05$) değişkeninin EC_{50} değerleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0215 < 0,05$).



Şekil 4.33 *Vibrio fischeri* bakterisinin ANOVA testi sonuçları

Nano-ZnO ve biyoluminesans bakterisi *Vibrio fischeri* ile yapılan toksisite çalışmalarına baktığımızda ; Heinlaan ve ark., (2008) nano-ZnO'nin *V.fischeri* bakterisine olan toksisitesini çalışmışlar ve 30 dakika sonucunda EC_{50} değerini 1,9 mg/l ; 8 saat boyunca maruz kalan *V.fischeri* bakterisi için MIC (Minimum İnhibe eden Konsantrasyonu) değerini 100 mg/l olarak rapor etmişlerdir. Mortimer ve ark., (2008) nanopartiküllerin *V.fischeri* bakterisinin biyoluminesansına olan toksik etkisini araştırmışlardır ve 30 dakika sonucunda nano-ZnO'nin EC_{50} değerini 4,8 mg/l ve 3,8 mg/l olarak bulmuşlardır. Yukarıdaki literatür sonuçları ile yapılan tez çalışmalarında bulunan EC_{50} sonuçları farklıdır, Heinlaan ve ark., (2008) ; Mortimer ve ark., (2008) sırasıyla EC_{50} değerlerini 1,9 mg/l ve 4,8 mg/l olarak rapor etmişler, bu tez çalışmasında ise 30 dakika sonucu *V.fischeri* bakterisinin EC_{50} değeri 16,097 mg/l olarak bulunmuştur. Binaeian ve Soroushnia (2013) tarafından yapılan çalışmada ise, saptadığımız EC_{50} değerine yakın bir sonuç rapor etmişlerdir ; 30 dakikalık maruz kalma süresinden sonra nano-ZnO'nin *V.fischeri* bakterisi için EC_{50} değeri 10,24 mg/l'dir. Bunun nedeni ; bakterinin karşılaştığı çevresel etkiler (pH, sıcaklık, seyreltme çözeltilerindeki katyon ve anyonlar) ile Microtox cihazından

kaynaklanan belirsizlik ölçümü ve bakterinin saklanması ile ilgili bazı genetiksel özellikler olabilir.

4.2.3 Anaerobik Bakteri Kullanılarak Metan Gazı Ölçümlerine Dayalı Toksisite Testi (ATA-Anaerobik Toksisite Testi) Sonuçları

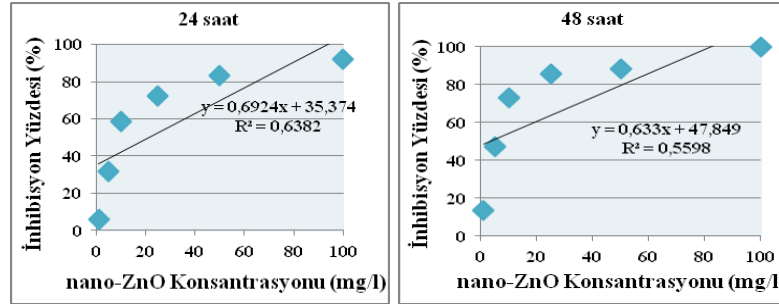
Nano-ZnO nanopartikülünün artan konsantrasyonlarının, anaerobik bakterilere toksik etki yapıp yapmadığı ATA-Anaerobik Toksisite Testi ile incelenmiştir. 150 ml'lik steril kapaklı şişelerde artan nanopartikül konsantrasyonlarında metan gazı ölçümleri yapılmıştır. Kontrol grubunda sadece substrat olarak glukoz bulunurken, diğer şişelerde 1 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 mg/l nano-ZnO nanopartikülü konularak inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonucunda kontrol grubunda oluşan CH₄ gazı miktarı 15 ml iken , 1 mg/l nano-ZnO dozunda 14,1 ml ; 5 mg/l nano-ZnO dozunda 10,02 ml ; 10 mg/l nano-ZnO dozunda 6,2 ml ; 25 mg/l nano-ZnO dozunda 4,1 ml ; 50 mg/l konsantrasyonunda 2,5 ml ve 100 mg/l nano-ZnO dozunda metan gazı miktarı 1,2 ml'ye düşmüştür (Tablo 4.16). 48 saat sonucunda kontrol grubunda 16 ml CH₄ gazı oluşurken 1 mg/l ; 5 mg/l ; 10 mg/l ; 25 mg/l ve 50 mg/l nano-ZnO dozunda sırasıyla metan gazı miktarları 13,8 ml ; 8,4ml; 4,3 ml ; 2,3 ml ; 1,9 ml'dir. 100 mg/l'de ise gaz ölçümü yapılamamıştır (Tablo 4.16).

Tablo 4.16 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu metan gazı miktarı ve inhibisyon yüzdesi

nano-ZnO	24 saat sonucu		48 saat sonucu	
	Metan Gazı Miktarı (ml)	İnhibisyon Yüzdesi (%)	Metan Gazı Miktarı (ml)	İnhibisyon Yüzdesi (%)
Kontrol	15	0	16	0
1 mg / l	14,1	6	13,8	13,7
5 mg / l	10,2	32	8,4	47,5
10 mg / l	6,2	58,6	4,3	73,1
25 mg / l	4,1	72,6	2,3	85,6
50 mg / l	2,5	83,3	1,9	88,1
100 mg / l	1,2	92	0	100

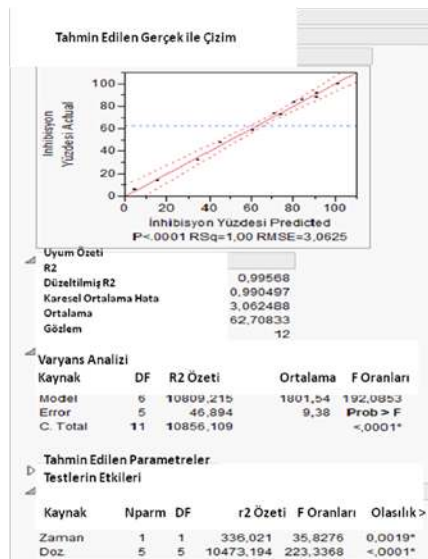
Şekil 4.34'te artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri yer almaktadır. Şekil 4.34'ten hesaplanabilen metan bakterilerinin % 70'ini inhibe eden EC₇₀ değeri 24 saat için 50,01 mg/l ; 48 saat için 34,99 mg/l'dir. 24 saat sonucunda 1 mg/l'den 100 mg/l'ye çıkan nanopartikül

konsantrasyonu anaerobik bakterilerin metan üretimini etkilemiş, inhibisyon oranı % 6'dan % 92'ye çıkmıştır (Tablo 4.16). 48 saat sonucunda ise bu inhibisyon artmış ve 1 mg/l için % 13,7 ; 5 mg/l için % 47,5 ; 10 mg/l için % 73,1 ; 25 mg/l için % 85,6 ; 50 mg/l için % 88,1 ve 100 mg/l için % 100'e yükselmiştir (Tablo 4.16).



Şekil 4.34 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₇₀ değeri= 50,01 mg/l; 48 saat sonucu EC₇₀ değeri= 34,99 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-ZnO konsantrasyonları ile anerobik metan Archae bakterilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,995$). Test sonucu Şekil 4.35'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0019 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0001 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0001 < 0,05$).



Şekil 4.35 Anaerobik metan Archae bakterilerinin ANOVA testi sonuçları

Literatür çalışmalarına baktığımızda Nyugen ve ark., (2015) nano-CeO₂ ve nano-ZnO'nin biyogaz üretimindeki toksisitesini araştırmışlar. 10 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda metan bakterilerine olan inhibisyonu 24 saat sonucu 34,8 mg/l olarak bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında 48 saat için bulunan EC₇₀ değeri 34,99 mg/l olarak saptanan nano-ZnO konsantrasyonuyla yakın bir sonuç olduğu görülmektedir. Luna-delRisco ve ark., (2011) nano-CuO ve nano-ZnO nanopartiküllerinin biyogaz üretiminde toksik etkisini araştırmış ve 14 günlük bir inkübasyon periyodu sonucu EC₅₀ değerini 57,3 mg/l olarak rapor etmişlerdir. Metan bakterisinin nano-ZnO'ya maruz kalma süresi arttıkça, nano-ZnO nanopartikülü daha yüksek dozlarda toksik etki göstermektedir. Bunun sebeplerinden biri bakterinin toksik çevre ortamını tolere edebilecek enzim salınımı ya da mikrobiyal metabolizmasına uyum sağlayacak şekilde ayarlaması gibi bir çok detoksifikasyon mekanizması ile adapte edebildiği olabilir (Gadd ve Griffiths, 1977).

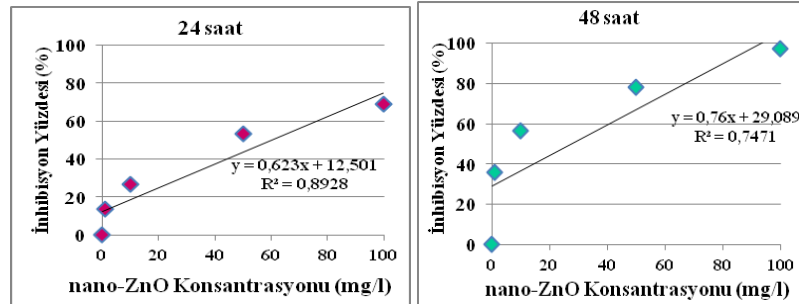
4.2.4 Maya (*Candida albicans*) - Küf (*Aspergillus niger*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano-ZnO nanopartikülünün akut toksisitesi maya (*Candida albicans*) ve küf (*Aspergillus niger*) olmak üzerine iki farklı organizma üzerinde çalışılmıştır. Tablo 4.17'de artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Candida albicans* maya kolonilerinin sayıları verilmektedir. Kontrol grubunda 24 saat sonucunda 165000 ; 164000 ; 166000 adet koloni/ml iken 1 mg/l nano-ZnO dozuna maruz kalan *C.albicans* kolonilerinin sayısı 135000 ; 134000 ; 163000 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l nano-ZnO dozunda 73000 ; 74000 ; 72000 adet koloni/ml'ye ; 100 mg/l nano-ZnO dozunda ise 48000 ; 47000 ; 49000 adet koloni' ml'ye düşmüştür (Tablo 4.17). 48 saat sonucunda ise kontrol grubunda 155000 ; 156000 ; 157000 adet koloni/ml iken 1 mg/l konsantrasyonunda maya kolonilerinin sayısı 106000 ; 105000 ; 107000 adet koloni/ml , maksimum doz 100 mg/l konsantrasyonunda canlı maya koloni sayıları 4000 ; 3000 ; 5000 adet koloni/ml'e düşmüştür (Tablo 4.17).

Tablo 4.17 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Candida albicans* maya kolonilerinin sayıları

nano-ZnO	CANLI <i>C.albicans</i> MAYA KOLONİSİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	165000	164000	166000	156000	155000	156000	157000	165000
1 mg / l	135000	134000	136000	135000	106000	105000	107000	106000
10 mg / l	114000	113000	115000	114000	73000	71000	72000	72000
50 mg / l	73000	74000	72000	73000	36000	35000	37000	36000
100 mg / l	48000	47000	49000	48000	4000	3000	5000	4000

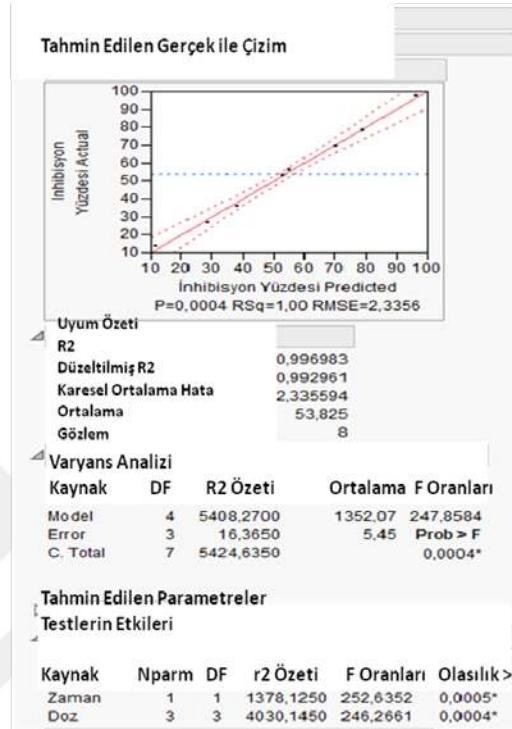
Şekil 4.36’da *Candida albicans* maya kolonilerinin 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerinde nano-ZnO’in artan konsantrasyonlarına karşın kontrole göre yüzde inhibisyonları gösterilmektedir. 24 saat sonucunda 1 mg/l nano-ZnO dozunda yüzde inhibisyon % 13,5 ; 10 mg/l , 50 mg/l ve 100 mg/l dozunda ise sırasıyla yüzde inhibisyon % 26,9 ; % 53,2 ; % 69,2’dir. 48 saat sonucunda ise 1 mg/l dozunda % 13,5’tan % 35,7’ye ; 10 mg/l dozunda % 26,9’dan % 56,4’e ; 50 mg/l dozunda % 53,2’den % 78,2’ye ve 100 mg/l nanopartikül dozunda inhibisyon % 69,2’den % 97,5’e yükselmiştir. Şekil 4.36’dan hesaplanabilen EC₅₀ değeri 24 saat sonucunda 60,2 mg/l iken 48 saat sonucunda 27,5 mg/l’a düşmüştür. Nano-ZnO’e maruz kaldığı süre arttıkça *Candida albicans* maya hücrelerinin hassasiyeti artmıştır.



Şekil 4.36 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı *Candida albicans* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 4.0 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 2.9 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-ZnO konsantrasyonları ile *C.albicans*’nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,996). Test sonucu Şekil 4.37’de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$

önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0005 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0004 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0004 < 0,05$).



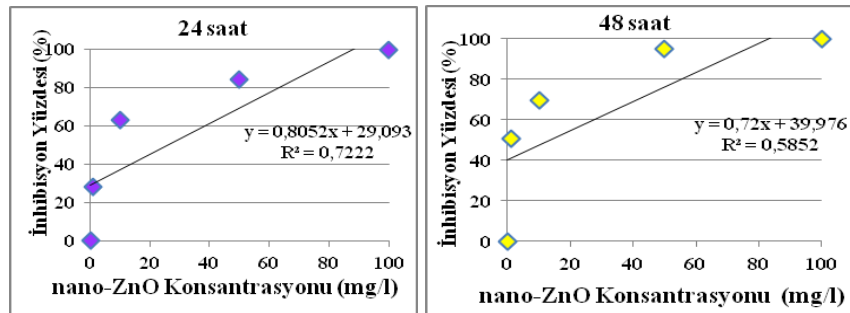
Şekil 4.37 *C.albicans*'in ANOVA testi sonuçları

Akut toksisitesi çalışılan diğer mikroorganizma ise küf (*Aspergillus niger*) 'tür. Tablo 4.18'de artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Aspergillus niger* küf kolonilerinin sayıları verilmektedir. Kontrol grubunda 24 saat sonucunda *A.niger* kolonileri 57000 ; 58000 ; 56000 adet koloni/ml iken 1 mg/l nanopartikül dozuna maruz kalan küf kolonilerinin sayısı 41000 ; 40000 ; 42000 adet koloni/ml'ye, en yüksek nanopartikül dozu olan 100 mg/l nano-ZnO'e maruz kalan *A.niger* kolonilerinin sayısı 200 ; 210 ; 220 adet koloni/ml'e düşmüştür (Tablo 4.18). 48 saat sonucunda kontrol grubundaki küf kolonilerinin sayısı 63000 ; 64000 ; 62000 adet koloni/ml iken 1 mg/l nano-ZnO'e maruz kalan *A.niger* koloni sayısı 31000 ; 30000 ; 32000 adet koloni/ml'e ; 50 mg/l nano-ZnO dozunda 3000 ; 3100 ; 2900 adet koloni/ml'ye ve 100 mg/l nano-ZnO dozunda *A.niger* kolonilerin tamamı inhibe olmuştur (Tablo 4.18).

Tablo 4.18 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Aspergillus niger* - küf kolonilerinin sayıları

nano-ZnO	CANLII.A.niger KÜF KOLONİSİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	57000	58000	56000	57000	63000	64000	62000	63000
1 mg /l	41000	40000	42000	41000	31000	30000	32000	31000
10 mg /l	20000	23000	20000	21000	19000	18000	20000	19000
50 mg /l	9000	9100	8900	9000	3000	3100	2900	3000
100 mg /l	200	210	220	210	0	0	0	0

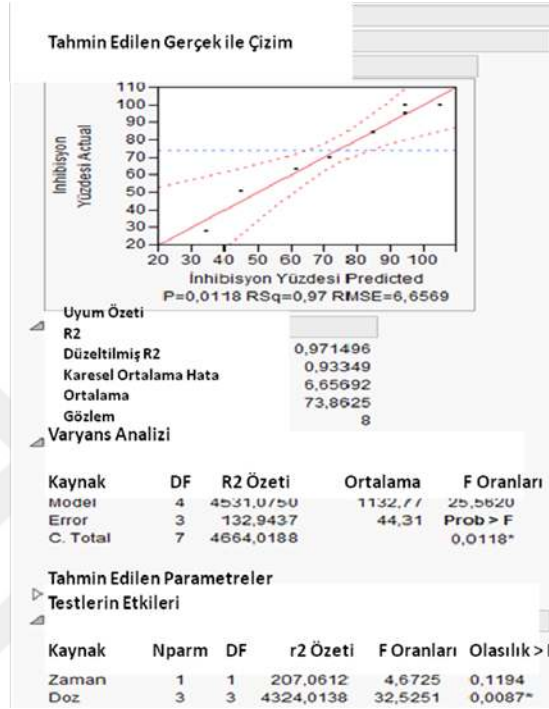
Şekil 4.38’de artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşın *A.niger* kolonilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki yüzde inhibisyonları görülmektedir. 1 mg/l konsantrasyonunda 24 saat sonucunda inhibisyon % 28,1 iken 48 saat sonucunda bu inhibisyon % 50,8’e çıkmaktadır. 10 mg/l nano-ZnO dozu 24 saat sonucunda küf kolonilerinin % 63,2’sini inhibe ederken, 48 saat sonucunda % 69,8’ini inhibe etmektedir. Nano-ZnO dozu 50 mg/l’den 100 mg/l’e çıkarıldığında inhibisyon 24 saat sonucunda % 99,6 ; 48 saat sonucunda inhibisyon % 100 olmaktadır. Şekil 4.38’den hesaplanabilen EC₅₀ değeri 24 saat sonucunda 25,9 mg/l iken 48 saat sonucunda 13,9 mg/l’a düşmüştür. Nano-ZnO’ye maruz kalan küf kolonileri konsantrasyon miktarları artıkça inhibisyonları artmıştır, maruz kalma süreleri artıkça küf kolonilerinin nanopartiküle olan hassasiyeti artmıştır.



Şekil 4.38 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı *Aspergillus niger* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu İnhibisyon Yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 25,9 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 13,9 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-ZnO konsantrasyonları ile *A.niger*’nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,971$). Test sonucu Şekil 4.39’da yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$

önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,1194 > 0,05$) değişkenine bağlı olmadığı ; konsantrasyon ($P=0,0087 < 0,05$) değişkeninin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0118 < 0,05$).



Şekil 4.39 *A.niger*'in ANOVA testi sonuçları

Şekil 4.40(a)'da potato dextrose agarda *Candida albicans* kolonilerini görülmektedir. Kontrol petrisindeki maya kolonileri ile 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-ZnO konsantrasyonlarındaki maya kolonilerini kıyasladığımızda 100 mg/l dozunda maya kolonilerinin neredeyse tamamı inhibisyona uğramıştır [Şekil 4.40(a)]. Şekil 4.40(b)'de ise potato dextrose agarda *Aspergillus niger* kolonileri görülmektedir. Kontrol petrisindeki küf kolonilerini artan nanopartikül dozlarına maruz kalan küf kolonileri ile kıyasladığımızda *Aspergillus niger*, konsantrasyon arttıkça inhibisyon artmış, maksimum doz – 100 mg/l'de maksimum inhibisyon gerçekleşmiştir. *Candida albicans*'a kıyasla nano-ZnO'e daha hassas olduğu Şekil 4.40(a) ve Şekil 4.40(b) ile görülmektedir. Ayrıca EC_{50} değerlerini kıyasladığımızda *A.niger*'in 48 saat sonucunda EC_{50} değeri 13,9 mg/l iken *Candida albicans*'ın 48 saat sonucunda EC_{50} değeri 27,5 mg/l'dir [Şekil 4.40(a) ve Şekil 4.40(b)].



Şekil 4.40 (a): Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı *Candida albicans* maya hücrelerinin sayılarının değişimi ; (b): Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı *Aspergillus niger* küf hücrelerinin sayılarının değişimi

Nano-ZnO ve maya ile yapılan çalışmalara baktığımızda ; Kasemets ve ark., (2009) nano-ZnO'nin *Saccharomyces cerevisiae*'ye olan toksisitesini çalışmışlar. 8 saat boyunca *S.cerevisiae*'ye maruz bıraktıkları nano-ZnO için EC₅₀ değerini 121 mg/l olarak ; 24 saat maruz bıraktıklarını EC₅₀ değerini 131 mg/l olarak rapor etmişler. Nano-ZnO'nin yüksek konsantrasyonlarındaki EC₅₀ değerlerini kararsız çinko iyonlarının maya hücrelerinde akümüle olduğunu ve bunun önemli bir hücresel savunma sistemi olduğunu tespit etmişler. Bu tez çalışmasında maya olarak *Candida albicans* kullanılmış ve 24 saat için EC₅₀ değeri 60,2 mg/l, 48 saat için 13,5 mg/l nano-ZnO olarak saptanmıştır. Farklı maya türlerinin nano-ZnO'ya karşı farklı toksisite cevapları olabilir. *Candida albicans* ile çalışılan literatürlere baktığımızda Liposvsky ve ark., (2011) nano-ZnO'nin antifungal aktivitesini *C.albicans* ile çalışmış. 24 saat maruz kalma süresi sonunda minimum fungisidal konsantrasyonunu 1 mg/ml bulmuşlardır.

4.2.5 Alg (*Chlorella* sp.) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano-ZnO nanopartikülünün alg üzerine inhibisyonu *Chlorella* sp. türü ile çalışılmıştır ve yapılan toksisite çalışmasında artan nano-ZnO konsantrasyonlarına (0,01 mg/l ; 0,25 mg/l ; 0,5 mg/l ; 1 mg/l ; 5 mg/l) karşı alg hücrelerinin 24 ; 48 ve 72 saat boyunca büyümelerine olan inhibisyon araştırılmıştır. Tablo 4.18'de artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24, 48 ve 72 saat sonunda 10 µl'deki alg hücrelerinin sayısı verilmiştir. Her bir konsantrasyon ve bekleme süresi 3 seri

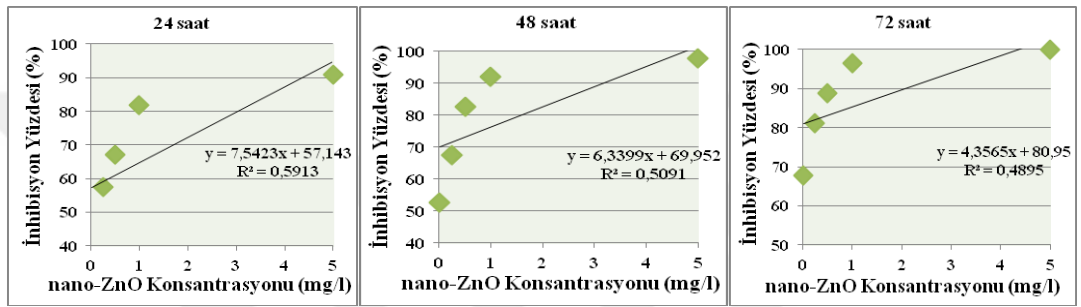
şeklinde çalışılmıştır. T=0'daki alg hücresi sayısı 46 adet alg/10 µl iken 24 saat inkübasyon periyodundan sonra kontrol grubundaki alg sayıları 120 ; 121 ; 125 adet alg / 10 µl iken 0,01 mg/l nano-ZnO'e maruz kalmış alg hücrelerinin sayısı 73 ; 72 ; 77 adet alg/ 10 µl ; 0,25 mg/l nano-ZnO'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 51 ; 50 ; 55 adet alg/ 10 µl ; 0,5 mg/l nano-ZnO'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 39 ; 37 ; 44 adet alg/ 10 µl ; 1 mg/l nano-ZnO'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 23 ; 19 ; 24 adet alg/ 10 µl ; maksimum doz 5 mg/l nano-ZnO'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 14 ; 11 ; 8 adet alg/ 10 µl'e düşmüştür (Tablo 4.19). 48 saat sonunda kontrol grubundaki alg sayıları 135 ; 138 ; 141 adet alg/ 10 µl iken 0,01 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda alg sayısı 65 ; 68 ; 62 adet alg/ 10 µl ; 0,25 mg/l nano-ZnO dozunda 45 ; 43 ; 47 adet alg/ 10 µl ; 0,5 mg/l nano-ZnO dozunda alg sayısı 25 ; 21 ; 26 adet alg/ 10 µl ; 1 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda alg sayısı 11 ; 9 ; 13 adet alg/ 10 µl ve 5 mg/l nano-ZnO dozundaki alg sayıları 3 ; 5 ; 1 adet alg/ 10 µl'ye düşmüştür (Tablo 4.19). 72 saat sonunda kontrol grubundaki alg sayıları 141 ; 146 ; 142 adet alg/ 10 µl iken 0,01 mg/l konsantrasyonunda alg sayıları 48 ; 46 ; 44 adet alg/ 10 µl'ye ; 0,25 mg/l nano-ZnO dozunda 28 ; 22 ; 31 adet alg/ 10 µl'ye ; 0,5 mg/l' de 16 ; 13 ; 19 adet alg/10 µl'ye ; 1 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda 5 ; 2 ; 8 adet alg/ 10 µl'ye ve 5 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda alg hücrelerinin tamamı inhibe olmuştur (Tablo 4.19).

Tablo 4.19 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Chlorella sp.* - alg hücresi sayıları

Nano-ZnO	ALG (<i>Chlorella sp.</i>) SAYILARI (adet Alg / 10 µl)											
	24 saat sonucu				48 saat sonucu				72 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama
Kontrol	120	121	125	122	135	138	141	135	141	146	142	141
0,01 mg / l	73	72	77	74	65	62	68	65	48	46	44	48
0,25 mg / l	51	50	55	52	45	43	47	45	28	22	31	28
0,5 mg / l	39	37	44	40	25	21	26	25	16	13	19	16
1 mg / l	23	19	24	22	11	9	13	11	5	2	8	5
5 mg / l	14	11	8	11	3	5	1	3	0	0	0	0

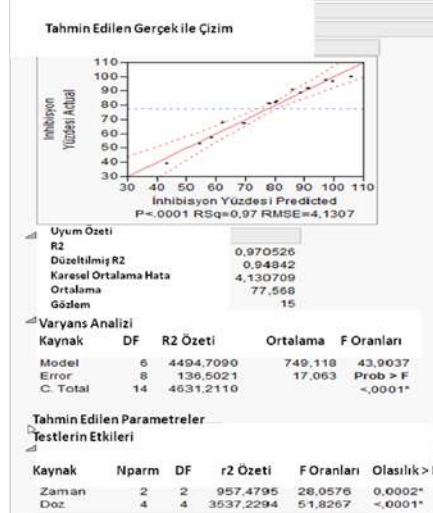
Şekil 4.41'de artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı *Chlorella sp.*'nin yüzde inhibisyon değerleri yer almaktadır. 24 saat sonucunda 0,01 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l ve 5 mg/l nano-ZnO konsantrasyonlarında inhibisyon yüzdeleri sırasıyla

% 39,3 ; % 57,4 ; % 67,2 ; % 81,9 ; % 90,9'dur. 48 saat sonunda bu inhibisyon değerleri biraz daha artmış, sırasıyla % 52,8 ; % 67,4 ; % 82,6 ; % 92,02 ; % 97,8. 72 saat sonunda 0,01 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l ve 5 mg/l nano-ZnO konsantrasyonlarında inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 67,8 ; % 81,1 ; % 88,8 ; % 96,5 ; % 100'dür. Alg hücrelerinin % 50'sini inhibe eden doz EC_{50} değeri Şekil 4.41'de hesaplanamamış, yerine % 80 ve % 85'ini etkileyen dozlar saptanmıştır. Buna göre 24 saat sonucu EC_{80} Değeri= 3,03 mg/l; 48 saat sonucu EC_{80} Değeri=1,6 mg/l ; 72 saat sonucu EC_{85} Değeri=0,93 mg/l'dir.



Şekil 4.41 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı *Chlorella sp.*'nin yüzde inhibisyon değerleri(24 saat sonucu EC_{80} değeri= 3,03 mg/l; 48 saat sonucu EC_{80} değeri=1,6 mg/l ; 72 saat sonucu EC_{85} değeri=0,93 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-ZnO konsantrasyonları ile *Chlorella sp.*'nin 24 ; 48 ve 72 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,97$). Test sonucu Şekil 4.42'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0002 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0001 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0001 < 0,05$).



Şekil 4.42 *Chlorella sp.*'nin ANOVA testi sonuçları

Nano-ZnO'nin alg üzerine toksisitesini çalışan Ji ve ark., (2011) alg olarak *Chlorella sp.* türünü seçmişler ve 1000 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda % 48,8 inhibisyona uğradığını rapor etmişler. Alg kültürünü hazırlarken kullanılan farklı kimyasallar, nanopartiküllerin farklı davranışları farklı toksikolojik cevaplara neden olabilir. Franklin ve ark., (2007) *Pseudokirchneriella subcapitata* ile çalışmış ve 72 saat sonucunda nano-ZnO için IC₅₀ değerini 0,06 mg/l olarak saptamışlar ve bu değer tez çalışmasında 72 saat sonucu saptanan EC₈₅ değerine yakın bir değerdir. Franklin ve ark., (2007)'nin yaptıkları çalışmaya paralel olarak Aruoja ve ark., (2009) da *Pseudokirchneriella subcapitata* ile çalışmış ve 72 saat sonucunda nano-ZnO için EC₅₀ değerini yaklaşık olarak 0,04 mg/l olarak bulmuşlardır ve bu yüksek toksisitenin nedeninin çözünmüş çinko iyonlarının olabileceğini söylemişler.

4.2.6 Su Piresi (*Daphnia magna*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

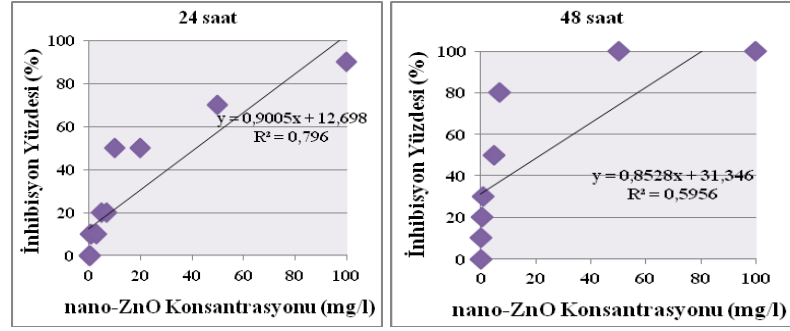
Daphnia magna ile yapılan akut toksisite testi nano-ZnO nanopartikülünün artan dozlarının *D. magna* üzerine inhibisyonuna dayanmaktadır. Deney ortamında nano-ZnO'nin değişen konsantrasyonları 100 ml olarak hazırlanıp, her bir konsantrasyon için 10 adet *D.magna* konulmuştur, ayrıca kontrol grubu olarak *D.magna*'nın mineral ortamını içeren 100 ml'lik ortama 10 adet *D.magna* konularak 24 ve 48 saat için ölüm olup olmadığı izlenmiştir. Tablo 4.20'de artan nano-ZnO konsantrasyonlarının

24 ve 48 saat sonucunda canlı ve ölen *D.magna* sayıları yer almaktadır. 24 saat sonucunda 0,01 ; 0,05 ; 0,5 mg/l nano-ZnO dozlarında *D.magna* üzerinde bir inhibisyon gerçekleşmemiş, 0,7 ; 1 ; 3 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda inhibisyon başlamış, 1 adet *D.magna* ölmüştür. Nano-ZnO dozu arttıkça inhibisyon artmış ; 10 ve 20 mg/l nano-ZnO'ya maruz kalan *D.magna*'ların yarısı inhibisyona uğramış, 5 adet *D.magna* ölmüştür. Maksimum dozlarda 50 mg/l nano-ZnO dozunda 7 adet *D.magna* ölürken, 100 mg/l nano-ZnO dozunda 9 adet *D.magna* ölmüştür (Tablo 4.20). 48 saat sonucunda 0,05 mg/l nano-ZnO'ya maruz kalan *D.magna*'larda etki göstermeye başlamış ; 1 adet *D.magna* ölmüştür. 1 ve 3 mg/l nano-ZnO dozunda 4 adet *D.magna* ölmüş ; konsantrasyon arttıkça inhibisyon maksimuma çıkmıştır. 10 ; 20 ; 50 ; 100 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda tüm *D.magna*'lar ölmüştür.

Tablo 4.20 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Daphnia magna* - su piresi sayıları

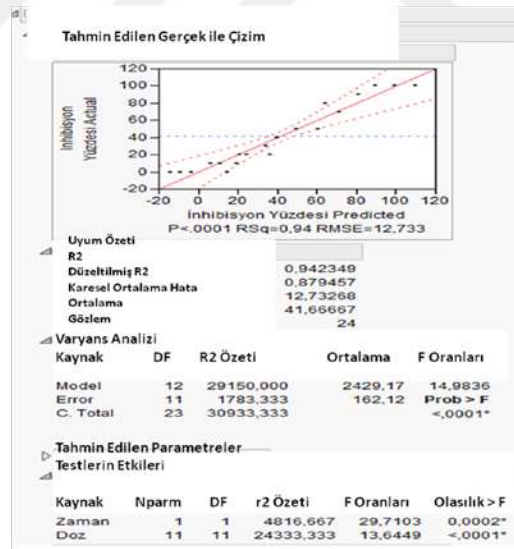
nano-ZnO konsantrasyonu (mg/l)	24 saat sonucu		nano-ZnO konsantrasyonu (mg/l)	48 saat sonucu	
	Canlı <i>Daphnia</i> sayısı	Ölen <i>Daphnia</i> sayısı		Canlı <i>Daphnia</i> sayısı	Ölen <i>Daphnia</i> sayısı
0,01	10	0	0,01	10	0
0,05	10	0	0,05	9	1
0,5	10	0	0,5	8	2
0,7	9	1	0,7	7	3
1	9	1	1	6	4
3	9	1	3	6	4
5	8	2	5	5	5
7	8	2	7	2	8
10	5	5	10	0	10
20	5	5	20	0	10
50	3	7	50	0	10
100	1	9	100	0	10

Şekil 4.43'de artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı *D.magna*'ların yüzde inhibisyonun grafiği bulunmaktadır. Nano-ZnO dozu arttıkça *D.magna* üzerine olan inhibisyonu artmıştır. 0,01 ; 0,05 ; 0,5 mg/l nano-ZnO konsantrasyonları 24 saat sonucunda toksik etki göstermezken, 10 ve 20 mg/l nano-ZnO *D.magna*'ların % 50'sini öldürmüştür. 48 saat sonucunda 0,05 mg/l nano-ZnO ile toksisite başlamış ; 10 ; 20 ; 50 ; 100 mg/l nano-ZnO konsantrasyonları *D.magna* üzerinde % 100 toksik etki göstermiştir. Şekil 4.43'ten hesaplanabilen *D.magna*'nın % 50'sini etkileyen EC₅₀ değeri 24 saat için 41,4 mg/l 48 saat için 21,8 mg/l'dir.



Şekil 4.43 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı *Daphnia magna*'ların yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 41,4 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=21,8 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-ZnO konsantrasyonları ile *Daphnia magna*'nın 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,942). Test sonucu Şekil 4.44'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,005$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0002 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0001 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0001 < 0,05).



Şekil 4.44 *Daphnia magna*'nın ANOVA testi sonuçları

Zhu ve ark., (2009) 6 farklı nanopartikülün *Daphnia magna* üzerine akut toksisitesini incelemişler ve 48 saat sonucu nano-ZnO için EC₅₀ değerini 0,622 mg/l olarak saptamışlar. Santo ve ark., (2014) 48 saat sonunda nano-ZnO'nin EC₅₀ değerini 3,1 mg/l ; Heinlaan ve ark. (2008) da hemen aynı sonuçları rapor etmiş ve 48 saat

sonunda nano-ZnO'nin EC₅₀ değerini 3,2 mg/l olarak saptamıştır. Poynton ve ark., (2011)'nin tespit ettiği EC₅₀ değeri ise bu tez çalışmasında saptanan EC₅₀ değerine çok yakın bir değer ; 24 saat sonucu nano-ZnO için EC₅₀ değeri 22 mg/l'dir. Blinova ve ark., (2010)'nin yaptıkları çalışmada 48 saat sonucu EC₅₀ değeri 16 mg Zn/l olarak bulmuşlar. Nano-ZnO *D.magna* üzerinde nasıl toksik etki gösteriyor cevabını Santo ve ark., (2014) araştırmışlar. İn vivo ortamda nano-ZnO'e maruz kalan *D.magna*'nın birincil toksisite nedeni epitelyum hücreler ve onların hücreler arası bağlantılarında hücresel dejenerasyonlardır. Hücre nanopartikülü hücre içine membranı parçalamadan endositik yolak ile içerisine alır ve nano-ZnO hücre içerisine girdiğinde çinko iyonlarını salıp bir çok hücresel hasarlara (sitoplazmik matriksde vakuolizasyon, mitokondriyal bozunma, oksidatif stres vb.) sebep olmaktadır (Blinova ve ark., 2010).

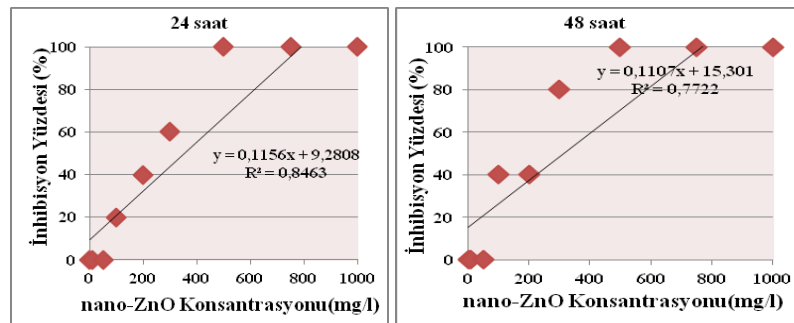
4.2.7 Balık (*lepistes - Poecillia reticula*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano-ZnO nanopartikülünün artan konstrasyonlarının balık üzerine akut toksisitesi çalışılmış ; balık olarak kullanılan lepestes - *Poecillia reticula*'nin 24 ve 48 saat sonucu kontrole kıyasla canlı ve ölü sayıları Tablo 4.21.'de yer almaktadır. 24 saat sonucunda 1 ; 10 ve 50 mg/l nano-ZnO konsantrasyonları lepestes - *Poecillia reticula* üzerine toksik etki göstermezken ; 100 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda lepestes - *Poecillia reticula* üzerinde inhibisyon gözlenmeye başlamıştır, 1 balık ölümü gözlenmiştir (Tablo 4.21). 200 mg/l nano-ZnO dozunda 2 balık ; 300 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda 3 balık ölümü gözlenmiştir. 500 ; 750 ve 1000 mg/l nano-ZnO konsantrasyonları balık üzerine % 100 toksik etki göstermiş, kontrol grubuna kıyasla tüm balıklar ölmüştür (Tablo 4.21). 48 saat sonucunda 24 saat sonuçlarına paralel olarak 1 ; 10 ; 50 mg/l nano-ZnO dozlarında inhibisyon gerçekleştirmemiş, 100 ve 200 mg/l nano-ZnO dozunda 2 balık ölümü gerçekleşmiştir. 300 mg/l nano-ZnO dozunda 3 balık ölümlen, 500 ; 750 ; 1000 mg/l nano-ZnO dozunda inhibisyon % 100 gerçekleşmiştir (Tablo 4.21).

Tablo 4.21 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu lepestes - *Poecillia reticula* sayıları

nano-ZnO konsantrasyonu (mg/l)	Kontroldeki Balık Sayısı	24 saat sonucu		48 saat sonucu	
		Canlı Balık Sayısı	Ölü balık sayısı	Canlı Balık Sayısı	Ölü balık sayısı
1	5	5	0	5	0
10	5	5	0	5	0
50	5	5	0	5	0
100	5	4	1	3	2
200	5	3	2	3	2
300	5	2	3	1	4
500	5	0	5	0	5
750	5	0	5	0	5
1000	5	0	5	0	5

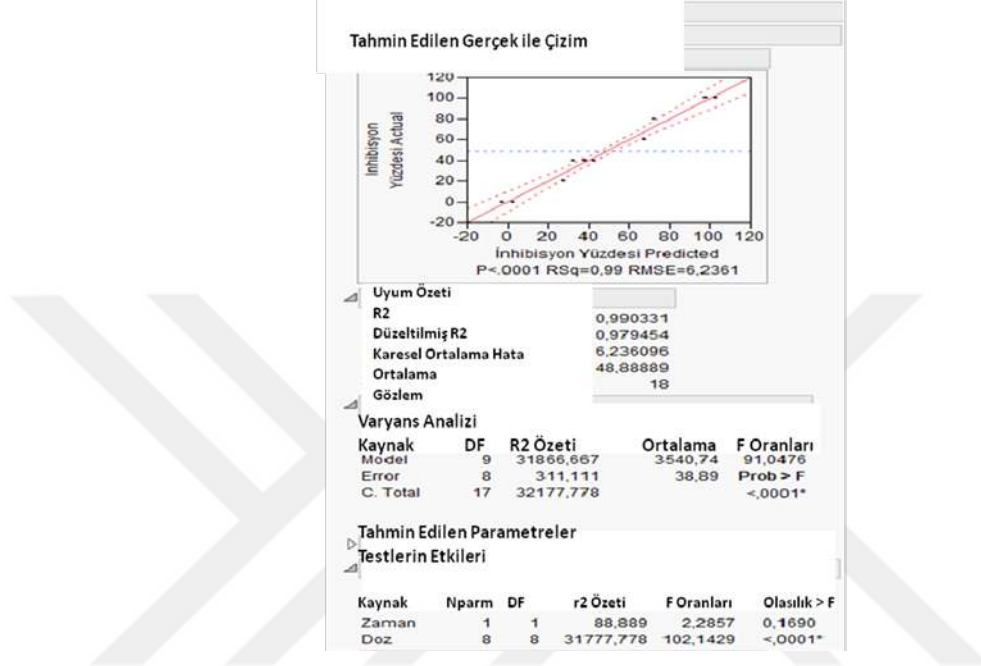
Şekil 4.45'te artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı lepestes - *Poecillia reticula*'lerin yüzde inhibisyonun grafiği yer almaktadır. Nano-ZnO nanopartikülünün 100 mg/l konsantrasyonunda başlayan toksik etki (% 20 inhibisyon) ile doz arttıkça inhibisyon artmaya devam etmiştir. 500 ; 750 ; 1000 mg/l nano-ZnO dozunda inhibisyon % 100 gerçekleşmiştir. 48 saat sonucu 24 saat sonuçlarıyla paralel sonuçlar göstermiş ; inhibisyon 100 mg/l'de başlamıştır (% 40 inhibisyon). 300 mg/l'de % 80 inhibisyon gerçekleşirken ; 500 ; 750 ; 1000 mg/l nano-ZnO dozunda inhibisyon % 100 gerçekleşmiştir. Nano-ZnO nanopartikülünün balıkların % 50'sine etki eden dozu (EC₅₀ Değeri) 24 saat sonucu EC₅₀ Değeri= 352,2 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ Değeri=324,3 mg/l Şekil 4.45'ten hesaplanmıştır.



Şekil 4.45 Artan nano-ZnO konsantrasyonlarına karşı lepestes - *Poecillia reticula*'lerin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 352,2 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=324,3 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-ZnO konsantrasyonları ile lepestes – *Poecillia reticula* 'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki

ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,990$). Test sonucu Şekil 4.46'da yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,1690 > 0,05$) değişkeninin etkili olmadığı ; konsantrasyon ($P=0,0001 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0001 < 0,05$).



Şekil 4.46 Lepistes – *Poecillia reticula*'nın ANOVA testi sonuçları

4.2.8 Biyoayrışabilirlik Testi Sonuçları

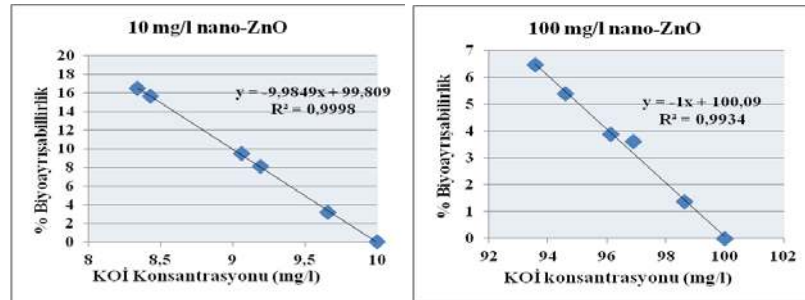
Nano-ZnO nanopartikülünün aktif çamurdaki mikroorganizmalar tarafından biyoayrışabilirliklerinin belirlenmesi amaçlanmış, ayrıca alıcı ortama deşarj edildiğinde canlı ekosistem tarafından tolere edilebilmesi için hangi seyreltmede verilmesinin daha uygun olup olmadığı araştırılmıştır. Nano-ZnO'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında % giderimleri 28 günlük süre boyunca belli zaman aralıklarında ölçülen KOİ değerleri ile hesaplanmıştır (Tablo 4.22). Başlangıç KOİ değerleri 10 ve 100 mg/l iken 5 ; 10 ; 15 ; 20 ve 28. günlerde azalan KOİ değerleri ölçülmüştür. t=0. günde KOİ değeri 10 mg/l iken 5.günün sonunda ölçülen KOİ 9,66 mg/l ; 10.günde 9,19 mg/l KOİ ; 15.günde 9,06 mg/l KOİ ; 20.günde 8,43 mg/l KOİ ; 28.günün sonunda ölçülen KOİ 8,34 mg/l'dir (Tablo 4.22). t=0. günde KOİ değeri 100 mg/l iken 5.günün sonunda ölçülen KOİ 98,63 mg/l ; 10.günde 96,89 mg/l KOİ ;

15.günde 96,13 mg/l KOİ ; 20.günde 94,61 mg/l KOİ ; 28.günün sonunda ölçülen KOİ 93,57 mg/l'dir (Tablo 4.22).

Tablo 4.22 28 gün boyunca nano-ZnO'nun 10 ve 100 mg/l konsantrasyonları için yüzde biyoayrışabilirlik değerleri

Günler	10 mg/l nano-ZnO		100 mg/l nano-ZnO	
	KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	% Giderim	KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	% Giderim
t=0	10	0	100	0
t=5	9,66	3,4	98,63	1,37
t=10	9,19	8,1	96,89	3,11
t=15	9,06	9,4	96,13	3,87
t=20	8,43	15,7	94,61	5,39
t=28	8,34	16,6	93,57	6,43

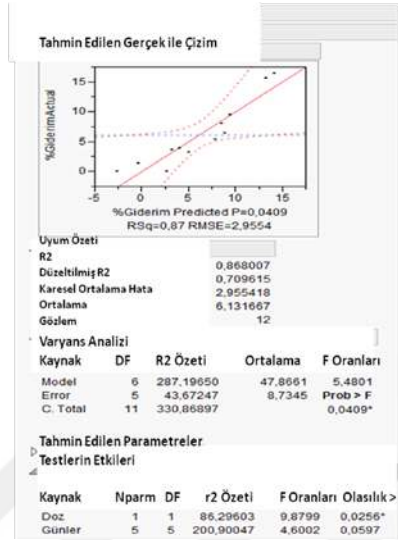
Şekil 4.47'de günlere karşı 10 mg/l ve 100 mg/l nano-ZnO'nun % biyoayrışabilirlik değerleri yer almaktadır. 10 mg/l başlangıç KOİ miktarı ortama konulan aerobik çamur bakteri tarafından ayrıştırıldığı için zaman artıka azalma nispeten gözlenmiştir, 28. günün sonucunda giderilen maksimum KOİ % 16,6 'da kalmıştır. 100 mg/l başlangıç KOİ miktarı için 5. günde % giderim % 1,37 iken ; 20. güne gelindiğinde % 5,39'a ; 28. günde % giderim % 6,43'a yükselmiştir. 10 mg/l ve 100 mg/l KOİ akvaryumlarında % biyoayrışabilirlik değerleri 28 gün boyunca çok az miktarlarda artmıştır. Bunun sebebi olarak nano-ZnO nanopartikülünün biyoayrışabilirlikten sorumlu aktif çamurda heterotrof aerobik mikroorganizmalara toksik etki göstermesi, ortamın pH, sıcaklık gibi çevresel faktörlerine ve ortamdaki heterotrofik bakteri grubunun hassas olmasından kaynaklanabilir.



Şekil 4.47 10 ve 100 mg/l nano-ZnO konsantrasyonlarının 28 günlük % biyoayrışabilirlik değerleri

Yapılan ANOVA testinde artan nano-ZnO konsantrasyonları ile biyoayrışabilirlik testinin 10 ve 100 mg/l nano-ZnO konsantrasyonlarının günlere karşı % giderimi arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,947$). Test sonucu Şekil 4.48'de

yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda günler ($P=0,0597 > 0,05$) değişkeninin % giderime etkili olmadığı ; konsantrasyon ($P=0,0256 < 0,05$) değişkeninin % giderim üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0409 < 0,05$).



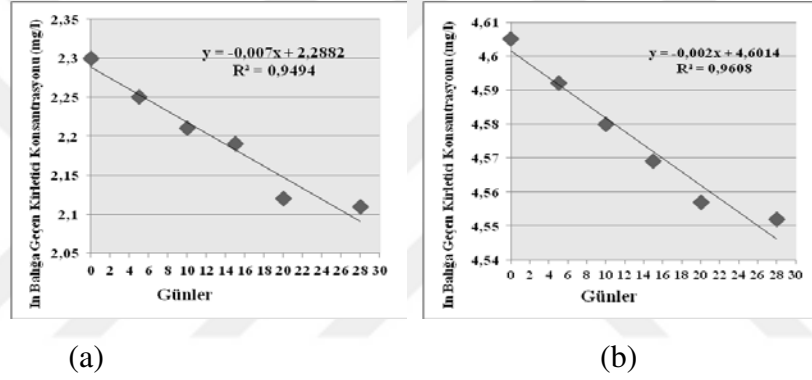
Şekil 4.48 Biyoayrışabilirlik testi'nin ANOVA testi sonuçları

4.2.9 Biyoakümülyasyon Testi Sonuçları

Nano-ZnO nanopartikülünün farklı konsantrasyonlarının canlı organizmadaki salınım ve birikimin saptanması amaçlanmıştır. Canlı organizma olarak lepidotes - *Poecillia reticula* kullanılmış, 28 gün boyunca 10 ve 100 mg/l konsantrasyonundaki nanopartikülün KOİ değerleri ölçülmüş ve 28 günlük periyodun sonunda balıklar temiz suya alınıp, balıktan suya geçen KOİ değerleri 28 gün boyunca hesaplanmıştır. Tablo 4.23'te 28 gün boyunca nano-ZnO'nun 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları yer almaktadır. Biyoakümülyasyon faktörü (BCF) 'nın hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanmıştır.

Tablo 4.23'te 10 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda 28 günlük periyotta sudan balığa geçen KOİ konsantrasyonları t=0. günde 10 mg/l iken 5. gün ; 10. gün ; 15. gün ; 20. gün ve 28. günde ölçülen KOİ değerleri sırasıyla 9,53 mg/l ; 9,18 mg/l ; 8,94 mg/l ; 8,41 mg/l ve 8,21 mg/l'dir. K_2 hesaplanmasında kullanılan C_{f1} (0.

Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması – $\ln KOİ=2,3$ mg/l) ve C_{f2} (28. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması – $\ln KOİ=2,11$ mg/l) değerleri Tablo 4.23'te yer almaktadır. Materyal-Metod bölümünde ayrıntılı anlatılan K_2 hesaplamasına göre ; k_2 değeri $0,0015 \text{ gün}^{-1}$ olarak hesaplanır. K_1 hesaplamasında yer alan C_f değeri Şekil 4.49(a)'da yer alan grafikte 14. güne gelen $\ln KOİ$ 2,39 mg/l olarak bulunmaktadır ; C_w değeri ise balıktan suya geçen $KOİ$ değerlerinin doğal logaritmalarından $[C_w = C_{w2} - C_{w1} \text{ (mg/l)} / (C_{w2} = 28.\text{gün}] (C_{w1}=0.\text{gün})]$ 1,49 mg/l olarak hesaplandı. Materyal-Metod bölümünde ayrıntılı anlatılan K_1 hesaplamasına göre ; k_1 değeri $0,0010 \text{ gün}^{-1}$ olarak hesaplanır. BCF değeri ise 0,66'dır.



Şekil 4.49 (a): 10 mg/l nano-ZnO in günlere göre $\ln$ (Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri ($C_f=2,2$ mg/l) ; (b): 100 mg/l nano-ZnO in günlere göre $\ln$ (Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri ($C_f=4,38$ mg/l)

100 mg/l nano-ZnO konsantrasyonunda 28 günlük periyotta sudan balığa geçen $KOİ$ konsantrasyonları $t=0$.günde 10 mg/l iken 5. ; 10. ; 15. ; 20. ve 28. günde $KOİ$ değerleri sırasıyla 98,72 mg/l ; 97,61 mg/l ; 96,51 mg/l ; 95,36 mg/l ve 94,91 mg/l'dir. K_2 hesaplanmasında kullanılan C_{f1} (0. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması – $\ln KOİ=4,605$ mg/l) ve C_{f2} (28. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması – $\ln KOİ=4,552$ mg/l) değerleri Tablo 4.23'te yer almaktadır. Materyal-Metod bölümünde ayrıntılı anlatılan K_2 hesaplamasına göre ; k_2 değeri $4,29 \text{ gün}^{-1}$ olarak hesaplanır. K_1 hesaplamasında yer alan C_f değeri Şekil 4.49(b)'de yer alan grafikte 14. güne gelen $\ln KOİ$ 4,63 mg/l olarak bulunmaktadır ; C_w değeri ise balıktan suya geçen $KOİ$ değerlerinin doğal logaritmalarından $[C_w = C_{w2} - C_{w1} \text{ (mg/l)} / (C_{w2} = 28.\text{gün}] (C_{w1}=0.\text{gün})]$ 1,33 mg/l

olarak hesaplandı. Materyal-Metod bölümünde ayrıntılı anlatılan K_1 hesaplamasına göre ; k_1 değeri $13,99 \text{ gün}^{-1}$ olarak hesaplanır. BCF değeri ise 3,26'dır.

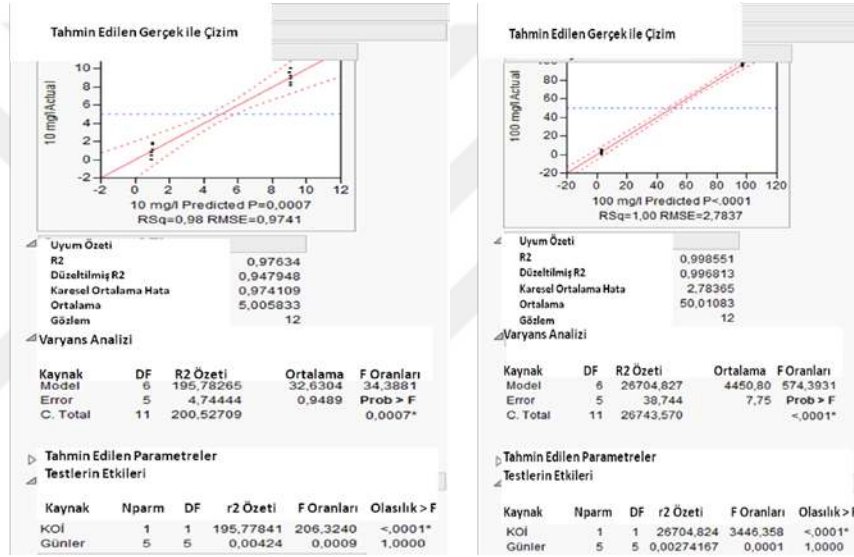
Tablo 4.23 28 gün boyunca nano-ZnO'ın 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları

10 mg/l nano-ZnO				
Günler	Numuneden Balığa Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)	Balıktan Suyu Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)
t=0	10	2,30	0	0
t=5	9,53	2,25	0,41	-0,89
t=10	9,18	2,21	0,82	-0,19
t=15	8,94	2,19	1,11	0,104
t=20	8,41	2,12	1,63	0,48
t=28	8,21	2,11	1,83	0,604
100 mg/l nano-ZnO				
Günler	Numuneden Balığa Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)	Balıktan Suyu Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)
t=0	100	4,605	0	0
t=5	98,72	4,592	1,36	0,307
t=10	97,61	4,580	2,39	0,871
t=15	96,51	4,569	3,52	1,258
t=20	95,36	4,557	4,63	1,532
t=28	94,91	4,552	5,12	1,633

Lepistes - *Poecillia reticula* bünyesinde nanopartikülün akümüle olup olmadığına dayalı bu testte OECD'de yer alan kriter BCF eğer 10'dan küçük ise anlamlı değil, eğer 10'dan büyük ise balık bünyesinde nanopartikülün akümüle olduğunu gösteriyor (OECD 305, 2012). 10 mg/l nano-ZnO için BCF değeri 0,66 ; 100 mg/l nano-ZnO için BCF değeri 3,26'tür. 10 mg/l ve 100 mg/l nanopartikül konsantrasyonunda balık bünyesinde biyoakümüle olmadığını göstermektedir. Hao ve ark., (2013) tarafından yapılan çalışmada ZnO nanopartikülünün *Cyprinus carpio* üzerindeki biyoakümüleyasyonu incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, 30 günlük maruz kalma süresinden sonra 50 mg/l nano-ZnO 'ın balığın dokularında önemli derecede akümüle olduğu bulunmuştur.

Yapılan ANOVA testinde artan nano-ZnO konsantrasyonları ile biyoakümüleyasyon testinin 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarına günlere karşı sudan balığa geçen KOİ konsantrasyonu ile balıktan suya geçen KOİ konsantrasyonları arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (10 mg/l için: $R=0,976$; 100 mg/l için:

R=0,998). Test sonucu Şekil 4.50’de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. 10 mg/l nano-ZnO konsantrasyonu için: yapılan varyans analizi sonucunda günler ($P=1,0000 > 0,05$) değişkeninin etkili olmadığı ve KOI (Sudan balığa geçen ve Balıktan suya geçen) ($P=0,0001 < 0,05$) değişkeninin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0007 < 0,05$). 100 mg/l nano-ZnO konsantrasyonu için: yapılan varyans analizi sonucunda günler ($P=1,0000 > 0,05$) değişkeninin etkili olmadığı ve KOI (Sudan balığa geçen ve Balıktan suya geçen) ($P=0,0001 < 0,05$) değişkeninin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0001 < 0,05$).



Şekil 4.50 Biyoakümülayon testi’nin ANOVA testi sonuçları (10 mg/l ve 100 mg/l için)

4.2.10 Nano-ZnO’in Farklı Trofik Seviyelerindeki EC_{50} Değerlerin Karşılaştırılması

Nano-ZnO’in prokaryot canlı olan ; bakteri (*Escherichia coli* ; *Bacillus cereus* ; *Vibrio fischeri* ; Metan Archae Bakterisi) , ökaryot canlı olan ; fungus (maya- *Candida albicans* / küf- *Aspergillus niger*) , alg (*Chlorella sp.*) , Crustacea (*Daphnia magna*) ve balık (lepistes - *Poecillia reticula*) olmak üzere 6 farklı trofik seviye üzerine 9 farklı akut toksisite deneyi yapılmıştır. Farklı beslenme seviyelerindeki canlıların nano-ZnO’e karşı farklı toksik cevapları oluşmuştur. Tablo 4.24’te yer alan EC değerlerine göre ; en düşük EC değerine (24 saat sonucu $EC_{80}= 3,03$ mg/l) sahip olan *Chlorella sp.*- alg nano-ZnO’e en hassas organizmadır ($P=0,0001 < 0,05$). En

yüksek EC₅₀ değerine sahip olan lepistes - *Poecillia reticula* (24 saat sonucu EC₅₀=352,2 mg/l) nano-ZnO'e en dirençli organizmadır (P=0,0001 < 0,05).

Tablo 4.24 Nano-ZnO'in farklı trofik seviyelerindeki EC₅₀ değerleri

	EC ₅₀ Değerleri (mg/l)			
	30 dakika sonucu	24 saat sonucu	48 saat sonucu	72 saat sonucu
Bakteri - <i>E.coli</i>	-	15,6	12,9	-
Bakteri - <i>B.cereus</i>	-	31,8	22,8	-
Bakteri - <i>V.fischeri</i>	16,097	-	-	-
Bakteri – Metan Archae	-	50,01 (EC ₇₀)	34,99 (EC ₇₀)	-
Maya – <i>C.albicans</i>	-	60,2	27,5	-
Küf – <i>A.niger</i>	-	25,9	13,9	-
Alg – <i>Chlorella sp.</i>	-	3,03 (EC ₈₀)	1,6 (EC ₈₅)	0,93 (EC ₈₀)
Crustacea – <i>D.magna</i>	-	41,4	21,8	-
Balık – lepistes - <i>Poecillia reticula</i>	-	352,2	324,3	-

4.3 Nano-Al₂O₃ ile Yapılan Akut Toksisite Çalışmaları

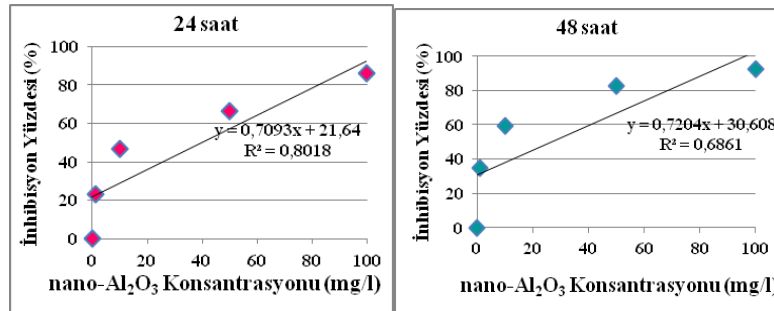
4.3.1 Bakteri (*Escherichia coli* – *Bacillus cereus*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano-Al₂O₃ nanopartikülünün bakteri üzerine akut toksisitesi iki farklı bakteri ile çalışılmıştır ve bu bakteriler gram negatif özelliğe sahip olan *Escherichia coli* bakterisi ile gram pozitif özelliğe sahip *Bacillus cereus* bakterisidir. Tablo 4.25'te artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu canlı kalan *E.coli* bakterisinin sayıları gösterilmektedir. Kontrol grubundaki bakteri sayıları başlangıçta 35 adet/koloni iken 24 saat sonucunda sayıları 65000 ; 64900 ; 65100 adet koloni/1 ml'ye yükselmiştir (Tablo 4.25). 24 saat sonunda 1 mg/l nano-Al₂O₃ konsantrasyonunda bakteri sayıları 50000 ; 49000 ; 51000 adet koloni/ml'ye düşmüştür. Nanopartikül miktarı 10 mg/l'den 100 mg/l'ye artıkça kontrole göre nanopartikülün *E.coli* üzerine inhibisyonu artmış, canlı bakteri sayıları 9000 ; 9100 ; 8900 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.25). 48 saat sonucunda kontrol grubundaki bakteri sayıları 69000 ; 69100 ; 68900 adet/ml iken 1 mg/l nano-Al₂O₃'e maruz kalan *E.coli* kolonileri 45000 ; 45100 ; 44900 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l dozunda 12000 ; 11900 ; 12100 adet koloni/ml'ye ve 100 mg/l konsantrasyonunda bakteri sayıları 5000 ; 5100 ; 5500 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.25).

Tablo 4.25 Artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Escherichia coli* bakterilerinin sayıları

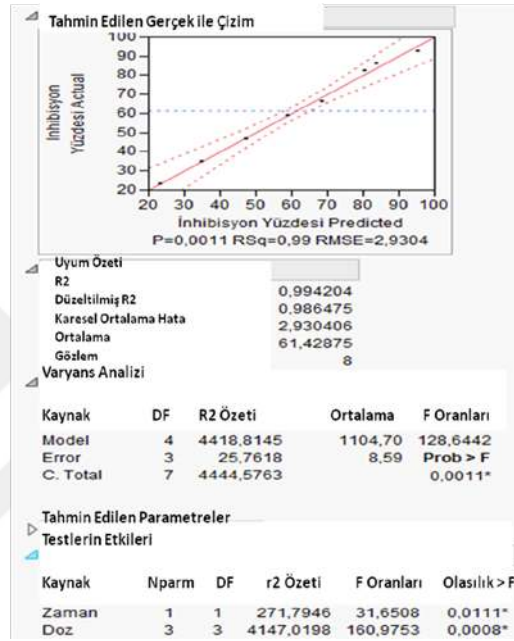
nano-Al ₂ O ₃	CANLI <i>E.coli</i> BAKTERİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	65000	64900	65100	65000	69000	69100	68900	69000
1 mg / l	50000	49000	51000	50000	45000	45100	44900	45000
10 mg / l	35000	34000	34500	34500	28000	28100	28500	28200
50 mg / l	22000	20000	24000	22000	12000	11900	12100	12000
100 mg / l	9000	9100	8900	9000	5000	5100	5500	5200

24 saat sonucunda nano-Al₂O₃ dozu 1 mg/l'den 100 mg/l'e çıkarıldığında inhibisyon yüzdesi % 23,1'den % 86,2'ye yükselmiştir. 48 saat sonunda ise nano-Al₂O₃'nin *E.coli*'ye olan inhibisyonu artmış ; 1 mg/l'den 100 mg/l'ye artan konsantrasyonda *E.coli*'nin inhibisyon yüzdesi % 34,8'den % 92,5' a çıkmıştır. Şekil 4.51'den nano-Al₂O₃ için *E.coli* bakterisinin % 50'sini etkileyen EC₅₀ değeri hesaplanmıştır. 24 saat sonucu ile 48 saat sonucu kıyasladığımızda *E.coli* ile nano-Al₂O₃naopartikülünün maruz kalma süresi artıkça bakterinin nanopartiküle hassasiyeti artmakta, *E.coli*'nin % 50'sini öldüren nano-Al₂O₃ konsantrasyonun 39,9 mg/l'den 26,9 mg/l'ye düştüğü saptanmıştır. Bu durum 48 saat sonucu inhibisyonun daha da arttığını göstermektedir. 24 saat sonunda *E.coli* daha yüksek nano-Al₂O₃konsantrasyonlarını tolere edebilmekte, 48 saat sonunda ise akut toksisitesi arttığından daha düşük nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarını tolere edebilmektedir.



Şekil 4.51 Artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı *Escherichia coli* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 39,9 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 26,9 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano- Al_2O_3 konsantrasyonları ile *E.coli*'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,994$). Test sonucu Şekil 4.52'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0111 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0008 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0011 < 0,05$).



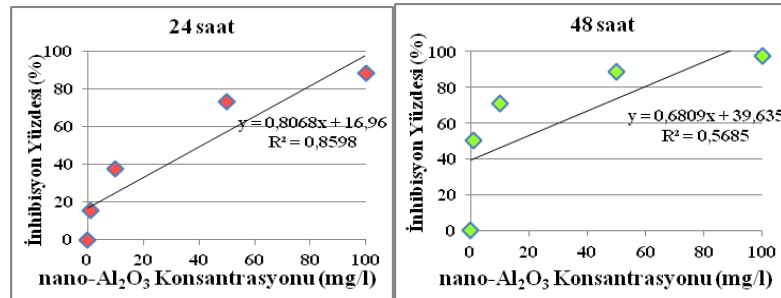
Şekil 4.52 *E.coli*'nin ANOVA testi sonuçları

Diğer akut toksisitesi çalışılan gram pozitif özelliğe sahip bakteri *Bacillus cereus*'un artan nano- Al_2O_3 konsantrasyonlarına karşı canlı *B. cereus* bakteri sayılarının 24 ve 48 saat sonuçları Tablo 4.26'da verilmiştir. 24 saat sonucunda kontrolde üreyen *B.cereus* kolonileri 130000 ; 131000 ; 129000 adet koloni/ml iken, 1 mg/l nanopartikülüne maruz kaldığında bu sayı 110000 ; 109000 ; 111000 adet koloni/ml'ye düşmektedir. 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano- Al_2O_3 konsantrasyonlarında kontrole kıyasla canlı bakteri sayıları gittikçe azalmaktadır (Tablo 4.26). 48 saat sonucunda ise kontrolde üreyen canlı bakteri sayıları 169000 ; 170000 ; 168000 adet koloni/ml iken 50 mg/l nano- Al_2O_3 dozunda nanopartiküle maruz kalan *B.cereus* bakterisinin canlı hücre sayısı 19000 ; 20000 ; 18000 adet koloni/1ml'ye düşmekte, 100 mg/l nanopartikül dozunda ise 4000 ; 4100 ; 3900 adet koloni/ml'ye kadar düşmektedir (Tablo 4.26).

Tablo 4.26 Artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Bacillus cereus* bakterilerinin sayıları

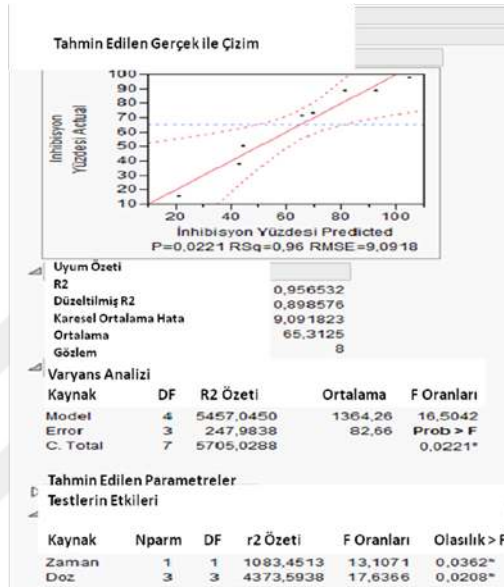
nano-Al ₂ O ₃	CANLI <i>B.cereus</i> BAKTERİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	130000	131000	129000	130000	169000	170000	168000	169000
1 mg / l	110000	109000	111000	110000	84000	83000	85000	84000
10 mg / l	81000	80000	82000	81000	49000	48000	50000	49000
50 mg / l	34000	35000	36000	35000	19000	20000	18000	19000
100 mg / l	15000	16000	14000	15000	4000	4100	3900	4000

B.cereus bakterisinin artan nanopartikül dozlarına karşın 24 ve 48 saat sonundaki inhibisyon yüzdeleri incelendiğinde 24 saat sonunda 1 mg/l’de inhibisyon yüzdesi % 15,4 iken, 10 mg/l’de % 37,7 ; 50 mg/l’de % 73,1 ve 100 mg/l’de % 88,5’e yükselmiştir (Şekil 4.53). 48 saat sonunda ise inhibisyon yüzdeleri 1 mg/l için % 50,3 ; 10 mg/l için % 71,1 ; 50 mg/l için 88,8 ve maksimum doz olan 100 mg/l’de ise % 97,6’ya çıkmıştır (Şekil 4.53). Şekil 4.46’dan hesaplanabilen *B.cereus* bakterisinin % 50’sine etki eden doz ; EC₅₀ değeri 24 saat için 40,9 mg/l ; 48 saat için 15,22 mg/l’dir. Bakterinin nanopartikülle maruz kaldığı süre arttıkça nano-Al₂O₃’in bakteriye olan akut toksisitesinin arttığı, bakterinin nanopartiküle olan hassasiyetinin arttığı ve daha düşük nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarını tolere edebildiği saptanmıştır. Kısa temas sürelerinde bakteri daha yüksek nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarında yaşayabilmekte, direnç gösterebilmekte, bu nedenle daha yüksek nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarını tolere edebilmektedir.



Şekil 4.53 Artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı *Bacillus cereus* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 40,9 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 15,22 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano- Al_2O_3 konsantrasyonları ile *B.cereus*'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,956$). Test sonucu Şekil 4.54'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0362 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0208 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0221 < 0,05$).

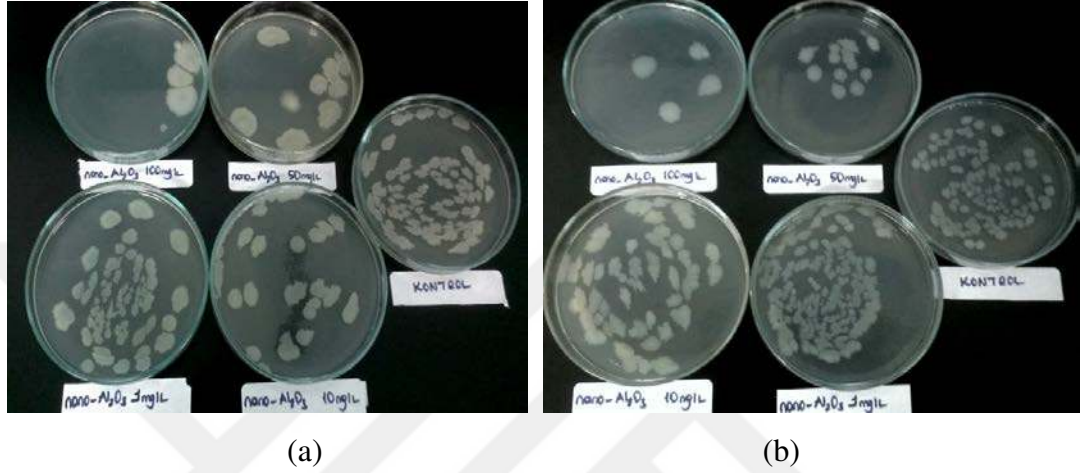


Şekil 4.54 *B.cereus*'un ANOVA testi sonuçları

Nano- Al_2O_3 nanopartikülünün gram negatif bir bakteri olan *E.coli* ile gram pozitif bir bakteri olan *B.cereus*'a olan akut toksisiteyi kıyaslandığında ; *B.cereus* ve *E.coli*'nin 24 saat sonucu EC_{50} değerleri birbirlerine yakın iken 48 saat sonucunda *B.cereus* bakterisinin EC_{50} değeri 26,9 mg/l iken *E.coli* bakterisinin EC_{50} değeri 15,22 mg/l olarak hesaplanmıştır. *B.cereus* bakterisinin düşük EC_{50} değeri bu bakterinin nano- Al_2O_3 nanopartikülü düşük konsantrasyonlarında bile *E.coli*'ye kıyasla *B.cereus*'a daha etkili olduğunu göstermektedir.

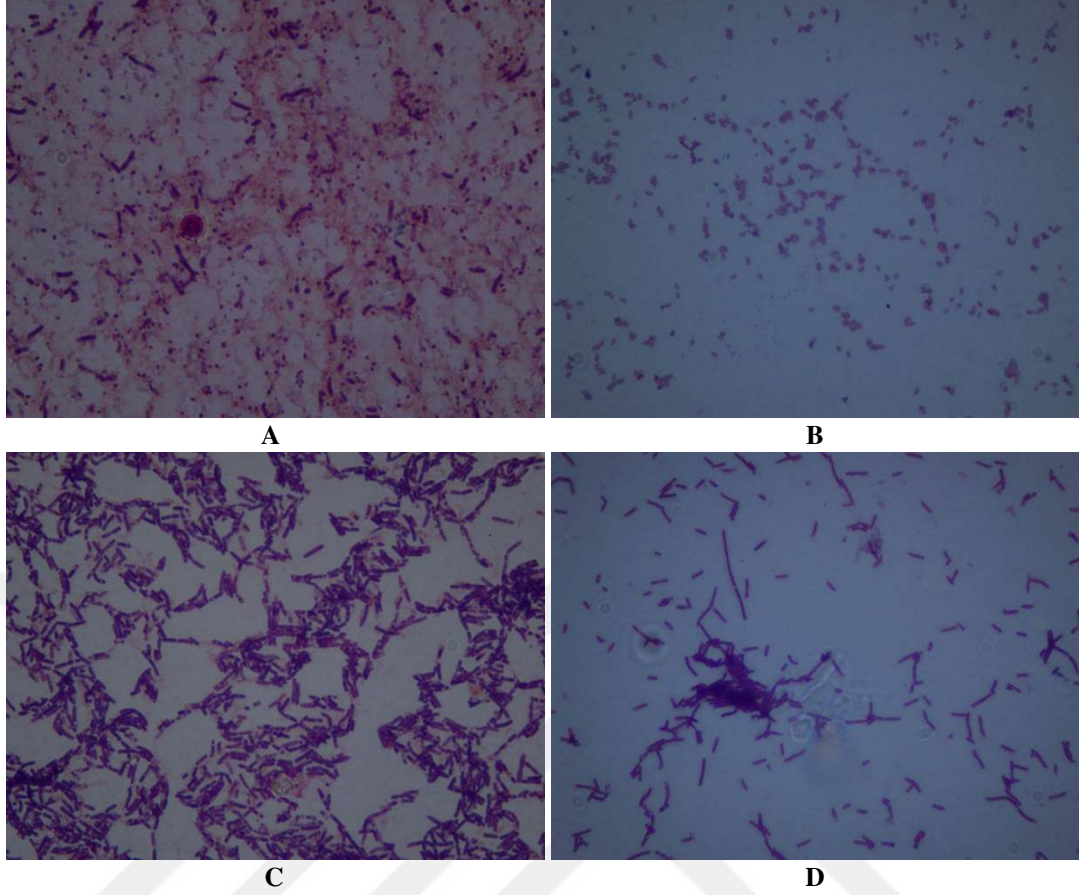
Şekil 4.55(a)'da *Escherichia coli* kolonilerinin nutrient agar ortamında artan nano- Al_2O_3 konsantrasyonlarında kontrole kıyasla azaldığı görülmektedir. 48 saat sonucunda kontrol petrisinde *E.coli* kolonileri oldukça yoğun iken, 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l konsantrasyonlarında 48 saat nanopartiküle maruz kalan *E.coli* bakterisinin sayısı epey azalmıştır. Şekil 4.55(b)'de ise *Bacillus cereus*'in nutrient

agar ortamındaki koloni sayıları görülmektedir. 48 saat boyunca nano- Al_2O_3 nanopartikülünün 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l konsantrasyonlarına *B.cereus* kolonileri maruz kalmış ve nutrient agar ortamına pasajı yapıp canlı *B.cereus* kolonileri sayılmıştır. *Bacillus cereus* bakterisinin *Escherichia coli* bakterisinden daha hassas olduğu Şekil 4.55(a) ve Şekil 4.55(b)’den gözlemlenmektedir.



Şekil 4.55 (a): Artan nano- Al_2O_3 konsantrasyonlarına karşı *Escherichia coli* bakteri sayılarının değişimi ; (b): artan nano- Al_2O_3 konsantrasyonlarına karşı *Bacillus cereus* bakteri sayılarının değişimi

Şekil 4.56’da *Escherichia coli* ve *Bacillus cereus* bakterilerinin gram boyama sonucu görüntüleri yer almaktadır. A ve B görüntüleri *E.coli* bakterisine ait olup ; A görüntüsü nanopartiküle hiç maruz kalmamış kontrol grubu bakteri kolonilerinin gram boyama sonucundaki görüntüsü B ise maksimum doz olan 100 mg/l nanopartikül konsantrasyonuna 48 saat boyunca maruz kalmış bakteri kolonilerinin gram boyama sonucundaki görüntüsüdür. Kontrol grubunda *E.coli* kolonileri gram negatif çubuk bakteriler ile 100 mg/l nanopartiküle 48 saat boyunca maruz kalmış bakterilerinin gram boyama görüntüsü kıyaslandığında bakteri şekillerinde boyutun biraz daha arttığı görülmektedir. Diğer gram pozitif özellikteki *Bacillus subtilis* bakterisinin kontrol grubu ve 100 mg/l konsantrasyonunda 48 saat boyunca maruz kalmış grubu kıyaslandığında ; kontrol grubunda gram pozitif çubuk bakteriler nanopartiküle maruz kaldıktan sonra hücre şekillerinde boyutun biraz arttığı görülmektedir.



Şekil 4.56 *Ecsheria coli* ve *Bacillus cereus* bakterisinin gram boyama sonucu görüntüleri (A: Kontrol grubundaki *E.coli* bakterisinin gram boyama sonucu ; B: nano-Al₂O₃ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan *E.coli* bakterisinin gram boyama sonucu ; C: Kontrol grubundaki *B.cereus* bakterisinin gram boyama sonucu ; D: nano-Al₂O₃ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan *B.cereus* bakterisinin gram boyama sonucu)

Nano-Al₂O₃'ün bakteriler üzerine toksisitesi ile ilgili yapılan çalışmalara baktığımızda ; Jiang ve ark., (2009) nano-Al₂O₃, nano-ZnO ve nano-SiO₂ nanopartiküllerinin *E.coli* , *B.subtilis* ve *P.fluorescens*'a olan toksisitesini araştırmışlar. 2 saat boyunca 20 mg/l nano-Al₂O₃'e maruz kalan *E.coli* ve *B.subtilis* kolonilerinin sırasıyla % 36 ve % 57'sinin öldüğünü rapor etmişler. Çok kısa sürede yüksek toksisite rapor edilmiş olan bu çalışma ile tez çalışmasında tespit edilen EC₅₀ değerleri birbirlerini desteklemekte ve 48 saat sonunda *E.coli* için EC₅₀ değeri 26,9 mg/l ; *B.cereus* için 15,22 mg/l'dir. Düşük EC₅₀ değeri bakterinin nanopartiküle daha hassas olduğunu yani nano-Al₂O₃'in *B.cereus* bakterisine daha yüksek toksik etki gösterdiğini bize söylemektedir. Jiang ve ark., (2009)'nın yaptıkları çalışmada da bu sonuca paralel olarak *B.cereus* için % 57'sini ; *E.coli*'nin ise % 36'sını öldürmüştür.

Fajardo ve ark., (2014) nano- Al_2O_3 nanopartikülünün toprak organizmalarından *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas stutzeri* üzerine etkisini araştırmışlar. 5 mg/l konsantrasyonuna kadar nano- Al_2O_3 'in toksik etki göstermediğini fakat yapılan moleküler testlerinde oksidatif stres savunma sisteminin göstergesi olan katB gen ekspresyonunun arttığını rapor etmişler. Bu tez çalışmasında nano- Al_2O_3 nanopartikülünün *B.cereus* üzerine toksik etki yaratıp yaratmadığı araştırılmış ve 48 saat sonucunda % 50'sini etkileyen EC_{50} değerini 15,22 mg/l olarak tespit edilmiştir. Yukarıda bahsedilen 5 mg/l'ye kadar toksik etki göstermediği rapor edilen çalışma ile farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bunun sebeplerinden biri Fajardo ve ark., (2014)'nın yaptığı çalışmada nano- Al_2O_3 'in sitotoksik etkisine bakılırken, bu tez çalışmasında nanopartikülün artan konsantrasyonlarında *E.coli* ve *B.cereus* bakterileri 24 ve 48 saat maruz bırakılmış ve kontrol grubuna kıyasla canlı bakteri kolonileri sayılıp inhibisyonlar hesaplanmıştır. Nanopartikülün bakteri üzerindeki toksik etkisi hala tam olarak açıklanamamakla birlikte bazı hipotezler öne sürülmektedir. Bunlara örnek olarak nanopartiküllerin ışığa olan hassasiyetleri ve spesifik dalga boylarında ROS (Reactive Oxygen Species/Reaktif Oksijen Türleri) üretimi verilmektedir (Jiang ve ark., 2009).

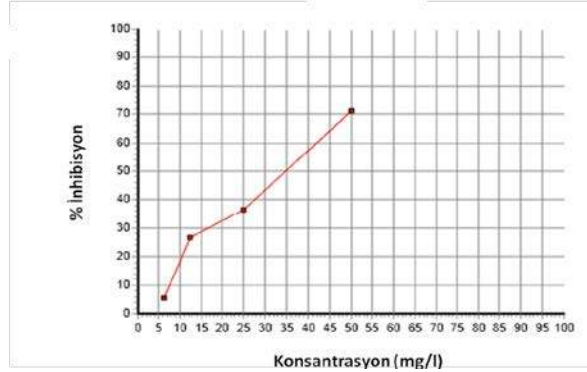
4.3.2 Bakteri (*Vibrio fischeri*) Biyoluminesans Değerine Göre Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano- Al_2O_3 'in artan konsantrasyonlarına karşı biyoluminesans bakterisi olan *Vibrio fischeri* 'nin luminesans değeri ölçülmüştür. *Vibrio fischeri* bakterisinin nano- Al_2O_3 'e maruz kaldığı süre arttıkça, luminesans değerinin azaldığı ve toksisitenin arttığı görülmektedir. Mikrotox deneyi nano- Al_2O_3 'in 100 mg/l stok çözeltisi hazırlanmış, % 3'lük NaCl ile seyreltmeler yapılmış Lumistox 300 (Hach Lange) ile bakterinin luminesans değeri ölçülmüştür. Yapılan seyreltmelerin en düşüğü 3,125 mg/l'de ölçülen inhibisyon % 2,64 ; 6,25 mg/l nano- Al_2O_3 dozunda % 5,48 ; 12,5 mg/l 'de % 26,63 ; 25 mg/l'de % 36,52 ; 50 mg/l'de % 71,26 ; 100 mg/l nano- Al_2O_3 dozunda % 99,61 inhibisyon gerçekleşmiştir (Tablo 4.27).

Tablo 4.27 30 dakika sonucu nano-Al₂O₃ nanopartikülünün artan konsantrasyonlarına karşı *Vibrio fischeri* – biyoluminesans bakterisinin % inhibisyon değerleri

nano-Al ₂ O ₃ Konsantrasyonları (mg/l)	% İnhibisyon
3,125 mg/l	2,64
6,25 mg/l	5,48
12,5 mg/l	26,63
25 mg/l	36,52
50 mg/l	71,26
100 mg/l	99,61

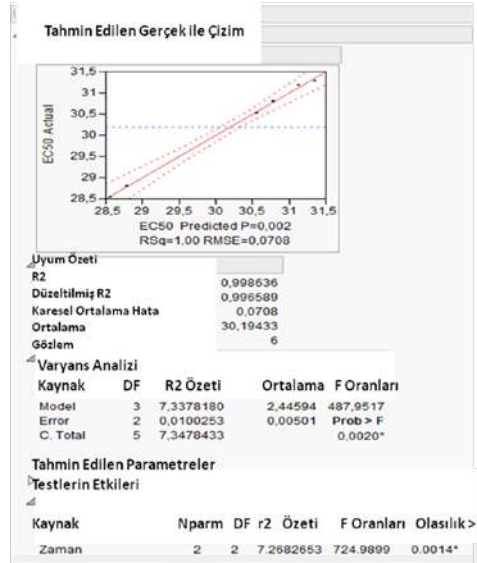
Şekil 4.57’de Mikrothox deneyinin sonucunda Lumistox 300 cihazından alınan grafik yer almaktadır. Grafikte artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlara (3,125 mg/l ; 6,25 mg/l ; 12,5 mg/l ; 25 mg/l ; 50 mg/l ; 100 mg/l) karşı *V.fischeri* bakterisinin % inhibisyon değerleri yer almaktadır. Nano-Al₂O₃ nanopartikülünün *Vibrio fischeri* bakterisinin % 50’sine etki eden dozu (EC₅₀ Değeri) 30 dakika sonucunda 28,806 mg/l olarak hesaplanmıştır. *Vibrio fischeri* biyoluminesans bakterisi nano-ZnO’e 5 dakika maruz kaldığındaki EC₅₀ değeri 31,29 mg/l ; 15 dakika maruz kaldığındaki EC₅₀ değeri 30,81mg/l’ye düşmüştür. Bakterinin nanopartiküle maruz kalma süresi arttıkça EC₅₀ değerinde bir azalma gözlenmiş ve bakterinin naopartiküle olan hassasiyeti artmıştır.



Şekil 4.57 nano-Al₂O₃’in artan konsantrasyonlarına karşı % inhibisyon değerleri (EC₅₀ değeri=28,806 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonları ile *Vibrio fischeri* bakterisinin 5. ; 15. ve 30. dakikalarındaki EC₅₀ değerlerinin arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,998). Test sonucu Şekil 4.58’de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi

sonucunda zaman ($P=0,014 < 0,05$) değişkeninin EC_{50} değerleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0020 < 0,05$).



Şekil 4.58 *Vibrio fischeri* bakterisinin ANOVA testi sonuçları

Nano- Al_2O_3 'in *Vibrio fischeri* bakterisi üzerine toksik etkisinin çalışıldığı bir literatür bilgisi saptanamamıştır.

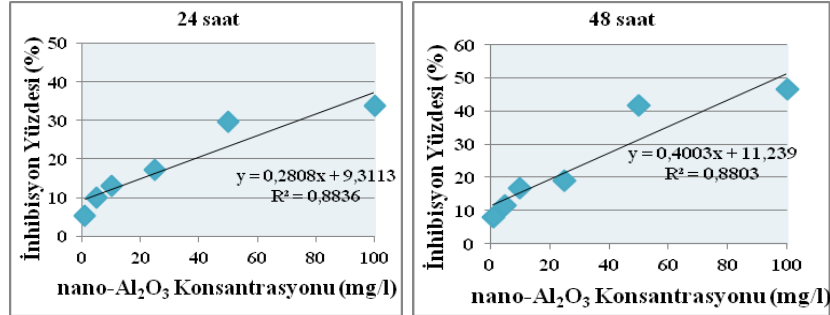
4.3.3 Anaerobik Bakteri Kullanılarak Metan Gazı Ölçümlerine Dayalı Toksisite Testi (ATA-Anaerobik Toksisite Testi) Sonuçları

Nano- Al_2O_3 nanopartikülünün artan konsantrasyonlarının, anaerobik bakterilere toksik etki yapıp yapmadığı ATA-anaerobik toksisite testi ile incelenmiştir. 150 ml'lik sterill kapaklı şişelerde artan nanopartikül konsantrasyonlarında metan gazı ölçümleri yapılmıştır. Kontrol grubunda sadece substrat olarak glukoz bulunurken, diğer şişelerde 1 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 mg/l nano- Al_2O_3 nanopartikülü konularak inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonucunda kontrol grubunda oluşan CH_4 gazı miktarı 16,8 ml iken , 1 mg/l nano- Al_2O_3 dozunda 15,9 ml ; 5 mg/l nano- Al_2O_3 dozunda 15,1 ml ; 10 mg/l nano- Al_2O_3 dozunda 14,6 ml ; 25 mg/l nano- Al_2O_3 dozunda 13,9 ml ; 50 mg/l konsantrasyonunda 11,8 ml ve 100 mg/l nano- Al_2O_3 dozunda metan gazı miktarı 11,1 ml'ye düşmüştür (Tablo 4.28). 48 saat sonucunda kontrol grubunda 17,2 ml CH_4 gazı oluşurken 1 mg/l ; 5 mg/l ; 10 mg/l ; 25 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano- Al_2O_3 dozunda sırasıyla metan gazı miktarları 15,8 ml ; 15,2 ml ; 14,3 ml ; 13,9 ml ; 10 ml ; 9,2 ml'ye düşmüştür (Tablo 4.28).

Tablo 4.28 Artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu metan gazı miktarı ve inhibisyon yüzdesi

nano-Al ₂ O ₃	24 saat sonucu		48 saat sonucu	
	Metan Gazı Miktarı (ml)	İnhibisyon Yüzdesi (%)	Metan Gazı Miktarı (ml)	İnhibisyon Yüzdesi (%)
Kontrol	16,8	0	17,2	0
1 mg / l	15,9	5,3	15,8	8,1
5 mg / l	15,1	10,1	15,2	11,6
10 mg / l	14,6	13,1	14,3	16,8
25 mg / l	13,9	17,3	13,9	19,1
50 mg / l	11,8	29,8	10	41,8
100 mg / l	11,1	33,9	9,2	46,5

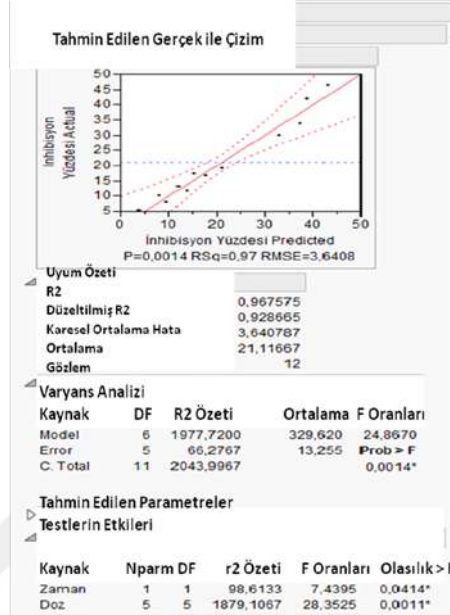
Şekil 4.59’da artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri yer almaktadır. Şekil 4.59’dan hesaplanabilen metan bakterilerinin % 50’sini inhibe eden EC₅₀ değeri 24 saat için 96,83 mg/l ; 48 saat için 43,2 mg/l’dir. 24 saat sonucunda 1 mg/l’den 100 mg/l’ye çıkan nanopartikül konsantrasyonu anaerobik bakterilerin metan üretimini etkilemiş, inhibisyon oranı % 5,3’ten % 33,9’a çıkmıştır (Tablo 4.28). 48 saat sonucunda ise bu inhibisyon artmış ve 1 mg/l için % 8,1 ; 10 mg/l için % 16,8 ; 50 mg/l için 41,8 ve 100 mg/l için % 46,5’e yükselmiştir (Tablo 4.28).



Şekil 4.59 Artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₃₀ değeri= 96,83 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 43,2 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonları ile anaerobik metan Archae bakterilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,967$). Test sonucu Şekil 4.60’de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0414 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0011 <$

0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0014 < 0,05$).



Şekil 4.60 Anaerobik metan Archae bakterilerinin ANOVA testi sonuçları

Nano- Al_2O_3 'in anaerobik bakterilerinin metan gazı üretimine olan toksisitesinin çalışıldığı literatürlere bakıldığında çok az çalışma yapıldığı görülmektedir. Mu ve ark., (2011) tarafından nano- Al_2O_3 , nano- SiO_2 ve nano- ZnO 'in aktif çamur sisteminde anaerobik arıtıma olan etkisini çalışılmış ve 6 mg/ g-AKM ; 30 mg/g-AKM ; 150 mg/g-AKM dozlarındaki nano- Al_2O_3 'in metan gazı üretimine toksik etki yaratmadığını rapor etmişler. Bu tez çalışmasında da bu literatüre paralel olarak 24 saat sonucundaki akut toksisitesi sonucu EC_{50} değeri 96,83 mg/l olarak tespit edilmiş ; 100 mg/l'ye kadar çıkan konsantrasyonlarda bile yüksek toksisite gözlenmemiş, maksimum % 33,9 ml'ye kadar çıkmıştır.

4.3.4 Maya (*Candida albicans*) - Küf (*Aspergillus niger*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

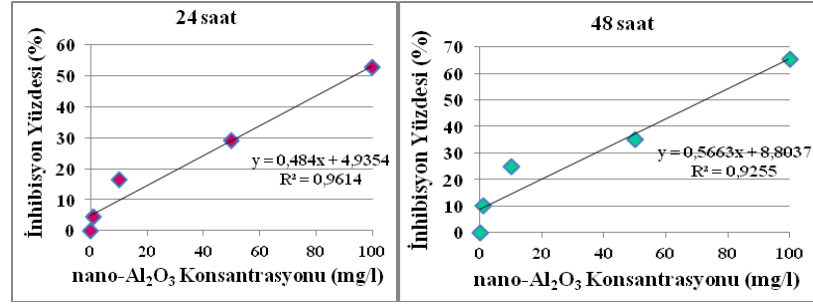
Nano- Al_2O_3 nanopartikülünün akut toksisitesi maya (*Candida albicans*) ve küf (*Aspergillus niger*) olmak üzerine iki farklı organizma üzerinde çalışılmıştır. Tablo 4.29'da artan nano- Al_2O_3 konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Candida albicans* maya kolonilerinin sayıları verilmektedir. Kontrol grubunda 24 saat

sonucunda 275000 ; 276000 ; 274000 adet koloni/ml iken 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l konsantrasyonlarına maruz kalan maya kolonilerinde kontrole göre daha az inhibisyon gözlenmiştir (Tablo 4.29). 48 saat sonucunda ise kontrol grubunda 281000 ; 280000 ; 282000 adet koloni/ml iken 1 mg/l konsantrasyonunda maya kolonilerinin sayısı 253000 ; 254000 ; 252000 adet koloni/ml , maksimum doz 100 mg/l konsantrasyonunda canlı maya koloni sayıları 97000 ; 98000 ; 96000 adet koloni/ml'e düşmüştür (Tablo 4.29).

Tablo 4.29 Artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Candida albicans* maya kolonilerinin sayıları

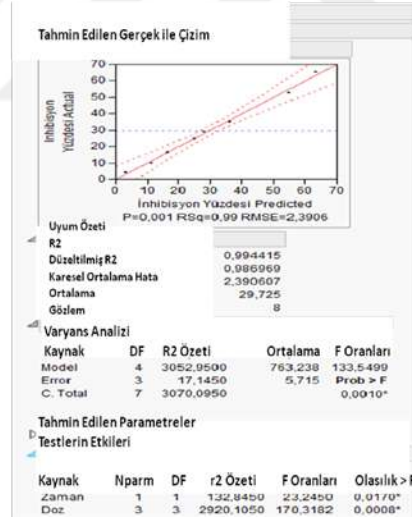
nano-Al ₂ O ₃	CANLI <i>C.albicans</i> MAYA KOLONİSİ SAYILARI (adet koloni /ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	275000	276000	274000	275000	281000	280000	282000	281000
1 mg / l	263000	262000	264000	263000	253000	254000	252000	253000
10 mg / l	231000	230000	229000	230000	211000	210000	212000	211000
50 mg / l	195000	196000	194000	195000	183000	184000	182000	183000
100 mg / l	130000	131000	129000	130000	97000	98000	96000	97000

Şekil 4.61'de *Candida albicans* maya kolonilerinin 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerinde nano-Al₂O₃'in artan konsantrasyonlarına karşı kontrole göre yüzde inhibisyonları gösterilmektedir. 24 saat sonucunda 1 mg/l nano-Al₂O₃ dozunda yüzde inhibisyon % 4,4 ; 10 mg/l , 50 mg/l ve 100 mg/l dozunda ise sırasıyla yüzde inhibisyon % 16,4 ; % 29,1 ; % 52,7'dir. 48 saat sonucunda ise 1 mg/l dozunda % 4,4'dan % 9,9'a ; 10 mg/l dozunda % 16,4'ten %24,9'a ; 50 mg/l dozunda % 29,1'den % 34,9'a ve 100mg/l nanopartikül dozunda inhibisyon % 52,7'den % 65,5'e yükselmiştir. Şekil 4.61'den hesaplanabilen EC₅₀ değeri 24 saat sonucunda 93,1 mg/l iken 48 saat sonucunda 72,7 mg/l'a düşmüştür. Nano-Al₂O₃ maruz kaldığı süre artıkça *Candida albicans* maya hücrelerinin hassasiyeti artmıştır. Ancak nano-Al₂O₃'in bakteriler üzerine inhibisyonu ile maya üzerine inhibisyonu kıyasladığımızda ; maya hücrelerinin nano-Al₂O₃'e karşı toleransının daha yüksek olduğunu bakterinin EC₅₀ değerlerine kıyasla daha yüksek EC₅₀ değerlerinden anlaşılmaktadır.



Şekil 4.61 Artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı *Candida albicans* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 93,1 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 72,7 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonları ile *C.albicans*'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,994). Test sonucu Şekil 4.62'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0170 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0008 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0010 < 0,05).



Şekil 4.62 *C.albicans*'in ANOVA testi sonuçları

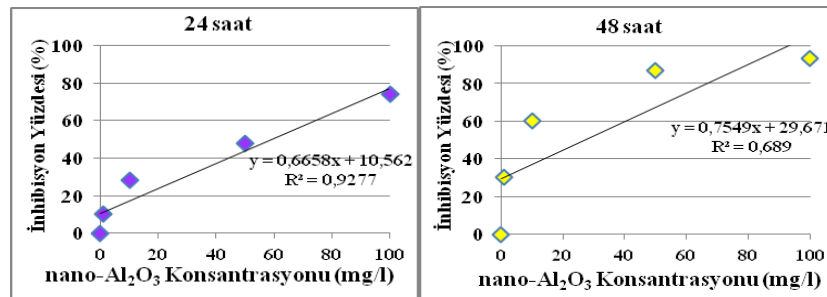
Nano-Al₂O₃ için akut toksisitesi çalışılan diğer mikroorganizma ise küf (*Aspergillus niger*) 'tür. Tablo 4.30'da artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Aspergillus niger* küf kolonilerinin sayıları verilmektedir. Kontrol grubunda 24 saat sonucunda *A.niger* kolonileri 50000 ; 51000 ; 49000 adet koloni/ml iken 100 mg/l nano-Al₂O₃'e maruz kalan *A.niger* kolonilerinin sayısı 13000 ; 12000 ; 14000 adet koloni/ml'e düşmüştür (Tablo 4.30). 48 saat sonucunda

kontrol grubundaki küf kolonilerinin sayısı 59000 ; 60000 ; 61000 adet koloni/ml iken 10 mg/l nano-Al₂O₃ konsantrasyonunda kontrol grubuna kıyasla 24000 ; 25000 ; 23000 adet koloni/ml'ye düşmüştür, 100 mg/l nano-Al₂O₃ dozunda *A.niger* sayıları 4000 ; 4100 ; 3900 adet koloni/ml'ye düşmüştür. (Tablo 4.30).

Tablo 4.30 Artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Aspergillus niger* - küf kolonilerinin sayıları

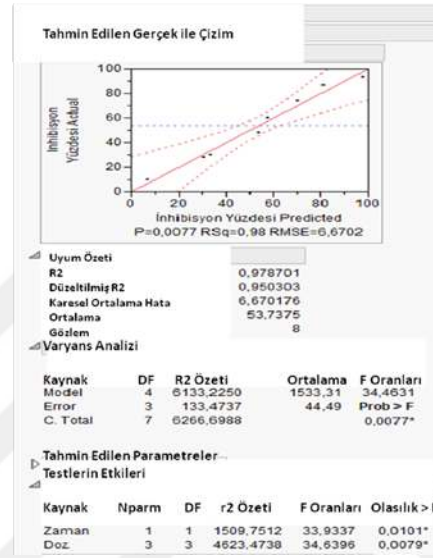
nano-Al ₂ O ₃	CANLI <i>A.niger</i> KÜF KOLONİSİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	50000	51000	49000	50000	59000	60000	61000	60000
1 mg /l	46000	45000	44000	45000	43000	42000	41000	42000
10 mg /l	37000	36000	35000	36000	24000	25000	23000	24000
50 mg /l	26000	25000	27000	26000	11000	12000	1000	8000
100 mg /l	13000	12000	14000	13000	4000	4100	3900	4000

Şekil 4.63'te artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşın *A.niger* kolonilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki yüzde inhibisyonları görülmektedir. 1 mg/l konsantrasyonunda 24 saat sonucunda inhibisyon % 10 iken 48 saat sonucunda bu inhibisyon % 30'a çıkmaktadır. 10 mg/l nano-Al₂O₃ dozu 24 saat sonucunda küf kolonilerinin % 28'ini inhibe ederken, 48 saat sonucunda % 60'ını inhibe etmektedir. Nano-Al₂O₃ dozu 50 mg/l'den 100 mg/l'e çıkarıldığında inhibisyon 24 saat sonucunda % 74 ; 48 saat sonucunda inhibisyon % 9,3 olmaktadır. Şekil 4.63'ten hesaplanabilen EC₅₀ değeri 24 saat sonucunda 59,2 mg/l iken 48 saat sonucunda 26,9 mg/l'a düşmüştür. nano-Al₂O₃'e maruz kalan küf kolonileri konsantrasyon miktarları arttıkça inhibisyonları artmıştır, maruz kalma süreleri arttıkça küf kolonilerinin nanopartiküle olan hassasiyeti artmıştır.



Şekil 4.63 Artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı *Aspergillus niger* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 59,2 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 26,9 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano- Al_2O_3 konsantrasyonları ile *A.niger*'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,978$). Test sonucu Şekil 4.64'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0101 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0079 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0077 < 0,05$).



Şekil 4.64 *A.niger*'in ANOVA testi sonuçları

Şekil 4.65(a)'da potato dextrose agarda *Candida albicans* kolonilerini görülmektedir. Kontrol petrisindeki maya kolonileri ile 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano- Al_2O_3 konsantrasyonlarındaki maya kolonilerini kıyasladığımızda inhibisyonun diğer bakteri türlerine kıyasla çok yüksek olmadığı görülmektedir [Şekil 4.65(a)]. Şekil 4.65(a)'de ise potato dextrose agarda *Aspergillus niger* kolonileri görülmektedir. Kontrol petrisindeki küf kolonilerini artan nanopartikül dozlarına maruz kalan küf kolonileri ile kıyasladığımızda 100 mg/l nano- Al_2O_3 konsantrasyonunda inhibisyonun yüksek olduğu (% 93,3) açıkça görülmektedir. *Aspergillus niger*, *Candida albicans*'a kıyasla nano- Al_2O_3 'e daha hassas olduğu Şekil 4.65(a) ve Şekil 4.65(b) ile görülmektedir. Ayrıca EC_{50} değerlerini kıyasladığımızda *A.niger*'in 48 saat sonucunda EC_{50} değeri 26,9 mg/l iken *Candida albicans*'ın 48 saat sonucunda EC_{50} değeri 72,7 mg/l'dir (Şekil 4.61 ve Şekil 4.63).



(a)

(b)

Şekil 4.65 (a): Artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı *Candida albicans* maya hücrelerinin sayılarının değişimi (b): artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı *Aspergillus niger* küf hücrelerinin sayılarının değişimi

Nano-Al₂O₃'in funguslar üzerine toksik etkisinin çalışıldığı literatüre baktığımızda sadece maya olarak *Saccharomyces cerevisiae* ile çalışıldığı görülmektedir. Garcia-Saucedo ve ark., (2011) nano-HfO₂, nano-SiO₂, nano-Al₂O₃ ve nano-CeO₂ nanopartiküllerin maya kolonileri üzerindeki toksisitesini çalışmışlar ve nano-CeO₂ haricindeki nanopartiküller için 1000 mg/l konsantrasyona kadar toksik etki göstermediğini rapor etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise nano-Al₂O₃'in 1 ; 10 ; 50 ve 100 mg/l konsantrasyonları çalışılmış ve çok yüksek toksik sonuçlar elde edilmese de % 50'sini etkileyen doz *C.albicans* için 24 saat sonucunda 59,2 mg/l, *A.niger* için 59,2 mg/l olarak tespit edilmiştir. Aynı nanopartikülün aynı tür olmasa bile maya organizmasına olan farklı cevabı ; nano-Al₂O₃'ün maya kültüründeki agregasyonundan kaynaklanıyor olabilir. Çünkü nanopartikülün dağılımı ya da agregasyonu ; partikül boyutunun nanopartikülün sitotoksik aktivitesini etkileyen anahtar bir faktördür.

4.3.5 Alg (*Chlorella sp.*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano-Al₂O₃ nanopartikülünün alg üzerine inhibisyonu *Chlorella sp.* türü ile çalışılmıştır. Yapılan toksisite çalışmasında artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına (0,01 mg/l ; 0,25 mg/l ; 0,5 mg/l ; 1 mg/l ; 5 mg/l) karşı alg hücrelerinin 24 ; 48 ve 72 saat boyunca büyümelerine olan inhibisyon araştırılmıştır. Tablo 4.31'de artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı 24, 48 ve 72 saat sonunda 10 µl'deki alg

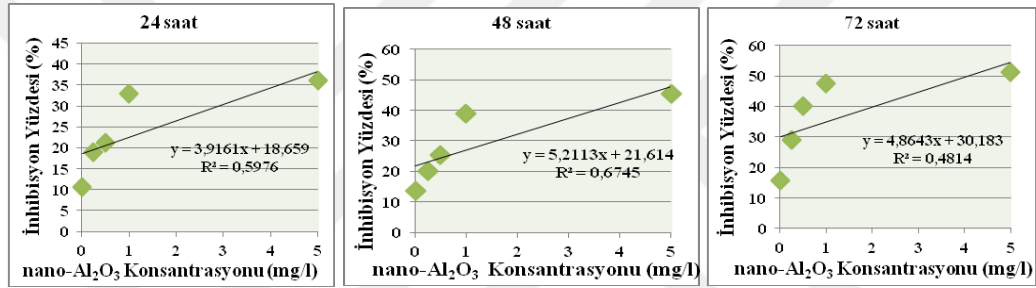
hücrelerinin sayısı verilmiştir. Her bir konsantrasyon ve bekleme süresi 3 seri şeklinde çalışılmıştır. T=0'daki alg hücresi sayısı 54 adet alg/10 µl iken 24 saat inkübasyon periyodundan sonra kontrol grubundaki alg sayıları 95 ; 97 ; 90 adet alg / 10 µl iken 0,01 mg/l nano-Al₂O₃ maruz kalmış alg hücrelerinin sayısı 89 ; 82 ; 81 adet alg/ 10 µl ; 0,25 mg/l nano-Al₂O₃'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 78 ; 76 ; 77 adet alg/ 10 µl ; 0,5 mg/l nano-Al₂O₃'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 75 ; 76 ; 71 adet alg/ 10 µl ; 1 mg/l nano-Al₂O₃'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 63 ; 61 ; 65 adet alg/ 10 µl ; maksimum doz 5 mg/l nano-Al₂O₃'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 59 ; 60 ; 61 adet alg/ 10 µl'e düşmüştür (Tablo 4.31). 48 saat sonunda kontrol grubundaki alg sayıları 98 ; 96 ; 91 adet alg/ 10 µl iken 0,01 mg/l nano-Al₂O₃ konsantrasyonunda alg sayısı 82 ; 84 ; 80 adet alg/ 10 µl ; 0,25 mg/l nano-Al₂O₃ dozunda 76 ; 79 ; 75 adet alg/ 10 µl ; 0,5 mg/l nano-Al₂O₃ dozunda alg sayısı 70 ; 72 ; 71 adet alg/ 10 µl ; 1 mg/l nano-Al₂O₃ konsantrasyonunda alg sayısı 59 ; 58 ; 57 adet alg/ 10 µl ve 5 mg/l nano-Al₂O₃ dozundaki alg sayıları 55 ; 57 ; 51 adet alg/ 10 µl'ye düşmüştür (Tablo 4.31). 72 saat sonunda kontrol grubundaki alg sayıları 112 ; 106 ; 103 adet alg/ 10 µl iken 0,01 mg/l konsantrasyonunda alg sayıları 89 ; 91 ; 90 adet alg/ 10 µl'ye ; 0,25 mg/l nano-Al₂O₃ dozunda 81 ; 75 ; 72 adet alg/ 10 µl'ye ; 0,5 mg/l' de 68 ; 61 ; 63 adet alg/10 µl'ye ; 1 mg/l nano-Al₂O₃ konsantrasyonunda 61 ; 55 ; 52 adet alg/ 10 µl'ye ve 5 mg/l nano-Al₂O₃ konsantrasyonunda 55 ; 50 ; 51 adet alg/ 10 µl'ye düşmüştür (Tablo 4.31).

Tablo 4.31 Artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Chlorella sp* - alg hücresi sayıları

Nano-Al ₂ O ₃	ALG (<i>Chlorella sp.</i>) SAYILARI (adet Alg / 10 µl)											
	24 saat sonucu				48 saat sonucu				72 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama
Kontrol	95	97	90	94	98	96	91	95	112	106	103	107
0,01 mg / l	89	82	81	84	82	84	80	82	89	91	90	90
0,25 mg / l	78	76	77	75	76	79	70	77	81	75	72	76
0,5 mg / l	75	76	71	74	70	72	71	71	68	61	63	64
1 mg / l	63	61	65	63	59	58	57	58	61	55	52	56
5 mg / l	59	60	61	60	55	50	51	52	55	51	50	52

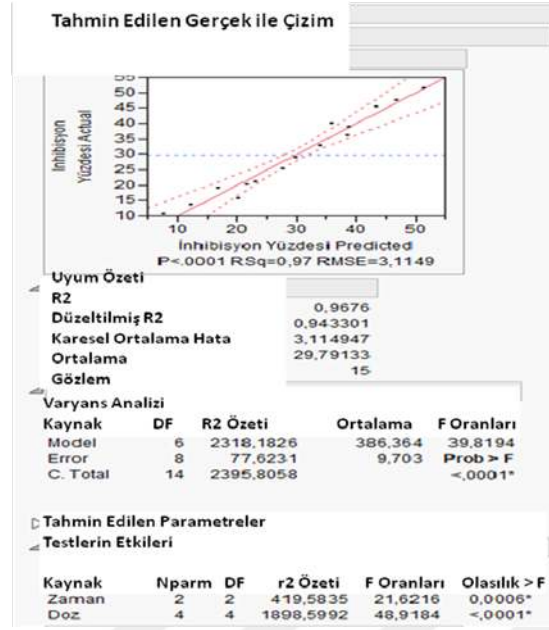
Şekil 4.66'da artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı *Chlorella sp*'nin yüzde inhibisyon değerleri yer almaktadır. 24 saat sonucunda 0,01 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l ve 5 mg/l nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarında inhibisyon yüzdeleri

sırasıyla % 10,6 ; % 18,9 ; % 21,2 ; % 32,9 ; % 36,2'dir. 48 saat sonunda bu inhibisyon değerleri biraz daha artmış, sırasıyla % 13,6 ; % 20,2 ; % 25,3 ; % 38,9 ; % 45,3. 72 saat sonunda 0,01 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l ve 5 mg/l nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarında inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 15,8 ; % 28,9 ; % 40,1 ; % 47,6 ; % 51,4'dır. Şekil 4.66'dan hesaplanabilen alg hücrelerinin % 30'sini inhibe eden doz EC₃₀ değeri 24 saat için 12,07 mg/l, % 40'sini inhibe eden doz EC₄₀ değeri 48 saat için 3,5 mg/l ve % 50'sini inhibe eden doz EC₅₀ değeri 72 saat için 4,07 mg/l nano-Al₂O₃ (Şekil 4.66). EC₅₀ değeri 72 saat için hesaplanabilirken 24 ve 48 saat için sırasıyla EC₃₀ ve EC₄₀ hesaplanabilmiştir. EC₅₀'ye dönüştürdüğümüz bu değerler 24 saat için 4,8 mg/l ; 48 saat için 4,3 mg/l'dir.



Şekil 4.66 Artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı *Chlorella sp.*'nin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₃₀ değeri= 2,9 mg/l; 48 saat sonucu EC₄₀ değeri=3,5 mg/l ; 72 saat sonucu EC₅₀ değeri=4,07 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonları ile *Chlorella sp.*'nin 24 ; 48 ve 72 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,943). Test sonucu Şekil 4.67'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0006 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0001 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0001 < 0,05).



Şekil 4.67 *Chlorella sp.*'nin ANOVA testi sonuçları

Literatür çalışmaları araştırıldığında nano- Al_2O_3 'in *Chlorella sp.*'ye olan toksik etkisinin bir çok araştırmacı tarafından çalışıldığı görülmektedir. Sadiq ve ark., (2011) nano- Al_2O_3 'in *Scenedesmus sp.* ve *Chlorella sp.* olmak üzere iki farklı mikroalg üzerindeki toksik etkisini araştırmışlar. 72 saat sonucunda EC_{50} değerini *Chlorella sp.* için 45,4 mg/l ; *Scenedesmus sp.* için 39,35 mg/l olarak rapor etmişlerdir. Nano- Al_2O_3 'e maruz kalan *Chlorella sp.* kültürünün SEM görüntülerinde nano- Al_2O_3 nanopartikülünün hücre etrafını tamamen çevreleyip kümелendiğini tespit etmişler ve toksisiteye sebep olan faktörler arasında başlıca neden bu olabileceğini öngörmüşlerdir. Pakrashi ve ark., (2013) alüminyum oksit nanopartikülüne maruz kalan alg hücrelerinin sitotoksitesini incelemişler. 24 saat sonucunda 1; 0,5 ve 0,05 mg/l konsantrasyonlarında hücre canlılığının % 18'e düştüğü ve membran hasarının ise 1 mg/l için % 16,3 olduğunu ; 72 saat sonucunda ise toksik etki arttığını, hücre canlılığı % 5,3'e düştüğünü ve membran hasarı 1 mg/l için % 17,5'e yükseldiğini rapor etmişler. Pakrashi ve ark., (2013)'ün yaptıkları çalışmalara paralel olarak, alg kültürünün nano- Al_2O_3 'in düşük konsantrasyon aralıklarına maruz bırakılmasına rağmen yüksek toksisite göstermiş ve 72 saat sonucunda % 50'sini etkileyen dozun 4,07 mg/l olarak hesaplanmıştır.

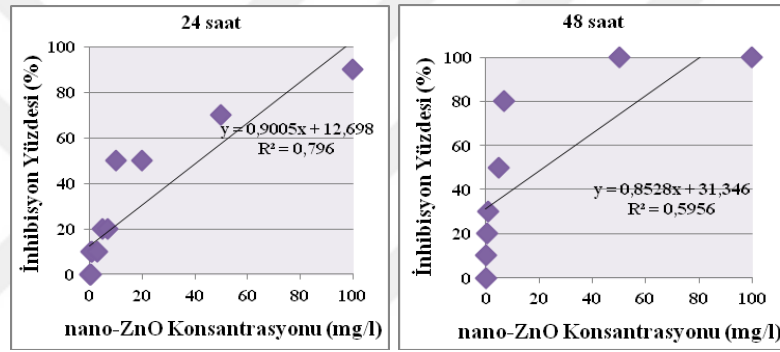
4.3.6 Su Piresi (*Daphnia magna*) Akut Toksikite Testi Sonuçları

Sucul besin ağının önemli bir parçası olan *Daphnia magna* ile yapılan akut toksisite testi nano- Al_2O_3 nanopartikülünün artan dozlarının *Daphnia magna* üzerine inhibisyonuna dayanmaktadır. Deney ortamında nano- Al_2O_3 'ün değişen konsantrasyonları 100 ml olarak hazırlanıp, her bir konsantrasyon için 10 adet *D.magna* konulmuştur, ayrıca kontrol grubu olarak *D.magna*'nın mineral ortamını içeren 100 ml'lik ortama 10 adet *D.magna* konularak 24 ve 48 saat için ölüm olup olmadığı izlenmiştir. Tablo 4.32'de artan nano- Al_2O_3 konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat sonucunda canlı ve ölen *D.magna* sayıları yer almaktadır. 24 saat sonucunda 0,01 ; 0,05 ; 0,5 ; 0,7 mg/l nano- Al_2O_3 konsantrasyonları *D.magna* üzerinde toksik etki göstermemiş, ölüm gerçekleştirmemiştir. 1 ve 3 mg/l nano- Al_2O_3 dozunda inhibisyon gözlenmeye başlamış ve 2 adet *D.magna* ölmüştür ; 50 ve 100 mg/l nano- Al_2O_3 dozunda maksimum inhibisyon gözlenmiş, 9 adet *D.magna* ölmüştür (Tablo 4.32). 48 saat sonucunda minimum konsantrasyonlarda bile *D.magna* üzerine inhibisyon gerçekleşmiş ; 0,01 ve 0,05 mg/l nano- Al_2O_3 dozunda 1 adet *D.magna* ölmüştür. nano- Al_2O_3 artan konsantrasyonları *D.magna* üzerinde toksik etki göstermiş, doz arttıkça ölüm sayıları artmış, maksimum konsantrasyonda 100 mg/l 'de tüm *D.magna*'lar inhibisyona uğramıştır (Tablo 4.32).

Tablo 4.32 Artan nano- Al_2O_3 konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Daphnia magna* - su piresi sayıları

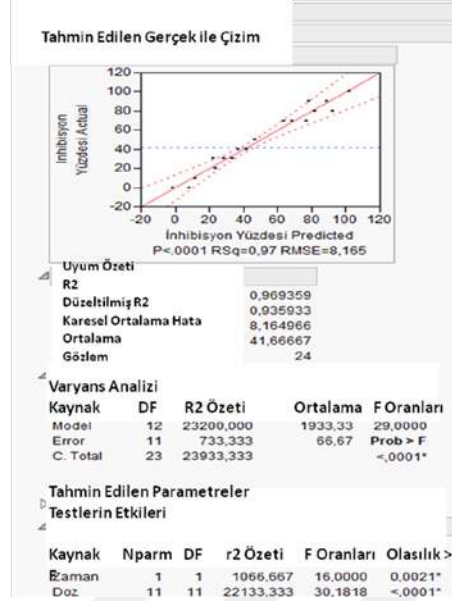
nano- Al_2O_3 konsantrasyonu (mg/l)	24 saat sonucu		nano- Al_2O_3 konsantrasyonu (mg/l)	48 saat sonucu	
	Canlı <i>Daphnia</i> sayısı	Ölen <i>Daphnia</i> sayısı		Canlı <i>Daphnia</i> sayısı	Ölen <i>Daphnia</i> sayısı
0,01	10	0	0,01	9	1
0,05	10	0	0,05	9	1
0,5	10	0	0,5	7	3
0,7	10	0	0,7	7	3
1	8	2	1	6	4
3	8	2	3	6	4
5	7	3	5	6	4
7	7	3	7	5	5
10	3	7	10	3	7
20	3	7	20	2	8
50	1	9	50	2	8
100	1	9	100	0	10

Şekil 4.68’de artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı *D.magna*’ların yüzde inhibisyonun grafiği bulunmaktadır. 24 saat sonucunda 0,01 ; 0,05 ; 0,5 ; 0,7 mg/l nano-Al₂O₃ dozları *D.magna*’yı inhibe etmezken ; 5 ve 7 mg/l’de % 30 inhibisyon ; 10 ve 20 mg/l’de % 70 inhibisyon ; 50 ve 100 mg/l’de % 90 inhibisyon gerçekleştirmiştir (Şekil 4.68). 48 saat sonucunda 0,01 ve 0,05 mg/l nano-Al₂O₃ dozunda % 10 inhibisyon gerçekleşirken ; 1 ; 3 ; 5 mg/l nano-Al₂O₃ dozunda % 40 inhibisyon gerçekleşmiş ; 20 ve 50 mg/l’de % 80 inhibisyon ; 100 mg/l nano-Al₂O₃ dozunda ise % 100 gerçekleşmiştir (Tablo 4.32). Şekil 31.’den hesaplanabilen *D.magna*’nın % 50’sini etkilen doz – EC₅₀ değeri: 24 saat için 36,13 mg/l; 48 saat için 23,37 mg/l’dir.



Şekil 4.68 Artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı *Daphnia magna*’ların yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 36,13 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=23,37 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonları ile *Daphnia magna*’nın 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,969). Test sonucu Şekil 4.69’da yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0021 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0001 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0001 < 0,05).



Şekil 4.69 *Daphnia magna*'nın ANOVA testi sonuçları

Zhu ve ark., (2009)'nın nano- Al_2O_3 'in *Daphnia magna* üzerine akut toksisitesi çalışmışlar ve 48 saat sonucu EC_{50} değerini 114,357 mg/l olarak rapor etmişler. Yaptıkları araştırmalarda *D.magna*'nın midesinde nanopartikülün akümüle olduğunu tespit etmişler ve bunun sebebi olarak *D.magna*'nın sucul ortamda filtreleme yaparak beslenmesi olabileceğini öngörmüşlerdir. Griffitt ve ark., (2008) *Daphnia pulex* ile çalışmış 48 saat sonucunda nano- Al_2O_3 'in LC_{50} (Lethal Dose-Öldürücü Doz) değerini > 10 mg/l olarak rapor etmişlerdir.

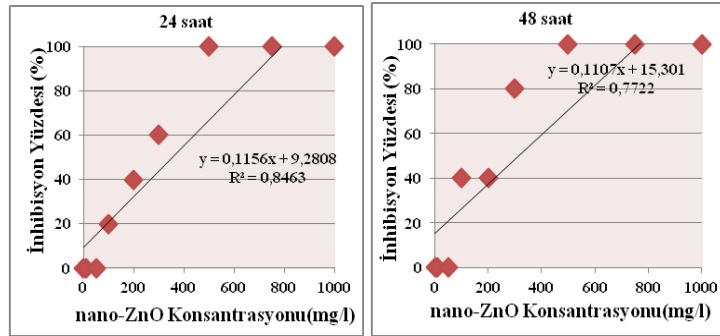
4.3.7 Balık (Ispides - *Poecillia reticula*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano- Al_2O_3 nanopartikülünün artan konsantrasyonlarının balık üzerine inhibisyonu incelenmiştir. Balık olarak kullanılan Ispides - *Poecillia reticula*'nin 24 ve 48 saat sonucu kontrole kıyasla canlı ve ölü sayıları Tablo 4.33'de yer almaktadır. Diğer yapılan akut toksisite testlerinden farklı olarak balık akut toksisite deneyinde daha yüksek konsantrasyonlar çalışılmıştır. 1 ; 10 ; 50 ; 100 ; 200 ; 300 mg/l nano- Al_2O_3 konsantrasyonuna kadar kontrol grubuna kıyasla balık ölümleri 24 saat sonucunda gözlenmemiş, 500 ; 750 ; 1000 mg/l nano- Al_2O_3 konsantrasyonunda 1 balık ölümü gözlenmiştir. 48 saat sonunda 24 saat ile paralel sonuçlar gözlenmiş olup ; toksisite 300 mg/l nano- Al_2O_3 dozunda başlamıştır ; 300, 500, 750, 1000 mg/l nano- Al_2O_3 dozunda kontrol grubuna kıyasla 1 balık ölümü gerçekleşmiştir (Tablo 4.33).

Tablo 4.33 Artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu lepestes - *Poecillia reticula* sayıları

nano-Al ₂ O ₃ konsantrasyonu (mg/l)	Kontroldeki Balık Sayısı	24 saat sonucu		48 saat sonucu	
		Canlı Balık Sayısı	Ölü balık sayısı	Canlı Balık Sayısı	Ölü balık sayısı
1	5	5	0	5	0
10	5	5	0	5	0
50	5	5	0	5	0
100	5	5	0	5	0
200	5	5	0	5	0
300	5	5	0	4	1
500	5	4	1	4	1
750	5	4	1	4	1
1000	5	4	1	4	1

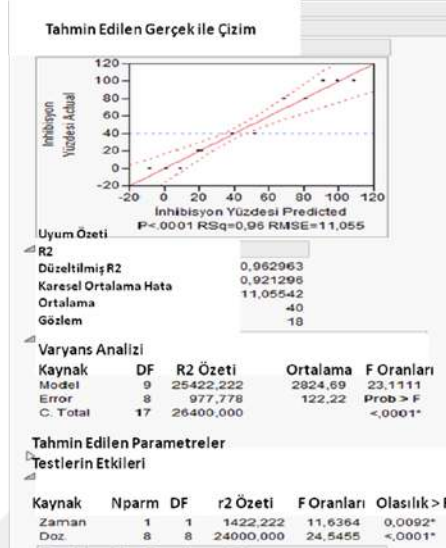
Şekil 4.70 artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı lepestes - *Poecillia reticula*'lerin yüzde inhibisyonun grafiği yer almaktadır. 24 saat sonucunda 1 mg/l ile 300 mg/l arasındaki nano-Al₂O₃'in lepestes - *Poecillia reticula*'e karşı toksisitenin gerçekleşmediği , 500 ; 750 ; 1000 mg/l'de % 20 inhibisyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.70). 48 saat sonucunda 1 mg/l ve 200 mg/l nano-Al₂O₃ dozunda inhibisyon gerçekleşmemiş ; 300, 500, 750, 1000 mg/l'de % 20 inhibisyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.70). Nano-Al₂O₃ nanopartikülünün balıkların % 20'sine etki eden dozu (EC₂₀ Değeri) 24 saat sonucu EC₂₀ Değeri= 849,8 mg/l; 48 saat sonucu EC₂₀ Değeri=771,3 mg/l Şekil 4.70'den hesaplanmıştır.



Şekil 4.70 Artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonlarına karşı lepestes - *Poecillia reticula*'lerin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₂₀ değeri= 849,8 mg/l; 48 saat sonucu EC₂₀ değeri=771,3 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-Al₂O₃ konsantrasyonları ile lepestes – *Poecillia reticula* 'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,962). Test sonucu Şekil 4.71'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans

analizi sonucunda zaman ($P=0,0092 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0001 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0001 < 0,05$).



Şekil 4.71 Lepistes – *Poecillia reticula*'nın ANOVA testi sonuçları

Nano- Al_2O_3 'in lepistes - *Poecillia reticula* üzerine akut toksisitesinin çalışıldığı bir literatür saptanmamıştır.

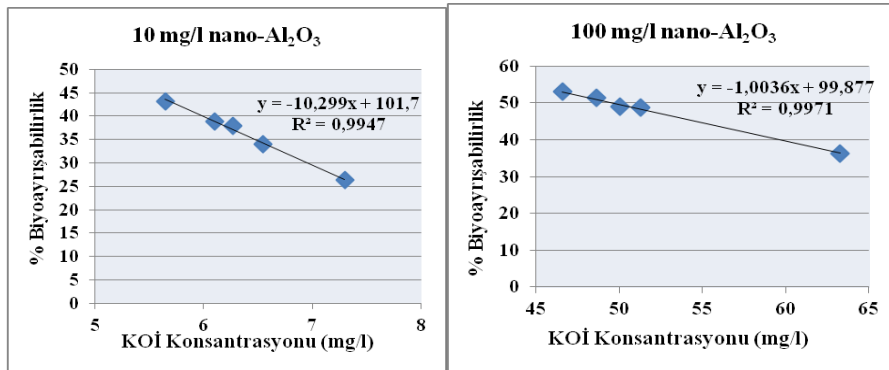
4.3.8 Biyoayrışabilirlik Testi Sonuçları

Nano- Al_2O_3 nanopartikülünün canlı mikroorganizmalar kullanılarak biyoayrışabilirliklerinin belirlenmesi amaçlanmış, ayrıca alıcı ortama deşarj edildiğinde canlı ekosistem tarafından tolere edilebilmesi için hangi seyreltmede verilmesinin daha uygun olup olmadığı araştırılmıştır. Nano- Al_2O_3 'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında % giderimleri 28 günlük süre boyunca belli zaman aralıklarında ölçülen KOİ değerleri ile hesaplanmıştır (Tablo 4.34). Başlangıç KOİ değerleri 10 ve 100 mg/l iken 5 ; 10 ; 15 ; 20 ve 28. günlerde azalan KOİ değerleri ölçülmüştür. t=0. günde KOİ değeri 10 mg/l iken 5. günde ölçülen KOİ 7,301 mg/l'e ; 10. günde ölçülen KOİ 6,548 mg/l ; 15. günde ölçülen KOİ 6,269 mg/l ; 20. günde ölçülen KOİ 6,105 mg/l'ye 28. günün sonunda ölçülen KOİ ise 5,647 mg/l olarak ölçülmüştür (Tablo 4.34). t=0. günde KOİ değeri 100 mg/l iken ; 5. Günde 91,6 mg/l ; 10. günde 90,8 mg/l ; 15.günde 82,1 mg/l ; 20. günde 79,4 mg/l ; 28. günün sonunda ise 75,1 mg/l olarak ölçülmüştür (Tablo 4.34).

Tablo 4.34 28 gün boyunca nano- Al_2O_3 'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonları için % biyoayrışabilirlik değerleri

Günler	10 mg/l nano- Al_2O_3		100 mg/l nano- Al_2O_3	
	KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	% Giderim	KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	% Giderim
t=0	10	0	100	0
t=5	7,301	26,9	91,6	8,4
t=10	6,548	34,5	90,8	9,2
t=15	6,269	37,3	82,1	17,9
t=20	6,105	38,9	79,4	20,6
t=28	5,647	43,5	75,1	24,9

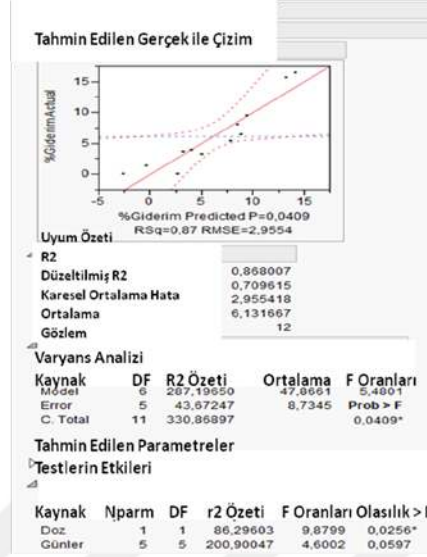
Şekil 4.72'de günlere karşı 10 mg/l ve 100 mg/l nano- Al_2O_3 'in % biyoayrışabilirlik değerleri yer almaktadır. 10 ve 100 mg/l başlangıç KOİ miktarı ortama konulan aerobik çamur bakteri tarafından ayrıştırıldığı için zaman artıkça azalma gözlenmiştir. 10 mg/l başlangıç KOİ ile başlatılan akvaryumda ; 5. günde % giderim % 26,9 iken ; 20. güne gelindiğinde % 38,9'a ; 28. günde % giderim % 43,5'e yükselmiştir. 100 mg/l başlangıç KOİ miktarı için 5. günde % giderim % 8,4 iken ; 10. günde % giderim % 9,2 ; 20. güne gelindiğinde % 20,6'e ; 28. günde % giderim % 24,9'e yükselmiştir (Tablo 4.34). 28 gün boyunca aerobik ortamda aktif çamur mikroorganizmaları tarafından ortamdaki KOİ ayrıştırılmaktadır.



Şekil 4.72 10 ve 100 mg/l nano- Al_2O_3 konsantrasyonlarının 28 günlük % biyoayrışabilirlik değerleri

Yapılan ANOVA testinde artan nano- Al_2O_3 konsantrasyonları ile biyoayrışabilirlik testinin 10 ve 100 mg/l nano- Al_2O_3 konsantrasyonlarının günlere karşı % giderimi arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,866$). Test sonucu Şekil 4.73'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda konsantrasyon ($P=0,0256 <$

0,05) değişkenin % giderime etkili olduğu ; günler ($P=0,0597 > 0,05$) değişkeninin % giderim üzerinde etkili olmadığı ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0409 < 0,05$).



Şekil 4.73 Biyoayrışabilirlik testi'nin ANOVA testi sonuçları

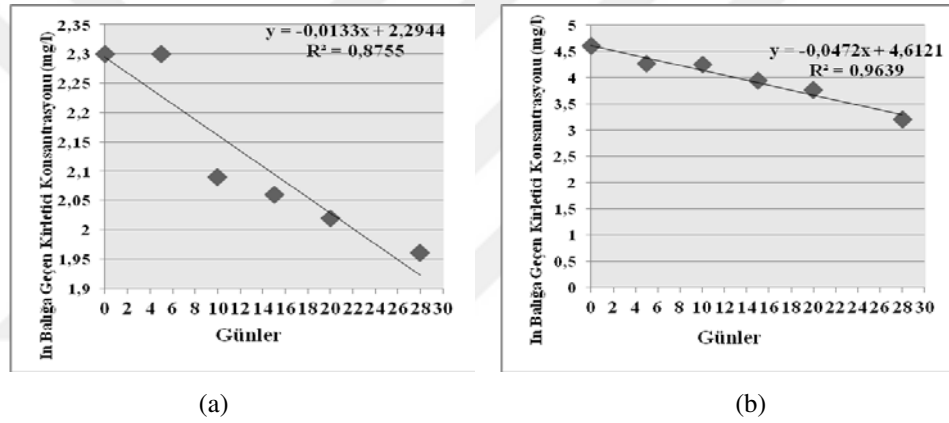
Nano- Al_2O_3 'in biyoayrışabilirliğini çalışmış bir literatür saptanmamıştır.

4.3.9 Biyoakümüülasyon Testi Sonuçları

Nano- Al_2O_3 nanopartikülünün farklı konsantrasyonlarının canlı organizmadaki salınım ve birikimin saptanması amaçlanmıştır. Canlı organizma olarak lepidotes - *Poecillia reticula* kullanılmış, 28 gün boyunca 10 ve 100 mg/l konsantrasyonundaki nanopartikülün KOİ değerleri ölçülmüş ve 28 günlük periyodun sonunda balıklar temiz suya alınıp, balıktan suya geçen KOİ değerleri 28 gün boyunca hesaplanmıştır. Tablo 4.35'te 28 gün boyunca nano- Al_2O_3 'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları yer almaktadır. Biyoakümüülasyon faktörü (BCF) 'nın hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanmıştır.

Tablo 4.35'te 10 mg/l nano- Al_2O_3 konsantrasyonunda 28 günlük periyotta sudan balığa geçen KOİ konsantrasyonları t=0. günde 10 mg/l iken 5. gün ; 10. gün ; 15. gün ; 20. gün ve 28. günde ölçülen KOİ değerleri sırasıyla 9,645 mg/l ; 8,126 mg/l ;

7,891 mg/l ; 7,563 mg/l ve 7,102 mg/l'dir. K_2 hesaplanmasında kullanılan C_{f1} (0. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması – $\ln KOİ=2,3$ mg/l) ve C_{f2} (28. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması – $\ln KOİ=1,96$ mg/l) değerleri Tablo 4.35'te yer almaktadır. Hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanan k_2 değeri $0,0059 \text{ gün}^{-1}$ olarak hesaplanır. K_1 hesaplamasında yer alan C_f değeri Şekil 4.74 (a)'da yer alan grafikte 14. güne gelen $\ln KOİ$ 2,1 mg/l olarak bulunmaktadır ; C_w değeri ise balıktan suya geçen $KOİ$ değerlerinin doğal logaritmalarından $[C_w = C_{w2} - C_{w1} \text{ (mg/l)} / (C_{w2} = 28.\text{gün}] (C_{w1}=0.\text{gün})]$ 2,9 mg/l olarak hesaplandı. Hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanan k_1 değeri $0,023 \text{ gün}^{-1}$ olarak hesaplanır. BCF değeri ise 3,9'tür.



Şekil 4.74 (a): 10 mg/l nano- Al_2O_3 in günlere göre $\ln$ (Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri ($C_f=2,1$ mg/l) ; (b): 100 mg/l nano- Al_2O_3 in günlere göre $\ln$ (Sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonu) değerleri ($C_f=3,9$ mg/l)

100 mg/l nano- Al_2O_3 konsantrasyonunda 28 günlük periyotta sudan balığa geçen $KOİ$ konsantrasyonları $t=0$. günde 100 mg/l iken 5. gün ; 10. gün ; 15. gün ; 20. gün ve 28. günde ölçülen $KOİ$ değerleri sırasıyla 71,261 mg/l ; 69,154 mg/l ; 51,317 mg/l ; 43,158 mg/l ve 24,168 mg/l'dir. K_2 hesaplanmasında kullanılan C_{f1} (0. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması – $\ln KOİ=4,61$ mg/l) ve C_{f2} (28. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması – $\ln KOİ=43,19$ mg/l) değerleri Tablo 4.35'te yer almaktadır. Hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanan k_2 değeri $0,014 \text{ gün}^{-1}$ olarak hesaplanır. K_1 hesaplamasında yer alan C_f değeri Şekil 4.74(b)'de yer alan grafikte 14. güne gelen $\ln KOİ$ 3,9 mg/l olarak bulunmaktadır ; C_w değeri ise balıktan suya geçen $KOİ$

değerlerinin doğal logaritmalarından $[C_w = C_{w2} - C_{w1} \text{ (mg/l)} / (C_{w2} = 28.\text{gün}]$ ($C_{w1}=0.\text{gün}$) 1,13 mg/l olarak hesaplandı. Hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanan k_1 değeri $0,102 \text{ gün}^{-1}$ olarak hesaplanır. BCF değeri ise 7,29'dur.

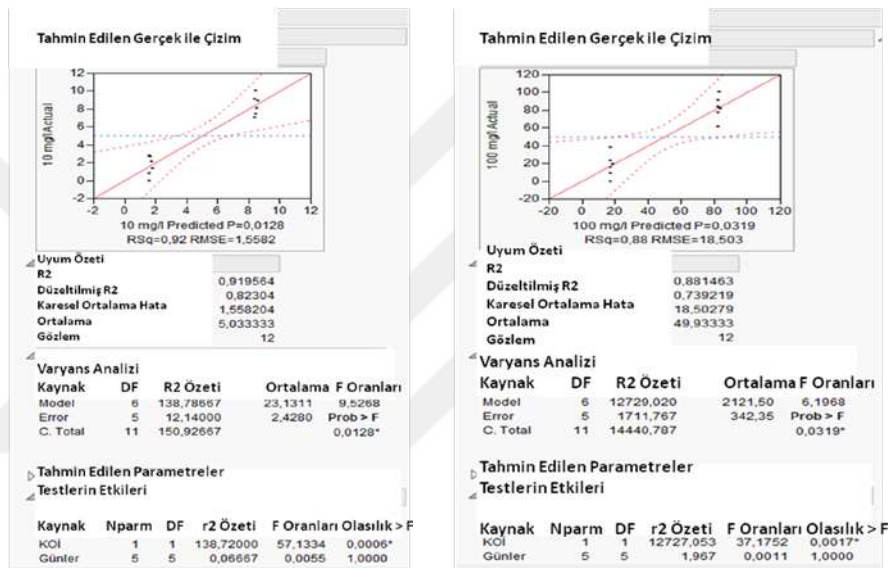
Tablo 4.35 28 gün boyunca nano- Al_2O_3 'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları

10 mg/l nano- Al_2O_3				
Günler	Numuneden Balığa Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)	Balıktan Suya Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)
t=0	10	2,3	0	0
t=5	9,645	2,3	0,381	-0,96
t=10	8,126	2,09	1,853	0,62
t=15	7,891	2,06	3,264	1,18
t=20	7,563	2,02	6,254	1,83
t=28	7,102	1,96	6,984	1,94
100 mg/l nano- Al_2O_3				
Günler	Numuneden Balığa Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)	Balıktan Suya Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)
t=0	100	4,60	0	0
t=5	71,261	4,26	24,561	3,20
t=10	69,154	4,24	31,842	3,46
t=15	51,317	3,94	46,845	3,85
t=20	43,158	3,76	56,248	4,03
t=28	24,168	3,19	76,254	4,33

Lepistes - *Poecillia reticula* bünyesinde nanopartikülün akümüle olup olmadığına dayalı bu testte OECD'de yer alan kriter BCF eğer 10'dan küçük ise anlamlı değil, eğer 10'dan büyük ise balık bünyesinde nanopartikülün akümüle olduğunu gösteriyor (OECD 305, 2012). 10 mg/l nano- Al_2O_3 için BCF değeri 3,9 ; 100 mg/l nano- Al_2O_3 için BCF değeri 7,29'dur. 10 mg/l ve 100 mg/l nanopartikül konsantrasyonunda balık bünyesinde biyoakümüle olmadığını göstermektedir.

Yapılan ANOVA testinde artan nano- Al_2O_3 konsantrasyonları ile biyoakümüleyasyon testinin 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarına günlere karşı sudan balığa geçen KOİ konsantrasyonu ile balıktan suya geçen KOİ konsantrasyonları arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (10 mg/l için: $R=0,919$; 100 mg/l için: $R=0,881$). Test sonucu Şekil 4.75'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. 10 mg/l nano- Al_2O_3 konsantrasyonu için: yapılan

varyans analizi sonucunda günler ($P=1,0000 > 0,05$) değişkeninin etkili olmadığı ve KOI (Sudan balığa geçen ve Balıktan suya geçen) ($P=0,0006 < 0,05$) değişkenin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0128 < 0,05$). 100 mg/l nano- Al_2O_3 konsantrasyonu için: yapılan varyans analizi sonucunda günler ($P=1,0000 > 0,05$) değişkeninin etkili olmadığı ve KOI (Sudan balığa geçen ve Balıktan suya geçen) ($P=0,0017 < 0,05$) değişkenin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0319 < 0,05$).



Şekil 4.75 Biyoakümülayasyon testi'nin ANOVA testi sonuçları (10 mg/l ve 100 mg/l için)

Nano- Al_2O_3 'in biyoakümülayasyonu ile ilgili çalışmış bir literatür saptanmamıştır.

4.3.10 Nano- Al_2O_3 'in Farklı Trofik Seviyelerindeki EC_{50} Değerlerinin Karşılaştırması

Nano- Al_2O_3 'in prokaryot canlı olan ; bakteri (*Escherichia coli* ; *Bacillus cereus* ; *Vibrio fischeri* ; Metan Archae Bakterisi) , ökaryot canlı olan ; maya- *Candida albicans* ; küf- *Aspergillus niger* , alg (*Chlorella sp.*) , Crustacea (*Daphnia magna*) ve balık (lepidistes - *Poecillia reticulata*) olmak üzere 6 farklı trofik seviye üzerine 9 farklı akut toksisite deneyi yapılmıştır. Farklı beslenme seviyelerindeki canlıların nano- Al_2O_3 'e karşı farklı toksik cevapları oluşmuştur. Tablo 4.36'da yer alan EC

değerlerine göre ; en düşük EC değerine (72 saat sonucu EC₃₀= 2,9 mg/l) sahip olan *Chlorella sp.* – alg nano-Al₂O₃’e en hassas organizmadır (P=0,0001 < 0,05). En yüksek EC değerine sahip olan lepestes - *Poecillia reticula* (24 saat sonucu EC₂₀=849,9 mg/l) nano-Al₂O₃’e en dirençli organizmadır (P=0,0001 < 0,05).

Tablo 4.36 Nano-Al₂O₃’in farklı trofik seviyelerindeki EC₅₀ değerleri

	EC ₅₀ Değerleri (mg/l)			
	30 dakika sonucu	24 saat sonucu	48 saat sonucu	72 saat sonucu
Bakteri - <i>E.coli</i>	-	39,9	26,9	-
Bakteri - <i>B.cereus</i>	-	40,9	15,22	-
Bakteri - <i>V.fischeri</i>	29,282	-	-	-
Bakteri – Metan Archae	-	96,83	43,2	-
Maya – <i>C.albicans</i>	-	93,1	72,7	-
Küf – <i>A.niger</i>	-	59,2	26,9	-
Alg – <i>Chlorella sp.</i>	-	2,9 (EC ₃₀)	3,5 (EC ₄₀)	4,07
Crustacea – <i>D.magna</i>	-	36,13	23,37	-
Balık – lepestes - <i>Poecillia reticula</i>	-	849,9	771,3	-

4.4 Nano-HfO₂ ile Yapılan Akut Toksikite Çalışmaları

4.4.1 Bakteri (*Escherichia coli* – *Bacillus cereus*) Akut Toksikite Testi Sonuçları

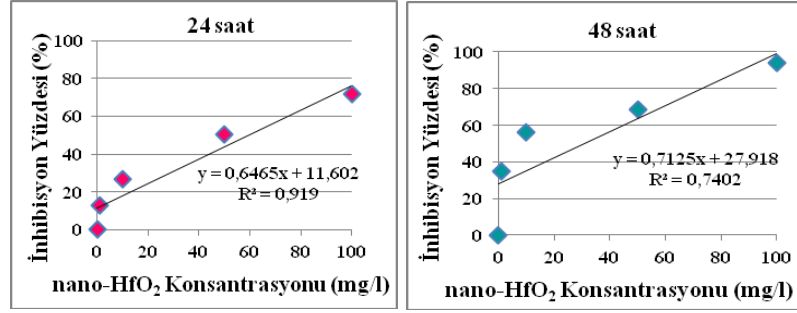
Nano-HfO₂ bakteriler üzerine akut toksisitesi gram negatif bakterilerden *E.coli* ve gram pozitif bakterilerden *B.cereus* ile çalışılmıştır. Tablo 4.37’de yer alan *E.coli* bakterinin sayıları, artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşın 24 ve 48 saat sonucu kontrole göre değişimlerini göstermektedir. 24 saat sonucunda 3 seri çalışılan kontrol grubu 150000 ; 149000 ; 151000 adet koloni/1 ml iken, artan nanopartikül konsantrasyonlarında canlı *E.coli* sayılarında azalma görülmektedir (Tablo 4.37). 1 mg/l nanopartikül dozunda canlı *E.coli* kolonileri 130000 ; 136000 ; 127000 adet koloni/1 ml , 50 mg/l nano-HfO₂ ‘e maruz kalan gram negatif bakterilerin sayısı 75000 ; 70000 ; 77000 adet koloni/1 ml ‘ye , nanoHfO₂ dozu 100 mg/l ‘ye çıkarıldığında 24 saat sonucunda canlı *E.coli* sayıları 40000 ; 46000 ; 40000 adet koloni/1 ml’ye düşmektedir (Tablo 4.37). 48 saat sonucunda kontrole kıyasla nano-HfO₂’in *E.coli* üzerine inhibisyonu artmıştır. Kontrol grubunda 48 saat sonunda canlı

E.coli sayıları 156000 ; 160000 ; 158000 adet koloni/1 ml iken 50 mg/l nanoHfO₂ ile 48 saat maruz kalan *E.coli* kolonilerinin sayıları 47000 ; 51000 ; 49000 adet koloni/1 ml' e , nano-HfO₂ dozu 100 mg/l'e çıkarıldığında ise 8000 ; 9000 ; 10000 adet koloni/1 ml'e düşmüştür (Tablo 4.37).

Tablo 4.37 Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Escherichia coli* bakterilerinin sayıları

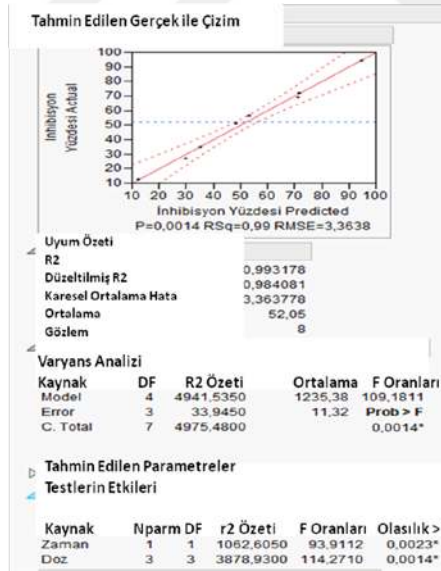
nano-HfO ₂	CANLI <i>E.coli</i> BAKTERİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	150000	149000	151000	150000	156000	160000	158000	158000
1 mg / l	130000	136000	127000	131000	103000	100000	106000	103000
10 mg / l	110000	105000	115000	110000	69000	72000	66000	69000
50 mg / l	75000	70000	77000	74000	47000	51000	49000	49000
100 mg / l	40000	46000	40000	42000	8000	9000	10000	9000

Şekil 4.76'da kontrol grubuna kıyasla artan nano-HfO₂ dozlarına karşın *E.coli* bakterisinin yüzde inhibisyon değerlerinin, 24 ve 48 saat sonucundaki grafikleri bulunmaktadır. Bu grafiklere baktığımızda 24 ve 48 saat sonucunda nano-HfO₂'in *E.coli* üzerine inhibisyonun önemli derecede arttığını görmekteyiz. 24 saat sonucunda 1 mg/l nano-HfO₂'e maruz kalan *E.coli* bakterisinin kontrol grubuna kıyasla yüzde inhibisyon değeri % 12,7 iken 48 saat sonucunda % 34,8 'e çıkmaktadır (Şekil 4.76). 10 mg/l konsantrasyonu 24 saat sonucunda *E.coli* bakteri kültürünün % 26,7'sini etkilerken , 48 saat sonucunda bakteri kültürünün % 56,3'ünü öldürmüştür (Şekil 4.76). Nano-HfO₂ konsantrasyonu 100 mg/l'ye çıkarıldığında 48 saat sonucunda, *E.coli* bakteri kültürünün yaklaşık % 94,3 'ü inhibisyona uğramıştır. Şekil 36.'den hesaplanabilen *E.coli* bakterisinin % 50'sine etki eden doz ; EC₅₀ değeri 24 saat için 59,4 mg/l ; 48 saat için 30,9 mg/l'dir. Gram negatif bakteri *E.coli* nano-HfO₂ ile maruz kaldığı süre arttıkça bakterinin akut toksisitesi artmış, düşük nano-HfO₂ konsantrasyonlarını ise tolere edebildiği görülmektedir. Kısa temas sürelerinde bakteri daha yüksek nano-HfO₂ konsantrasyonlarında yaşayabilmekte, direnç gösterebilmektedir.



Şekil 4.76 Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı *Escherichia coli* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 59,4 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=30,9 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-HfO₂ konsantrasyonları ile *E.coli*'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,993$). Test sonucu Şekil 4.77'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0023 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0014 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0014 < 0,05$).



Şekil 4.77 *E.coli*'nin ANOVA testi sonuçları

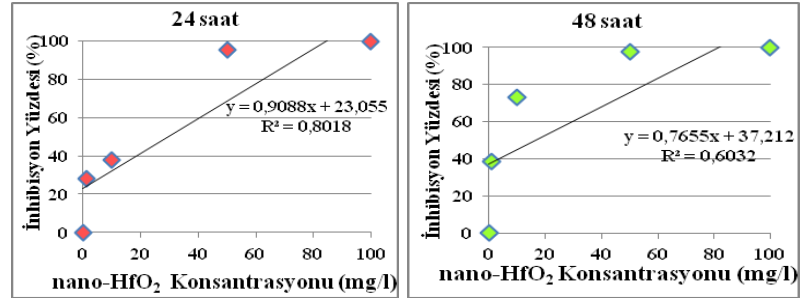
Akut toksisitesi çalışılan diğer bakteri ise gram pozitif özelliğe sahip olan *B.cereus* bakterisidir. 24 saat sonucunda kontrol grubundaki canlı *B.cereus* sayıları 70000 ; 71000 ; 72000 adet koloni/1 ml iken , 1 mg/l dozunda 24 saat sonucunda canlı *B.cereus* sayıları 51000 ; 52000 ; 50000 adet koloni/1 ml'e düşmüştür. 10 mg/l

konsantrasyonuna 24 saat maruz kalan *B.cereus* bakterisi 44000 ; 43000 ; 45000 adet koloni/1 ml'ye, 50 mg/l nanopartikül dozunda ise bu sayı 3200 ; 3300 ; 3100 adet koloni/1 ml'ye düşmüştür (Tablo 438). 48 saat nano-HfO₂'e maruz kalan *B.cereus* kolonileri kontrol grubuna göre (75000 ; 75100 ; 74900 adet koloni/1 ml) sayıları azalmıştır. 1 mg/l nano-HfO₂ dozuna 48 saat maruz kalan canlı bakteri sayıları 46000 ; 46100 ; 45900 adet koloni/1 ml'e düşmüş, 100 mg/l nanopartikül konsantrasyonunda bakteri kültürünün tamamı inhibisyona uğramıştır (Tablo 4.38).

Tablo 4.38 Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Bacillus cereus* bakterilerinin sayıları

nano-HfO ₂	CANLI <i>B.cereus</i> BAKTERİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	70000	71000	72000	71000	75000	75100	74900	75000
1 mg /l	51000	52000	50000	51000	46000	46100	45900	46000
10 mg /l	44000	43000	45000	44000	20000	19000	21000	20000
50 mg /l	3200	3300	3100	3200	2000	2100	1900	2000
100 mg /l	100	110	120	110	0	0	0	0

Şekil 4.78'de 24 ve 48 saat boyunca artan nanopartikül konsantrasyonların kontrole kıyasla *B.cereus* bakterisi üzerine inhibisyonunu göstermektedir. 24 saat sonucunda 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l konsantrasyonlarının *B.cereus* bakterisi üzerine akut toksisitesi sırasıyla % 28,2 ; % 38,1 ; % 95,5 ; % 99,8'dir (Şekil 4.78). 48 saat sonunda nanopartiküle maruz süresi iki katına çıkmış, ve maksimum dozda (100 mg/l) *B.cereus* bakterisinin tamamı inhibe olmuştur. Diğer dozlar ise 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l konsantrasyonlarında sırasıyla inhibisyon yüzdeleri % 38,7 ; % 73,3 ; % 97,3'e yükselmiştir (Şekil 4.78). Şekil 4.68.'den hesaplanabilen *E.coli* bakterisinin % 50'sine etki eden doz ; EC₅₀ değeri 24 saat için 29,6 mg/l ; 48 saat için 16,7 mg/l'dir.



Şekil 4.78 Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı *Bacillus cereus* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 29,6 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 16,7 mg/l)

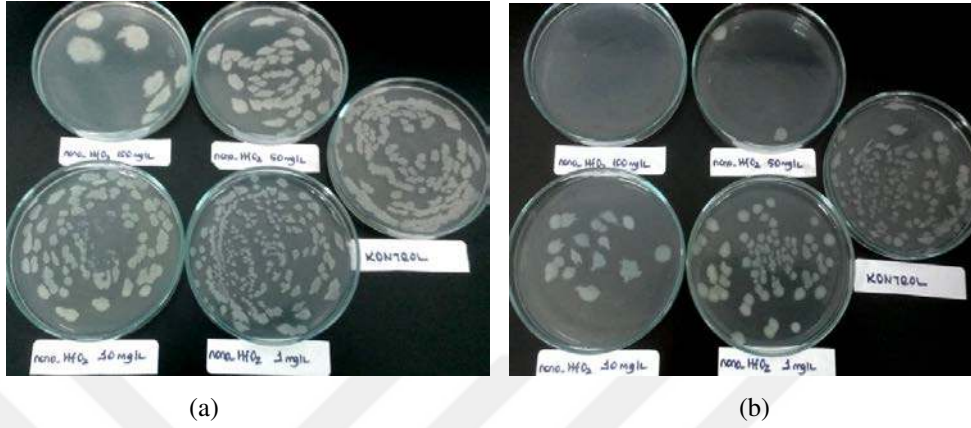
Yapılan ANOVA testinde artan nano-HfO₂ konsantrasyonları ile *B.cereus*'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,943). Test sonucu Şekil 4.79'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,2365 > 0,05) değişkeninin etkili olmadığı ; konsantrasyon (P=0,0239 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0325 < 0,05).



Şekil 4.79 *B.cereus*'un ANOVA testi sonuçları

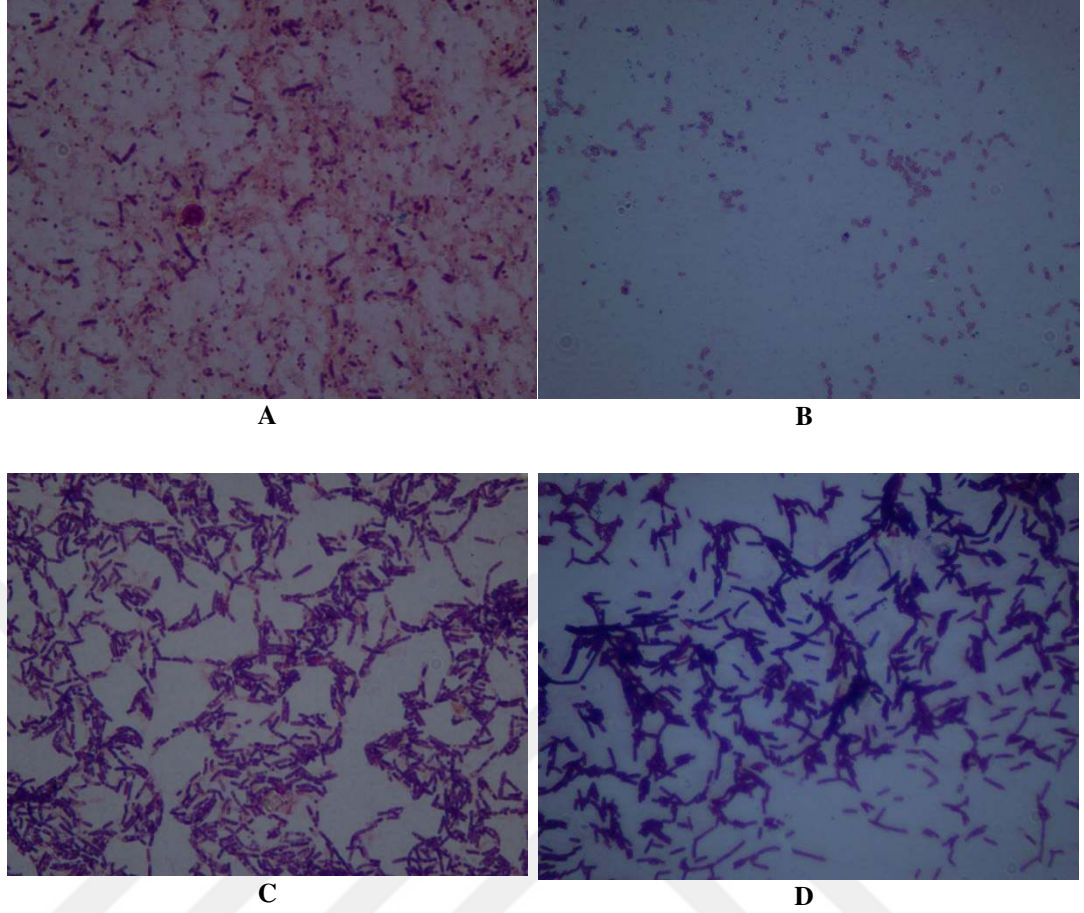
Şekil 4.80(a)'da nutrient agar ortamındaki *B.cereus* ve *E.coli* kolonileri gösterilmektedir. Kontrol grubunda 48 saat sonucunda üreyen koloniler ile 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-HfO₂'e 48 saat maruz kalmış kolonileri kıyasladığımızda ; *E.coli* bakteri kültürünün *B.cereus* bakteri kültürüne kıyasla daha

az inhibisyona uğramıştır [(Şekil 4.80(a) ve Şekil 4.80(b)]. 48 saat sonucunda 100 mg/l nano-HfO₂'in *B.cereus* bakterisine inhibisyonu % 100 iken *E.coli* bakterisine olan inhibisyonu % 94,3'tür (Şekil 4.76 ve Şekil 4.78).



Şekil 4.80 (a): Artan nano-HfO₂ dozlarına karşı *Escherichia coli* bakteri sayılarının değişimi ; (b): artan nano-HfO₂ dozlarına karşı *Bacillus cereus* bakteri sayılarının değişimi

Şekil 4.81'de *E.coli* ve *B.cereus* bakterilerinin gram boyama sonuçları bulunmaktadır. A resminde kontrol grubundaki *E.coli* bakterisinin gram boyama sonuçları ; C resminde ise nano-HfO₂'e 48 saat boyunca maruz kalmış bakterilerinin gram boyama sonuçları bulunmaktadır. Kontrol grubuna kıyasla B resminde bakteri hücre duvar yapılarındaki değişiklikler dikkat çekmektedir (Resim 4.18). B resminde kontrol grubundaki *B.cereus* bakterisinin gram boyama sonuçları ; D resminde ise nano-HfO₂'e 48 saat boyunca maruz kalmış bakterilerinin gram boyama sonuçları bulunmaktadır. Kontrol grubunda *E.coli* kolonileri gram negatif çubuk bakteriler ile 100 mg/l nanopartiküle 48 saat boyunca maruz kalmış bakterilerinin gram boyama görüntüsü kıyaslandığında nanopartiküle maruz kalmış bakterilerinin şekillerinde deformasyonlar olduğu görülmektedir. Diğer gram pozitif özellikteki *Bacillus cereus* bakterisinin kontrol grubu ve 100 mg/l konsantrasyonunda 48 saat boyunca maruz kalmış grubu kıyaslandığında ; kontrol grubunda gram pozitif çubuk bakteriler nanopartiküle maruz kaldıktan sonra hücre uzunluk boyutunun arttığı (0,01 μ) görülmektedir.



Şekil 4.81 *Escherichia coli* ve *Bacillus cereus* bakterisinin gram boyama sonucu görüntüleri (A: Kontrol grubundaki *E.coli* bakterisinin gram boyama sonucu ; C: nano-HfO₂ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan *E.coli* bakterisinin gram boyama sonucu ; B: Kontrol grubundaki *B.cereus* bakterisinin gram boyama sonucu ; D: nano-HfO₂ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan *B.cereus* bakterisinin gram boyama sonucu)

Nano-HfO₂ nanopartikülünün bakteriler üzerine toksisite çalışmaları literatürde bulunmamaktadır.

4.4.2 Bakteri (*Vibrio fischeri*) Biyoluminesans Değerine Göre Akut Toksisite Testi Sonuçları

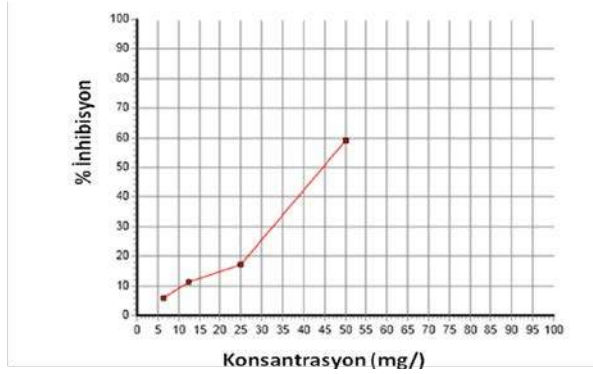
Nano-HfO₂'in artan konsantrasyonlarına karşı biyoluminesans bakterisi olan *Vibrio fischeri* 'nin luminesans değeri ölçülmüştür. *Vibrio fischeri* bakterisinin nano-HfO₂'e maruz kaldığı süre arttıkça, luminesans değerinin azaldığı ve toksisitenin arttığı görülmektedir. Mikrotox deneyi nano-HfO₂'in 100 mg/l stok çözeltisi

hazırlanmış, % 3'lük NaCl ile seyreltmeler yapılmış Lumistox 300 (Hach Lange) ile bakterinin luminesans değeri ölçülmüştür. Yapılan seyreltmelerin en düşüğü 3,125 mg/l'de ölçülen inhibisyon % 3,54 ; 6,25 mg/l nano-HfO₂ dozunda % 5,81 ; 12,5 mg/l 'de % 11,47 ; 25 mg/l'de % 17,33 ; 50 mg/l'de % 59,26 ; 100 mg/l nano-HfO₂ dozunda % 84,51 inhibisyon gerçekleşmiştir (Tablo 4.39).

Tablo 4.39 30 dakika sonucu nano-HfO₂ nanopartikülünün artan konsantrasyonlarına karşı *Vibrio fischeri* – biyoluminesans bakterisinin % inhibisyon değerleri

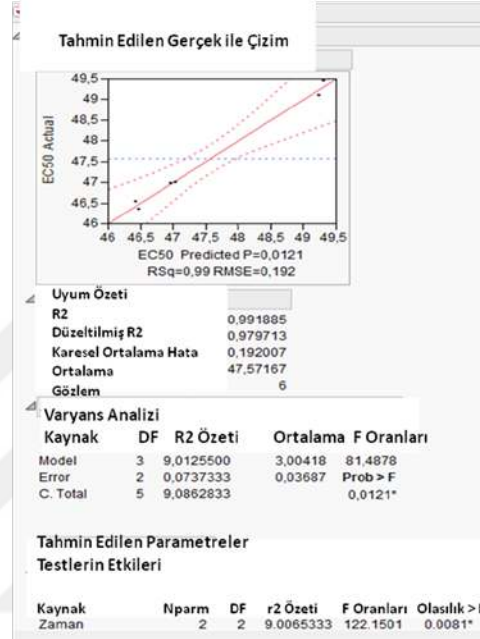
nano-HfO ₂ Konsantrasyonları (mg/l)	% İnhibisyon
3,125 mg/l	3,54
6,25 mg/l	5,81
12,5 mg/l	11,47
25 mg/l	17,33
50 mg/l	59,26
100 mg/l	84,51

Şekil 4.82'de Mikrotox deneyinin sonucunda Lumistox 300 cihazından alınan grafik yer almaktadır. Grafikte artan nano-HfO₂ konsantrasyonlara (3,125 mg/l ; 6,25 mg/l ; 12,5 mg/l ; 25 mg/l ; 50 mg/l ; 100 mg/l) karşı *V.fischeri* bakterisinin % inhibisyon değerleri yer almaktadır. Nano-HfO₂ nanopartikülünün *Vibrio fischeri* bakterisinin % 50'sine etki eden dozu (EC₅₀ Değeri) 30 dakika sonucunda 46,35 mg/l olarak hesaplanmıştır. *Vibrio fischeri* biyoluminesans bakterisi nano-HfO₂'e 5 dakika maruz kaldığındaki EC₅₀ değeri 49,45 mg/l ; 15 dakika maruz kaldığındaki EC₅₀ değeri 47,01 mg/l'ye düşmüştür. Bakterinin nanopartiküle maruz kalma süresi arttıkça EC₅₀ değerinde bir azalma gözlenmiş ve bakterinin naopartiküle olan hassasiyeti artmıştır.



Şekil 4.82 nano-HfO₂'in artan konsantrasyonlarına karşı % inhibisyon değerleri (EC₅₀ değeri=46,35 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-HfO₂ konsantrasyonları ile *Vibrio fischeri* bakterisinin 5. ; 15. ve 30. dakikalarındaki EC₅₀ değerlerinin arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,991). Test sonucu Şekil 4.83'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,081 < 0,05) değişkeninin EC₅₀ değerleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0121 < 0,05).



Şekil 4.83 *Vibrio fischeri* bakterisinin ANOVA testi sonuçları

Nano-HfO₂ nanopartikülünün *Vibrio fischeri* üzerine toksisite çalışmaları literatürde bulunmamaktadır.

4.4.3 Anaerobik Bakteri Kullanılarak Metan Gazı Ölçümlerine Dayalı Toksisite Testi (ATA-Anaerobik Toksisite Testi) Sonuçları

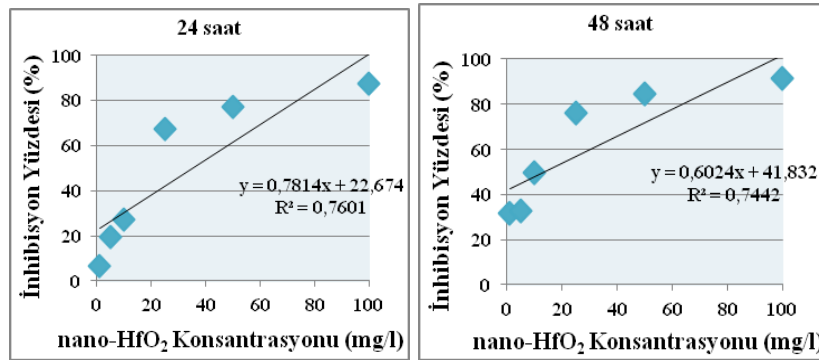
Nano-HfO₂ nanopartikülünün artan konsantrasyonlarının, anaerobik bakterilere toksik etki yapıp yapmadığı ATA-anaerobik toksisite testi ile incelenmiştir. 125 ml'lik steril kapaklı şişelerde artan nanopartikül konsantrasyonlarında metan gazı ölçümleri yapılmıştır. Kontrol grubunda sadece substrat olarak glukoz bulunurken, diğer şişelerde 1 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 mg/l nano-HfO₂ nanopartikülü konularak inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonucunda kontrol grubunda oluşan CH₄ gazı miktarı 18 ml iken , 1 mg/l nano-HfO₂ dozunda 16,8 ml ; 5 mg/l nano-HfO₂ dozunda 14,5 ml ; 10 mg/l nano-HfO₂ dozunda 13,1 ml ; 25 mg/l nano-HfO₂ dozunda 5,9 ml ;

50 mg/l konsantrasyonunda 4,1 ml ve 100 mg/l nano-HfO₂ dozunda metan gazı miktarı 2,2 ml'ye düşmüştür (Tablo 4.40). 48 saat sonucunda kontrol grubunda 19,2 ml CH₄ gazı oluşurken 1 mg/l ; 5 mg/l ; 10 mg/l ; 25 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-HfO₂ dozunda sırasıyla metan gazı miktarları 13,1 ml ; 12,9 ml; 9,7 ml ; 4,6 ml ; 3 ml ; 1,6 ml'ye düşmüştür (Tablo 4.40).

Tablo 4.40 Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu metan gazı miktarı ve inhibisyon yüzdesi

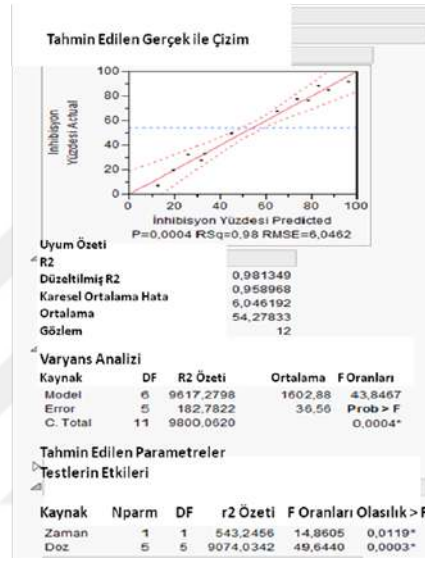
nano-HfO ₂	24 saat sonucu		48 saat sonucu	
	Metan Gazı Miktarı (ml)	İnhibisyon Yüzdesi (%)		Metan Gazı Miktarı (ml)
Kontrol	18	0	Kontrol	18
1 mg / l	16,8	6,6	1 mg / l	16,8
5 mg / l	14,5	19,4	5 mg / l	14,5
10 mg / l	13,1	27,2	10 mg / l	13,1
25 mg / l	5,9	67,2	25 mg / l	5,9
50 mg / l	4,1	77,2	50 mg / l	4,1
100 mg / l	2,2	87,7	100 mg / l	2,2

Şekil 4.84'te artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri yer almaktadır. Şekil 4.84'ten hesaplanabilen metan bakterilerinin % 50'sini inhibe eden EC₅₀ değeri 24 saat için 34,97 mg/l ; 48 saat için 13,55 mg/l'dir. 24 saat sonucunda 1 mg/l'den 100 mg/l'ye çıkan nanopartikül konsantrasyonu anaerobik bakterilerin metan üretimini etkilemiş, inhibisyon oranı % 6,6'ten % 87,7'a çıkmıştır (Tablo 4.40). 48 saat sonucunda ise bu inhibisyon artmış ve 1 mg/l için % 31,7 ; 10 mg/l için % 49,5 ; 50 mg/l için 84,4 ve 100 mg/l için % 91,6'e yükselmiştir (Tablo 4.40).



Şekil 4.84 Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₃₀ değeri= 34,97 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 13,55 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-HfO₂ konsantrasyonları ile anaerobik metan Archae bakterilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,981). Test sonucu Şekil 4.85'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0119 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0003 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0004 < 0,05).



Şekil 4.85 Anaerobik metan Archae bakterilerinin ANOVA testi sonuçları

Nano-HfO₂ nanopartikülünün metan Archae bakterileri üzerine toksisite çalışmaları literatürde bulunmamaktadır.

4.4.4 Maya (*Candida albicans*) - Küf (*Aspergillus niger*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

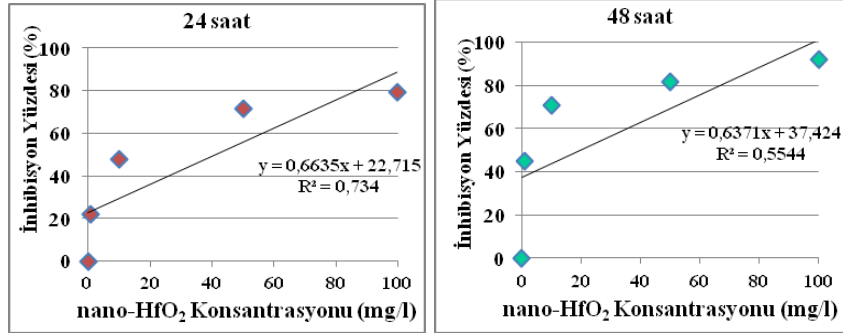
Nano-HfO₂ nanopartikülünün akut toksisitesi maya (*Candida albicans*) ve küf (*Aspergillus niger*) olmak üzerine iki farklı organizma üzerinde çalışılmıştır. Tablo 4.41'te artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı canlı maya kolonilerinin sayısı bulunmaktadır. 24 saat sonucunda kontrol grubundaki *C.albicans* kolonileri 210000 ; 211000 ; 209000 adet koloni/ml iken nano-HfO₂'e maruz kalan *C.albicans* kolonilerinde azalma gözlenmiştir (Tablo 4.41). 1 mg/l konsantrasyonunda canlı

maya kolonilerinin sayısı 164000 ; 163000 ; 165000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l konsantrasyonunda 110000 ; 109000 ; 111000 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l konsantrasyonunda 60000 ; 61000 ; 59000 adet koloni/ml'ye ve 100 mg/l konsantrasyonunda 43000 ; 44000 ; 42000 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.41). 48 saat sonucunda kontrol grubunda üreyen canlı *C.albicans* kolonilerinin sayısı 265000 ; 266000 ; 264000 adet koloni/ml iken, artan nano-HfO₂ konsantrasyonları maruz kalma süresi artıkça *C.albicans* kolonilerine inhibisyonu artmıştır. 1 mg/l konsantrasyonunda bu sayı 147000 ; 146000 ; 145000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l konsantrasyonunda 77000 ; 78000 ; 76000 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l konsantrasyonunda 48000 ; 47000 ; 49000 adet koloni/ml'ye ve 100 mg/l konsantrasyonunda 21000 ; 20000 ; 22000 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.41).

Tablo 4.41 Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Candida albicans* maya kolonilerinin sayıları

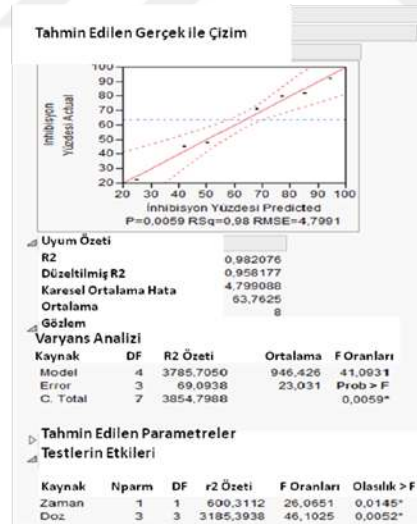
nano-HfO ₂	CANLI <i>C.albicans</i> MAYA KOLONİSİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	210000	211000	209000	210000	265000	266000	264000	265000
1 mg / l	164000	163000	165000	164000	147000	146000	145000	146000
10 mg / l	110000	109000	111000	110000	77000	78000	76000	77000
50 mg / l	60000	61000	59000	60000	48000	47000	49000	48000
100 mg / l	43000	44000	42000	43000	21000	20000	22000	21000

Şekil 4.86'da *Candida albicans* maya kolonilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki nano-HfO₂'e olan inhibisyon yüzdeleri verilmektedir. 24 saat sonucunda 1 mg/l nano-HfO₂ konsantrasyonunda inhibisyon % 21,9 iken 48 saat sonunda inhibisyon yüzdesi 44,9'a çıkmaktadır. 10 mg/l , 50 mg/l ve 100 mg/l nano-HfO₂ dozunda 24 saat sonucunda inhibisyon yüzdesi sırasıyla 47,6 ; 71,4 ; 79,5 iken 48 saat sonunda sırasıyla % 70,9 ; % 81,8 ; % 92,1'e çıkmaktadır (Şekil 4.86). 24 saat sonunda *C.albicans* kolonilerinin % 50'sini inhibe eden EC₅₀ değeri 41,1 mg/l ; 48 saat sonunda EC₅₀ değeri ise 19,7 mg/l'dir (Şekil 4.86). Maruz kalma süresi artıkça nanopartikülün maya kolonilerini etkilediği doz azalmış ; daha az dozlarda daha çok maya hücrelerini inhibe etmiştir.



Şekil 4.86 Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı *Candida albicans* maya kolonilerinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 41,1 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 19,7 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-HfO₂ konsantrasyonları ile *C.albicans*'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,982). Test sonucu Şekil 4.87'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0145 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0052 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0059 < 0,05).



Şekil 4.87 *C.albicans*'in ANOVA testi sonuçları

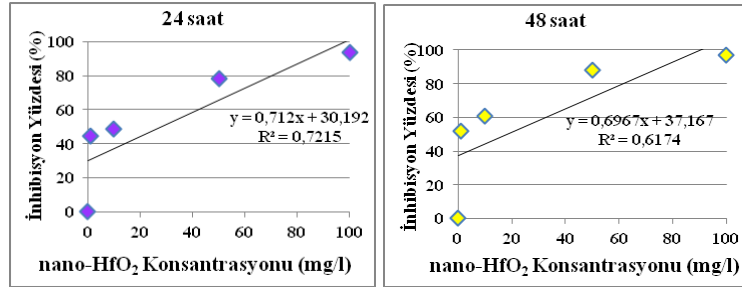
Akut toksisitesi çalışılan diğer mikroorganizma ise küf (*Aspergillus niger*) 'tür. Tablo 41'de artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Aspergillus niger* küf kolonilerinin sayıları verilmektedir. Kontrol grubunda 24 saat sonucunda 90000 ; 91000 ; 89000 adet koloni/ml üreyen küf kolonileri, nano-HfO₂

ile 24 saat boyunca karşı karşıya kaldığında koloni sayıları azalmıştır (Tablo 4.42). 1 mg/l dozunda 50000 ; 51000 ; 49000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l dozunda 46000 ; 45000 ; 47000 adet koloni/ml'ye 50 mg/l dozunda 19000 ; 19500 ; 19400 adet koloni/ml'ye düşmüştür. 48 saat sonucunda kontrol grubunda üreyen küf kolonilerinin sayısı 96000 ; 95000 ; 94000 adet koloni/ml iken 24 saat sonucundaki üreyen küf kolonilerine kıyasla canlı küf kolonilerinde azalma gözlenmiştir (Tablo 4.42). 1 mg/l dozunda 47000 ; 46000 ; 45000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l dozunda 37000 ; 36000 ; 38000 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l dozunda 11000 ; 12000 ; 10000 adet koloni/ml'ye ve 100 mg/l dozunda ise canlı küf kolonilerinin sayısı 3000 ; 3100 ; 3000 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.42).

Tablo 4.42 Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Aspergillus niger* - küf kolonilerinin sayıları

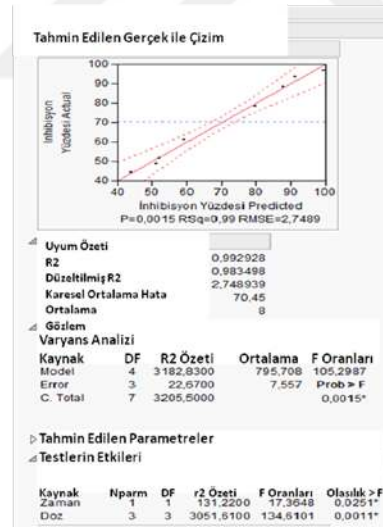
nano-HfO ₂	CANLI <i>A.niger</i> KÜF KOLONİSİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	90000	91000	89000	90000	96000	95000	94000	95000
1 mg /l	50000	51000	49000	50000	47000	46000	45000	46000
10 mg /l	46000	45000	47000	46000	37000	36000	38000	37000
50 mg /l	19000	19500	19400	19300	11000	12000	10000	11000
100 mg /l	5700	5710	5690	5700	3000	3100	2900	3000

Şekil 4.88'de *Aspergillus niger* küf kolonilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki nano-HfO₂'e olan inhibisyon yüzdelerinin grafikleri verilmektedir. 24 saat sonunda artan nanopartikül dozlarına karşın *A.niger*'in hassasiyeti artmış ve inhibisyon gözlenmiştir. 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l dozlarındaki *A.niger*'in inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 44,4 ; % 48,9 ; % 78,6 ; % 93,7'dir (Şekil 4.88). 48 saat sonunda *A.niger*'in nano-HfO₂'e karşı inhibisyon yüzdeleri % 51,7 ; % 61,1 ; % 88,4 ; % 96,8'dir (Şekil 4.88). 24 saat sonunda *A.niger* kolonilerinin % 50'sini inhibe eden EC₅₀ değeri 27,8 mg/l ; 48 saat sonunda EC₅₀ değeri ise 18,4 mg/l'dir (Şekil 4.88). Maruz kalma süresi arttıkça nanopartikülün maya kolonilerini etkilediği doz azalmış ; daha az dozlarda daha çok küf hücrelerini inhibe etmiştir.



Şekil 4.88 Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı *Aspergillus niger* küf kolonilerinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 27,8 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 18,4 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-HfO₂ konsantrasyonları ile *A.niger*'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,992$). Test sonucu Şekil 4.89'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0251 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0011 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0015 < 0,05$).



Şekil 4.89 *A.niger*'in ANOVA testi sonuçları

Şekil 4.90(a)'da artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı *C.albicans* maya hücrelerinin potato dextrose agardaki koloni morfolojileri gösterilmektedir. Kontrol grubundaki maya kolonilerine kıyasla artan nano-HfO₂ dozları *C.albicans* üzerine toksik etki göstermiş ve canlı *C.albicans* sayıları azalmıştır. Şekil 4.90(b)'de ise artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı *A.niger* küf koloninin potato dextrose

agardaki koloni morfolojileri gösterilmektedir. Kontrol grubundaki küf kolonileri ile 1 mg/l ve 10 mg/l dozuna maruz kalmış *A.niger* küf kültüründeki kolonileri kıyasladığımızda inhibisyon daha az olduğunu, ancak nano-HfO₂ dozu arttıkça bu inhibisyonun arttığı görülmektedir.



Şekil 4.90(a) Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı *Candida albicans* maya hücrelerinin sayılarının değişimi ; (b): Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı *Aspergillus niger* küf hücrelerinin sayılarının değişimi

Garcia-Saucedo ve ark., (2011) nano-HfO₂'in maya-*Saccharomyces cerevisiae* üzerine toksisitesini araştırmışlar. Nano-HfO₂ konsantrasyonu 1000 mg/l'ye kadar çıkarıldığında, maya hücrelerinin O₂ alımına karşı toksik olmadığı saptanmıştır. Nanopartikülün olası toksisite mekanizmalarından biri nano-HfO₂'e maruz kalan maya hücrelerinin O₂ tüketimini indüklemesidir.

4.4.5 Alg (*Chlorella sp.*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano-HfO₂ nanopartikülünün alg üzerine inhibisyonu *Chlorella sp.* türü ile çalışılmıştır. Yapılan toksisite çalışmasında artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına (0,01 mg/l ; 0,25 mg/l ; 0,5 mg/l ; 1 mg/l ; 5 mg/l) karşı alg hücrelerinin 24 ; 48 ve 72 saat boyunca büyümelerine olan inhibisyon araştırılmıştır. Tablo 4.43'te artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı 24, 48 ve 72 saat sonunda 10 µl'deki alg hücrelerinin sayısı verilmiştir. Her bir konsantrasyon ve bekleme süresi 3 seri şeklinde çalışılmıştır. T=0'daki alg hücresi sayısı 45 adet alg/10 µl iken 24 saat inkübasyon periyodundan sonra kontrol grubundaki alg sayıları 154 ; 150 ; 158 adet

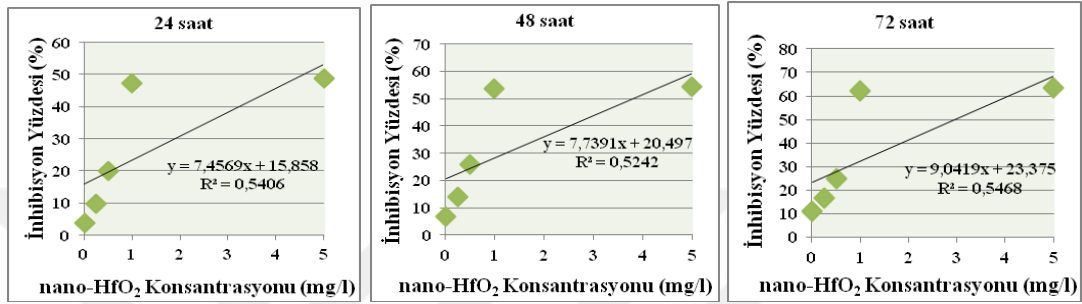
alg / 10 µl iken 0,01 mg/l nano-HfO₂ maruz kalmış alg hücrelerinin sayısı 146 ; 151 ; 147 adet alg/ 10 µl ; 0,25 mg/l nano-HfO₂'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 140 ; 136 ; 141 adet alg/ 10 µl ; 0,5 mg/l nano-HfO₂'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 121 ; 120 ; 128 adet alg/ 10 µl ; 1 mg/l nano-HfO₂'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 84 ; 88 ; 77 adet alg/ 10 µl ; maksimum doz 5 mg/l nano-HfO₂'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 81 ; 79 ; 77 adet alg/ 10 µl'e düşmüştür (Tablo 4.43). 48 saat sonunda kontrol grubundaki alg sayıları 158 ; 161 ; 155 adet alg/ 10 µl iken 0,01 mg/l nano-HfO₂ konsantrasyonunda alg sayısı 146 ; 150 ; 145 adet alg/ 10 µl ; 0,25 mg/l nano-HfO₂ dozunda 135 ; 136 ; 137 adet alg/ 10 µl ; 0,5 mg/l nano-HfO₂ dozunda alg sayısı 119 ; 117 ; 115 adet alg/ 10 µl ; 1 mg/l nano-HfO₂ konsantrasyonunda alg sayısı 75 ; 73 ; 71 adet alg/ 10 µl ve 5 mg/l nano-HfO₂ dozundaki alg sayıları 71 ; 72 ; 73 adet alg/ 10 µl'ye düşmüştür (Tablo 4.43). 72 saat sonunda kontrol grubundaki alg sayıları 160 ; 165 ; 167 adet alg/ 10 µl iken 0,01 mg/l konsantrasyonunda alg sayıları 145 ; 146 ; 147 adet alg/ 10 µl'ye ; 0,25 mg/l nano-HfO₂ dozunda 135 ; 136 ; 137 adet alg/ 10 µl'ye ; 0,5 mg/l' de 124 ; 125 ; 120 adet alg/10 µl'ye ; 1 mg/l nano-HfO₂ konsantrasyonunda 64 ; 62 ; 60 adet alg/ 10 µl'ye ve 5 mg/l nano-HfO₂ konsantrasyonunda 61 ; 60 ; 59 adet alg/ 10 µl'ye düşmüştür (Tablo 4.43).

Tablo 4.43 Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Chlorella sp.*- alg hücresi sayıları

Nano-HfO ₂	ALG (<i>Chlorella sp.</i>) SAYILARI (adet Alg / 10 µl)											
	24 saat sonucu				48 saat sonucu				72 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama
Kontrol	154	150	158	154	158	155	161	158	160	165	167	164
0,01 mg / l	146	147	151	148	146	145	150	147	145	146	147	146
0,25 mg / l	141	140	136	139	135	136	137	136	135	136	140	137
0,5 mg / l	121	120	128	123	119	117	115	117	124	125	120	123
1 mg / l	84	82	77	81	75	71	73	73	64	62	60	62
5 mg / l	81	79	77	79	71	72	73	72	61	60	59	60

Şekil 4.91'de artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı *Chlorella sp.*'nin yüzde inhibisyon değerleri yer almaktadır. 24 saat sonucunda 0,01 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l ve 5 mg/l nano-HfO₂ konsantrasyonlarında inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 3,86 ; % 9,7 ; % 20,1 ; % 47,4 ; % 48,7'dir. 48 saat sonunda bu

inhibisyon değerleri biraz daha artmış, sırasıyla % 6,9 ; % 13,9 ; % 25,9 ; % 53,7 ; % 54,4. 72 saat sonunda 0,01 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l ve 5 mg/l nano-HfO₂ konsantrasyonlarında inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 10,9 ; % 16,5 ; % 25 ; % 62,2 ; % 63,4'dır. Şekil 4.91'den hesaplanabilen alg hücrelerinin % 50'sini inhibe eden doz EC₅₀ değeri 24 saat için 4,57 mg/l, 48 saat için 3,8 mg/l ve 72 saat için 2,94 mg/l nano-HfO₂ (Şekil 4.91).



Şekil 4.91 Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı *Chlorella sp.*'nin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 4,57 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=3,8 mg/l ; 72 saat sonucu EC₅₀ değeri=2,94 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-HfO₂ konsantrasyonları ile *Chlorella sp.*'nin 24 ; 48 ve 72 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,991$). Test sonucu Şekil 4.92'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0013 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0001 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0001 < 0,05$).



Şekil 4.92 *Chlorella sp.*'nin ANOVA testi sonuçları

Nano-HfO₂ nanopartikülünün alg üzerine toksisite çalışmaları literatürde bulunmamaktadır.

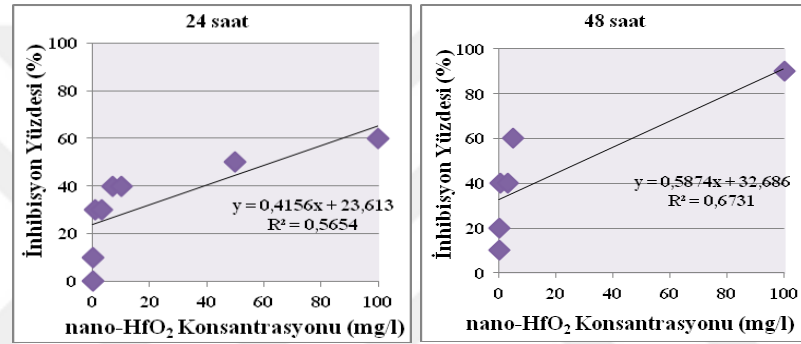
4.4.6 Su Piresi (*Daphnia magna*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Daphnia magna ile yapılan akut toksisite testi nano-HfO₂ nanopartikülünün artan dozlarının *D.magna* üzerine inhibisyonuna dayanmaktadır. Deney ortamında nano-HfO₂'in değişen konsantrasyonları 100 ml olarak hazırlanıp, her bir konsantrasyon için 10 adet *D.magna* konulmuştur, ayrıca kontrol grubu olarak *D.magna*'nın mineral ortamını içeren 100 ml'lik ortama 10 adet *D.magna* konularak 24 ve 48 saat için ölüm olup olmadığı izlenmiştir. Tablo 4.44'de artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat sonucunda canlı ve ölen *D.magna* sayıları yer almaktadır. 24 saat sonucunda 0,01 mg/l nano-HfO₂ dozunda ölüm gözlenmezken ; 0,05 mg/l'de toksisite gözlenmeye başlamıştır. 0,05 ; 0,5 ; 0,7 mg/l nano-HfO₂ dozunda 1 adet *D.magna* ölmüş, doz arttıkça ölüm sayıları artmıştır. Doz 100 mg/l'ye çıktığında 6 adet *D.magna* ölmüştür (Tablo 4.44). 48 saat sonucunda en düşük dozda (0,01 mg/l) toksisite başlamış, 1 adet *D.magna* ölmüştür. 0,7 ; 1 ; 3 mg/l dozunda 4 adet, 20 ve 50 mg/l dozunda 8 adet *D.magna* ölmüş ; maksimum dozda 9 adet *D.magna* ölmüştür (Tablo 4.44).

Tablo 4.44 Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Daphnia magna* - su piresi sayıları

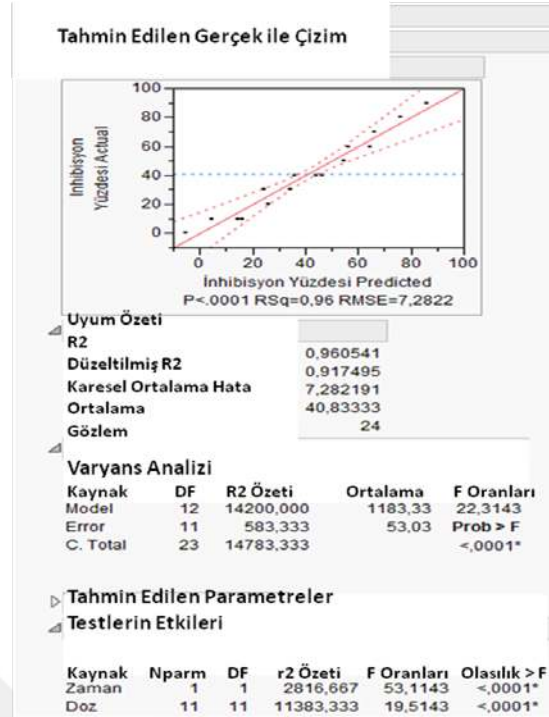
nano-HfO ₂ konsantrasyonu (mg/l)	24 saat sonucu		nano-HfO ₂ konsantrasyonu (mg/l)	48 saat sonucu	
	Canlı <i>Daphnia</i> sayısı	Ölen <i>Daphnia</i> sayısı		Canlı <i>Daphnia</i> sayısı	Ölen <i>Daphnia</i> sayısı
0,01	10	0	0,01	9	1
0,05	9	1	0,05	8	2
0,5	9	1	0,5	8	2
0,7	9	1	0,7	6	4
1	7	3	1	6	4
3	7	3	3	6	4
5	7	3	5	4	6
7	6	4	7	3	7
10	6	4	10	3	7
20	5	5	20	2	8
50	5	5	50	2	8
100	4	6	100	1	9

Şekil 4.93'te artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı *D.magna*'ların yüzde inhibisyonun grafiği bulunmaktadır. 24 saat sonucunda 0,01 mg/l nano-HfO₂ dozu *D.magna*'yı inhibe etmezken ; 1,3 ve 5 mg/l'de % 30 inhibisyon ; 20 ve 50 mg/l'de % 50 inhibisyon ; 100 mg/l'de % 60 inhibisyon gerçeklemiştir (Tablo 4.93). 48 saat sonucunda 0,01 mg/l nano-HfO₂ dozunda % 10 inhibisyon gerçekleşirken 0,7 ; 1 ; 3 mg/l nano-HfO₂ dozunda % 40 inhibisyon gerçekleşmiş ; 20 ve 50 mg/l'de % 80 inhibisyon ; 100 mg/l nano-HfO₂ dozunda ise % 90 gerçekleşmiştir (Tablo 4.93). Şekil 43.'ten hesaplanabilen *D.magna*'nın % 50'sini etkilen doz – EC₅₀ değeri: 24 saat için 63,49 mg/l; 48 saat için 50,18 mg/l'dir.



Şekil 4.93 Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı *Daphnia magna*'ların yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 63,49 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=50,18 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-HfO₂ konsantrasyonları ile *Daphnia magna*'nın 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,960). Test sonucu Şekil 4.94'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0001 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0001 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0001 < 0,05).



Şekil 4.94 *Daphnia magna*'nın ANOVA testi sonuçları

Nano-HfO₂ nanopartikülünün *Daphnia magna* üzerine toksisite çalışmaları literatürde bulunmamaktadır.

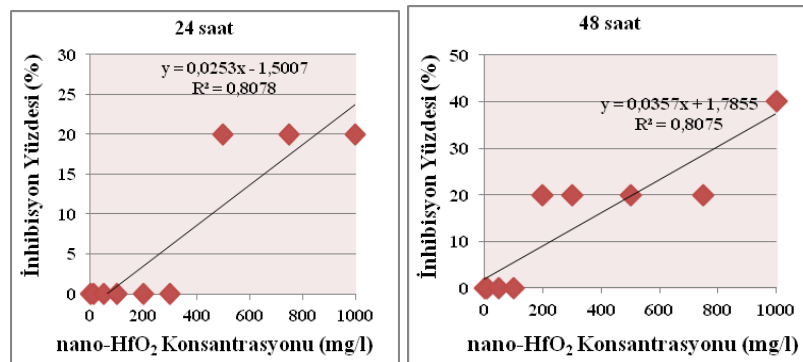
4.4.7 Balık (Iepistes - *Poecillia reticula*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano-HfO₂ nanopartikülünün artan konstrasyonlarının balık üzerine inhibisyonu incelenmiştir. Balık olarak kullanılan Iepistes - *Poecillia reticula*'nin 24 ve 48 saat sonucu kontrole kıyasla canlı ve ölü sayıları Tablo 4.45'de yer almaktadır. Diğer yapılan akut toksisite testlerinden farklı olarak balık akut toksisite deneyinde daha yüksek konsantrasyonlar çalışılmıştır. 1 ; 10 ; 50 ; 100 ; 200 ; 300 mg/l nano-HfO₂ konsantrasyonuna kadar kontrol grubuna kıyasla balık ölümleri 24 saat sonucunda gözlenmemiş, 500 ; 750 ; 1000 mg/l nano-HfO₂ konsantrasyonunda 1 balık ölümü gözlenmiştir. 48 saat sonunda 24 saat ile paralel sonuçlar gözlenmiş olup ; toksisite 200 mg/l nano-HfO₂ dozunda başlamıştır ; 200 ; 300, 500 ve 750 mg/l nano-HfO₂ dozunda kontrol grubuna kıyasla 1 balık ölümü gerçekleşmiştir, 1000 mg/l'de ise 2 balık ölümü gözlenmiştir (Tablo 4.45).

Tablo 4.45 Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu lepistes - *Poecillia reticula* sayıları

nano-HfO ₂ konsantrasyonu (mg/l)	Kontroldeki Balık Sayısı	24 saat sonucu		48 saat sonucu	
		Canlı Balık Sayısı	Ölü balık sayısı	Canlı Balık Sayısı	Ölü balık sayısı
1	5	5	0	5	0
10	5	5	0	5	0
50	5	5	0	5	0
100	5	5	0	5	0
200	5	5	0	4	1
300	5	5	0	4	1
500	5	4	1	4	1
750	5	4	1	4	1
1000	5	4	1	3	2

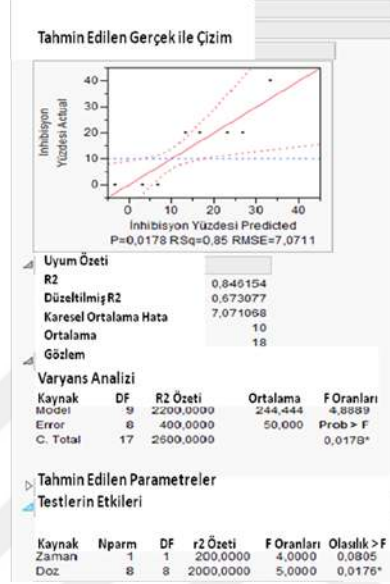
Şekil 4.95 artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı lepistes - *Poecillia reticula*'lerin yüzde inhibisyonun grafiği yer almaktadır. 24 saat sonucunda 1 mg/l ile 300 mg/l arasındaki nano-HfO₂'in lepistes - *Poecillia reticula*'e karşı toksisitenin gerçekleşmediği, 500 ; 750 ; 1000 mg/l'de % 20 inhibisyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.85). 48 saat sonucunda 1 mg/l ve 100 mg/l nano-HfO₂ dozunda inhibisyon gerçekleşmemiş ; 200, 300 500 ve 750 mg/l'de % 20 inhibisyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.95). Nano-HfO₂ nanopartikülünün balıkların % 20'sine etki eden dozu (EC₂₀ Değeri) 24 saat sonucu EC₂₀ Değeri= 849,8 mg/l; 48 saat sonucu EC₃₀ Değeri=790,3 mg/l Şekil 4.95'ten hesaplanmıştır.



Şekil 4.95 Artan nano-HfO₂ konsantrasyonlarına karşı lepistes - *Poecillia reticula*'lerin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₂₀ değeri= 849,8 mg/l; 48 saat sonucu EC₃₀ değeri=790,3 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-HfO₂ konsantrasyonları ile lepistes - *Poecillia reticula* 'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki

ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,846$). Test sonucu Şekil 4.96'da yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,805 > 0,05$) değişkeninin etkili olmadığı ; konsantrasyon ($P=0,0176 < 0,05$) değişkeninin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0178 < 0,05$).



Şekil 4.96 Lepistes – *Poecillia reticula*'nın ANOVA testi sonuçları

Nano-HfO₂'in lepistes - *Poecillia reticula* üzerine akut toksisitesinin çalışıldığı bir literatür saptanmamıştır.

4.4.8 Biyoayrışabilirlik Testi Sonuçları

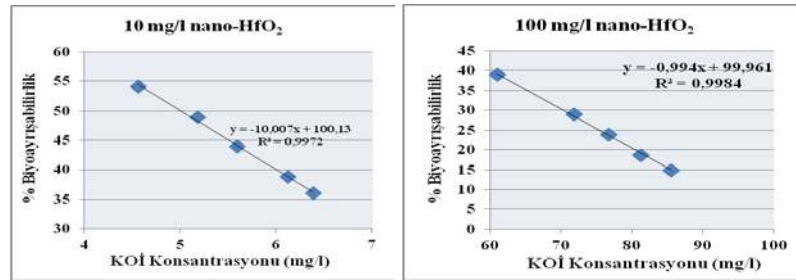
Nano-HfO₂ nanopartikülünün canlı mikroorganizmalar kullanılarak biyoayrışabilirliklerinin belirlenmesi amaçlanmış, ayrıca alıcı ortama deşarj edildiğinde canlı ekosistem tarafından tolere edilebilmesi için hangi seyreltmede verilmesinin daha uygun olup olmadığı araştırılmıştır. Nano-HfO₂'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında % giderimleri 28 günlük süre boyunca belli zaman aralıklarında ölçülen KOİ değerleri ile hesaplanmıştır (Tablo 4.46). Başlangıç KOİ değerleri 10 ve 100 mg/l iken 5 ; 10 ; 15 ; 20 ve 28. günlerde azalan KOİ değerleri ölçülmüştür. t=0. günde KOİ değeri 10 mg/l iken 5. günde ölçülen KOİ 6,389 mg/l'e ; 10. günde ölçülen KOİ 6,125 mg/l ; 15. günde ölçülen KOİ 5,598 mg/l ; 20. günde ölçülen KOİ 5,184 mg/l'ye 28. günün sonunda ölçülen KOİ ise 4,561 mg/l olarak ölçülmüştür (Tablo 4.46). t=0. günde KOİ değeri 100 mg/l iken ; 5. Günde 96,7 mg/l

; 10. günde 93,4 mg/l ; 15. günde 86,7 mg/l ; 20. günde 81,5 mg/l ; 28. günün sonunda ise 80,9 mg/l olarak ölçülmüştür (Tablo 4.46).

Tablo 4.46 28 gün boyunca nano-HfO₂'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonları için % biyoayrışabilirlik değerleri

Günler	10 mg/l nano-HfO ₂		100 mg/l nano-HfO ₂	
	KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	% Giderim	KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	% Giderim
t=0	10	0	100	0
t=5	6,389	36,1	96,7	3,3
t=10	6,125	38,8	93,4	6,6
t=15	5,598	44,02	86,7	13,3
t=20	5,184	48,2	81,5	18,5
t=28	4,561	54,4	80,9	19,01

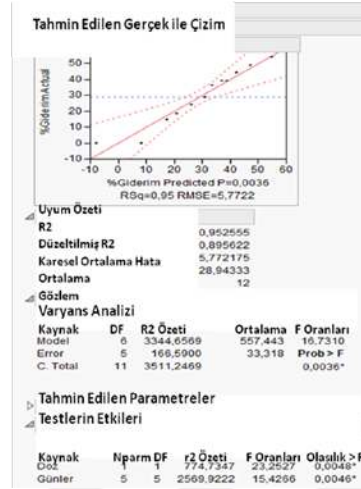
Şekil 4.97'de günlere karşı 10 mg/l ve 100 mg/l nano-HfO₂'in % biyoayrışabilirlik değerleri yer almaktadır. 10 ve 100 mg/l başlangıç KOİ miktarı ortama konulan aerobik çamur bakteri tarafından ayrıştırıldığı için zaman artıkça azalma gözlenmiştir. 10 mg/l başlangıç KOİ ile başlatılan akvaryumda ; 5. günde % giderim % 36,1 iken ; 20. güne gelindiğinde % 48,2'ye ; 28. günde % giderim % 54,4'e yükselmiştir. 100 mg/l başlangıç KOİ miktarı için 5. günde % giderim % 3,3 iken ; 10. günde % giderim % 6,6 ; 20. güne gelindiğinde % 18,5'e ; 28. günde % giderim % 19,01'e yükselmiştir (Tablo 4.46).



Şekil 4.97 10 ve 100 mg/l nano-HfO₂ konsantrasyonlarının 28 günlük % biyoayrışabilirlik değerleri

Yapılan ANOVA testinde artan nano-HfO₂ konsantrasyonları ile biyoayrışabilirlik testinin 10 ve 100 mg/l nano-HfO₂ konsantrasyonlarının günlere karşı % giderimi arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,952$). Test sonucu Şekil 4.98'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda konsantrasyon ($P=0,0048 > 0,05$) ve günler ($P=0,0046 <$

0,05) değişkeninin % giderim üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0036 < 0,05$).



Şekil 4.98 Biyoayrışabilirlik Testi'nin ANOVA testi sonuçları

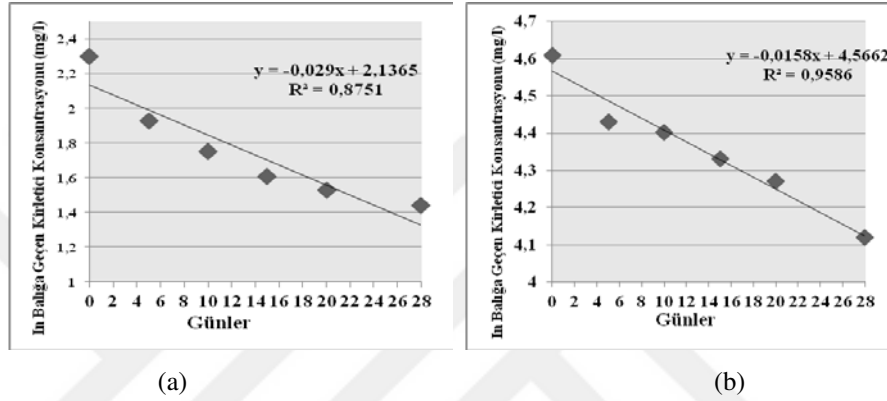
Nano-HfO₂'in biyoayrışabilirliğini çalışmış bir literatür saptanmamıştır.

4.4.9 Biyoakümülyasyon Testi Sonuçları

Nano-HfO₂ nanopartikülünün farklı konsantrasyonlarının canlı organizmadaki salınım ve birikimin saptanması amaçlanmıştır. Canlı organizma olarak lepidotes - *Poecillia reticula* kullanılmış, 28 gün boyunca 10 ve 100 mg/l konsantrasyonundaki nanopartikülün KOİ değerleri ölçülmüş ve 28 günlük periyodun sonunda balıklar temiz suya alınıp, balıktan suya geçen KOİ değerleri 28 gün boyunca hesaplanmıştır. Tablo 4.47'de 28 gün boyunca nano-HfO₂'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları yer almaktadır. Biyoakümülyasyon faktörü (BCF) 'nın hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanmıştır.

Tablo 4.47'de 10 mg/l nano-HfO₂ konsantrasyonunda 28 günlük periyotta sudan balığa geçen KOİ konsantrasyonları t=0. günde 10 mg/l iken 5. gün ; 10. gün ; 15. gün ; 20. gün ve 28. günde ölçülen KOİ değerleri sırasıyla 6,891 mg/l ; 5,785 mg/l ; 4,993 mg/l ; 4,625 mg/l ve 4,261 mg/l'dir. K₂ hesaplanmasında kullanılan C_{f1} (0. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması – lnKOİ=2,3 mg/l) ve C_{f2} (28. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal

logaritması – $\ln KOİ=1,44$ mg/l) değerleri Tablo 4.47’de yer almaktadır. Hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanan k_2 değeri $0,017$ gün⁻¹ olarak hesaplanır. K_1 hesaplamasında yer alan C_f değeri Şekil 4.99(a)’da yer alan grafikte 14. güne gelen $\ln KOİ$ 2,5 mg/l olarak bulunmaktadır ; C_w değeri ise balıktan suya geçen $KOİ$ değerlerinin doğal logaritmalarından $[C_w= C_{w2}-C_{w1}$ (mg/l) / ($C_{w2}= 28.$ gün] ($C_{w1}=0.$ gün)] $0,448$ mg/l olarak hesaplandı. Hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanan k_1 değeri $0,16$ gün⁻¹ olarak hesaplanır. BCF değeri ise $0,941$ ’dir.



Şekil 4.99 (a): 10 mg/l nano-HfO₂ in günlere göre ln(Sudan balığa geçen kirlenici konsantrasyonu) değerleri ($C_f=2,5$ mg/l) ; (a): 100 mg/l nano-HfO₂ in günlere göre ln(Sudan balığa geçen kirlenici konsantrasyonu) değerleri ($C_f=4,7$ mg/l)

100 mg/l nano-HfO₂ konsantrasyonunda 28 günlük periyotta sudan balığa geçen $KOİ$ konsantrasyonları $t=0.$ günde 100 mg/l iken 5. gün ; 10. gün ; 15. gün ; 20. gün ve 28. günde ölçülen $KOİ$ değerleri sırasıyla 83,64 mg/l ; 81,73 mg/l ; 75,71 mg/l ; 71,74 mg/l ve 61,51 mg/l’dir. K_2 hesaplanmasında kullanılan C_{f1} (0. Günde sudan balığa geçen kirlenici konsantrasyonun doğal logaritması – $\ln KOİ=4,61$ mg/l) ve C_{f2} (28. Günde sudan balığa geçen kirlenici konsantrasyonun doğal logaritması – $\ln KOİ=4,12$ mg/l) değerleri Tablo 4.47’de yer almaktadır. Hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanan k_2 değeri $0,0042$ gün⁻¹ olarak hesaplanır. K_1 hesaplamasında yer alan C_f değeri Şekil 4.99(b)’de yer alan grafikte 14. güne gelen $\ln KOİ$ 4,7 mg/l olarak bulunmaktadır ; C_w değeri ise balıktan suya geçen $KOİ$ değerlerinin doğal logaritmalarından $[C_w= C_{w2}-C_{w1}$ (mg/l) / ($C_{w2}= 28.$ gün] ($C_{w1}=0.$ gün)] $0,85$ mg/l olarak hesaplandı. Hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanan k_1 değeri $0,16$ gün⁻¹ olarak hesaplanır. BCF değeri ise $38,1$ ’dir.

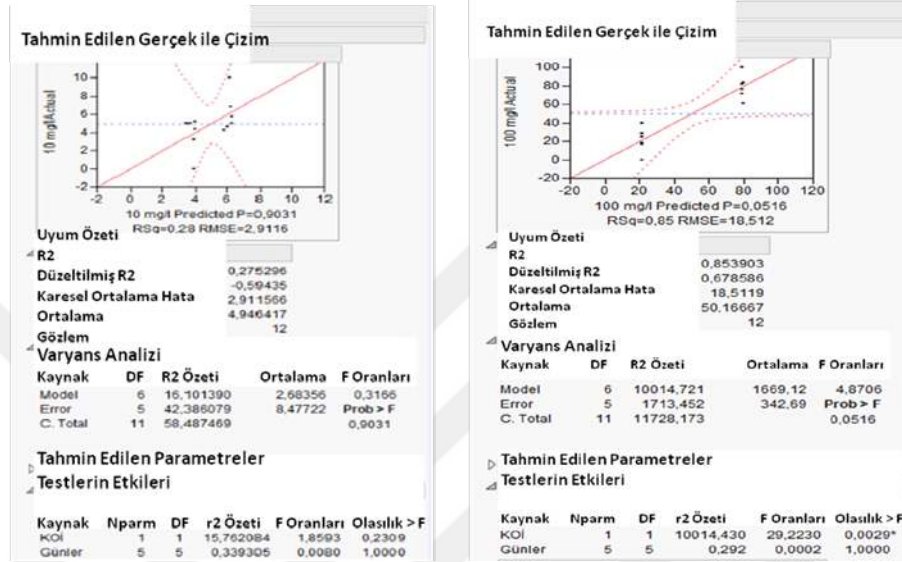
Tablo 4.47 28 gün boyunca nano-HfO₂'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları

10 mg/l nano-HfO ₂				
Günler	Numuneden Balığa Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)	Balıktan Suyu Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)
t=0	10	2,3	0	0
t=5	6,891	1,93	3,204	1,16
t=10	5,785	1,75	4,384	1,47
t=15	4,993	1,61	5,193	1,65
t=20	4,625	1,53	5,026	1,61
t=28	4,261	1,44	4,995	1,608
100 mg/l nano-HfO ₂				
Günler	Numuneden Balığa Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)	Balıktan Suyu Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)
t=0	100	4,61	0	0
t=5	83,64	4,43	16,74	2,82
t=10	81,73	4,403	18,45	2,91
t=15	75,71	4,33	24,58	3,201
t=20	71,74	4,27	28,43	3,34
t=28	61,51	4,12	39,47	3,67

Lepistes - *Poecillia reticula* bünyesinde nanopartikülün akümüle olup olmadığına dayalı bu testte OECD'de yer alan kriter BCF eğer 10'dan küçük ise nanopartikül içeren örnek balık bünyesinde akümüle olmamıştır, eğer BCF değeri 10'dan büyük ise balık bünyesinde nanopartikülün akümüle olduğunu gösteriyor (OECD 305, 2012). 10 mg/l nano-HfO₂ için BCF değeri 0,941 ; 100 mg/l nano-HfO₂ için BCF değeri 38,1'dir. 10 mg/l nanopartikül konsantrasyonunda balık bünyesinde biyoakümüle olmadığı, 100 mg/l konsantrasyonunda ise biyakümüle olduğunu göstermektedir.

Yapılan ANOVA testinde artan nano-HfO₂ konsantrasyonları ile biyoakümüleyasyon testinin 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarına günlere karşı sudan balığa geçen KOİ konsantrasyonu ile balıktan suya geçen KOİ konsantrasyonları arasındaki ilişkinin 10 mg/l için (R=0,275) lineer olmadığı ; 100 mg/l için (R=0,853) lineer olduğu saptanmıştır. Test sonucu Şekil 4.100'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. 10 mg/l nano-HfO₂ konsantrasyonu için: yapılan varyans analizi sonucunda günler (P=1,0000 > 0,05) ve KOİ (Sudan

balığa geçen ve Balıktan suya geçen) ($P=0,2309 < 0,05$) değişkenin değişkeninin etkili olmadığı ve regresyonun anlamlı olmadığı görülmüştür ($P=0,9031 < 0,05$). 100 mg/l nano-HfO₂ konsantrasyonu için: yapılan varyans analizi sonucunda günler ($P=1,0000 > 0,05$) değişkeninin etkili olmadığı ve KOI (Sudan balığa geçen ve Balıktan suya geçen) ($P=0,0029 < 0,05$) değişkenin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olmadığı görülmüştür ($P=0,051 < 0,05$).



Şekil 4.100 Biyoakümülyasyon testi'nin ANOVA testi sonuçları (10 mg/l ve 100 mg/l için)

Nano-HfO₂'in biyoakümülyasyonu ile ilgili çalışmış bir literatür saptanmamıştır.

4.4.10 Nano-HfO₂'in Farklı Trofik Seviyelerindeki EC₅₀ Değerlerinin Karşılaştırılması

Nano-HfO₂'in prokaryot canlı olan ; bakteri (*Escherichia coli* ; *Bacillus cereus* ; *Vibrio fischeri* ; Metan Archae Bakterisi) , ökaryot canlı olan ; maya- *Candida albicans* ; küf- *Aspergillus niger* , alg (*Chlorella sp.*) , Crustacea (*Daphnia magna*) ve balık (lepestes - *Poecillia reticula*) olmak üzere 6 farklı trofik seviye üzerine 9 farklı akut toksisite deneyi yapılmıştır. Farklı beslenme seviyelerindeki canlıların nano-HfO₂'e karşı farklı toksik cevapları oluşmuştur. Tablo 4.48'de yer alan EC₅₀ değerlerine göre ; en düşük EC₅₀ değerine (24 saat sonucu EC₅₀= 4,57 mg/l) sahip olan *Chlorella sp.* – alg nano-HfO₂'e en hassas organizmadır ($P=0,0001 < 0,05$). En yüksek EC₅₀ değerine sahip olan lepestes - *Poecillia reticula* (24 saat sonucu EC₅₀=849,8mg/l) nano-HfO₂'e en dirençli organizmadır ($P=0,0178 < 0,05$).

Tablo 4.48 Nano-HfO₂'in farklı trofik seviyelerindeki EC₅₀ değerleri

	EC ₅₀ Değerleri (mg/l)			
	30 dakika sonucu	24 saat sonucu	48 saat sonucu	72 saat sonucu
Bakteri - <i>E.coli</i>	-	59,4	30,9	-
Bakteri - <i>B.cereus</i>	-	29,6	16,7	-
Bakteri - <i>V.fischeri</i>	46,35	-	-	-
Bakteri – Metan Archae	-	34,97	13,55	-
Maya – <i>C.albicans</i>	-	41,1	19,7	-
Küf – <i>A.niger</i>	-	27,8	18,4	-
Alg – <i>Chlorella sp.</i>	-	4,57	3,8	2,94
Crustacea – <i>D.magna</i>	-	63,49	50,18	-
Balık – İpistess – <i>Poecilia reticulata</i>	-	849,8	790,3	-

4.5 Nano-Ta₂O₅ ile Yapılan Akut Toksisite Çalışmaları

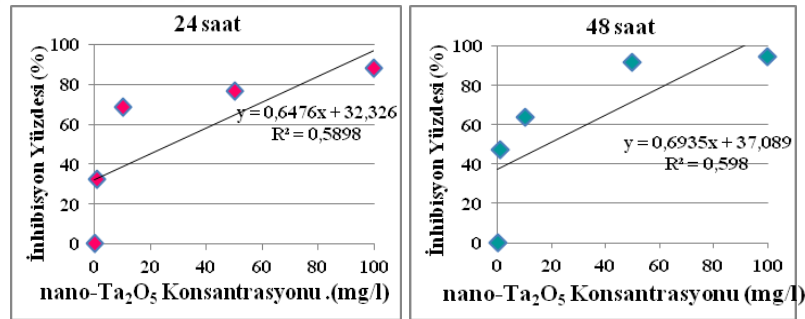
4.5.1 Bakteri (*Escherichia coli* – *Bacillus cereus*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano-Tantalyum oksitin (nano-Ta₂O₅) bakteriler üzerine akut toksisitesi gram negatif bakterilerden *E.coli* ve gram pozitif bakterilerden *B.cereus* ile çalışılmıştır. Tablo 4.49’da yer alan *E.coli* bakterinin sayıları, artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşın 24 ve 48 saat sonucu kontrole göre değişimlerini göstermektedir. 24 saat sonucunda kontrol grubundaki canlı *E.coli* sayıları 35000 ; 30000 ; 34000 adet koloni/ml’dir. 24 saat sonucunda 1 mg/l nano-Ta₂O₅ dozu canlı *E.coli* kolonilerinin sayılarını 23000 ; 22000 ; 24000 adet koloni/ml’e düşmüştür. 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l konsantrasyonlarında bu sayı daha azalmış, en son 100 mg/l dozunda canlı *E.coli* sayıları 4000 ; 5000 ; 3000 adet koloni/ml’ye düşmüştür (Tablo 4.49). 48 saat sonucunda nanopartikülün *E.coli* bakterisine olan inhibisyonu devam etmiştir. 48 saat sonucunda kontrol grubundaki *E.coli* sayıları 36000 ; 37000 ; 35000 adet koloni/ml’dir. 1 mg/l dozunda canlı *E.coli* koloni sayıları 19000 ; 20000 ; 18000 adet koloni/ml ; 10 mg/l dozunda canlı *E.coli* sayıları 13000 ; 14000 ; 12000 adet koloni/ml ; 50 mg/l dozunda canlı *E.coli* sayıları 4000 ; 2000 ; 3000 adet koloni/ml ve 100 mg/l dozunda canlı *E.coli* sayıları 1000 ; 3000 ; 2000 adet koloni/ml’ye düşmüştür (Tablo 4.49).

Tablo 4.49 Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Escherichia coli* bakterilerinin sayıları

nano-Ta ₂ O ₅	CANLI <i>E.coli</i> BAKTERİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	35000	30000	37000	34000	36000	37000	35000	36000
1 mg /l	23000	22000	24000	23000	19000	20000	18000	19000
10 mg /l	12000	11000	13000	12000	13000	14000	12000	13000
50 mg /l	6000	7000	5000	6000	4000	2000	3000	3000
100 mg /l	4000	5000	3000	4000	1000	3000	2000	2000

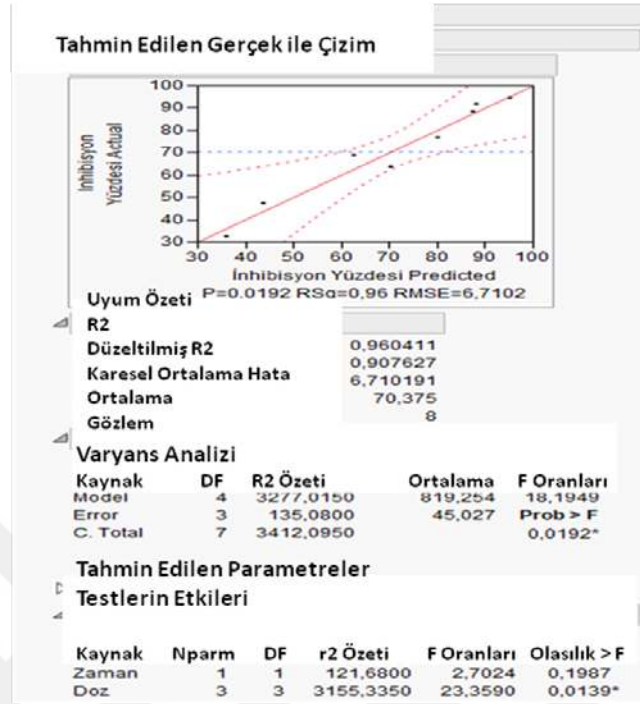
Şekil 4.101’de artan nanopartikül konsantrasyonlarına karşı *E.coli* kolonilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdelerinin grafikleri bulunmaktadır. 24 saat sonunda 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-Ta₂O₅ dozlarının *E.coli*’ye olan inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 32,4 ; % 68,8 ; % 76,5 ; % 88,2’dir (Şekil 4.101). 48 saat sonunda ise bu inhibisyon yüzdeleri artmakta, sırasıyla % 47,2 ; % 63,8 ; % 91,7 ; % 94,4’e kadar çıkmaktadır (Şekil 4.101). Grafikten hesaplanabilen, *E.coli*’nin % 50’sini inhibe eden EC₅₀ konsantrasyonu 24 saat için 26,1 mg/l ; 48 saat için 18,6 mg/l olarak saptanmıştır.



Şekil 4.101 Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı *Escherichia coli* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 26,1 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=18,6 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonları ile *E.coli*’nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,960). Test sonucu Şekil 4.102’de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,1987 > 0,05) değişkeninin etkili olmadığı ; konsantrasyon (P=0,0139 < 0,05)

değişkeninin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0192 < 0,05$).



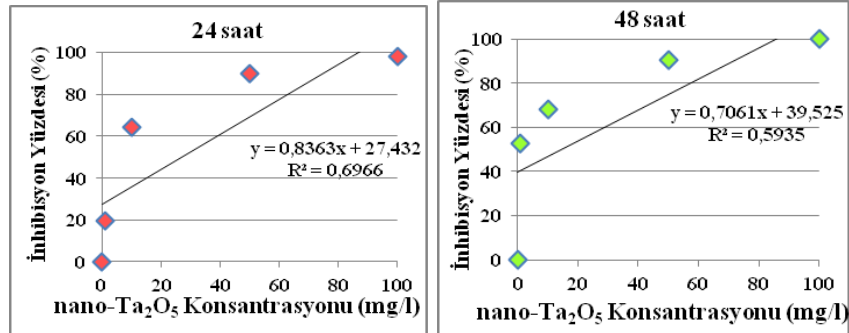
Şekil 4.102 *E.coli*'nin ANOVA testi sonuçları

Akut toksisitesi çalışılan diğer bir bakteri, gram pozitif özelliğe sahip *Bacillus cereus* bakterisidir. Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucunda canlı *Bacillus cereus* bakterisinin sayıları Tablo 4.50'de yer almaktadır. 24 saat sonucunda kontrol numunesinde üreyen canlı *B.cereus* kolonilerinin sayıları 3000 ; 32000 ; 31000 adet koloni/ml iken 1 mg/l konsantrasyonuna maruz kalan *B.cereus* bakterisinin sayıları 25000 ; 26000 ; 24000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l dozunda canlı *B.cereus* bakterisinin sayıları 11000 ; 12000 ; 10000 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l dozunda canlı *B.cereus* bakterisinin sayıları 3000 ; 3100 ; 3200 adet koloni/ml'ye ; 100 mg/l konsantrasyonuna maruz kalan *B.cereus* bakterisinin sayıları 650 ; 660 ; 640 adet koloni/ml'ye düşmektedir (Tablo 4.50). 48 saat sonucunda kontrol grubunda üreyen bakteri sayıları 44000 ; 44500 ; 44100 adet koloni/ml iken ; 1 mg/l konsantrasyonuna maruz kalan *B.cereus* kolonilerinin sayısı 21000 ; 20000 ; 22000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l dozunda canlı *B.cereus* sayıları 14000 ; 13000 ; 15000 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l konsantrasyonunda *B.cereus* 4200 ; 4100 ; 4300 adet koloni/ml'ye ve 100 mg/l dozunda ise kontrole kıyasla *B.cereus* kültürünün tamamı inhibisyona uğramıştır (Tablo 4.50).

Tablo 4.50 Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Bacillus cereus* bakterilerinin sayıları

nano-Ta ₂ O ₅	CANLI <i>B.cereus</i> BAKTERİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	30000	31000	32000	31000	44000	44500	44100	44200
1 mg / l	25000	26000	24000	25000	21000	20000	22000	21000
10 mg / l	11000	12000	10000	11000	14000	13000	15000	14000
50 mg / l	3000	3100	3200	3100	4200	4100	4300	4200
100 mg / l	650	660	640	650	0	0	0	0

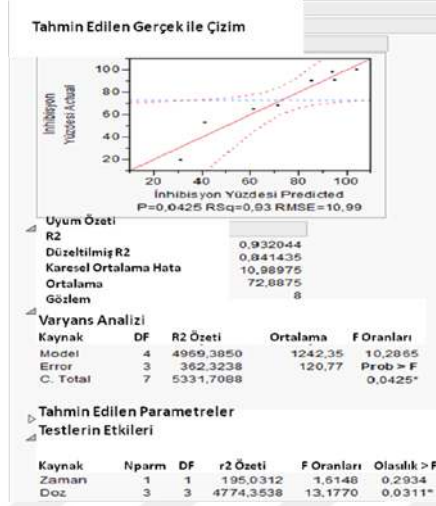
Şekil 4.103'te artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı *B.cereus* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri verilmektedir. 24 saat sonucunda 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarında *B.cereus* bakterisinin inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 19,4 ; % 64,5 ; % 90 ; % 97,9'dur (Şekil 4.103). 48 saat sonucunda *B.cereus* bakterisinin nano-Ta₂O₅'e olan hassasiyeti artmış, inhibisyon yüzdeleri de artmıştır. 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarında *B.cereus* bakterisinin inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 52,5 ; % 68,3 ; % 90,5 ; %100'dür (Şekil 4.103). Grafikten hesaplanabilen, *B.cereus*'un % 50'sini inhibe eden EC₅₀ konsantrasyonu 24 saat için 26,9 mg/l ; 48 saat için 14,8 mg/l olarak saptanmıştır.



Şekil 4.103 Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı *Bacillus cereus* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 26,9 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=14,8 mg/l)

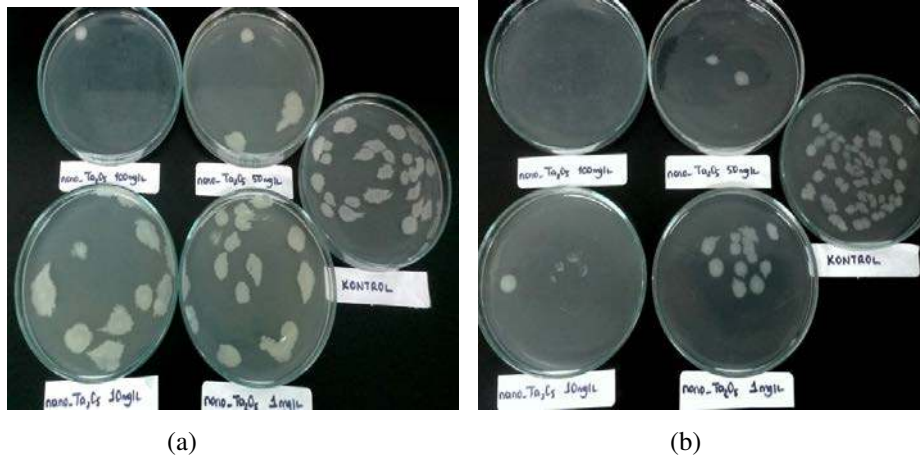
Yapılan ANOVA testinde artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonları ile *B.cereus*'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,932). Test sonucu Şekil 4.104'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman

($P=0,2365 > 0,05$) değişkeninin etkili olmadığı ; konsantrasyon ($P=0,0239 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0425 < 0,05$).



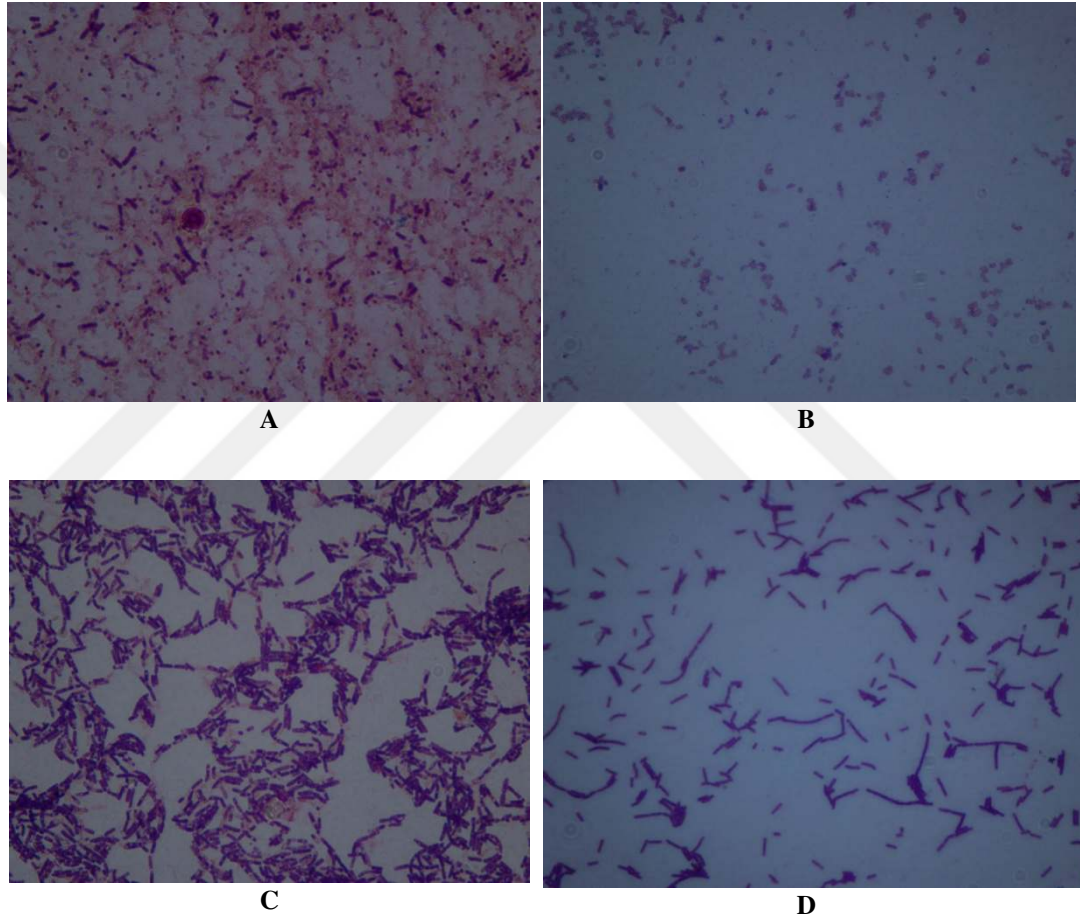
Şekil 4.104 *B.cereus*'un ANOVA testi sonuçları

Şekil 4.105(a) ve Şekil 4.105(b)'de nutrient agar ortamındaki *B.cereus* ve *E.coli* kolonileri gösterilmektedir. Kontrol grubunda 48 saat sonucunda üreyen koloniler ile 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-Ta₂O₅'e 48 saat maruz kalmış kolonileri kıyasladığımızda ; *E.coli* bakteri kültürünün *B.cereus* bakteri kültürüne kıyasla daha az inhibisyona uğramıştır [Şekil 4.105(a) ve Şekil 4.105(b)]. 48 saat sonucunda 100 mg/l nano-Ta₂O₅'in *B.cereus* bakterisine inhibisyonu % 100 iken *E.coli* bakterisine olan inhibisyonu % 94,3'tür (Şekil 4.101 ve Şekil 4.103).



Şekil 4.105 (a): Artan nano-Ta₂O₅ dozlarına karşı *Escherichia coli* bakteri sayılarının değişimi (b): artan nano-Ta₂O₅ dozlarına karşı *Bacillus cereus* bakteri sayılarının değişimi

Şekil 4.106'de *E.coli* ve *B.cereus* bakterilerinin gram boyama sonuçları bulunmaktadır. A resminde kontrol grubundaki *E.coli* bakterisinin gram boyama sonuçları ; C resminde ise nano-Ta₂O₅'e 48 saat boyunca maruz kalmış bakterilerinin gram boyama sonuçları bulunmaktadır. Kontrol grubunda *E.coli* kolonileri gram negatif çubuk bakteriler ile 100 mg/l nanopartiküle 48 saat boyunca maruz kalmış bakterilerinin gram boyama görüntüsü kıyaslandığında nanopartiküle maruz kalmış bakterilerinin şekillerinde 0,01 µm büyümeler görülmektedir.



Şekil 4.106 *Escherichia coli* ve *Bacillus cereus* bakterisinin gram boyama sonucu görüntüleri (A: Kontrol grubundaki *E.coli* bakterisinin gram boyama sonucu ; B: nano-Ta₂O₅ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan *E.coli* bakterisinin gram boyama sonucu ; C: Kontrol grubundaki *B.cereus* bakterisinin gram boyama sonucu ; D: nano- Ta₂O₅ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan *B.cereus* bakterisinin gram boyama sonucu)

Nano-Ta₂O₅ ile yapılmış toksisite testlerine baktığımızda ; Chang ve ark. (2014)'nın tantalum oksitin antibakteriyel özelliklerini *Staphylococcus aureus* ve

Actinobacillus actinomycetemcomitans olmak üzere gram pozitif ve gram negatif iki farklı bakteri ile çalışmışlar. Amorf tantalum oksit nanopartikülün *S.aureus* ve *A.actinomycetemcomitans* bakterilerine karşı iyi bir antimikrobiyal performans gösterdiğini rapor etmişler. Nano-Ta₂O₅ ile ilgili toksisite çalışmaları çok kısıtlı olup, nanopartikülün *E.coli* ve *B.cereus* bakterilerine olan toksisitesi çalışılmamıştır.

4.5.2 Bakteri (*Vibrio fischeri*) Biyoluminesans Değerine Göre Akut Toksisite Testi Sonuçları

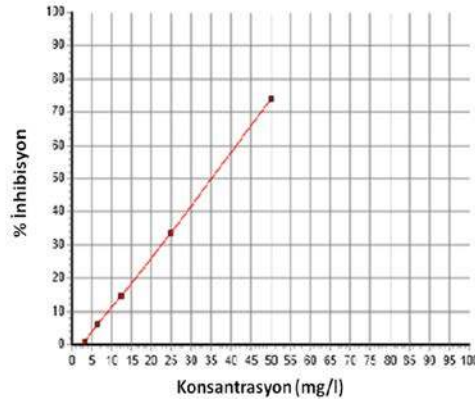
Nano-Ta₂O₅'in artan konsantrasyonlarına karşı biyoluminesans bakterisi olan *Vibrio fischeri* 'nin luminesans değeri ölçülmüştür. *Vibrio fischeri* bakterisinin nano-Ta₂O₅'e maruz kaldığı süre arttıkça, luminesans değerinin azaldığı ve toksisitenin arttığı görülmektedir. Mikrotox deneyi nano-Ta₂O₅'in 100 mg/l stok çözeltisi hazırlanmış, % 3'lük NaCl ile seyreltmeler yapılmış Lumistox 300 (Hach Lange) ile bakterinin luminesans değeri ölçülmüştür. Yapılan seyreltmelerin en düşüğü 3,125 mg/l'de ölçülen inhibisyon % 0,75 ; 6,25 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda % 6,142 ; 12,5 mg/l 'de % 14,50 ; 25 mg/l'de % 33,55 ; 50 mg/l'de % 74,11 ; 100 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda % 91,9 inhibisyon gerçekleşmiştir (Tablo 4.51).

Tablo 4.51 30 dakika sonucu nano-Ta₂O₅ nanopartikülünün artan konsantrasyonlarına karşı *Vibrio fischeri* – bioluminesans bakterisinin % inhibisyon değerleri

nano-Ta ₂ O ₅ Konsantrasyonları (mg/l)	% İnhibisyon
3,125 mg/l	0,75
6,25 mg/l	6,142
12,5 mg/l	14,50
25 mg/l	33,55
50 mg/l	74,11
100 mg/l	91,9

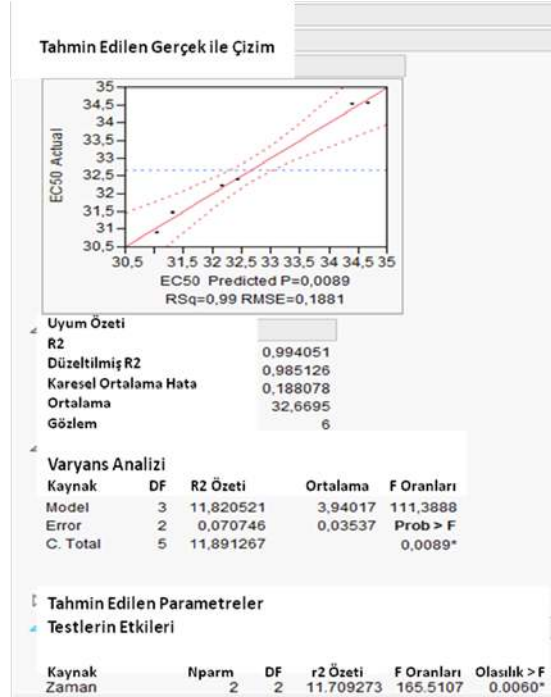
Şekil 4.107'de Mikrotox deneyinin sonucunda Lumistox 300 cihazından alınan grafik yer almaktadır. Grafikte artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlara (3,125 mg/l ; 6,25 mg/l ; 12,5 mg/l ; 25 mg/l ; 50 mg/l ; 100 mg/l) karşı *V.fischeri* bakterisinin % inhibisyon değerleri yer almaktadır. Nano-Ta₂O₅ nanopartikülünün *Vibrio fischeri* bakterisinin % 50'sine etki eden dozu (EC₅₀ Değeri) 30 dakika sonucunda 31,457 mg/l olarak hesaplanmıştır. *Vibrio fischeri* bioluminesans bakterisi nano-Ta₂O₅'e 5 dakika maruz kaldığındaki EC₅₀ değeri 34,56 mg/l ; 15 dakika maruz kaldığındaki EC₅₀ değeri 32,40 mg/l'ye düşmüştür. Bakterinin nanopartiküle maruz kalma süresi

arttıkça EC_{50} değerinde bir azalma gözlenmiş ve bakterinin naopartiküle olan hassasiyeti artmıştır.



Şekil 4.107 nano-Ta₂O₅'in artan konsantrasyonlarına karşı % inhibisyon değerleri (EC_{50} değeri=31,457 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonları ile *Vibrio fischeri* bakterisinin 5. ; 15. ve 30. dakikalarındaki EC_{50} değerlerinin arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,994$). Test sonucu Şekil 4.108'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0089 < 0,05$) değişkeninin EC_{50} değerleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0060 < 0,05$).



Şekil 4.108 *Vibrio fischeri* bakterisinin ANOVA testi sonuçları

Nano-Ta₂O₅ nanopartikülünün *Vibrio fischeri* üzerine toksisite çalışmaları literatürde bulunmamaktadır.

4.5.3 Anaerobik Bakteri Kullanılarak Metan Gazı Ölçümlerine Dayalı Toksisite Testi (ATA-Anaerobik Toksisite Testi) Sonuçları

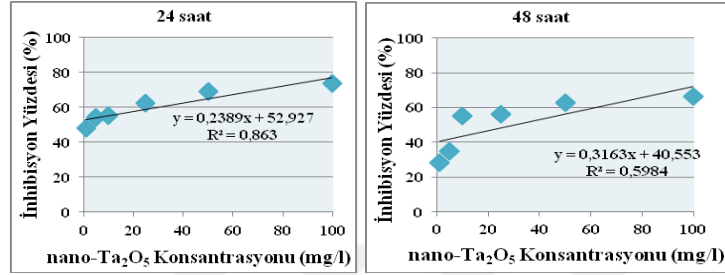
Nano-Ta₂O₅ nanopartikülünün artan konsantrasyonlarının, anaerobik bakterilere toksik etki yapıp yapmadığı ATA-anaerobik toksisite testi ile incelenmiştir. 125 ml'lik steril kapaklı şişelerde artan nanopartikül konsantrasyonlarında metan gazı ölçümleri yapılmıştır. Kontrol grubunda sadece substrat olarak glukoz bulunurken, diğer şişelerde 1 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 mg/l nano-Ta₂O₅ nanopartikülü konularak inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonucunda kontrol grubunda oluşan CH₄ gazı miktarı 19,9 ml iken , 1 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda 10,3 ml ; 5 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda 9,1 ml ; 10 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda 8,9 ml ; 25 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda 7,5 ml ; 50 mg/l konsantrasyonunda 6,1 ml ve 100 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda metan gazı miktarı 5,2 ml'ye düşmüştür (Tablo 4.52). 48 saat sonucunda kontrol grubunda 21,7 ml CH₄ gazı oluşurken 1 mg/l ; 5 mg/l ; 10 mg/l ; 25 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda sırasıyla metan gazı miktarları 15,6 ml ; 14,1 ml ; 9,7 ml ; 9,5 ml ; 8,1 ml ; 7,3 ml'ye düşmüştür (Tablo 4.52).

Tablo 4.52 Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu metan gazı miktarı ve inhibisyon yüzdesi

nano-Ta ₂ O ₅	24 saat sonucu		48 saat sonucu	
	Metan Gazı Miktarı (ml)	İnhibisyon Yüzdesi (%)	Metan Gazı Miktarı (ml)	İnhibisyon Yüzdesi (%)
Kontrol	19,9	0	21,7	0
1 mg / l	10,3	48,2	15,6	28,1
5 mg / l	9,1	54,3	14,1	35,02
10 mg / l	8,9	55,3	9,7	55,3
25 mg / l	7,5	62,3	9,5	56,2
50 mg / l	6,1	69,3	8,1	62,7
100 mg / l	5,2	73,8	7,3	66,4

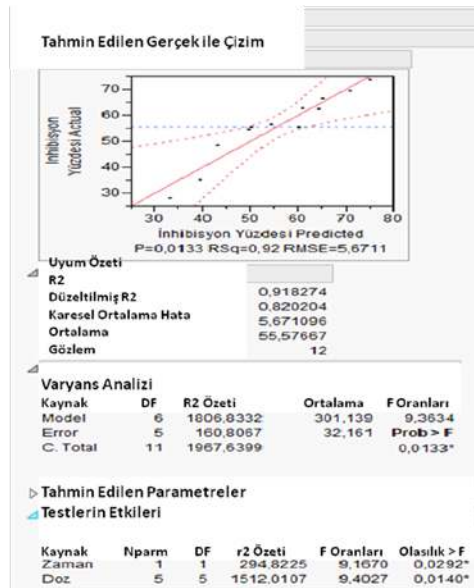
Şekil 4.109'de artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri yer almaktadır. Şekil 4.109'dan hesaplanabilen metan bakterilerinin % 50'sini inhibe eden EC₅₀ değeri 24 saat için 29,6mg/l ; 48 saat için

93,1 mg/l'dir. 24 saat sonucunda 1 mg/l'den 100 mg/l'ye çıkan nanopartikül konsantrasyonu anaerobik bakterilerin metan üretimini etkilemiş, inhibisyon oranı % 48,2'den % 73,8'e çıkmıştır (Tablo 4.52). 48 saat sonucunda ise bu inhibisyon artmış ve 1 mg/l için % 28,1 ; 10 mg/l için % 55,3 ; 50 mg/l için 62,7 ve 100 mg/l için % 66,4'e yükselmiştir (Tablo 4.52).



Şekil 4.109 Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₆₀ değeri= 29,6 mg/l; 48 saat sonucu EC₇₀ değeri= 93,1 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonları ile anaerobik metan Archae bakterilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,918$). Test sonucu Şekil 4.110'da yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0292 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0140 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0133 < 0,05$).



Şekil 4.110 Anaerobik metan Archae bakterilerinin ANOVA testi sonuçları

Nano-Ta₂O₅ nanopartikülünün metan Archae bakterileri üzerine toksisite çalışmaları literatürde bulunmamaktadır.

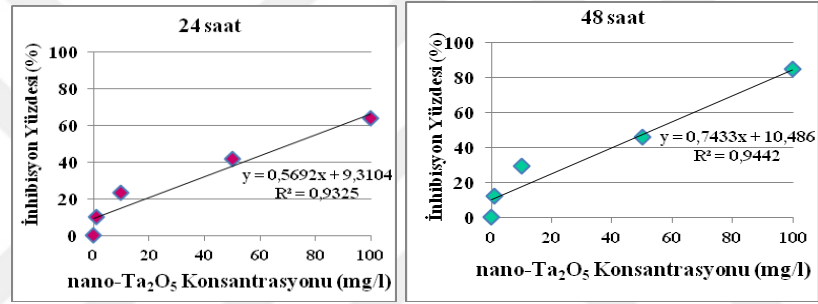
4.5.4 Maya (*Candida albicans*) - Küf (*Aspergillus niger*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano-Ta₂O₅ nanopartikülünün akut toksisitesi maya (*Candida albicans*) ve küf (*Aspergillus niger*) olmak üzerine iki farklı organizma üzerinde çalışılmıştır. Tablo 4.53'te artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı canlı maya kolonilerinin sayısı bulunmaktadır. 24 saat sonucunda kontrol grubundaki *C.albicans* kolonileri 220000 ; 221000 ; 219000 adet koloni/ml iken nano-Ta₂O₅'e maruz kalan *C.albicans* kolonilerinde azalma gözlenmiştir (Tablo 4.53). 1 mg/l konsantrasyonunda canlı maya kolonilerinin sayısı 198000 ; 199000 ; 197000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l konsantrasyonunda 168000 ; 170000 ; 169000 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l konsantrasyonunda 129000 ; 130000 ; 128000 adet koloni/ml'ye ve 100 mg/l konsantrasyonunda 70000 ; 80000 ; 90000 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.53). 48 saat sonucunda kontrol grubunda üreyen canlı *C.albicans* kolonilerinin sayısı 240000 ; 241000 ; 239000 adet koloni/ml iken, artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonları maruz kalma süresi artıkça *C.albicans* kolonilerine inhibisyonu artmıştır. 1 mg/l konsantrasyonunda bu sayı 210000 ; 209000 ; 211000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l konsantrasyonunda 170000 ; 169000 ; 171000 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l konsantrasyonunda 130000 ; 131000 ; 129000 adet koloni/ml'ye ve 100 mg/l konsantrasyonunda 37000 ; 38000 ; 36000 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.53).

Tablo 4.53 Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Candida albicans* maya kolonilerinin sayıları

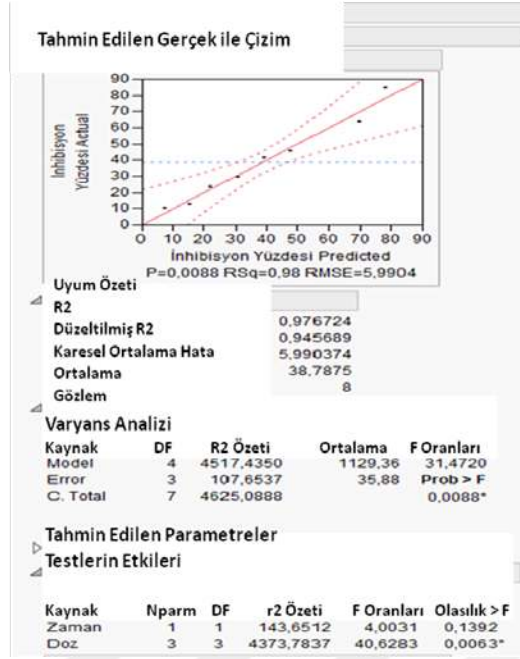
nano-Ta ₂ O ₅	CANLI <i>C.albicans</i> MAYA KOLONİSİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	220000	221000	219000	220000	240000	241000	239000	240000
1 mg /l	198000	199000	197000	198000	210000	209000	211000	210000
10 mg /l	168000	170000	169000	169000	170000	169000	171000	170000
50 mg /l	129000	130000	128000	129000	130000	131000	129000	130000
100 mg /l	70000	80000	90000	80000	37000	38000	36000	37000

Şekil 4.111’de *Candida albicans* maya kolonilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki nano-Ta₂O₅’e olan inhibisyon yüzdeleri verilmektedir. 24 saat sonucunda 1 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonunda inhibisyon % 10 iken 48 saat sonunda inhibisyon yüzdesi 12,5’a çıkmaktadır. 10 mg/l , 50 mg/l ve 100 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda 24 saat sonucunda inhibisyon yüzdesi sırasıyla 23,2 ; 41,4 ; 63,6 iken 48 saat sonunda sırasıyla % 29,2 ; % 45,8 ; % 84,6’e çıkmaktadır (Şekil 4.111). 24 saat sonunda *C.albicans* kolonilerinin % 50’sini inhibe eden EC₅₀ değeri 71,5 mg/l ; 48 saat sonunda EC₅₀ değeri ise 53,2 mg/l’dir (Şekil 4.111). Maruz kalma süresi arttıkça nanopartikülün maya kolonilerini etkilediği doz azalmış ; daha az dozlarda daha çok maya hücrelerini inhibe etmiştir.



Şekil 4.111 Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı *Candida albicans* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 71,5 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=53,2 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonları ile *C.albicans*’nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,976). Test sonucu Şekil 4.112’de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,1392 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0063 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0088 < 0,05).



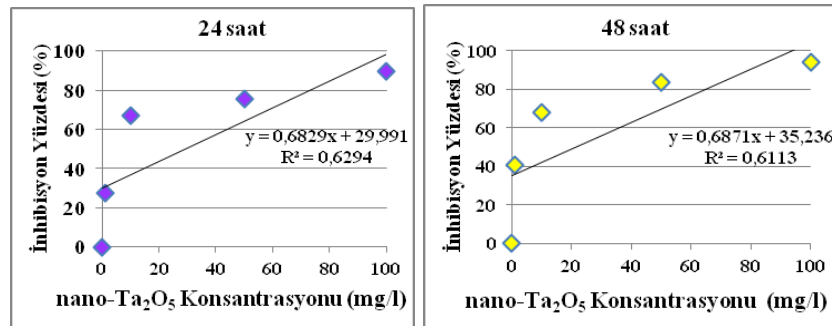
Şekil 4.112 *C.albicans*'ın ANOVA testi sonuçları

Akut toksisitesi çalışılan diğer mikroorganizma ise küf (*Aspergillus niger*) 'tür. Tablo 4.54'te artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Aspergillus niger* küf kolonilerinin sayıları verilmektedir. Kontrol grubunda 24 saat sonucunda 150000 ; 155000 ; 151000 adet koloni/ml üreyen küf kolonileri, nano-Ta₂O₅ ile 24 saat boyunca karşı karşıya kaldığında koloni sayıları azalmıştır (Tablo 4.54). 1 mg/l dozunda 110000 ; 111000 ; 109000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l dozunda 51000 ; 49000 ; 50000 adet koloni/ml'ye 50 mg/l dozunda 37000 ; 38000 ; 36000 adet koloni/ml'ye düşmüştür. 48 saat sonucunda kontrol grubunda üreyen küf kolonilerinin sayısı 121000 ; 123000 ; 120000 adet koloni/ml iken 24 saat sonucundaki üreyen küf kolonilerine kıyasla canlı küf kolonilerinde azalma gözlenmiştir (Tablo 4.54). 1 mg/l dozunda 71000 ; 72000 ; 73000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l dozunda 39000 ; 40000 ; 38000 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l dozunda 21000 ; 19000 ; 20000 adet koloni/ml'ye ve 100 mg/l dozunda ise canlı küf kolonilerinin sayısı 7000 ; 6900 ; 7100 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.54).

Tablo 4.54 Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Aspergillus niger* küf kolonilerinin sayıları

nano-Ta ₂ O ₅	CANLI <i>A.niger</i> KÜF KOLONİSİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	150000	155000	151000	152000	122000	121000	123000	122000
1 mg /l	110000	111000	109000	110000	71000	72000	73000	72000
10 mg /l	51000	49000	50000	50000	39000	40000	38000	39000
50 mg /l	37000	36000	38000	37000	21000	20000	19000	20000
100 mg /l	16000	15000	17000	16000	7000	7100	6900	7000

Şekil 4.113'te *Aspergillus niger* küf kolonilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki nano-Ta₂O₅'e olan inhibisyon yüzdelerinin grafikleri verilmektedir. 24 saat sonunda artan nanopartikül dozlarına karşın *A.niger*'in hassasiyeti artmış ve inhibisyon gözlenmiştir. 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l dozlarındaki *A.niger*'in inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 27,6 ; % 67,1 ; % 75,7 ; % 89,5'dur (Şekil 4.113). 48 saat sonunda *A.niger*'in nano-Ta₂O₅'e karşı inhibisyon yüzdeleri % 40,9 ; % 68 ; % 83,6 ; % 94,3'dür (Şekil 4.113). 24 saat sonunda *A.niger* kolonilerinin % 50'sini inhibe eden EC₅₀ değeri 71,5 mg/l ; 48 saat sonunda EC₅₀ değeri ise 53,2 mg/l'dir (Şekil 4.113). Maruz kalma süresi arttıkça nanopartikülün maya kolonilerini etkilediği doz azalmış ; daha az dozlarda daha çok küf hücrelerini inhibe etmiştir.



Şekil 4.113 Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı *Aspergillus niger* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 29,3 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=21,5 mg/l)

Şekil 4.114(a)'da artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı *C.albicans* maya hücrelerinin potato dextrose agardaki koloni morfolojileri gösterilmektedir. Kontrol

grubundaki maya kolonilerine kıyasla artan nano-Ta₂O₅ dozları *C.albicans* üzerine toksik etki göstermiş ve canlı *C.albicans* sayıları azalmıştır. Şekil 4.114(b)'de ise artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı *A.niger* küf koloninin potato dextrose agardaki koloni morfolojileri gösterilmektedir. Kontrol grubundaki küf koloniler ile 1 mg/l ve 10 mg/l dozuna maruz kalmış *A.niger* küf kültüründeki kolonileri kıyasladığımızda inhibisyon daha az olduğunu, ancak nano-Ta₂O₅ dozu arttıkça bu inhibisyonun arttığı görülmektedir.

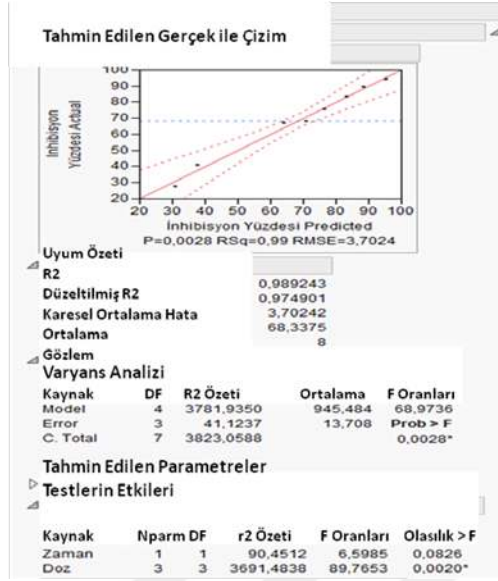


(a)

(b)

Şekil 4.114 (a): Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı *Candida albicans* maya hücrelerinin sayılarının değişimi ; (b): artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı *Aspergillus niger* küf hücrelerinin sayılarının değişimi

Yapılan ANOVA testinde artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonları ile *A.niger*'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,989). Test sonucu Şekil 4.115'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0826 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0020 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0028 < 0,05).



Şekil 4.115 *A.niger*'in ANOVA testi sonuçları

Nano-Ta₂O₅ nanopartikülünün maya ve küf üzerine toksisite çalışmaları literatürde bulunmamaktadır.

4.5.5 Alg (*Chlorella sp.*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

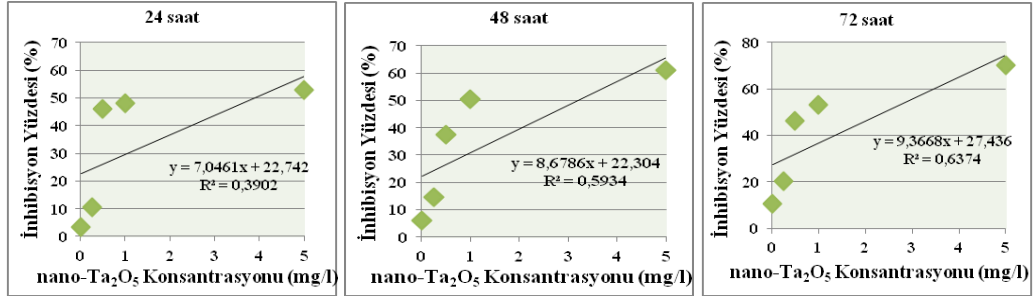
Nano-Ta₂O₅ nanopartikülünün alg üzerine inhibisyonu *Chlorella sp.* türü ile çalışılmıştır. Yapılan toksisite çalışmasında artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına (0,01 mg/l ; 0,25 mg/l ; 0,5 mg/l ; 1 mg/l ; 5 mg/l) karşı alg hücrelerinin 24 ; 48 ve 72 saat boyunca büyümelerine olan inhibisyon araştırılmıştır. Tablo 4.55'te artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı 24, 48 ve 72 saat sonunda 10 µl'deki alg hücrelerinin sayısı verilmiştir. Her bir konsantrasyon ve bekleme süresi 3 seri şeklinde çalışılmıştır. T=0'daki alg hücresi sayısı 57 adet alg/10 µl iken 24 saat inkübasyon periyodundan sonra kontrol grubundaki alg sayıları 168 ; 164 ; 160 adet alg / 10 µl iken 0,01 mg/l nano-Ta₂O₅ maruz kalmış alg hücrelerinin sayısı 166 ; 162 ; 164 adet alg/ 10 µl ; 0,25 mg/l nano-Ta₂O₅'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 145 ; 149 ; 147 adet alg/ 10 µl ; 0,5 mg/l nano-Ta₂O₅'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 112 ; 108 ; 116 adet alg/ 10 µl ; 1 mg/l nano-Ta₂O₅'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 81 ; 85 ; 89 adet alg/ 10 µl ; maksimum doz 5 mg/l nano-Ta₂O₅'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 75 ; 79 ; 77 adet alg/ 10 µl'e düşmüştür (Tablo 4.55). 48 saat sonunda kontrol grubundaki alg sayıları 170 ; 171 ; 169 adet alg/ 10 µl iken 0,01

mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonunda alg sayısı 155 ; 154 ; 153 adet alg/ 10 µl ; 0,25 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda 141 ; 145 ; 149 adet alg/ 10 µl ; 0,5 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda alg sayısı 109 ; 103 ; 106 adet alg/ 10 µl ; 1 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonunda alg sayısı 77 ; 89 ; 86 adet alg/ 10 µl ve 5 mg/l nano-Ta₂O₅ dozundaki alg sayıları 61 ; 67 ; 69 adet alg/ 10 µl'ye düşmüştür (Tablo 4.55). 72 saat sonunda kontrol grubundaki alg sayıları 175 ; 179 ; 177 adet alg/ 10 µl iken 0,01 mg/l konsantrasyonunda alg sayıları 159 ; 158 ; 157 adet alg/ 10 µl'ye ; 0,25 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda 142 ; 141 ; 140 adet alg/ 10 µl'ye ; 0,5 mg/l' de 98 ; 97 ; 90 adet alg/10 µl'ye ; 1 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonunda 76 ; 92 ; 81 adet alg/ 10 µl'ye ve 5 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonunda 55 ; 54 ; 50 adet alg/ 10 µl'ye düşmüştür (Tablo 4.55).

Tablo 4.55 Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Chlorella sp* - alg Hücresi sayıları

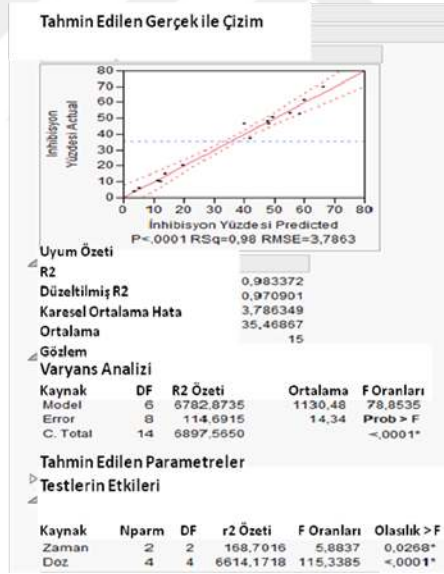
Nano-Ta ₂ O ₅	ALG (<i>Chlorella sp.</i>) SAYILARI (adet Alg / 10 µl)											
	24 saat sonucu				48 saat sonucu				72 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama
Kontrol	164	160	168	164	171	170	169	170	175	177	179	177
0,01 mg / l	166	162	164	164	155	154	153	154	159	158	157	158
0,25 mg / l	147	145	149	147	141	145	149	145	142	141	140	141
0,5 mg / l	112	108	116	112	109	103	106	106	98	97	90	95
1 mg / l	81	85	89	85	77	89	86	84	76	92	81	83
5 mg / l	75	77	79	77	61	67	70	66	55	54	50	53

Şekil 4.116'da artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı *Chlorella sp*'nin yüzde inhibisyon değerleri yer almaktadır. 24 saat sonucunda 0,01 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l ve 5 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarında inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 3,5 ; % 10,4 ; % 46,2 ; % 48,2 ; % 53,04'dir. 48 saat sonunda bu inhibisyon değerleri biraz daha artmış, sırasıyla 0,5 mg/l, 1 mg/l ve 5 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarında inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 6,09, % 14,7 ; % 37,6 ; % 50,6 ; % 61,2'dir. Şekil 4.116'dan hesaplanabilen alg hücrelerinin % 50'sini inhibe eden doz EC₅₀ değeri 24 saat için 3,9 mg/l, 48 saat için 3,2 mg/l ve 72 saat için 2,4 mg/l nano-Ta₂O₅ (Şekil 4.116).



Şekil 4.116 Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı *Chlorella sp.*'nin yüzde inhibisyon değerleri(24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 3,9 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=3,2 mg/l ; 72 saat sonucu EC₅₀ değeri=2,4 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonları ile *Chlorella sp.*'nin 24 ; 48 ve 72 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,983$). Test sonucu Şekil 4.117'de yer almaktadır. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0268 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0001 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0001 < 0,05$).



Şekil 4.117 *Chlorella sp.*'nin ANOVA testi sonuçları

4.5.6 Su Piresi (*Daphnia magna*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Sucul besin ağının önemli bir parçası olan *Daphnia magna* ile yapılan akut toksisite testi nano-Ta₂O₅ nanopartikülünün artan dozlarının *Daphnia magna* üzerine inhibisyonuna dayanmaktadır. Deney ortamında nano-Ta₂O₅'in değişen

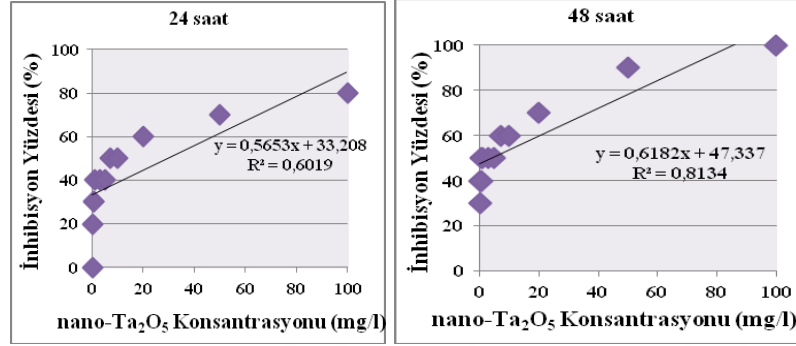
konsantrasyonları 100 ml olarak hazırlanıp, her bir konsantrasyon için 10 adet *D.magna* konulmuştur, ayrıca kontrol grubu olarak *D.magna*'nın mineral ortamını içeren 100 ml'lik ortama 10 adet *D.magna* konularak 24 ve 48 saat için ölüm olup olmadığı izlenmiştir. Tablo 4.56'da artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat sonucunda canlı ve ölen *D.magna* sayıları yer almaktadır. 24 saat sonucunda 0,01 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonları *D.magna* üzerinde toksik etki göstermemiş, ölüm gerçekleştirmemiştir. 0,05 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda inhibisyon gözlenmeye başlamış ve 2 adet *D.magna* ölmüştür ; 50 mg/l dozunda 8 adet *D.magna* ölürken ; 100 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda maksimum inhibisyon gözlenmiş, 9 adet *D.magna* ölmüştür (Tablo 4.56). 48 saat sonucunda minimum konsantrasyonlarda bile *D.magna* üzerine inhibisyon gerçekleşmiş ; 0,01 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda 3 adet *D.magna* ölmüştür. nano-Ta₂O₅ artan konsantrasyonları *D.magna* üzerinde toksik etki göstermiş, doz arttıkça ölüm sayıları artmış, maksimum konsantrasyonda 100 mg/l 'de tüm *D.magna*'lar inhibisyona uğramıştır (Tablo 4.56).

Tablo 4.56 Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Daphnia magna* - su piresi sayıları

nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonu (mg/l)	24 saat sonucu		nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonu (mg/l)	48 saat sonucu	
	Canlı <i>Daphnia</i> sayısı	Ölen <i>Daphnia</i> sayısı		Canlı <i>Daphnia</i> sayısı	Ölen <i>Daphnia</i> sayısı
0,01	10	0	0,01	7	3
0,05	8	2	0,05	6	4
0,5	7	3	0,5	6	4
0,7	7	3	0,7	5	5
1	6	4	1	5	5
3	6	4	3	5	5
5	6	4	5	5	5
7	5	5	7	4	6
10	5	5	10	4	6
20	4	6	20	3	7
50	3	7	50	1	9
100	2	8	100	0	10

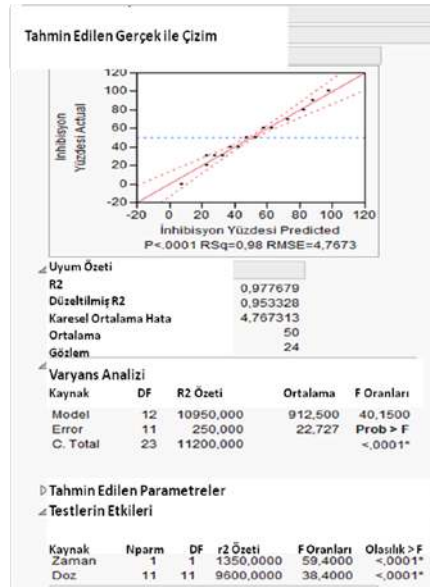
Şekil 4.118'de artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı *D.magna*'ların yüzde inhibisyonun grafiği bulunmaktadır. 24 saat sonucunda 0,01 mg/l nano-Ta₂O₅ dozları *D.magna*'yı inhibe etmezken ; 0,5 ve 0,7 mg/l'de % 30 inhibisyon ; 7 ve 10 mg/l'de % 50 inhibisyon ; 50 mg/l'de % 70 inhibisyon gerçeklemiştir (Şekil 4.118). 48 saat sonucunda 0,01 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda % 30 inhibisyon gerçekleşirken ; 0,7 ; 1 ;

3 ; 5 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda % 50 inhibisyon gerçekleşmiş ; 50 mg/l'de % 0 inhibisyon ; 100 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda ise % 100 gerçekleşmiştir (Tablo 4.118). Şekil 4.118'den hesaplanabilen *D.magna*'nın % 50'sini etkilen doz – EC₅₀ değeri: 24 saat için 29,7 mg/l; % 70'ini etkilen doz – EC₇₀ değeri 48 saat için 36,7 mg/l'dir.



Şekil 4.118 Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı *Daphnia magna*'ların yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 29,7 mg/l; 48 saat sonucu EC₇₀ değeri=36,7 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonları ile *Daphnia magna*'nın 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,977). Test sonucu Şekil 4.119'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0001 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0001 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0001 < 0,05).



Şekil 4.119 *Daphnia magna*'nın ANOVA testi sonuçları

Nano-Ta₂O₅ nanopartikülünün *Daphnia magna* üzerine toksisite çalışmaları literatürde bulunmamaktadır.

4.5.7 Balık (lepistes - *Poecillia reticula*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

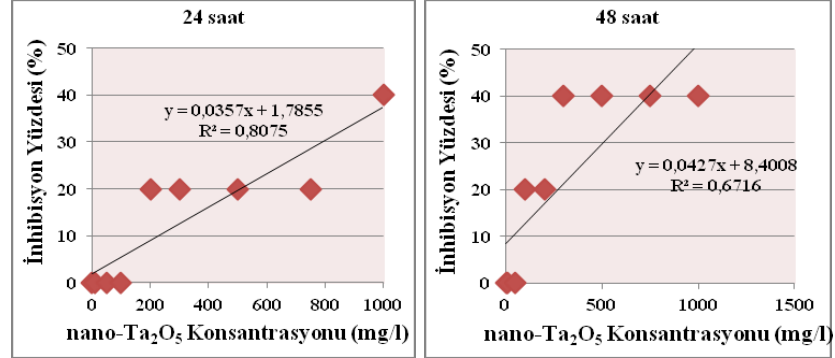
Nano-Ta₂O₅ nanopartikülünün artan konsantrasyonlarının balık üzerine inhibisyonu incelenmiştir. Balık olarak kullanılan *lepistes* – *Poecillia reticula*'nin 24 ve 48 saat sonucu kontrole kıyasla canlı ve ölü sayıları Tablo 4.57'de yer almaktadır. Diğer yapılan akut toksisite testlerinden farklı olarak balık akut toksisite deneyinde daha yüksek konsantrasyonlar çalışılmıştır. 1 ; 10 ; 50 ; 100 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonuna kadar kontrol grubuna kıyasla balık ölümleri 24 saat sonucunda gözlenmemiş, 200 ; 300 ; 500 ; 750 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonunda 1 balık ölümü gözlenmiştir. 48 saat sonunda 24 saat ile paralel sonuçlar gözlenmiş olup ; toksisite 100 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda başlamıştır ; 100 ve 200 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda kontrol grubuna kıyasla 1 balık ölümü gerçekleşmiştir (Tablo 4.57).

Tablo 4.57 Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *lepistes* – *Poecillia reticula* sayıları

nano-Ta ₂ O ₅ konsantrasyonu (mg/l)	Kontroldeki Balık Sayısı	24 saat sonucu		48 saat sonucu	
		Canlı Balık Sayısı	Ölü balık sayısı	Canlı Balık Sayısı	Ölü balık sayısı
1	5	5	0	5	0
10	5	5	0	5	0
50	5	5	0	5	0
100	5	5	0	4	1
200	5	4	1	4	1
300	5	4	1	3	2
500	5	4	1	3	2
750	5	4	1	3	2
1000	5	3	2	3	2

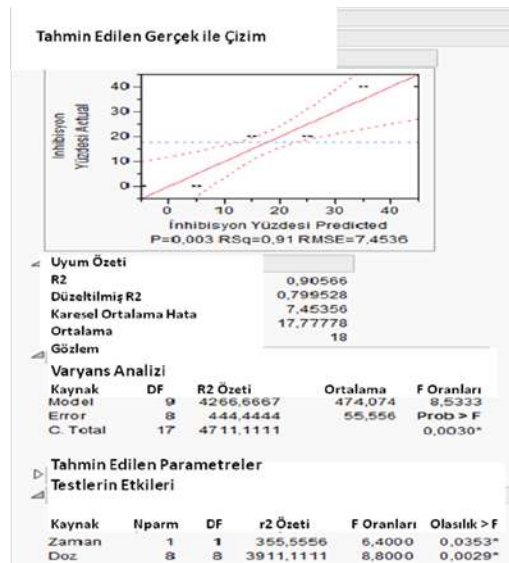
Şekil 4.120 artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı *lepistes* – *Poecillia reticula*'lerin yüzde inhibisyonun grafiği yer almaktadır. 24 saat sonucunda 1 mg/l ile 100 mg/l arasındaki nano-Ta₂O₅'in *lepistes* – *Poecillia reticula*'e karşı toksisitenin gerçekleşmediği , 200 ; 300 ; 500 ve 750 mg/l'de % 20 inhibisyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.120). 48 saat sonucunda 1 mg/l ve 200 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda inhibisyon gerçekleşmemiş ; 300, 500, 750, 1000 mg/l'de % 20 inhibisyon

gerçekleşmiştir (Şekil 4.120). Nano-Ta₂O₅ nanopartikülünün balıkların % 30'una etki eden dozu (EC₃₀ Değeri) 24 saat sonucu EC₃₀ Değeri= 790,3 mg/l; 48 saat sonucu EC₂₀ Değeri=505,8 mg/l Şekil 4.120'den hesaplanmıştır.



Şekil 4.120 Artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarına karşı lepestes – *Poecillia reticulata*'lerin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₃₀ değeri= 790,3 mg/l; 48 saat sonucu EC₃₀ değeri=505,8 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonları ile lepestes – *Poecillia reticulata* 'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,905). Test sonucu Şekil 4.121'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0353 > 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0029 < 0,05) değişkeninin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0030 < 0,05).



Şekil 4.121 Lepistes – *Poecillia reticulata*'nın ANOVA testi sonuçları

Nano-Ta₂O₅'in *Iepistes* – *Poecillia reticula* üzerine akut toksisitesinin çalışıldığı bir literatür saptanmamıştır.

4.5.8 Biyoayrışabilirlik Testi Sonuçları

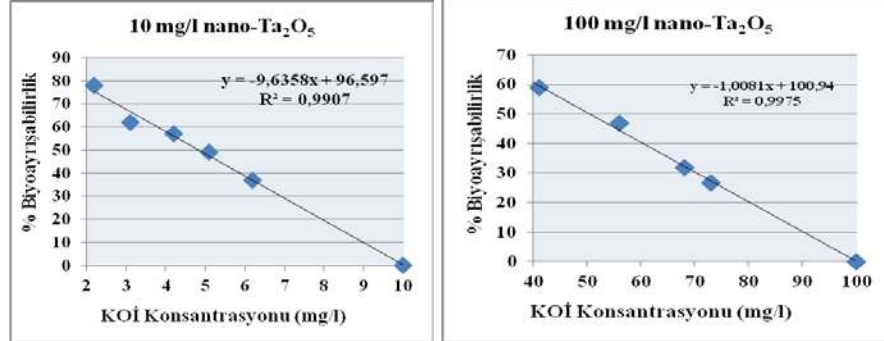
Nano-Ta₂O₅ nanopartikülünün canlı mikroorganizmalar kullanılarak biyoayrışabilirliklerinin belirlenmesi amaçlanmış, ayrıca alıcı ortama deşarj edildiğinde canlı ekosistem tarafından tolere edilebilmesi için hangi seyreltmede verilmesinin daha uygun olup olmadığı araştırılmıştır. Nano-Ta₂O₅'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında % giderimleri 28 günlük süre boyunca belli zaman aralıklarında ölçülen KOİ değerleri ile hesaplanmıştır (Tablo 4.58). Başlangıç KOİ değerleri 10 ve 100 mg/l iken 5 ; 10 ; 15 ; 20 ve 28. günlerde azalan KOİ değerleri ölçülmüştür. t=0. günde KOİ değeri 10 mg/l iken 5. günde ölçülen KOİ 6,2 mg/l'e ; 10. günde ölçülen KOİ 5,1 mg/l ; 15. günde ölçülen KOİ 4,2 mg/l ; 20. günde ölçülen KOİ 3,2 mg/l'ye 28. günün sonunda ölçülen KOİ ise 2,2 mg/l olarak ölçülmüştür (Tablo 4.58). t=0. günde KOİ değeri 100 mg/l iken ; 5. Günde 86,6 mg/l ; 10. günde 80,3 mg/l ; 15. günde 78,2 mg/l ; 20. günde 72,6 mg/l ; 28. günün sonunda ise 68,5 mg/l olarak ölçülmüştür (Tablo 4.58).

Tablo 4.58 28 gün boyunca nano-Ta₂O₅'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonları için % biyoayrışabilirlik değerleri

Günler	10 mg/l nano-Ta ₂ O ₅		100 mg/l nano-Ta ₂ O ₅	
	KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	% Giderim	KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	% Giderim
t=0	10	0	100	0
t=5	6,2	36,8	86,6	13,4
t=10	5,1	49	80,3	19,7
t=15	4,2	57,1	78,2	21,8
t=20	3,1	61,9	72,6	27,4
t=28	2,2	78	68,5	31,5

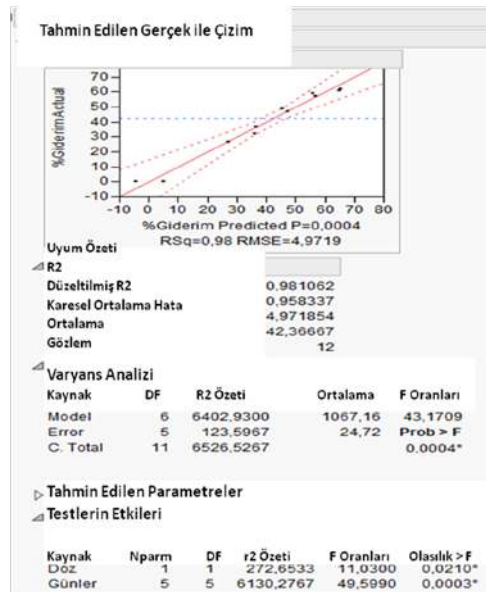
Şekil 4.122'de günlere karşı 10 mg/l ve 100 mg/l nano-Ta₂O₅'in % biyoayrışabilirlik değerleri yer almaktadır. 10 ve 100 mg/l başlangıç KOİ miktarı ortama konulan aerobik çamur bakteri tarafından ayrıştırıldığı için zaman artıka azalma gözlenmiştir. 10 mg/l başlangıç KOİ ile başlatılan akvaryumda ; 5. günde % giderim % 36,8 iken ; 20. güne geldiğinde % 61,9'a ; 28. günde % giderim % 78'a yükselmiştir. 100 mg/l başlangıç KOİ miktarı için 5. günde % giderim % 13,4 iken ;

10. günde % giderim % 19,7 ; 20. güne gelindiğinde % 27,4'a ; 28. günde % giderim % 34,5'a yükselmiştir (Tablo 4.58).



Şekil 4.122 10 ve 100 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarının 28 günlük % biyoayrışabilirlik değerleri

Yapılan ANOVA testinde artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonları ile biyoayrışabilirlik testinin 10 ve 100 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonlarının günlere karşı % giderimi arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,981). Test sonucu Şekil 4.123'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda konsantrasyon (P=0,0210 > 0,05) ve günler (P=0,0003 < 0,05) değişkeninin % giderim üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0004 < 0,05).



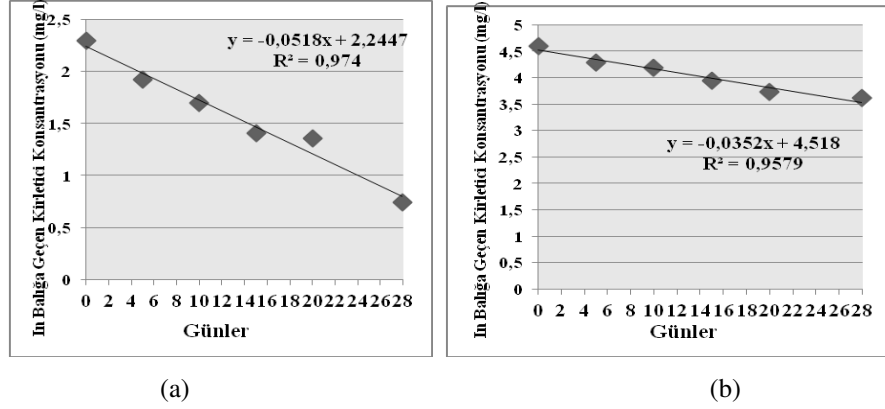
Şekil 4.123 Biyoayrışabilirlik testi'nin ANOVA testi sonuçları

Nano-Ta₂O₅'in biyoayrışabilirliğini çalışmış bir literatür saptanmamıştır.

4.5.9 Biyoakümülyasyon Testi Sonuçları

Nano-Ta₂O₅ nanopartikülünün farklı konsantrasyonlarının canlı organizmadaki salınım ve birikimin saptanması amaçlanmıştır. Canlı organizma olarak *lepistes* – *Poecillia reticula* kullanılmış, 28 gün boyunca 10 ve 100 mg/l konsantrasyonundaki nanopartikülün KOİ değerleri ölçülmüş ve 28 günlük periyodun sonunda balıklar temiz suya alınıp, balıktan suya geçen KOİ değerleri 28 gün boyunca hesaplanmıştır. Tablo 4.59'da 28 gün boyunca nano-Ta₂O₅'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları yer almaktadır. Biyoakümülyasyon faktörü (BCF) 'nın hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanmıştır.

Tablo 4.59'da 10 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonunda 28 günlük periyotta sudan balığa geçen KOİ konsantrasyonları t=0. günde 10 mg/l iken 5. gün ; 10. gün ; 15. gün ; 20. gün ve 28. günde ölçülen KOİ değerleri sırasıyla 6,8 mg/l ; 5,5 mg/l ; 4,1 mg/l ; 3,9 mg/l ve 2,1 mg/l'dir. K₂ hesaplanmasında kullanılan C_{f1} (0. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması – lnKOİ=2,3 mg/l) ve C_{f2} (28. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması – lnKOİ=0,74 mg/l) değerleri Tablo 4.59'da yer almaktadır. Hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanan k₂ değeri 0,042 gün⁻¹ olarak hesaplanır. K₁ hesaplamasında yer alan C_f değeri Şekil 4.124(a)'da yer alan grafikte 14. güne gelen lnKOİ 1,5 mg/l olarak bulunmaktadır ; C_w değeri ise balıktan suya geçen KOİ değerlerinin doğal logaritmalarından $[C_w = \frac{C_{w2} - C_{w1}}{(C_{w2} = 28.\text{gün}} - (C_{w1} = 0.\text{gün})]$ 0,91 mg/l olarak hesaplandı. Hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanan k₁ değeri 0,301 gün⁻¹ olarak hesaplanır. BCF değeri ise 7,17'dir.



Şekil 4.124 (a): 10 mg/l nano-Ta₂O₅ in günlere göre In(Sudan balığa geçen kirlenici konsantrasyonu) değerleri ($C_f=1,5$ mg/l) ; (b): 100 mg/l nano-Ta₂O₅ in günlere göre In(Sudan balığa geçen kirlenici konsantrasyonu) değerleri ($C_f=4,02$ mg/l)

100 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonunda 28 günlük periyotta sudan balığa geçen KOİ konsantrasyonları $t=0$. günde 100 mg/l iken 5. gün ; 10. gün ; 15. gün ; 20. gün ve 28. günde ölçülen KOİ değerleri sırasıyla 72,6 mg/l ; 66,5 mg/l ; 51,6 mg/l ; 41,8 mg/l ve 37,5 mg/l'dir. K_2 hesaplanmasında kullanılan C_{f1} (0. Günde sudan balığa geçen kirlenici konsantrasyonun doğal logaritması – $\ln KOİ=4,61$ mg/l) ve C_{f2} (28. Günde sudan balığa geçen kirlenici konsantrasyonun doğal logaritması – $\ln KOİ=3,62$ mg/l) değerleri Tablo 4.59'da yer almaktadır. Hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanan k_2 değeri $0,0089 \text{ gün}^{-1}$ olarak hesaplanır. K_1 hesaplamasında yer alan C_f değeri Şekil 4.124(a)'da yer alan grafikte 14. güne gelen $\ln KOİ$ 4,02 mg/l olarak bulunmaktadır ; C_w değeri ise balıktan suya geçen KOİ değerlerinin doğal logaritmalarından $[C_w = C_{w2} - C_{w1} \text{ (mg/l)} / (C_{w2} = 28.\text{gün}]$ ($C_{w1}=0.\text{gün}$) 0,83 mg/l olarak hesaplandı. Hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanan k_1 değeri $0,16 \text{ gün}^{-1}$ olarak hesaplanır. BCF değeri ise 17,9'dur.

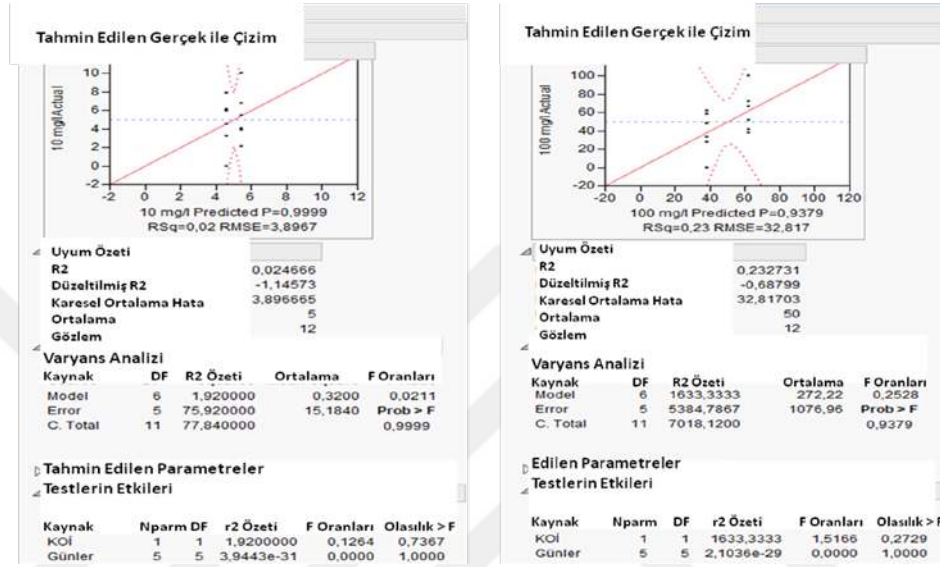
Tablo 4.59 28 gün boyunca nano-Ta₂O₅'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları

10 mg/l nano-Ta ₂ O ₅				
Günler	Numuneden Balığa Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)	Balıktan Suya Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)
t=0	10	2,3	0	0
t=5	6,8	1,92	3,2	1,16
t=10	5,5	1,7	4,5	1,5
t=15	4,1	1,41	5,9	1,77
t=20	3,9	1,36	6,1	1,81
t=28	2,1	0,74	7,9	2,07
100 mg/l nano-Ta ₂ O ₅				
Günler	Numuneden Balığa Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)	Balıktan Suya Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)
t=0	100	4,6	0	0
t=5	72,6	4,28	27,4	3,31
t=10	66,5	4,19	33,5	3,51
t=15	51,6	3,94	48,4	3,88
t=20	41,8	3,73	58,2	4,06
t=28	37,5	3,62	62,5	4,14

Lepistes - *Poecillia reticula* bünyesinde nanopartikülün akümüle olup olmadığına dayalı bu testte OECD'de yer alan kriter BCF eğer 10'dan küçük ise nanopartikül içeren örnek balık bünyesinde akümüle olmamıştır, eğer BCF değeri 10'dan büyük ise balık bünyesinde nanopartikülün akümüle olduğunu gösteriyor (OECD 305, 2012). 10 mg/l nano-Ta₂O₅ için BCF değeri 7,17 ; 100 mg/l nano-Ta₂O₅ için BCF değeri 17,93'tür. 10 mg/l nanopartikül konsantrasyonunda balık bünyesinde biyoakümüle olmadığı, 100 mg/l konsantrasyonunda ise biyakümüle olduğunu göstermektedir.

Yapılan ANOVA testinde artan nano-Ta₂O₅ konsantrasyonları ile biyoakümüleyon testinin 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarına günlere karşı sudan balığa geçen KOİ konsantrasyonu ile balıktan suya geçen KOİ konsantrasyonları arasındaki ilişkinin 10 mg/l için (R=0,0246) ve 100 mg/l için (R=0,232) lineer olmadığı saptanmıştır. Test sonucu Şekil 4.125'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. 10 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonu için: yapılan varyans analizi sonucunda günler (P=1,0000 > 0,05) ve KOİ (Sudan balığa geçen ve Balıktan suya geçen) (P=0,736 > 0,05) değişkenin etkili

olmadığı ve regresyonun anlamlı olmadığı görülmüştür ($P=0,9999 > 0,05$). 100 mg/l nano-Ta₂O₅ konsantrasyonu için: yapılan varyans analizi sonucunda günler ($P=1,0000 > 0,05$) ve KOI (Sudan balığa geçen ve Balıktan suya geçen) ($P=0,272 > 0,05$) değişkenin inhibisyon yüzdeleri üzerinde değişkeninin etkili olmadığı ve regresyonun anlamlı olmadığı görülmüştür ($P=0,051 > 0,05$).



Şekil 4.125 Biyoakümülyasyon testi'nin ANOVA testi sonuçları (10 mg/l ve 100 mg/l için)

Nano-Ta₂O₅'in biyoakümülyasyonu ile ilgili çalışmış bir literatür saptanmamıştır.

4.5.10 Nano-Ta₂O₅'in Farklı Trofik Seviyelerindeki EC₅₀ Değerlerinin Karşılaştırılması

Nano-Ta₂O₅'in prokaryot canlı olan ; bakteri (*Escherichia coli* ; *Bacillus cereus* ; *Vibrio fischeri* ; Metan Archae Bakterisi) , ökaryot canlı olan ; maya- *Candida albicans* ; küf- *Aspergillus niger* , alg (*Chlorella sp.*) , Crustacea (*Daphnia magna*) ve balık (lepidistes - *Poecillia reticulata*) olmak üzere 6 farklı trofik seviye üzerine 9 farklı akut toksisite deneyi yapılmıştır. Farklı beslenme seviyelerindeki canlıların nano-Ta₂O₅'e karşı farklı toksik cevapları oluşmuştur. Tablo 4.60'da yer alan EC₅₀ değerlerine göre ; en düşük EC₅₀ değerine (24 saat sonucu EC₅₀= 3,9 mg/l) sahip olan *Chlorella sp.* – alg nano-Ta₂O₅'e en hassas organizmadır ($P=0,0001 < 0,05$). En

yüksek EC₅₀ değerine sahip olan lepistes - *Poecillia reticula* (24 saat sonucu EC₃₀=790,3 mg/l) nano-Ta₂O₅'e en dirençli organizmadır (P=0,0030 < 0,05).

Tablo 4.60 Nano-Ta₂O₅'in farklı trofik seviyelerindeki EC₅₀ değerleri

	EC ₅₀ Değerleri (mg/l)			
	30 dakika sonucu	24 saat sonucu	48 saat sonucu	72 saat sonucu
Bakteri - <i>E.coli</i>	-	26,1	18,6	-
Bakteri - <i>B.cereus</i>	-	26,9	14,8	-
Bakteri - <i>V.fischeri</i>	31,457	-	-	-
Bakteri – Metan Archae	-	29,6 (EC ₆₀)	93,1 (EC ₇₀)	-
Maya – <i>C.albicans</i>	-	71,5	53,2	-
Küf – <i>A.niger</i>	-	29,3	21,5	-
Alg – <i>Chlorella sp.</i>	-	3,9	3,2	2,4
Crustacea – <i>D.magna</i>	-	29,7	36,7 (EC ₇₀)	-
Balık – lepistes - <i>Poecillia reticula</i>	-	790,3 (EC ₃₀)	505,8 (EC ₃₀)	-

4.6 Nano-SiO₂ ile Yapılan Akut Toksisite Çalışmaları

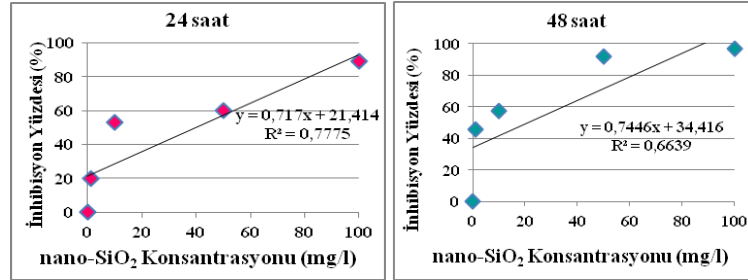
4.6.1 Bakteri (*Escherichia coli* – *Bacillus cereus*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano-SiO₂'in bakteriler üzerine akut toksisitesi gram negatif bakterilerden *E.coli* ve gram pozitif bakterilerden *B.cereus* ile çalışılmıştır. Tablo 4.61'de yer alan *E.coli* bakterinin sayıları, artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşın 24 ve 48 saat sonucu kontrole göre değişimlerini göstermektedir. 24 saat sonucunda kontrol grubundaki canlı *E.coli* sayıları 120000 ; 121000 ; 119000 adet koloni/ml'dir. 24 saat sonucunda 1 mg/l nano-SiO₂ dozu canlı *E.coli* kolonilerinin sayılarını 95000 ; 95100 ; 94900 adet koloni/ml'e düşmüştür. 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l konsantrasyonlarında bu sayı daha azalmış, en son 100 mg/l dozunda canlı *E.coli* sayıları 4900 ; 5000 ; 5100 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.61). 48 saat sonucunda nanopartikülün *E.coli* bakterisine olan inhibisyonu devam etmiştir. 48 saat sonucunda kontrol grubundaki *E.coli* sayıları 125000 ; 126000 ; 124000 adet koloni/ml'dir. 1 mg/l dozunda canlı *E.coli* koloni sayıları 86000 ; 85900 ; 86100 adet koloni/ml ; 10 mg/l dozunda canlı *E.coli* sayıları 24000 ; 24100 ; 23900 adet koloni/ml ; 50 mg/l dozunda canlı *E.coli* sayıları 2000 ; 1900 ; 2100 adet koloni/ml ve 100 mg/l dozunda canlı *E.coli* kültürünün tamamı inhibe olmuştur (Tablo 4.61).

Tablo 4.61 Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Escherichia coli* bakterilerinin sayıları

nano-SiO ₂	CANLI <i>E.coli</i> BAKTERİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	120000	121000	119000	120000	125000	126000	124000	125000
1 mg / l	95000	95100	94900	95000	86000	85900	86100	86000
10 mg / l	45000	44900	45100	45000	24000	24100	23900	24000
50 mg / l	10000	9900	11000	10300	2000	1900	2100	2000
100 mg / l	5000	4900	5100	5000	0	0	0	0

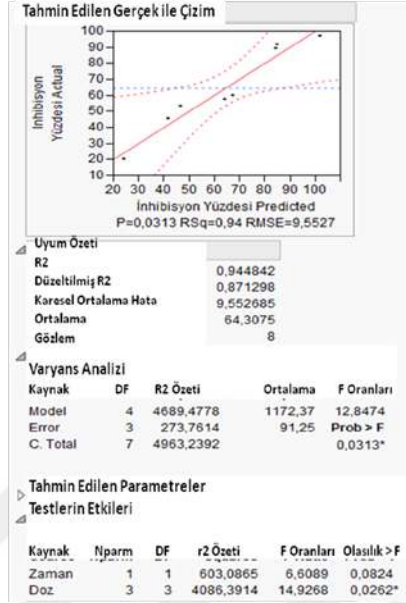
Şekil 4.126’da artan nanopartikül konsantrasyonlarına karşı *E.coli* kolonilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdelerinin grafikleri bulunmaktadır. 24 saat sonunda 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-SiO₂ dozlarının *E.coli*’ye olan inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 20,8 ; % 62,5 ; % 91,4 ; % 95,8’dir (Şekil 4.126). 48 saat sonunda ise bu inhibisyon yüzdeleri artmakta, sırasıyla % 31,2 ; % 80,8 ; % 98,4 ; % 100’e kadar çıkmaktadır (Şekil 4.126). Grafikten hesaplanabilen, *E.coli*’nin % 50’sini inhibe eden EC₅₀ konsantrasyonu 24 saat için 27,2 mg/l ; 48 saat için 16,7 mg/l olarak saptanmıştır.



Şekil 4.126 Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı *Escherichia coli* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 27,2 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 16,7 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-SiO₂ konsantrasyonları ile *E.coli*’nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,944). Test sonucu Şekil 4.127’de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0824 > 0,05) değişkeninin etkili olmadığı ; konsantrasyon (P=0,0262 < 0,05)

değişkeninin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0313 < 0,05$).



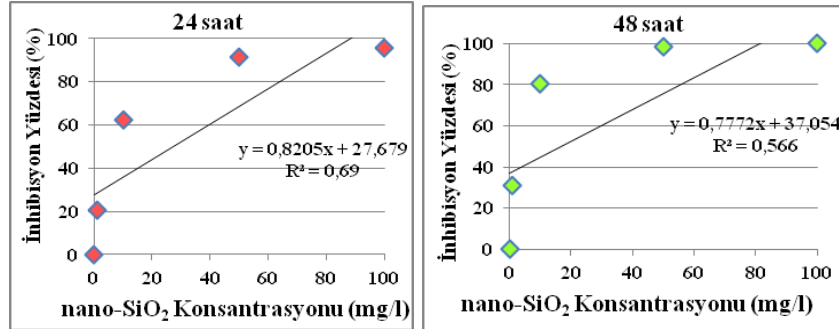
Şekil 4.127 *E.coli*'nin ANOVA testi sonuçları

Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucunda canlı *Bacillus cereus* bakterisinin sayıları Tablo 4.62'de yer almaktadır. 24 saat sonucunda kontrol numunesinde üreyen canlı *B.cereus* kolonilerinin sayıları 150000 ; 151000 ; 149000 adet koloni/ml iken 1 mg/l konsantrasyonuna maruz kalan *B.cereus* bakterisinin sayıları 110000 ; 120000 ; 130000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l dozunda canlı *B.cereus* bakterisinin sayıları 64000 ; 63000 ; 65000 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l dozunda canlı *B.cereus* bakterisinin sayıları 60000 ; 59000 ; 61000 adet koloni/ml'ye ; 100 mg/l konsantrasyonuna maruz kalan *B.cereus* bakterisinin sayıları 16000 ; 16100 ; 15900 adet koloni/ml'ye düşmektedir (Tablo 4.62). 48 saat sonucunda kontrol grubunda üreyen bakteri sayıları 173000 ; 172000 ; 174000 adet koloni/ml iken ; 1 mg/l konsantrasyonuna maruz kalan *B.cereus* kolonilerinin sayısı 94000 ; 93000 ; 95000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l dozunda canlı *B.cereus* sayıları 80000 ; 81000 ; 82000 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l konsantrasyonunda *B.cereus* 14000 ; 13900 ; 14100 adet koloni/ml'ye ve 100 mg/l dozunda ise kontrole kıyasla *B.cereus* 5000 ; 5100 ; 4900 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.62).

Tablo 4.62 Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Bacillus cereus* bakterilerinin sayıları

nano-SiO ₂	CANLI <i>B.cereus</i> BAKTERİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	150000	151000	149000	150000	173000	172000	174000	173000
1 mg / l	110000	120000	130000	120000	94000	93000	95000	94000
10 mg / l	64000	63000	65000	64000	81000	80000	82000	81000
50 mg / l	60000	61000	59000	60000	14000	14100	13900	14000
100 mg / l	16000	16100	15900	16000	5000	5100	4900	5000

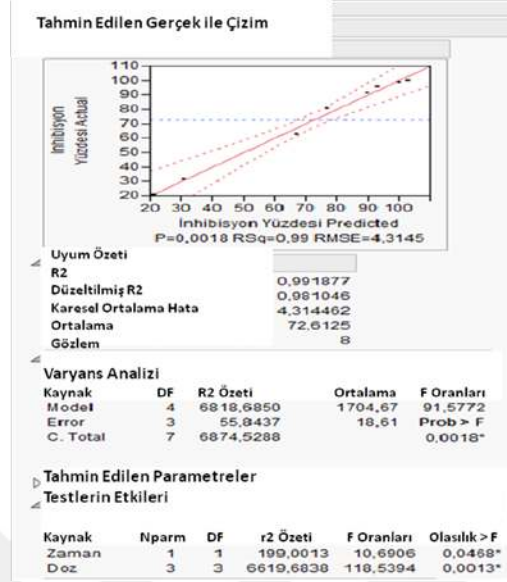
Şekil 4.128’de artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı *B.cereus* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri verilmektedir. 24 saat sonucunda 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonlarında *B.cereus* bakterisinin inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 20 ; % 57,3 ; % 60 ; % 89,3’dur (Şekil 4.128). 48 saat sonucunda *B.cereus* bakterisinin nano-SiO₂’e olan hassasiyeti artmış, inhibisyon yüzdeleri de artmıştır. 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonlarında *B.cereus* bakterisinin inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 45,66 ; % 53,2 ; % 91,9 ; %97,1’dür (Şekil 4.128). Grafikten hesaplanabilen, *B.cereus*’un % 50’sini inhibe eden EC₅₀ konsantrasyonu 24 saat için 39,9 mg/l ; 48 saat için 20,9 mg/l olarak saptanmıştır.



Şekil 4.128 Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı *Bacillus cereus* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 39,9 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 20,9 mg/l)

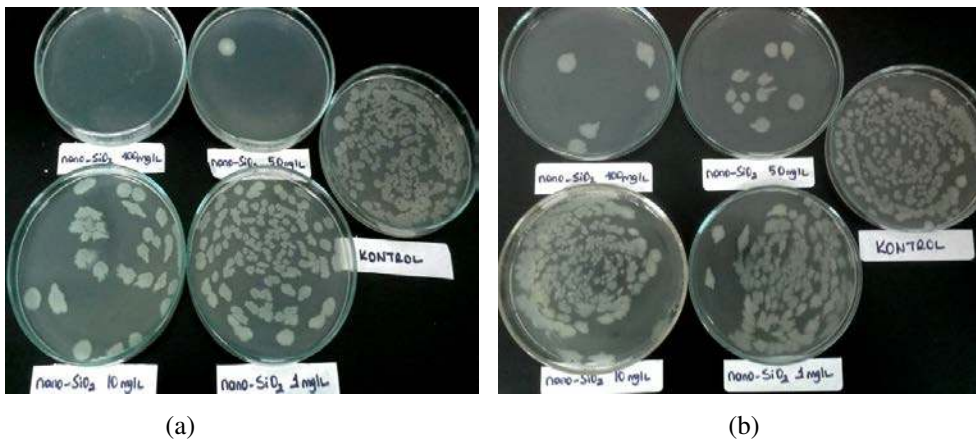
Yapılan ANOVA testinde artan nano-SiO₂ konsantrasyonları ile *B.cereus*’nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,991). Test sonucu Şekil 4.129’da yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman

($P=0,0468 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0013 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0018 < 0,05$).



Şekil 4.129 *B.cereus*'un ANOVA testi sonuçları

Şekil 4.130(a) ve (b)'de nutrient agar ortamındaki *B.cereus* ve *E.coli* kolonileri gösterilmektedir. Kontrol grubunda 48 saat sonucunda üreyen koloniler ile 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-SiO₂'e 48 saat maruz kalmış kolonileri kıyasladığımızda ; *E.coli* bakteri kültürünün *B.cereus* bakteri kültürüne kıyasla daha az inhibisyona uğramıştır [Şekil 4.130(a) ve Şekil 4.130(b)]. 48 saat sonucunda 100 mg/l nano-SiO₂'in *B.cereus* bakterisine inhibisyonu % 97,1 iken *E.coli* bakterisine olan inhibisyonu % 100'dür (Şekil 4.126 ve Şekil 4.128).

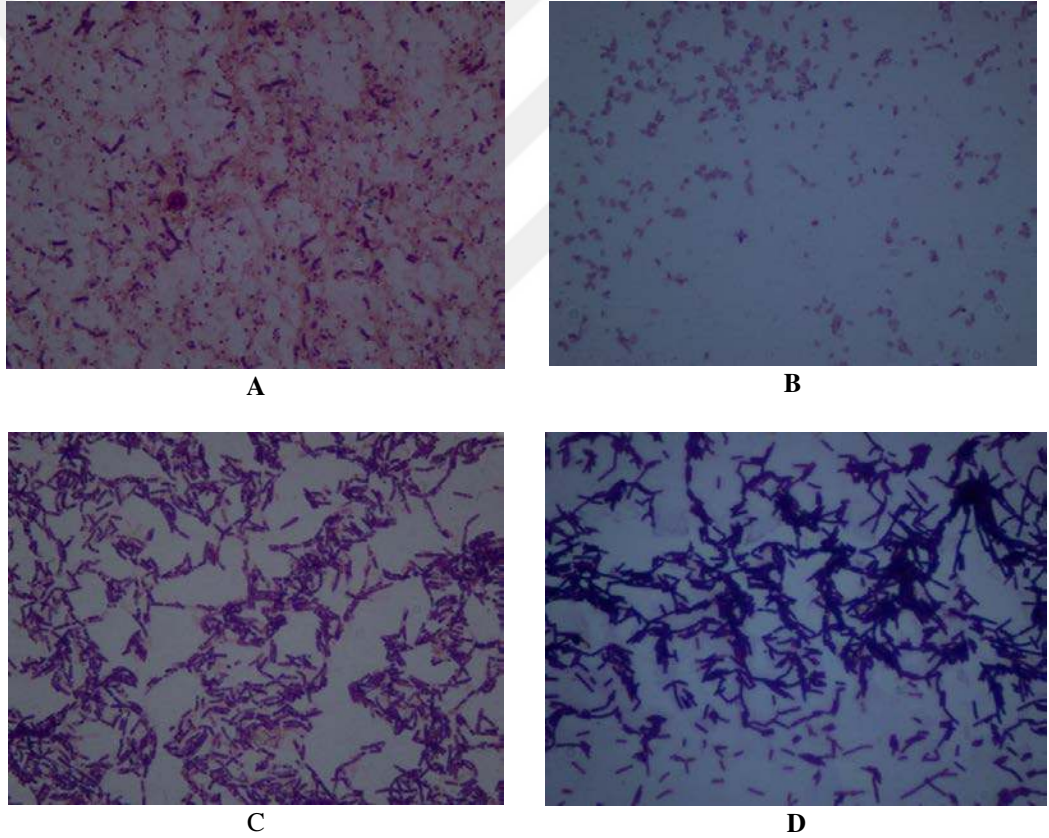


(a)

(b)

Şekil 4.130 (a): Artan nano-SiO₂ dozlarına karşı *Escherichia coli* bakteri sayılarının değişimi ; (b): artan nano-SiO₂ dozlarına karşı *Bacillus cereus* bakteri sayılarının değişimi

Şekil 4.131’de *E.coli* ve *B.cereus* bakterilerinin gram boyama sonuçları bulunmaktadır. A resminde kontrol grubundaki *E.coli* bakterisinin gram boyama sonuçları ; C resminde ise nano-SiO₂’e 48 saat boyunca maruz kalmış bakterilerinin gram boyama sonuçları bulunmaktadır. Kontrol grubunda *E.coli* kolonileri gram negatif çubuk bakteriler ile 100 mg/l nanopartiküle 48 saat boyunca maruz kalmış bakterilerinin gram boyama görüntüsü kıyaslandığında nanopartiküle maruz kalmış bakterilerinin şekillerinde deformasyonlar olduğu görülmektedir. Diğer gram pozitif özellikteki *Bacillus cereus* bakterisinin kontrol grubu ve 100 mg/l konsantrasyonunda 48 saat boyunca maruz kalmış grubu kıyaslandığında ; kontrol grubunda gram pozitif çubuk bakteriler nanopartiküle maruz kaldıktan sonra hücre uzunluk boyutunun arttığı görülmektedir.



Şekil 4.131 *Escherichia coli* ve *Bacillus cereus* bakterisinin gram boyama sonucu görüntüleri (A: Kontrol grubundaki *E.coli* bakterisinin gram boyama sonucu ; B: nano-SiO₂ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan *E.coli* bakterisinin gram boyama sonucu ; C: Kontrol grubundaki *B.cereus* bakterisinin gram boyama sonucu ; D: nano-SiO₂ nanopartikülüne 48 saat maruz kalan *B.cereus* bakterisinin gram boyama sonucu)

Jiang ve ark., (2009) nano-SiO₂'in *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* üzerine toksik etkisini araştırmışlar. 2 saat boyunca nano-SiO₂'e maruz kalan bakteri kültürlerinde ; *B.subtilis* için % 40 ; *E.coli* için % 58 oranında ölüm oranı gözlenmiştir. Jiang ve ark. (2009)'nın yaptıkları çalışmada *E.coli*'nin nano-SiO₂'ye daha hassas olduğunu rapor etmişler ve bu sonuç tez çalışmasında saptanan değerlere paralel bir sonucu kanıtlamaktadır. *E.coli* için 24 saat sonucu EC₅₀ değeri 27,2 mg/l ; 48 saat için EC₅₀ değeri 16,7 mg/l iken *B.cereus* için EC₅₀ değerleri daha yüksek ; 24 saat için EC₅₀ değeri 39,9 mg/l, 48 saat için EC₅₀ değeri 20,9 mg/l olarak tespit edilmiştir. *E.coli* için düşük EC₅₀ değeri düşük konsantrasyonlarda bile nano-SiO₂'in *E.coli* kolonileri toksik etkisini bize göstermektedir. Nanopartiküllerin metal iyonu salınımı yaparak (Zn²⁺) toksik etki gösterdiğini daha önce bahsetmiştik. Ancak nano-SiO₂'in herhangi bir iyon salınımı yaptığı tespit edilmemiş olup, olası toksisite mekanizması olarak nanopartikülün boyutundan kaynaklanan bir toksisite yarattığı ya da bakteri hücresinin etrafında agregasyon meydana getirip hücre duvar yapısında deformasyonlar yarattığı düşünülmektedir (Jiang ve ark., 2009).

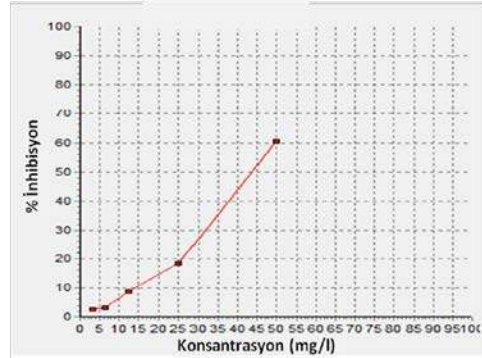
4.6.2 Bakteri (*Vibrio fischeri*) Biyoluminesans Değerine Göre Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano-SiO₂'in artan konsantrasyonlarına karşı biyoluminesans bakterisi olan *Vibrio fischeri* 'nin luminesans değeri ölçülmüştür. *Vibrio fischeri* bakterisinin nano-SiO₂'e maruz kaldığı süre arttıkça, luminesans değerinin azaldığı ve toksisitenin arttığı görülmektedir. Mikrotox deneyi nano-SiO₂'in 100 mg/l stok çözeltisi hazırlanmış, % 3'lük NaCl ile seyreltmeler yapılmış Lumistox 300 (Hach Lange) ile bakterinin luminesans değeri ölçülmüştür. Yapılan seyreltmelerin en düşüğü 3,125 mg/l'de ölçülen inhibisyon % 2,659 ; 6,25 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda % 3,40 ; 12,5 mg/l 'de % 8,92 ; 25 mg/l'de % 18,52 ; 50 mg/l'de % 60,57 ; 100 mg/l nano-Ta₂O₅ dozunda % 73,64 inhibisyon gerçekleşmiştir (Tablo 4.62).

Tablo 4.63 30 dakika sonucu nano-SiO₂ nanopartikülünün artan konsantrasyonlarına karşı *Vibrio fischeri* – biyoluminesans bakterisinin % inhibisyon değerleri

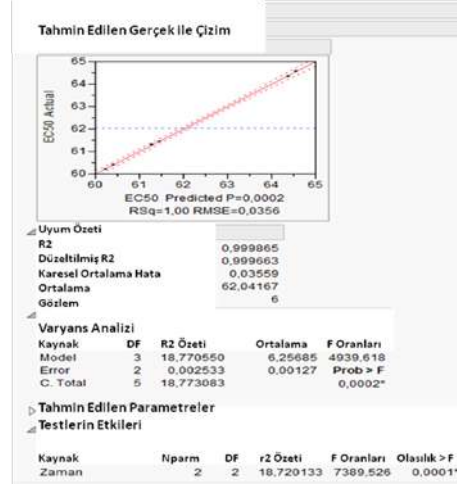
nano-SiO ₂ Konsantrasyonları (mg/l)	% İnhibisyon
3,125 mg/l	2,659
6,25 mg/l	3,40
12,5 mg/l	8,92
25 mg/l	18,52
50 mg/l	60,57
100 mg/l	73,64

Şekil 4.132’da Mikrotox deneyinin sonucunda Lumistox 300 cihazından alınan grafik yer almaktadır. Grafikte artan nano-SiO₂ konsantrasyonlara (3,125 mg/l ; 6,25 mg/l ; 12,5 mg/l ; 25 mg/l ; 50 mg/l ; 100 mg/l) karşı *V.fischeri* bakterisinin % inhibisyon değerleri yer almaktadır. Nano-SiO₂ nanopartikülünün *Vibrio fischeri* bakterisinin % 50’sine etki eden dozu (EC₅₀ Değeri) 30 dakika sonucunda 60,4 mg/l olarak hesaplanmıştır. *Vibrio fischeri* biyoluminesans bakterisi nano-SiO₂’e 5 dakika maruz kaldığındaki EC₅₀ değeri 64,58 mg/l ; 15 dakika maruz kaldığındaki EC₅₀ değeri 61,42 mg/l’ye düşmüştür. Bakterinin nanopartiküle maruz kalma süresi arttıkça EC₅₀ değerinde bir azalma gözlenmiş ve bakterinin naopartiküle olan hassasiyeti artmıştır.



Şekil 4.132 nano-SiO₂’in artan konsantrasyonlarına karşı % inhibisyon değerleri (EC₅₀ değeri=60,4 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-SiO₂ konsantrasyonları ile *Vibrio fischeri* bakterisinin 5. ; 15. ve 30. dakikadalarındaki EC₅₀ değerlerinin arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,999). Test sonucu Şekil 4.133’te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0001 < 0,05) değişkeninin EC₅₀ değerleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0002 < 0,05).



Şekil 4.133 *Vibrio fischeri* bakterisinin ANOVA testi sonuçları

Nano-SiO₂ ile bakteri biyoluminesansına dayalı yapılan toksisite çalışmalarına örnek olarak ; Binaeian ve ark., (2013)'nın nano-ZnO ve nano-SiO₂ ile çalışmaları verilebilir. *Vibrio fischeri* bakterisine 30 dakika maruz bıraktıktan sonra ölçtükleri luminesans değerlerine göre nano-ZnO nano-SiO₂'e göre daha yüksek toksisite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Nano-SiO₂ için tespit ettikleri EC₂₀ değeri 26,98 mg/l'dir. Teorik olarak EC₅₀'e göre hesapladığımızda bu değer yaklaşık 67,5 mg/l'ye denk geliyor ve bu tez çalışmasında 30 dakika sonucu tespit edilen EC₅₀ değerine (60,4 mg/l) yakın bir sonuç olduğu görülmektedir. Nano-SiO₂ ile microthox testine dayalı literatür çalışmaları kısıtlı olup bu tez çalışmasında bulunan EC₅₀ değeri Binaeian ve ark. (2009) buldukları sonucu desteklemektedir.

4.6.3 Anaerobik Bakteri Kullanılarak Metan Gazı Ölçümlerine Dayalı Toksisite Testi (ATA-Anaerobik Toksisite Testi) Sonuçları

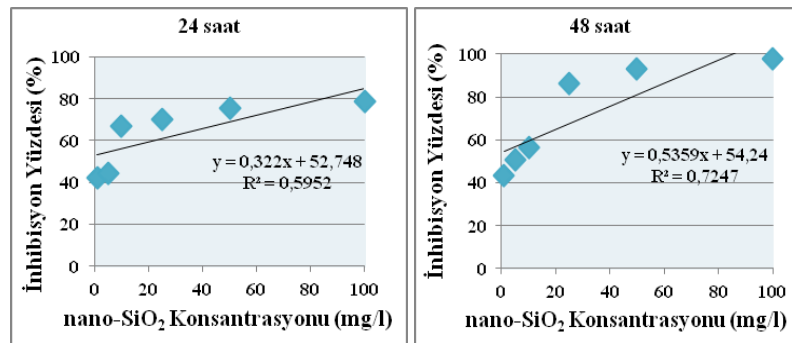
Nano-SiO₂ nanopartikülünün artan konsantrasyonlarının, anaerobik bakterilere toksik etki yapıp yapmadığı ATA-anaerobik toksisite testi ile incelenmiştir. 125 ml'lik streil kapaklı şişelerde artan nanopartikül konsantrasyonlarında metan gazı ölçümleri yapılmıştır. Kontrol grubunda sadece substrat olarak glukoz bulunurken, diğer şişelerde 1 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 mg/l nano-SiO₂ nanopartikülü konularak inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonucunda kontrol grubunda oluşan CH₄ gazı miktarı 19,4 ml iken , 1 mg/l nano-SiO₂ dozunda 11,2 ml ; 5 mg/l nano-SiO₂ dozunda 10,8 ml ; 10 mg/l nano-SiO₂ dozunda 6,4 ml ; 25 mg/l nano-SiO₂ dozunda 5,8 ml ; 50

mg/l konsantrasyonunda 4,8 ml ve 100 mg/l nano-SiO₂ dozunda metan gazı miktarı 4,1 ml'ye düşmüştür (Tablo 4.64). 48 saat sonucunda kontrol grubunda 23,6 ml CH₄ gazı oluşurken 1 mg/l ; 5 mg/l ; 10 mg/l ; 25 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l nano-SiO₂ dozunda sırasıyla metan gazı miktarları 13,4 ml ; 11,6 ml; 10,3 ml ; 3,2 ml ; 1,6 ml ; 0,5 ml'ye düşmüştür (Tablo 4.64).

Tablo 4.64 Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu metan gazı miktarı ve inhibisyon yüzdesi

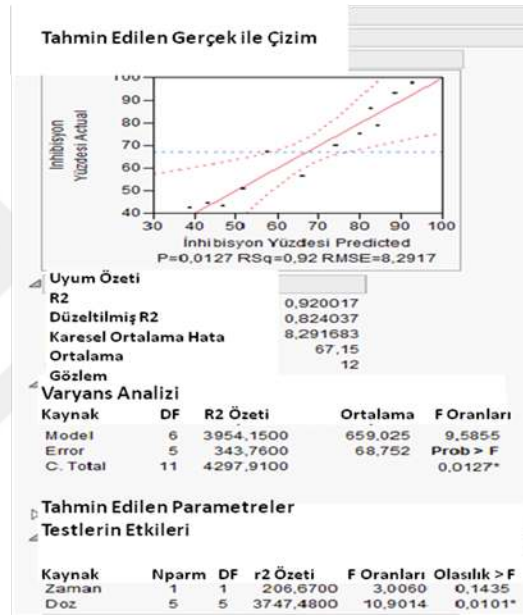
nano-SiO ₂	24 saat sonucu		48 saat sonucu	
	Metan Gazı Miktarı (ml)	İnhibisyon Yüzdesi (%)	Metan Gazı Miktarı (ml)	İnhibisyon Yüzdesi (%)
Kontrol	19,4	0	23,6	0
1 mg / l	11,2	42,3	13,4	43,2
5 mg / l	10,8	44,3	11,6	50,8
10 mg / l	6,4	67,1	10,3	56,4
25 mg / l	5,8	70,1	3,2	86,4
50 mg / l	4,8	75,3	1,6	93,2
100 mg / l	4,1	78,9	0,5	97,8

Şekil 4.134'te artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri yer almaktadır. Şekil 64'den hesaplanabilen metan bakterilerinin % 80'ini inhibe eden EC₈₀ değeri 24 saat için 84,6 mg/l ; 48 saat için 48,1 mg/l'dir. 24 saat sonucunda 1 mg/l'den 100 mg/l'ye çıkan nanopartikül konsantrasyonu anaerobik bakterilerin metan üretimini etkilemiş, inhibisyon oranı % 42,2'den % 78,9'a çıkmıştır (Tablo 4.134). 48 saat sonucunda ise bu inhibisyon artmış ve 1 mg/l için % 43,2 ; 10 mg/l için % 56,4 ; 50 mg/l için 93,2 ve 100 mg/l için % 97,8'e yükselmiştir (Tablo 4.134).



Şekil 4.134 Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı metan gazının yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₈₀ değeri= 84,6 mg/l; 48 saat sonucu EC₈₀ değeri= 48,1 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-SiO₂ konsantrasyonları ile anaerobik metan Archae bakterilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,920). Test sonucu Şekil 4.135'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,1435 > 0,05) değişkeninin etkili olmadığı ; konsantrasyon (P=0,0101 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0127 < 0,05).



Şekil 4.135 Anaerobik metan Archae bakterilerinin ANOVA testi sonuçları

Nano-SiO₂ nanopartikülünün metan Archae bakterileri üzerine toksisite çalışmaları literatürde bulunmamaktadır.

4.6.4 Maya (*Candida albicans*) - Küf (*Aspergillus niger*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

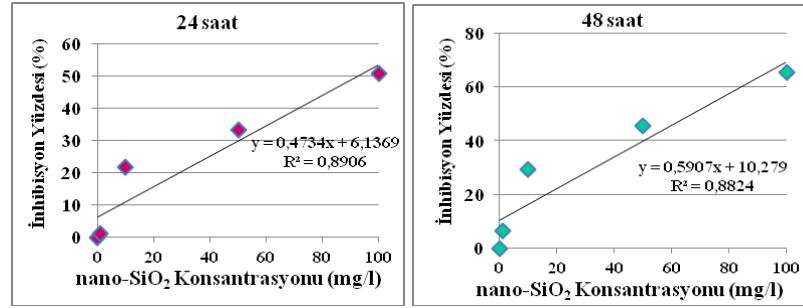
Nano-SiO₂ nanopartikülünün akut toksisitesi maya (*Candida albicans*) ve küf (*Aspergillus niger*) olmak üzerine iki farklı organizma üzerinde çalışılmıştır. Tablo 4.65'te artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı canlı maya kolonilerinin sayısı bulunmaktadır. 24 saat sonucunda kontrol grubundaki *C.albicans* kolonileri 346000 ; 345000 ; 344000 adet koloni/ml iken nano-SiO₂'e maruz kalan *C.albicans*

kolonilerinde azalma gözlenmiştir (Tablo 4.65). 1 mg/l konsantrasyonunda canlı maya kolonilerinin sayısı 342000 ; 340000 ; 341000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l konsantrasyonunda 270000 ; 271000 ; 269000 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l konsantrasyonunda 230000 ; 231000 ; 229000 adet koloni/ml'ye ve 100 mg/l konsantrasyonunda 170000 ; 171000 ; 169000 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.65). 48 saat sonucunda kontrol grubunda üreyen canlı *C.albicans* kolonilerinin sayısı 353000 ; 352000 ; 351000 adet koloni/ml iken, artan nano-SiO₂ konsantrasyonları maruz kalma süresi artıkça *C.albicans* kolonilerine inhibisyonu artmıştır. 1 mg/l konsantrasyonunda bu sayı 330000 ; 331000 ; 329000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l konsantrasyonunda 250000 ; 251000 ; 249000 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l konsantrasyonunda 191000 ; 192000 ; 193000 adet koloni/ml'ye ve 100 mg/l konsantrasyonunda 123000 ; 122000 ; 124000 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.65).

Tablo 4.65 Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Candida albicans* maya kolonilerinin sayıları

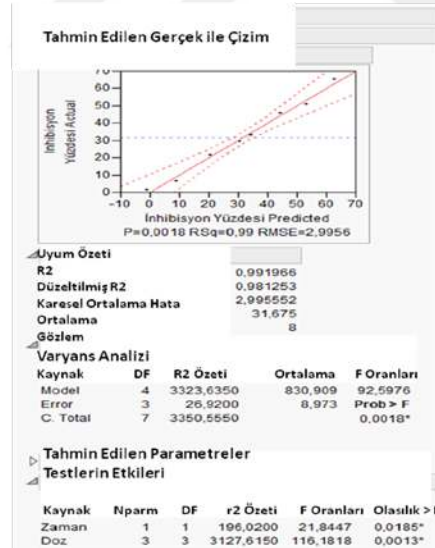
nano-SiO ₂	CANLI <i>C.albicans</i> MAYA KOLONİSİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	346000	345000	344000	345000	353000	352000	354000	353000
1 mg / l	342000	341000	340000	341000	330000	331000	329000	330000
10 mg / l	271000	270000	269000	270000	250000	251000	249000	250000
50 mg / l	230000	231000	229000	230000	192000	191000	193000	192000
100 mg / l	170000	171000	169000	170000	123000	122000	124000	123000

Şekil 4.136'da *Candida albicans* maya kolonilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki nano-SiO₂'e olan inhibisyon yüzdeleri verilmektedir. 24 saat sonucunda 1 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonunda inhibisyon % 1,2 iken 48 saat sonunda inhibisyon yüzdesi 6,5'a çıkmaktadır. 10 mg/l , 50 mg/l ve 100 mg/l nano-SiO₂ dozunda 24 saat sonucunda inhibisyon yüzdesi sırasıyla 21,7 ; 33,3 ; 50,7 iken 48 saat sonunda sırasıyla % 29,2 ; % 45,6 ; % 65,2'e çıkmaktadır (Şekil 4.136). 24 saat sonunda *C.albicans* kolonilerinin % 50'sini inhibe eden EC₅₀ değeri 92,7 mg/l ; 48 saat sonunda EC₅₀ değeri ise 67,2 mg/l'dir (Şekil 4.136). Maruz kalma süresi artıkça nanopartikülün maya kolonilerini etkilediği doz azalmış ; daha az dozlarda daha çok maya hücrelerini inhibe etmiştir.



Şekil 4.136 Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı *Candida albicans* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 92,7 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 67,2 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-SiO₂ konsantrasyonları ile *C.albicans*'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,991). Test sonucu Şekil 4.137'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0,0185 < 0,05) ve konsantrasyon (P=0,0013 < 0,05) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0018 < 0,05).



Şekil 4.137 *C.albicans*'in ANOVA testi sonuçları

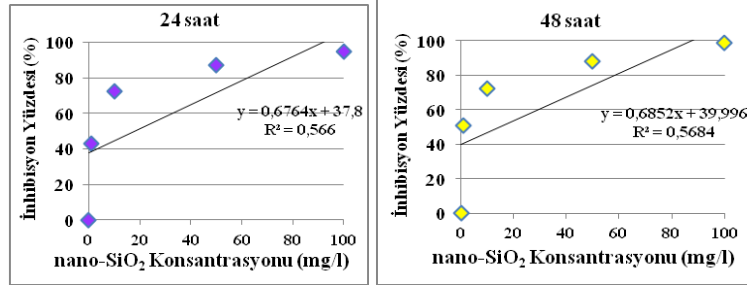
Akut toksisitesi çalışılan diğer mikroorganizma ise küf (*Aspergillus niger*) 'tür. Tablo 4.66'da artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Aspergillus niger* küf kolonilerinin sayıları verilmektedir. Kontrol grubunda 24 saat sonucunda 95000 ; 96000 ; 94000 adet koloni/ml üreyen küf kolonileri, nano-SiO₂ ile

24 saat boyunca karşı karşıya kaldığında koloni sayıları azalmıştır (Tablo 4.66). 1 mg/l dozunda 54000 ; 53000 ; 52000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l dozunda 26000 ; 25000 ; 27000 adet koloni/ml'ye 50 mg/l dozunda 12000 ; 13000 ; 11000 adet koloni/ml'ye düşmüştür. 48 saat sonucunda kontrol grubunda üreyen küf kolonilerinin sayısı 112000 ; 110000 ; 114000 adet koloni/ml iken 24 saat sonucundaki üreyen küf kolonilerine kıyasla canlı küf kolonilerinde azalma gözlenmiştir (Tablo 4.66). 1 mg/l dozunda 56000 ; 55000 ; 54000 adet koloni/ml'ye ; 10 mg/l dozunda 31000 ; 32000 ; 30000 adet koloni/ml'ye ; 50 mg/l dozunda 12000 ; 13000 ; 14000 adet koloni/ml'ye ve 100 mg/l dozunda ise canlı küf kolonilerinin sayısı 900 ; 1000 ; 1100 adet koloni/ml'ye düşmüştür (Tablo 4.66).

Tablo 4.66 Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Aspergillus niger* küf kolonilerinin sayıları

nano-SiO ₂	CANLI <i>A.niger</i> KÜF KOLONİSİ SAYILARI (adet koloni /1 ml)							
	24 saat sonucu				48 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER	1. Seri	2. Seri	3. Seri	ORTALAMA DEĞER
Kontrol	95000	94000	96000	95000	112000	110000	114000	112000
1 mg /l	54000	53000	55000	54000	56000	55000	54000	55000
10 mg /l	26000	25000	27000	26000	31000	30000	32000	31000
50 mg /l	12000	13000	11000	12000	13000	12000	14000	13000
100 mg /l	5000	6000	4000	5000	900	1000	2000	1300

Şekil 4.138'de *Aspergillus niger* küf kolonilerinin 24 ve 48 saat sonucundaki nano-SiO₂'e olan inhibisyon yüzdelerinin grafikleri verilmektedir. 24 saat sonunda artan nanopartikül dozlarına karşın *A.niger*'in hassasiyeti artmış ve inhibisyon gözlenmiştir. 1 mg/l ; 10 mg/l ; 50 mg/l ve 100 mg/l dozlarındaki *A.niger*'in inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 43,2 ; % 72,6 ; % 87,4 ; % 94,7'dir (Şekil 4.138). 48 saat sonunda *A.niger*'in nano-SiO₂'e karşı inhibisyon yüzdeleri % 50,8 ; % 72,3 ; % 88,4 ; % 98,4'dür (Şekil 4.138). 24 saat sonunda *A.niger* kolonilerinin % 50'sini inhibe eden EC₅₀ değeri 18,03 mg/l ; 48 saat sonunda EC₅₀ değeri ise 14,6 mg/l'dir (Şekil 4.138). Maruz kalma süresi arttıkça nanopartikülün küf kolonilerini etkilediği doz azalmış ; daha az dozlarda daha çok küf hücrelerini inhibe etmiştir.



Şekil 4.138 Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı *Aspergillus niger* bakterisinin 24 ve 48 saat sonucu inhibisyon yüzdeleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 18,03 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri= 14,6 mg/l)

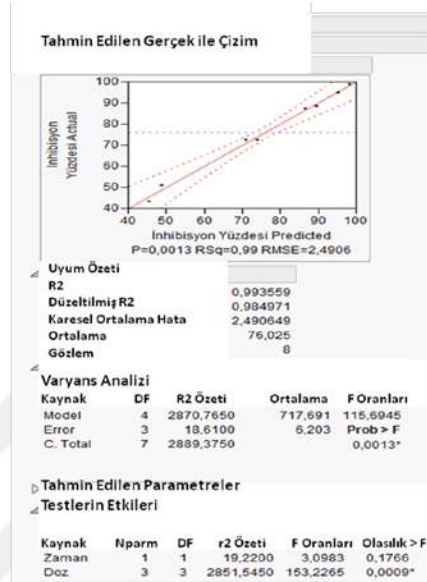
Şekil 4.139(a)'da artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı *C.albicans* maya hücrelerinin potato dextrose agardaki koloni morfolojileri gösterilmektedir. Kontrol grubundaki maya kolonilerine kıyasla artan nano-SiO₂ dozları *C.albicans* üzerine toksik etki göstermiş ve canlı *C.albicans* sayıları azalmıştır. Şekil 4.139(b)'da ise artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı *A.niger* küf koloninin potato dextrose agardaki koloni morfolojileri gösterilmektedir. Kontrol grubundaki küf koloniler ile 1 mg/l ve 10 mg/l dozuna maruz kalmış *A.niger* küf kültüründeki kolonileri kıyasladığımızda inhibisyon daha az olduğunu, ancak nano-SiO₂ dozu arttıkça bu inhibisyonun arttığı görülmektedir.



Şekil 4.139 (a): Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı *Candida albicans* maya hücrelerinin sayılarının değişimi ; (b): artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı *Aspergillus niger* küf hücrelerinin sayılarının değişimi

Yapılan ANOVA testinde artan nano-SiO₂ konsantrasyonları ile *A.niger*'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,993). Test sonucu Şekil 4.140'da yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$

önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,1766 > 0,05$) değişkeninin etkili olmadığı ; konsantrasyon ($P=0,0009 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0013 < 0,05$).



Şekil 4.140 *A.niger*'in ANOVA testi sonuçları

Garcia-Saucedo ve ark., (2011)'nin maya - *Saccharomyces cerevisiae* ile yaptıkları çalışmada nano-HfO₂, nano-SiO₂ ve nano-Al₂O₃'in maya hücrelerinin oksijen tüketimine bağlı yaptıkları toksisite çalışmalarında 1000 mg/l'ye kadar herhangi bir toksik etki göstermediğini saptamıştır. Bu tez çalışmasında maya olarak *Candida albicans* ile çalışılmış ve nano-SiO₂'in bu canlıya çok yüksek toksisite göstermediği düşük EC₅₀ (24 saat sonucunda EC₅₀ değeri: 92,7 mg/l) değeri ile anlaşılmaktadır. Nano-SiO₂'in küf üzerine toksisite çalışmaları üzerine herhangi bir literatür saptanmamıştır.

4.6.5 Alg (*Chlorella sp.*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

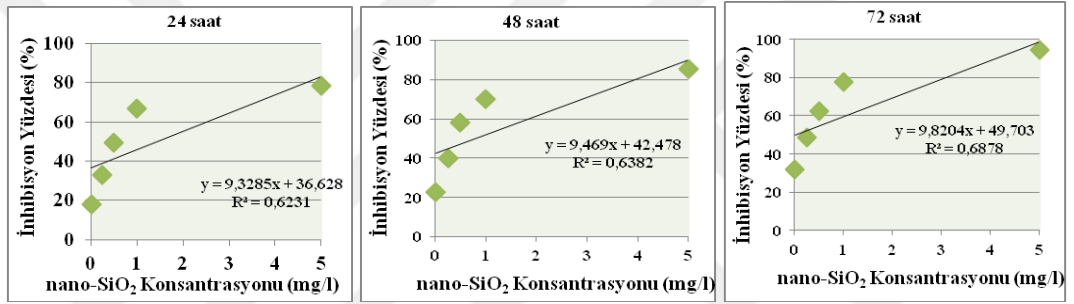
Nano-SiO₂ nanopartikülünün alg üzerine inhibisyonu *Chlorella sp.* türü ile çalışılmıştır. Yapılan toksisite çalışmasında artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına (0,01 mg/l ; 0,25 mg/l ; 0,5 mg/l ; 1 mg/l ; 5 mg/l) karşı alg hücrelerinin 24 ; 48 ve 72 saat boyunca büyümelerine olan inhibisyon araştırılmıştır. Tablo 4.676'de artan

nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı 24, 48 ve 72 saat sonunda 10 µl'deki alg hücrelerinin sayısı verilmiştir. Her bir konsantrasyon ve bekleme süresi 3 seri şeklinde çalışılmıştır. T=0'daki alg hücresi sayısı 54 adet alg/10 µl iken 24 saat inkübasyon periyodundan sonra kontrol grubundaki alg sayıları 150 ; 151 ; 149 adet alg / 10 µl iken 0,01 mg/l nano-SiO₂ maruz kalmış alg hücrelerinin sayısı 121 ; 120 ; 132 adet alg/ 10 µl ; 0,25 mg/l nano-SiO₂'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 106 ; 101 ; 102 adet alg/ 10 µl ; 0,5 mg/l nano-SiO₂'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 70 ; 79 ; 85 adet alg/ 10 µl ; 1 mg/l nano-SiO₂'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 55 ; 53 ; 45 adet alg/ 10 µl ; maksimum doz 5 mg/l nano-SiO₂'e maruz kalmış alg hücreleri sayısı 36 ; 33 ; 30 adet alg/ 10 µl'e düşmüştür (Tablo 4.67). 48 saat sonunda kontrol grubundaki alg sayıları 164 ; 151 ; 156 adet alg/ 10 µl iken 0,01 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonunda alg sayısı 120 ; 123 ; 120 adet alg/ 10 µl ; 0,25 mg/l nano-SiO₂ dozunda 91 ; 93 ; 98 adet alg/ 10 µl ; 0,5 mg/l nano-SiO₂ dozunda alg sayısı 65 ; 66 ; 64 adet alg/ 10 µl ; 1 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonunda alg sayısı 47 ; 43 ; 51 adet alg/ 10 µl ve 5 mg/l nano-SiO₂ dozundaki alg sayıları 25 ; 19 ; 25 adet alg/ 10 µl'ye düşmüştür (Tablo 4.67). 72 saat sonunda kontrol grubundaki alg sayıları 171 ; 166 ; 164 adet alg/ 10 µl iken 0,01 mg/l konsantrasyonunda alg sayıları 119 ; 116 ; 110 adet alg/ 10 µl'ye ; 0,25 mg/l nano-SiO₂ dozunda 84 ; 81 ; 93 adet alg/ 10 µl'ye ; 0,5 mg/l' de 65 ; 61 ; 63 adet alg/10 µl'ye ; 1 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonunda 39 ; 37 ; 35 adet alg/ 10 µl'ye ve 5 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonunda 12 ; 9 ; 6 adet alg/ 10 µl'ye düşmüştür (Tablo 4.67).

Tablo 4.67 Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Chlorella sp* - alg hücresi sayıları

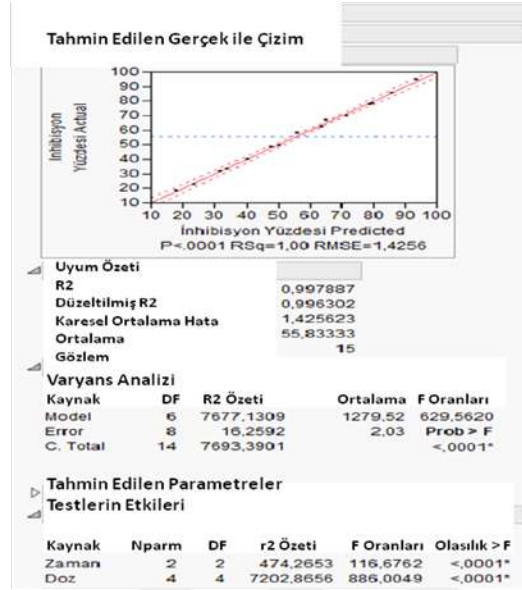
Nano-SiO ₂	ALG (<i>Chlorella sp.</i>) SAYILARI (adet Alg / 10 µl)											
	24 saat sonucu				48 saat sonucu				72 saat sonucu			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama
Kontrol	150	151	161	154	164	156	151	157	171	166	164	167
0,01 mg / l	121	125	132	126	120	123	120	121	119	116	110	115
0,25 mg / l	106	101	102	103	91	93	98	94	84	81	93	86
0,5 mg / l	70	79	85	78	65	66	67	66	65	61	63	63
1 mg / l	55	53	45	51	47	43	51	47	39	37	35	37
5 mg / l	36	33	30	33	25	25	19	23	12	9	6	9

Şekil 4.141’de artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı *Chlorella sp*’nin yüzde inhibisyon değerleri yer almaktadır. 24 saat sonucunda 0,01 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l ve 5 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonlarında inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 18,18 ; % 33,12 ; % 49,4 ; % 66,9 ; % 78,6’dır. 48 saat sonunda bu inhibisyon değerleri biraz daha artmış, sırasıyla % 22,9 ; % 40,1 ; % 57,9 ; % 70,1 ; % 85,4. 72 saat sonunda 0,01 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l ve 5 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonlarında inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 31,7 ; % 48,5 ; % 62,3 ; % 77,8 ; % 4,6’dır. Şekil 4.141’den hesaplanabilen alg hücrelerinin % 60’ını inhibe eden doz EC₆₀ değeri 24 saat için 2,5 mg/l, 48 saat için 1,9 mg/l ve % 72 saat için 1,04 mg/l nano-SiO₂ (Şekil 4.141).



Şekil 4.141 Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı *Chlorella sp*’nin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₆₀ değeri= 2,5 mg/l; 48 saat sonucu EC₆₀ değeri=1,9 mg/l ; 72 saat sonucu EC₆₀ değeri=1,04 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-SiO₂ konsantrasyonları ile *Chlorella sp.*’nin 24 ; 48 ve 72 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,997$). Test sonucu Şekil 4.142’de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0001 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0001 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0001 < 0,05$).



Şekil 4.142 *Chlorella sp.*'nin ANOVA testi sonuçları

Gambardella ve ark., (2014) nano-SiO₂'in mikroalg – *Cricosphaera elongata*'dan deniz kestanesine transferini araştırmışlar. Öncelikle nano-SiO₂ içeren alg kültürü 15 gün boyunca inkübe edilmiş daha sonra mikroalg ile beslenen deniz kestanesi larvalarına nano-SiO₂'in transfer olduğunu ve bu larvaların gelişimini etkileyen nano-SiO₂ hem mikroalg için hem de deniz kestanesi larvaları için toksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Van Hoecke ve ark., (2008) *Pseudokirchneriella subcapitata* ile yaptıkları toksisite çalışmalarında 72 saat sonucu EC₂₀ değerini 3,9 mg/l olarak rapor etmişlerdir. *Chlorella sp.* türü ile çalışılmış herhangi bir literatüre rastlanmamakla birlikte ; bu tez çalışmasında tespit edilen 24, 48 ve 72 saat sonucu düşük EC₅₀ değerleri nano-SiO₂'in alg – *Chlorella sp.* üzerine toksik etki gösterdiğini kanıtlamaktadır. Bir çok yerde yaygın olarak kullanılan nanopartiküller besin zincirine girip, sucul organizmaların bünyesinde birikip gelişimlerini etkileyebilir.

4.6.6 Su Piresi (*Daphnia magna*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Sucul besin ağının önemli bir parçası olan *Daphnia magna* ile yapılan akut toksisite testi nano-SiO₂ nanopartikülünün artan dozlarının *Daphnia magna* üzerine inhibisyonuna dayanmaktadır. Deney ortamında nano-SiO₂'in değişen konsantrasyonları 100 ml olarak hazırlanıp, her bir konsantrasyon için 10 adet

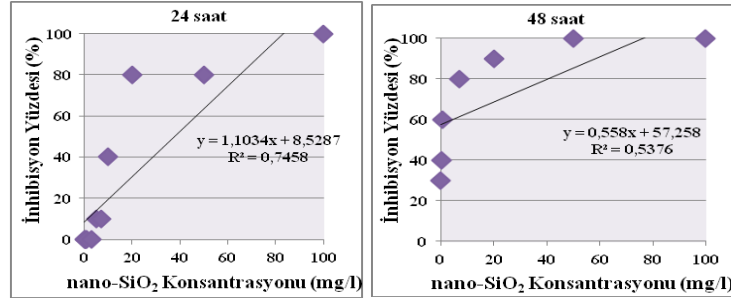
D.magna konulmuştur, ayrıca kontrol grubu olarak *D.magna*'nın mineral ortamını içeren 100 ml'lik ortama 10 adet *D.magna* konularak 24 ve 48 saat için ölüm olup olmadığı izlenmiştir. Tablo 4.68'de artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat sonucunda canlı ve ölen *D.magna* sayıları yer almaktadır. 24 saat sonucunda 0,01 ; 0,05 ; 0,5 ; 0,7 ; 1 ve 3 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonları *D.magna* üzerinde toksik etki göstermemiş, ölüm gerçekleştirmemiştir. 100 mg/l nano-SiO₂ dozunda maksimum inhibisyon gözlenmiş, 10 adet *D.magna* ölmüştür (Tablo 4.68). 48 saat sonucunda minimum konsantrasyonlarda bile *D.magna* üzerine inhibisyon gerçekleşmiş ; 0,01 mg/l nano-SiO₂ dozunda 3 adet *D.magna* ölmüştür. Nano-SiO₂ artan konsantrasyonları *D.magna* üzerinde toksik etki göstermiş, doz arttıkça ölüm sayıları artmış, maksimum konsantrasyonda 50 ve 100 mg/l 'de tüm *D.magna*'lar inhibisyona uğramıştır (Tablo 4.68).

Tablo 4.68 Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu *Daphnia magna* - su piresi sayıları

nano-SiO ₂ konsantrasyonu (mg/l)	24 saat sonucu		nano-SiO ₂ konsantrasyonu (mg/l)	48 saat sonucu	
	Canlı <i>Daphnia</i> sayısı	Ölen <i>Daphnia</i> sayısı		Canlı <i>Daphnia</i> sayısı	Ölen <i>Daphnia</i> sayısı
0,01	10	0	0,01	7	3
0,05	10	0	0,05	6	4
0,5	10	0	0,5	4	6
0,7	10	0	0,7	4	6
1	10	0	1	3	7
3	10	0	3	3	7
5	9	1	5	3	7
7	9	1	7	2	8
10	6	4	10	2	8
20	2	8	20	1	9
50	2	8	50	0	10
100	0	10	100	0	10

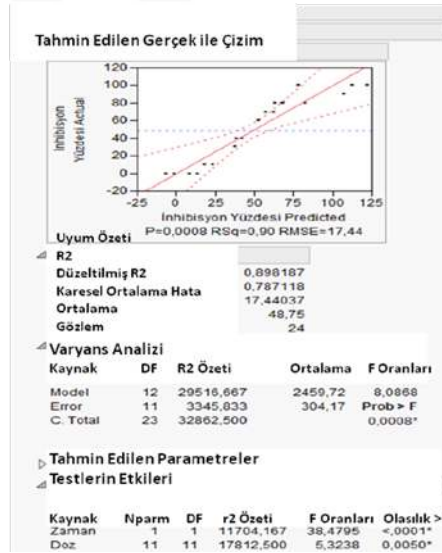
Şekil 4.143'de artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı *D.magna*'ların yüzde inhibisyonun grafiği bulunmaktadır. 24 saat sonucunda 0,01 ; 0,05 ; 0,5 ; 0,7 ; 1 ve 3 mg/l nano-SiO₂ dozları *D.magna*'yı inhibe etmezken ; 5 ve 7 mg/l'de % 10 inhibisyon ; 20 ve 80 mg/l'de % 80 inhibisyon ; 100 mg/l'de % 100 inhibisyon gerçekleştirmiştir (Şekil 4.143). 48 saat sonucunda 0,01 mg/l nano-SiO₂ dozunda % 30 inhibisyon gerçekleşirken ; 1 ; 3 ; 5 mg/l nano-SiO₂ dozunda % 70 inhibisyon gerçekleşmiş ; 50 ve 100 mg/l nano-SiO₂ dozunda ise % 100 gerçekleşmiştir (Tablo 4.143). Şekil 68.'den hesaplanabilen *D.magna*'nın % 50'sini etkilen doz – EC₅₀

değeri: 24 saat için 36,7 mg/l; % 80'ini etkilen doz – EC₈₀ değeri 48 saat için 40,76 mg/l' dir.



Şekil 4.143 Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı *Daphnia magna*'ların yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 36,7 mg/l; 48 saat sonucu EC₈₀ değeri=40,76 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-SiO₂ konsantrasyonları ile *Daphnia magna*'nın 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır ($R=0,898$). Test sonucu Şekil 4.144'te yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman ($P=0,0001 < 0,05$) ve konsantrasyon ($P=0,0050 < 0,05$) değişkenlerinin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0008 < 0,05$).



Şekil 4.144 *Daphnia magna*'nın ANOVA testi sonuçları

Bing ve ark., (2009) tarafından yapılan toksisite çalışmasında nano-SiO₂'in 24 saat sonucu EC₅₀ değerini 148,871 mg/l olarak rapor etmişlerdir. Bu sonuç tez çalışmaları sonucu tespit edilen 24 saat sonucu EC₅₀ değeri 36,7 mg/l'den epey yüksek bir

konsantrasyondur. Nanopartikül çözeltisini hazırlarken kullanılan kimyasallar, nanopartikülün boyutu, ortamın pH'sı gibi bir çok etken farklı sonuçlar elde edilmesine neden olmuş olabilir. Nano-SiO₂'in *D.magna* üzerine toksik etkisi ile ilgili çok çalışma bulunmamaktadır ancak bir çok araştırmacı süzerek beslenen bu canlılarda nanopartikülün midesinde akümüle olduğunu ve besin zincirinde yüksek seviyelere kadar transfer olabileceğini öngörmektedirler.

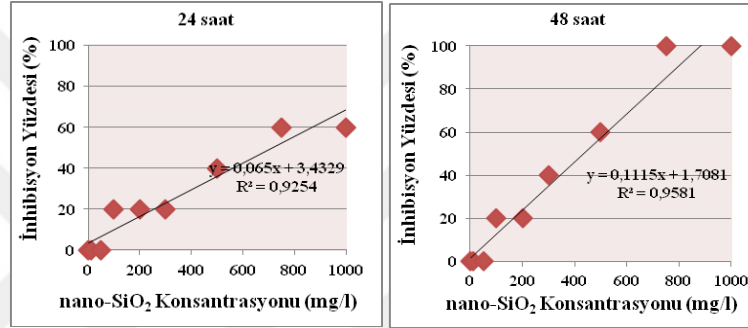
4.6.7 Balık (*lepistes - Poecillia reticula*) Akut Toksisite Testi Sonuçları

Nano-SiO₂ nanopartikülünün artan konstrasyonlarının balık üzerine inhibisyonu incelenmiştir. Balık olarak kullanılan lepistes - *Poecillia reticula*'nin 24 ve 48 saat sonucu kontrole kıyasla canlı ve ölü sayıları Tablo 4.69'da yer almaktadır. Diğer yapılan akut toksisite testlerinden farklı olarak balık akut toksisite deneyinde daha yüksek konsantrasyonlar çalışılmıştır. 1 ; 10 ve 50 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonuna kadar kontrol grubuna kıyasla balık ölümleri 24 saat sonucunda gözlenmemiş, 100 ; 200 ; 300 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonunda 1 balık ölümü gözlenmiş ; 750 ve 1000 mg/l dozunda 2 adet balık ölümü gözlenmiştir (Tablo 4.69). 48 saat sonunda toksisite 100 mg/l nano-SiO₂ dozunda başlamıştır ; 100 ve 200 mg/l nano-SiO₂ dozunda kontrol grubuna kıyasla 1 balık ölümü gerçekleşmiş, maksimum 50 ve 1000 mg/l'de kontrol grubuna kıyasla tüm balıklar ölmüştür (Tablo 4.69).

Tablo 4.69 Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı 24 ve 48 saat sonucu lepistes - *Poecillia reticula* sayıları

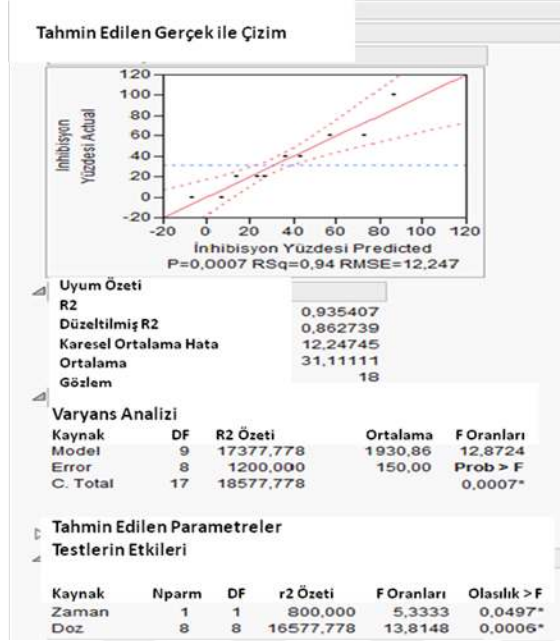
nano-SiO ₂ konsantrasyonu (mg/l)	Kontroldeki Balık Sayısı	24 saat sonucu		48 saat sonucu	
		Canlı Balık Sayısı	Ölü balık sayısı	Canlı Balık Sayısı	Ölü balık sayısı
1	5	5	0	5	0
10	5	5	0	5	0
50	5	5	0	5	0
100	5	4	1	4	1
200	5	4	1	4	1
300	5	4	1	3	2
500	5	3	2	2	3
750	5	2	3	0	5
1000	5	2	3	0	5

Şekil 4.145 artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı lepistes - *Poecillia reticula*'lerin yüzde inhibisyonun grafiği yer almaktadır. 24 saat sonucunda 1 mg/l ile 50 mg/l arasındaki nano-SiO₂'in lepistes - *Poecillia reticula*'e karşı toksisitenin gerçekleşmediği , 100 ; 200 ; 300 mg/l'de % 10 inhibisyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.145). 48 saat sonucunda 1 mg/l ve 50 mg/l nano-SiO₂ dozunda inhibisyon gerçekleşmemiş ; 300 mg/l'de % 20 inhibisyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.145). Nano-SiO₂ nanopartikülünün balıkların % 50'sine etki eden dozu (EC₅₀ Değeri) 24 saat sonucu EC₅₀ Değeri= 716,4 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ Değeri=433,1 mg/l Şekil 4.145'den hesaplanmıştır.



Şekil 4.145 Artan nano-SiO₂ konsantrasyonlarına karşı lepistes - *Poecillia reticula*'lerin yüzde inhibisyon değerleri (24 saat sonucu EC₅₀ değeri= 716,4 mg/l; 48 saat sonucu EC₅₀ değeri=433,1 mg/l)

Yapılan ANOVA testinde artan nano-SiO₂ konsantrasyonları ile lepistes – *Poecillia reticula* 'nin 24 ve 48 saat sonucundaki inhibisyon yüzdeleri arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,935). Test sonucu Şekil 4.146'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda zaman (P=0.0497 < 0.05) ve konsantrasyon (P=0,0006 < 0,05) değişkeninin inhibisyon yüzdeleri üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0007 < 0,05).



Şekil 4.146 Lepistes – *Poecillia reticula*'nın ANOVA testi sonuçları

Nano-SiO₂'in lepistes – *Poecillia reticula* üzerine akut toksisitesinin çalışıldığı bir literatür saptanmamıştır.

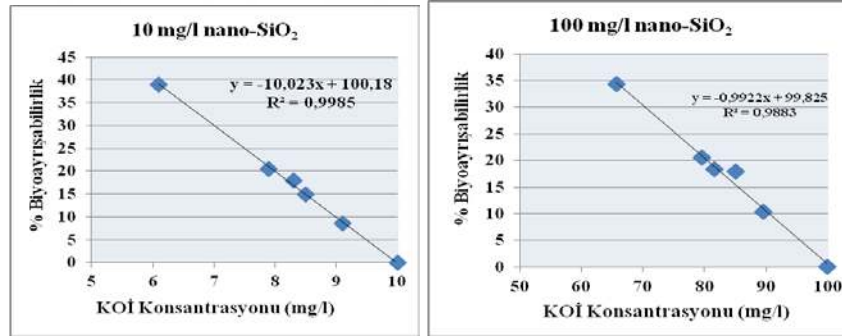
4.6.8 Biyoayrışabilirlik Testi Sonuçları

Nano-SiO₂ nanopartikülünün canlı mikroorganizmalar kullanılarak biyoayrışabilirliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır, ayrıca alıcı ortama deşarj edildiğinde canlı ekosistem tarafından tolere edilebilmesi için hangi seyreltmede verilmesinin daha uygun olup olmadığı araştırılmıştır. Nano-SiO₂'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında % giderimleri 28 günlük süre boyunca belli zaman aralıklarında ölçülen KOİ değerleri ile hesaplanmıştır (Tablo 4.70). Başlangıç KOİ değerleri 10 ve 100 mg/l iken 5 ; 10 ; 15 ; 20 ve 28. günlerde azalan KOİ değerleri ölçülmüştür. t=0. günde KOİ değeri 10 mg/l iken 5. günde ölçülen KOİ 9,1 mg/l'e ; 10. günde ölçülen KOİ 8,5 mg/l ; 15. günde ölçülen KOİ 8,3 mg/l ; 20. günde ölçülen KOİ 7,9 mg/l'ye 28. günün sonunda ölçülen KOİ ise 2,1 mg/l olarak ölçülmüştür (Tablo 4.70). t=0. günde KOİ değeri 100 mg/l iken ; 5. Günde 85,56 mg/l ; 10. günde 85,13 mg/l ; 15.günde 81,543 mg/l ; 20. günde 79,51 mg/l ; 28. günün sonunda ise 65,66 mg/l olarak ölçülmüştür (Tablo 4.70).

Tablo 4.70 28 gün boyunca nano-SiO₂'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonları için % biyoayrışabilirlik değerleri

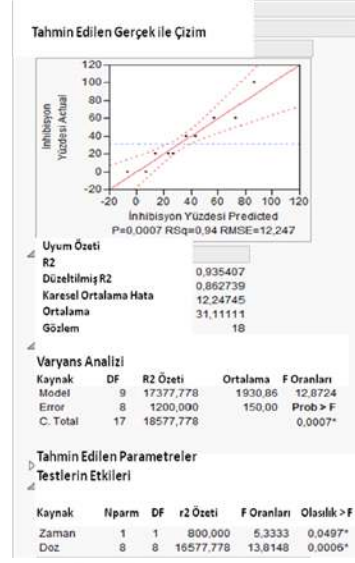
Günler	10 mg/l nano-SiO ₂		100 mg/l nano-SiO ₂	
	KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	% Giderim	KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	% Giderim
t=0	10	0	100	0
t=5	9,1	8,5	89,56	10,44
t=10	8,5	15	85,13	17,87
t=15	8,3	17,9	81,54	18,46
t=20	7,9	20,5	79,51	20,49
t=28	2,1	79	65,66	34,34

Şekil 4.147'de günlere karşı 10 mg/l ve 100 mg/l nano-SiO₂'in % biyoayrışabilirlik değerleri yer almaktadır. 10 ve 100 mg/l başlangıç KOİ miktarı ortama konulan aerobik çamur bakteri tarafından ayrıştırıldığı için zaman arttıkça azalma gözlenmiştir. 10 mg/l başlangıç KOİ ile başlatılan akvaryumda ; 5. günde % giderim % 8,5 iken ; 20. güne gelindiğinde % 20,5'e ; 28. günde % giderim % 79'a yükselmiştir. 100 mg/l başlangıç KOİ miktarı için 5. günde % giderim % 10,44 iken ; 10. günde % giderim % 17,87 ; 20. güne gelindiğinde % 20,49'a ; 28. günde % giderim % 34,34'e yükselmiştir (Tablo 4.70).



Şekil 4.147 10 ve 100 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonlarının 28 günlük % biyoayrışabilirlik değerleri

Yapılan ANOVA testinde artan nano-SiO₂ konsantrasyonları ile biyoayrışabilirlik testinin 10 ve 100 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonlarının günlere karşı % giderimi arasındaki ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (R=0,935). Test sonucu Şekil 4.148'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda konsantrasyon (P=0,0497 > 0,05) ve günler (P=0,0006 < 0,05) değişkeninin % giderim üzerinde etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0007 < 0,05).



Şekil 4.148 Biyoayrışabilirlik testi'nin ANOVA testi sonuçları

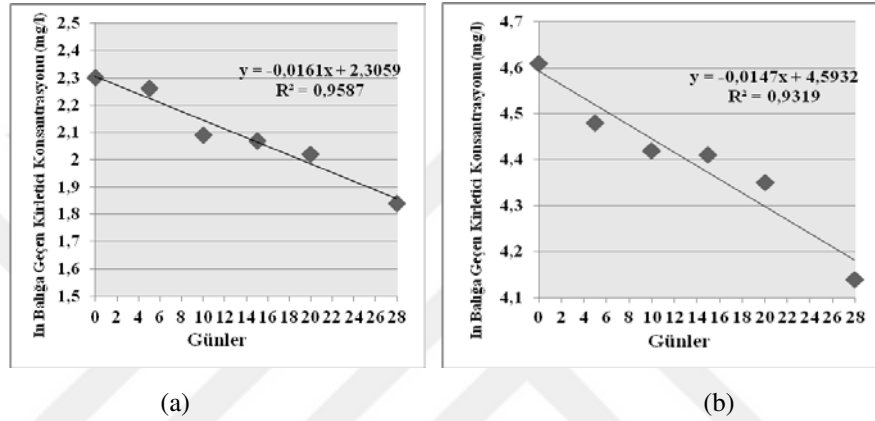
Nano-SiO₂'in biyoayrışabilirliğini çalışmış bir literatür saptanmamıştır.

4.6.9 Biyoakümülyasyon Testi Sonuçları

Nano-SiO₂ nanopartikülünün farklı konsantrasyonlarının canlı organizmadaki salınım ve birikimin saptanması amaçlanmıştır. Canlı organizma olarak lepidotes - *Poecillia reticula* kullanılmış, 28 gün boyunca 10 ve 100 mg/l konsantrasyonundaki nanopartikülün KOİ değerleri ölçülmüş ve 28 günlük periyodun sonunda balıklar temiz suya alınıp, balıktan suya geçen KOİ değerleri 28 gün boyunca hesaplanmıştır. Tablo 4.71'de 28 gün boyunca nano-SiO₂'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları yer almaktadır. Biyoakümülyasyon faktörü (BCF) 'nın hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanmıştır.

Tablo 4.71'de 10 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonunda 28 günlük periyotta sudan balığa geçen KOİ konsantrasyonları t=0. günde 10 mg/l iken 5. gün ; 10. gün ; 15. gün ; 20. gün ve 28. günde ölçülen KOİ değerleri sırasıyla 9,61 mg/l ; 8,16 mg/l ; 7,94 mg/l ; 7,54 mg/l ve 6,28 mg/l'dir. K₂ hesaplanmasında kullanılan C_{f1} (0. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması – lnKOİ=2,3 mg/l) ve C_{f2} (28. Günde sudan balığa geçen kirletici konsantrasyonun doğal logaritması –

InKOİ=1,84 mg/l) değerleri Tablo 4.71’de yer almaktadır. Hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanan k_2 değeri 0,0083 gün⁻¹ olarak hesaplanır. K_1 hesaplamasında yer alan C_f değeri Şekil 4.149(a)’da yer alan grafikte 14. güne gelen InKOİ 2,1 mg/l olarak bulunmaktadır ; C_w değeri ise balıktan suya geçen KOİ değerlerinin doğal logaritmalarından [$C_w = C_{w2} - C_{w1}$ (mg/l) / ($C_{w2} = 28$.gün] ($C_{w1} = 0$.gün)] 2,25 mg/l olarak hesaplandı. Hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanan k_1 değeri 0,15 gün⁻¹ olarak hesaplanır. BCF değeri ise 18,1’tür.



Şekil 4.149 (a): 10 mg/l nano-SiO₂ in günlere göre In(Sudan balığa geçen kirlenici konsantrasyonu) değerleri ($C_f=2,1$ mg/l) ; (b): 100 mg/l nano-SiO₂ in günlere göre In(Sudan balığa geçen kirlenici konsantrasyonu) değerleri ($C_f=4,4$ mg/l)

100 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonunda 28 günlük periyotta sudan balığa geçen KOİ konsantrasyonları t=0. günde 100 mg/l iken 5. gün ; 10. gün ; 15. gün ; 20. gün ve 28. günde ölçülen KOİ değerleri sırasıyla 85,54 mg/l ; 83,13 mg/l ; 81,52 mg/l ; 77,51 mg/l ve 62,55 mg/l’dir. K_2 hesaplanmasında kullanılan C_{f1} (0. Günde sudan balığa geçen kirlenici konsantrasyonun doğal logaritması – InKOİ=4,61 mg/l) ve C_{f2} (28. Günde sudan balığa geçen kirlenici konsantrasyonun doğal logaritması – InKOİ=4,14 mg/l) değerleri Tablo 4.71’de yer almaktadır. Hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanan k_2 değeri 0,004 gün⁻¹ olarak hesaplanır. K_1 hesaplamasında yer alan C_f değeri Şekil 4.149(b)’de yer alan grafikte 14. güne gelen InKOİ 4,4 mg/l olarak bulunmaktadır ; C_w değeri ise balıktan suya geçen KOİ değerlerinin doğal logaritmalarından [$C_w = C_{w2} - C_{w1}$ (mg/l) / ($C_{w2} = 28$.gün] ($C_{w1} = 0$.gün)] 1,18 mg/l olarak hesaplandı. Hesaplanması materyal-metod bölümünde ayrıntılı açıklanan k_1 değeri 0,13 gün⁻¹ olarak hesaplanır. BCF değeri ise 32,5’dur.

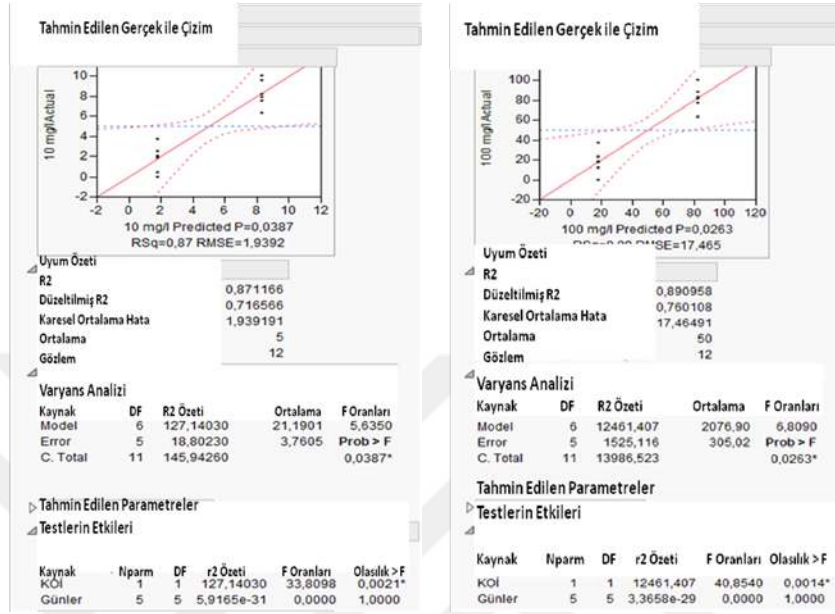
Tablo 4.71 28 gün boyunca nano-SiO₂'in 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarında numuneden balığa geçen KOİ konsantrasyonları ve balıktan temiz suya geçen KOİ konsantrasyonları

10 mg/l nano-SiO ₂				
Günler	Numuneden Balığa Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)	Balıktan Suyu Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)
t=0	10	2,3	0	0
t=5	9,61	2,26	0,39	-0,94
t=10	8,16	2,09	1,84	0,61
t=15	7,94	2,07	2,06	0,72
t=20	7,54	2,02	2,46	0,9
t=28	6,28	1,84	3,72	1,31
100 mg/l nano-SiO ₂				
Günler	Numuneden Balığa Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)	Balıktan Suyu Geçen KOİ Konsantrasyonu (mg/L)	lnKOİ (mg/L)
t=0	100	4,61	0	0
t=5	88,54	4,48	11,46	2,44
t=10	83,13	4,42	16,87	2,83
t=15	81,52	4,41	18,48	2,92
t=20	77,51	4,35	22,49	3,11
t=28	62,65	4,14	37,35	3,62

Lepistes - *Poecillia reticula* bünyesinde nanopartikülün akümüle olup olmadığına dayalı bu testte OECD'de yer alan kriter BCF eğer 10'dan küçük ise nanopartikül içeren örnek balık bünyesinde akümüle olmamıştır, eğer BCF değeri 10'dan büyük ise balık bünyesinde nanopartikülün akümüle olduğunu gösteriyor (OECD 305, 2012). 10 mg/l nano-SiO₂ için BCF değeri 18,1 ; 100 mg/l nano-SiO₂ için BCF değeri 32,5'dur. 10 mg/l ve 100 mg/l konsantrasyonunda biyakümüle olduğunu göstermektedir.

Yapılan ANOVA testinde artan nano-SiO₂ konsantrasyonları ile biyoakümülyasyon testinin 10 ve 100 mg/l konsantrasyonlarına günlere karşı sudan balığa geçen KOİ konsantrasyonu ile balıktan suya geçen KOİ konsantrasyonları arasındaki ilişkinin 10 mg/l için (R=0,0871) ve 100 mg/l için (R=0,890) lineer olduğu saptanmıştır. Test sonucu Şekil 4.150'de yer almaktadır. Analiz $\alpha=0,05$ önem derecesinde gerçekleştirilmiştir. 10 mg/l nano-SiO₂ konsantrasyonu için: yapılan varyans analizi sonucunda günler (P=1,0000 > 0,05) etkili olmadığı ; KOİ (Sudan balığa geçen ve Balıktan suya geçen) (P=0,0021 < 0,05) değişkenin değişkeninin etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür (P=0,0387 < 0,05). 100 mg/l nano-SiO₂

konsantrasyonu için: yapılan varyans analizi sonucunda günler ($P=1,0000 > 0,05$) etkili olmadığı ; KOI (Sudan balığa geçen ve Balıktan suya geçen) ($P=0,0014 < 0,05$) değişkenin değişkeninin etkili olduğu ve regresyonun anlamlı olduğu görülmüştür ($P=0,0263 < 0,05$).



Şekil 4.150 Biyoakümülyasyon testi'nin ANOVA testi sonuçları (10 mg/l ve 100 mg/l için)

Nano-SiO₂'in biyoakümülyasyonu ile ilgili çalışmış bir literatür saptanmamıştır.

4.6.10 Nano-SiO₂'in Farklı Trofik Seviyelerindeki EC₅₀ Değerlerinin Karşılaştırılması

Nano-SiO₂'in prokaryot canlı olan ; bakteri (*Escherichia coli* ; *Bacillus cereus* ; *Vibrio fischeri* ; Metan Archae Bakterisi) , ökaryot canlı olan ; maya- *Candida albicans* ; küf- *Aspergillus niger* , alg (*Chlorella sp.*) , Crustacea (*Daphnia magna*) ve balık (lepistes - *Poecillia reticula*) olmak üzere 6 farklı trofik seviye üzerine 9 farklı akut toksisite deneyi yapılmıştır. Farklı beslenme seviyelerindeki canlıların nano-SiO₂'e karşı farklı toksik cevapları oluşmuştur. Tablo 4.72'de yer alan EC₅₀ değerlerine göre ; en düşük EC₅₀ değerine (24 saat sonucu EC₆₀= 1,04 mg/l) sahip olan *Chlorella sp.* – alg nano-SiO₂'e en hassas organizmadır ($P=0,0001 < 0,05$). En yüksek EC₅₀ değerine sahip olan lepistes - *Poecillia reticula* (24 saat sonucu EC₅₀=716,4 mg/l) nano-SiO₂'e en dirençli organizmadır ($P=0,0007 < 0,05$).

Tablo 4.72 Nano-SiO₂'in farklı trofik seviyelerindeki EC₅₀ değerleri

	EC ₅₀ Değerleri (mg/l)			
	30 dakika sonucu	24 saat sonucu	48 saat sonucu	72 saat sonucu
Bakteri - <i>E.coli</i>	-	27,2	16,7	-
Bakteri - <i>B.cereus</i>	-	39,9	20,9	-
Bakteri - <i>V.fischeri</i>	60,4	-	-	-
Bakteri – Metan Archae	-	84,6 (EC ₈₀)	48,11(EC ₈₀)	-
Maya – <i>C.albicans</i>	-	92,7	67,2	-
Küf – <i>A.niger</i>	-	18,03	14,6	-
Alg – <i>Chlorella sp.</i>	-	2,5(EC ₆₀)	1,9(EC ₆₀)	1,04(EC ₆₀)
Crustacea – <i>D.magna</i>	-	36,7	40,76(EC ₈₀)	-
Bahk – İpistes – <i>Poecillia reticula</i>	-	716,4	433,1	-

BÖLÜM BEŞ

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Altı farklı NMO (nano- Ta₂O₅, nano-HfO₂, nano-CeO₂, nano-ZnO, nano-SiO₂, nano-Al₂O₃) kullanılarak altı farklı beslenme (trofik) seviyesine olan etkileri araştırıldı (Gram negatif bakteri – *E.coli* ; gram pozitif bakteri – *B.cereus* ; biyoluminesans bakteri – *V.fischeri* ; metan Archae bakterisi ; maya – *C.albicans* ; küf – *A.niger* ; alg – *Chlorella sp.* ; Crustacea – *Daphnia magna* ; balık – lepestes – *Poecillia reticula*). Yapılan akut toksisite testleri sonucu kullanılan organizmaların tüm nanopartiküllere olan hassasiyeti ve dirençli olup olmaması % inhibisyonlar ve EC₅₀ değerleri açısından çalışılmıştır. Nano-ZnO nanopartikülünün, çalışılan diğer nanopartiküller arasında en toksik olduğunu tespit edildi. Bunu takip eden toksik nanopartiküller sırasıyla nano-CeO₂, nano-SiO₂, nano-Ta₂O₅, nano-Al₂O₃, nano-HfO₂'dir. ZnO nanopartikülünün yapılan dokuz farklı akut toksisite testleri için EC değerlerine baktığımızda en hassas canlının *Chlorella sp.* – alg (72 saat sonucu EC₈₀ değeri 0,93 mg/l) ; en dirençli canlının lepestes – *Poecillia reticula* (48 saat sonucu EC₅₀ değeri 324,3 mg/l) olduğu saptandı. Nano-ZnO'e *Chlorella sp.* – alg'den sonra en hassas organizma ; *E.coli*, sonrasında Metan Archae bakterileridir. En dirençli canlı ise lepestes – *Poecillia reticula*'dan sonra *C.albicans* – maya ve *A.niger* – küf mikroorganizmalarıdır.

Altı farklı beslenme seviyesine toksik etkisinin en az olduğu nanopartikül nano-HfO₂'dir. 24 saat sonucu lepestes – *Poecillia reticula* için EC₅₀ değeri 849,8 mg/l olarak saptanmış olup ; bu değer diğer nanopartiküller arasında bulunan en yüksek EC₅₀ değeridir. Lepistes – *Poecillia reticula*'dan sonra nano-HfO₂'e karşı en dirençli canlı *Daphnia magna*'dır (24 saat sonucu EC₅₀ değeri 63,49 mg/l). Bunu sırasıyla *E.coli*, *C.albicans*, metan Archae bakterisi, *B.cereus* ve *A.niger* izlemektedir.

Genel olarak hassasiyeti en yüksek olan *Chlorella sp.* – alg canlısının tüm nanopartiküllere olan toleransına baktığımızda ; nano-CeO₂'e maruz kalan alg hücreleri için diğer nanopartiküller arasında hassasiyetinin en düşük olduğu nanopartikül nano-CeO₂'dir (24 saat sonucu EC₅₀ değeri 12,07 mg/l). Tüm canlılar

arasında dayanıklı organizmalar lepidotes – *Poecillia reticula*’dan ; sonra saptanan en yüksek EC değeri arasında *Daphnia magna*, *Candida albicans* ve Metan Archae bakterileridir (*D.magna* : nano-CeO₂ için 24 saat sonucu 70,9 mg/l ; *C.albicans* : nano-Al₂O₃ için 24 saat sonucu 93,1 mg/l ; Metan Archae bakterileri için : nano-Al₂O₃ için 24 saat sonucu 96,83 mg/l).

Genel olarak olarak çalışılan nanopartiküller arasında toksisitesi en yüksek nanopartikül nano-ZnO ; toksisitesi en az olan nanopartikül nano-HfO₂’dir. Akut toksisitesi çalışılan organizmalar arasında en hassas canlı alg – *Chlorella sp.* ; en dirençli canlı ise lepidotes – *Poecillia reticula*’dır.

Nanopartiküller günümüzde çok yaygın bir şekilde endüstriyel atıksuların arıtımında kullanılmaktadır. Bu nanopartiküllerin altı farklı beslenme seviyesindeki canlıda meydana getirdikleri farklı toksisite cevapları canlının gelişmişlik seviyesine göre farklı olmuştur. Nanopartikül kullanarak arıtma yapan endüstrilerde nanopartikülün geri kazanılarak tekrar kullanımları çok ekonomik olmasına rağmen, bazen alıcı ortama olabilecek deşarj kaçaklarından ekosisteme verilebilecek nanopartikül kalıntılarının çevreye zarar verebileceği ve toksisite oluşturabileceği varsayılarak bu tez çalışmasında dokuz farklı canlı içi çalışılmış ve bazı nanopartiküller için yüksek akut toksisite toksisite gözlenmiştir. En çok toksik etki gösteren nano-ZnO için alıcı ortama deşarj edilirken çok dikkatli olunmalı ; çünkü çok düşük konsantrasyonlarda dahi *Chlorella sp.* için toksik etki (EC₈₀ Değeri 0,93 mg/l) göstermektedir. Nano-ZnO ile yapılan çalışmalarda 0.93 mg/l ile 850 mg/l arasında değişen EC₅₀ değerleri için ; nanopartiküller ile çalışılırken bu konsantrasyon aralığına dikkat edilmelidir. Diğer en toksik nanopartiküllerden nano-CeO₂ ve nano-SiO₂ ile yapılan çalışmalarda sırasıyla; 7 mg/l ile 500 mg/l arasında ve 1,04 mg/l ile 720 mg/l arasında değişen EC₅₀ değerleri için ; nanopartiküller ile çalışılırken bu konsantrasyon aralığına dikkat edilmelidir.

KAYNAKLAR

- Aruoja, V., Dubourguier, H.C., Kasemets, K. ve Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*, 407, 1461-1468.
- Atlı-Şekeroğlu, Z. (2013). Nanoteknolojiden nanogenotoksikolojiye: kobalt-krom nanopartiküllerinin genotoksik etkisi. *Türk Hijyen Derneği Biyoloji Dergisi*, 70-1, 33-42.
- Auffan, M., Rose, J., Wiesner, M.R. ve Bottero, J.Y. (2009). Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity *in vitro*. *Environmental Pollution*, 157-4, 1127-1133.
- Baek, Y.W. ve An, J.W. (2011). Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Science of the Total Environment*, 409, 1603-1608.
- Barnard, A. S. (2006). Nanohazards: Knowledge is our first defence. *Nature Material*, 5, 245-248.
- Binaeian, E. ve Soroushnia, S.H. (2013). Investigation on toxicity of manufactured nanoparticles to bioluminescence bacteria *Vibrio fischeri*. *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering*, 7-8, 9958-9964.
- Bing, H., Chen-xi, W., Di, Y., Chuan-lu, H., Xiao-wei, Y. ve Xu, Y. (2009). Acute toxicity of suspension of nanosized silicon dioxide particle to *Daphnia magna*, *Chemosphere*, 978-1-4244-290, 8/09.

- Blinova, I., Ivaska, A., Heinlaan, M., Mortimer, M. ve Kahru, A. (2010). Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environmental Pollution*, 158, 41–47.
- Bringmann, G. ve Kuhn, R. (1959). Comparative water-toxicological investigations on bacteria, algae and *Daphnia*. *Gesundheitsingenieur*, 80, 115–120.
- Buschini, A., Poli, P. ve Rossi, C. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* as an eukaryotic cell model to assess cytotoxicity and genotoxicity of three anticancer anthraquinones. *Mutagenesis*, 18, 25–36.
- Cabral, M.G., Viegas, C.A., Teixeira, M.C. ve Sa-Correia, I. (2003). Toxicity of chlorinated phenoxyacetic acid herbicides in the experimental eukaryotic model *Saccharomyces cerevisiae*: role of pH and of growth phase and size of the yeast cell population, *Chemosphere*, 51, 47–54.
- Cattaneo, A.G., Gornati, R., Chiriva-Internati, M. ve Bernardini, G. (2009). Ecotoxicology of nanomaterials: the role of invertebrate testing. *Invertebrate Survival Journal*, 6, 78-97.
- Chang, W., Huang, H., Chena, H., Lai, C. ve Wen, C. (2014). Antibacterial properties and cytocompatibility of tantalum oxide coatings. *Surface & Coatings Technology*, 259, 193–198.
- Chen, Y., Su, Y., Zheng, X., Chen, H. ve Yang H. (2012). Alumina nanoparticles-induced effects on wastewater nitrogen and phosphorus removal after short-term and long-term exposure. *Water Research*, 46, 4379-4386.
- Choi, O. ve Hu, Z. (2008). Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental Science and Technology*, 42-12, 4583-4588.

- Cong, Y., Park, H.S., Dang H.X., Fan, R.F., Bard, A.L. ve Mullins, C.B. (2012). Tantalum cobalt nitride photocatalysts for water oxidation under visible light. *Chemical Material*, 24, 579-586.
- Dai, Q., Wang, J., Yu, J., Chen, J. ve Chen, J. (2014). Catalytic ozonation for the degradation of acetylsalicylic acid in aqueous solution by magnetic CeO₂ nanometer catalyst particles. *Chemical Applied Catalysis B: Environmental*, 144, 686– 693.
- Dasari, T.P., Pathakoti, K. ve Hwang, H. (2013). Determination of the mechanism of photoinduced toxicity of selected metal oxide nanoparticles (ZnO, CuO, Co₃O₄ and TiO₂) to *E. coli* bacteria. *Journal of Environmental Sciences*, 25-5, 882–888.
- De Faria, L. A. ve Trasatti, S., (1994). The point of zero charge of CeO₂. *Journal of Colloid Interface Science*, 167, 352-357.
- De Jong, L. E. D. (1965). Tolerance of *Chlorella vulgaris* for metallic and non-metallic ions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 31, 301– 313.
- Dutta, R.K., Sharma, P.K., Bhargava, R., Kumar, N. ve Pandey, A.C. (2010). Differential susceptibility of *Escherichia coli* cells toward transition metal-doped and matrix embedded ZnO nanoparticles. *Journal of Physical and Chemical B*, 114, 5594–5599.
- Fajardo, C., Saccà, M.L., Costa, G., Nande, M. ve Martina, M. (2014). Impact of Ag and Al₂O₃ nanoparticles on soil organisms: In vitro and soil experiments. *Science of the Total Environment*, 473–474, 254–261.
- Field, J.A., Luna-Velasco, A., Boitano, S.A., Shadman, F., Ratner, B.D., Barnes, C. ve Sierra-Alvarez, R. (2011). Cytotoxicity and physicochemical properties of hafnium oxide nanoparticles. *Chemosphere*, 84-10, 1401–1407.

- Franklin, N., Rogers, N., Apte, N., Batley, G., Gadd, G. ve Casey, P. (2007). Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. *Environmental Science and Technology*, 41, 8484–8490.
- Gadd, G.M. ve Griffiths, A.J. (1978). Microorganisms and heavy metal toxicity, *Microbial Ecology*, 4, 303–317.
- Gaiser, B.K., Biswas, A., Rosenkranz, P., Jepson, M.A., Lead, J.R., Stone, V.S. ve ark. (2011). Effects of silver and cerium dioxide micro- and nano-sized particles on *Daphnia magna*. *Environmental Monitoring*, 13, 1227.
- Gaiser, B.K., Fernandes, T., Jepson, M., Lead, J.R., Tyler, J.R. ve Stone, V. (2009). Assessing exposure, uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles from contaminated environments. *Environmental Health*, 8-1, 1186-1476.
- Gambardellaa, C., Gallusb, L., Gattic , A.M. ve Faimali, M. (2014). Toxicity and transfer of metal oxide nanoparticles from microalgae to sea urchin larvae. *Chemistry and Ecology*, 30- 4, 308–316.
- Ganesh, R., Smeraldi, J., Hosseini, T., Khatib, L., Olson, B.H. ve Rosso, D. (2010). Evaluation of nanocopper removal and toxicity in municipal wastewaters. *Environmental Science and Technology*, 44-20, 7808-7813.
- García, A., Espinosa, R., Delgado, L., Casals, E., González, E., Puntos V. ve ark. (2011). Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. *Desalination*, 269, 136–141.

- García^a, A., Delgado^a, L., Torà^a, J.A., Casals^b, E., González^b, E., Puntès^b, K. ve ark. (2012). Effect of cerium dioxide, titanium dioxide, silver, and gold nanoparticles on the activity of microbial communities intended in wastewater treatment, *Journal of Hazardous Materials*, 199– 200, 64– 72.
- García-Saucedo, C., Field, J.A., Otero-Gonzalez, L. ve Sierra-Álvarez R. (2011). Low toxicity of HfO₂, SiO₂, Al₂O₃ and CeO₂ nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Hazardous Materials*, 192, 1572– 1579.
- Gong , N, Shao, K., Feng, W., Lin, Z., Liang, C. ve Sun, Y. (2011). Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere* 83, 510–516.
- Griffitt, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J.C. ve Barber, D.S. (2008). Effect of Particle composition and species on toxicology of metallic nanomaterials in aquatic organisms effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemical*, 27-9, 1972-8.
- Hao, L., Chen L., Hao, J. ve Zhong, N. (2013). Bioaccumulation and sub-acute toxicity of zinc oxide nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*): A comparative study with its bulk counterparts, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, 52–60.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.C. ve Kahru, A. (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71, 1308-1316.
- Hua, M., Zhang, S., Pan, B., Zhang, W., Lu, L. ve Zhang, Q. (2012). Heavy metal removal from water/wastewater by nanosized metal oxides. *Journal of Hazardous Materials*, 211– 212, 317– 331.

- Jemec, A., Djinić, P., Titišler, T. ve Pintara, A. (2012). Effects of four CeO₂ nanocrystalline catalysts on early-life stages of zebrafish *Danio rerio* and crustacean *Daphnia magna*. *Journal of Hazardous Materials*, 219–220, 213–220.
- Ji, J., Longa, Z. ve Lina, D. (2011). Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella sp.* *Chemical Engineering Journal*, 170, 525–530.
- Jiang, W., Mashayekhi, H. ve Xing, B. (2009). Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environmental Pollution*, 157, 1619–1625.
- Kahru, A. ve Dubourguier, H.C. (2010). From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*, 269, 105–119.
- Kahru, A., Dubourguier, H.C., Blinova, I., Ivask, A. ve Kasemets, K. (2008). Biotests and biosensors for ecotoxicology of metal oxide nanoparticles: A Minireview. *Sensors*, 8-8, 5153–5170.
- Kasemets, K., Ivask, A., Dubourguier, H.C. ve Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Toxicology in Vitro*, 23, 1116–1122.
- Krishnamoorthy, K., Veerapandian, M., Zhang, L., Yun, L. ve Kim, S. (2014). Surface chemistry of cerium oxide nanocubes: Toxicity against pathogenic bacteria and their mechanistic study. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20, 3513–3517.
- Kumar, A., Pandey, A.K., Singh, S.S., Shanker, R. ve Dhawan, A. (2011). Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells. *Chemosphere*, 83, 1124–1132.

- Kumar, K.Y., Muralidhara, H.B., Arthoba, Y., Nayaka B, Balasubramanyam, J. ve Hanumanthappa, H. (2013). Low-cost synthesis of metal oxide nanoparticles and their application in adsorption of commercial dye and heavy metal ion in aqueous solution. *Powder Technology*, 246, 125–136.
- Lee, M., Zine, N., Baraket, A., Zabala, M., Campabadal, F., Caruso, R. ve ark. (2012). A novel biosensor based on hafnium oxide: Application for early stage detection of human interleukin-10. *Original Research Article Sensors and Actuators B: Chemical*, 175, 201-207.
- Leung, H.,L., Yung, M., Alan, M.C., Angel, P.Y., Stella, W.Y., Charis, M.N. ve ark. (2015). Toxicity of CeO₂ nanoparticles – The effect of nanoparticle properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 145, 48–59.
- Li, M., Zhu, L. ve Lin, D. (2011). Toxicity of ZnO Nanoparticles to *Escherichia coli*: mechanism and the influence of medium components. *Environmental Science. Technololgy*, 45, 1977–1983.
- Liang, P., Shi, T.Q. ve Li, J. (2004). Nanometer-size titanium dioxide separation/preconcentration and FAAS determination of trace Zn and Cd in water sample. *International Journal of Environmental Analyze and Chemical*, 84, 315–321.
- Lipovsky, A., Nitzan, Y., Gedanken, A. ve Lubart, R. (2011). Antifungal activity of ZnO nanoparticles—the role of ROS mediated cell injury. *Nanotechnology*, 22, 105-101.
- Liu, G., Wang, D., Wang, J. ve Mendoza, C. (2011). Effect of ZnO particles on activated sludge: role of particle dissolution. *Science Total Environmental* 409, 2852-2857.

- Lovern, S.B. ve Klaper, R. (2006). *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 1132-1137.
- Luna-delRiscoa, M., Orupolda, K. ve Dubourguiera, H.C. (2011). Particle-size effect of CuO and ZnO on biogas and methane production during anaerobic digestion. *Journal of Hazardous Materials*, 189, 603–608.
- Manier, M., Bado-Nilles, A., Delalain, P., Aguerre-Chariol, O. ve Pandard, P. (2013). Ecotoxicity of non-aged and aged CeO₂ nanomaterials towards freshwater microalgae. *Environmental Pollution*, 180, 63-70.
- Mortimer, M., Kasemets, K., Heinlaan, M., Kurvet, I. ve Kahru, A. (2008). High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles. *Toxicology in Vitro*, 22, 1412–1417.
- Mu, H., Chen, Y. ve Xiao, H. (2011). Effects of metal oxide nanoparticles (TiO₂, Al₂O₃, SiO₂ and ZnO) on waste activated sludge anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 102, 10305–10311.
- Negahdary, M., Mohseni, G., Fazilati, M., Parsania, S., Rahimi, G., Rad, H. ve ark. (2012). The Antibacterial effect of cerium oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus* bacteria. *Annals of Biological Research*, 3-7, 3671-3678.
- Nguyen, D., Visvanathan, C., Jacob, P. ve Jegatheesan, V. (2015). Effects of nano cerium (IV) oxide and zinc oxide particles on biogas production. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Article in Press.
- OECD 202, (2004). *OECD Guidelines for Testing of Chemicals*, *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test.

OECD 203, (1992). *OECD Guidelines for Testing of Chemicals*, Fish Acute Toxicity Test.

OECD 301, (1992). *OECD Guidelines for Testing of Chemicals*, Ready Biodegradability.

OECD 305, (2012). *OECD Guidelines for Testing of Chemicals*, Bioconcentration: Flow-through Fish Test.

Oh, M.H., Lee, N., Kim, H., Park, S.P., Piao, Y., Lee, J. ve ark. (2011). Large-Scale synthesis of bioinert tantalum oxide nanoparticles for X-ray computed tomography imaging and bimodal-guided sentinel lymph node mapping. *Jornal of American Chemical Society*, 133(14), 5508-5515.

Owen, W.F., Stuckey, D.C., Healy, J.B., Young, L.Y. ve McCarty, Jr. (1979). Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Research*, 13, 485–492.

Pasqueta, J., Chevalierb, Y., Couvala, E., Bouviera, D., Noizeta, G., Morlierea, C. ve ark. (2014). Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five micro-organisms of the challenge tests related to their physicochemical properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 460, 92– 100.

Poynton, H.C., Lazorchak, J.M., Impellitteri, C.A., Smith, M.E., Rogers, K., Patra, M. ve ark. (2011). Differential gene expression in *Daphnia magna* suggests distinct modes of action and bioavailability for ZnO nanoparticles and zn ions. *Environmental Science and Technology*, 45, 762-768.

Razo-Flores, E., Luijten, M., Donlon, B.A., Lettinga, G. ve Field, J.A. (1997). Complete biodegradation azo dye azodisalicylate under anaerobic conditions. *Environmental Science and Technology*, 31-7, 2098–2103.

- Recillas, S., García, A., González, E., Casals, E., Puentes, V., Sánchez, A. ve ark. (2011). Use of CeO₂, TiO₂ and Fe₃O₄ nanoparticles for the removal of lead from water Toxicity of nanoparticles and derived compounds. *Desalination*, 277, 213–220.
- Roger, N.J., Franklin, N., Apte, S.C., Batley, G.E., Angel, B.M., Lead, J.R. ve ark. (2010). Physico-chemical behaviour and algal toxicity of nanoparticulate CeO₂ in freshwater. *Environmental Chemistry*, 7, 50-60.
- Sa´nchez, A., Recillas, S., Font, X., Casals, E., Gonza´lez, E. ve Puentes, V. (2011). Ecotoxicity of, and remediation with, engineered inorganic nanoparticles in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 30-3.
- Sadiq, M., Dalai, S., Chandrasekaran, N. ve Mukherjee, A. (2011). Ecotoxicity study of titania (TiO₂) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.* *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 1180–1187.
- Santo,N., Fascio, U., Torres, F., Guazzoni, N., Tremolada, P., Bettinetti, R. ve ark. (2014). Toxic effects and ultrastructural damages to *Daphnia magna* of two differently sized ZnO nanoparticles: Does size matter? *Water Research*, 53, 339-350.
- Schmitt, M., Gellert, G., Ludwig, J. ve Lichtenberg-Frate, H. (2004). Phenotypic yeast growth analysis for chronic toxicity testing, *Ecotoxicology Environmental Safety*, 59, 142–150.
- Speece, R.E. (1996). Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. *Archae Press, Nashville Tennessee, USA*, 115.
- Suneesh, P.V., Chandhini, K., Ramachandran, T., Nair, B.G. ve Satheesh, T.G. (2013). Tantalum oxide honeycomb architectures for the development of a non-

enzymatic glucose sensor with wide detection range. *Biosensors and Bioelectronics*, 50, 472–477.

Thill, A., Zeyons, O., Spalla, F., Chauvat, J., Rose, M., Auffan, O. ve ark. (2006). Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for *Escherichia coli*. physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. *Environmental Science and Technology*, 40, 6151–6156.

Türk Sanayicileri ve İş Adamları Derneği (TÜSİAD), (2008). Nanoteknoloji ve Türkiye. *TÜSİAD-T*, 474.

Van Hoecke, K., Schamphelaere, K., Meeren, P., Lucas, S. ve Janssen, C.R. (2008). Ecotoxicity of silica nanoparticles to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: Importance of surface area. *Laboratory of Environmental Toxicology and Aquatic Ecology, Faculty of Bioscience Environmental Toxicology and Chemistry*, 27-9, 948–1957.

Xu, P., Zeng G.M., Huang D.L., Feng C.L., Hu S., Zhao M.H. ve ark. (2012). Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: A review. *Science of the Total Environment*, 42, 41–10.

Zelmanov, G. ve Semiat, R. (2008). Phenol oxidation kinetics in water solution using iron(3)-oxide-based nano-catalysts. *Water Research*, 42, 3848-3856.

Zheng, X., Wu, R. ve Chen, Y. (2011). Effects of ZnO nanoparticles on wastewater biological nitrogen and phosphorus removal. *Environmental Science and Technology*, 45-7, 2826-2832.

Zhou, Q., Wangb, X., Liu, J. ve Zhang, L. (2012). Phosphorus removal from wastewater using nano-particulates of hydrated ferric oxide doped activated carbon fiber prepared by Sol–Gel method. *Chemical Engineering Journal* 200–202, 619–626.

Zhu, X., Zhu, L., Chen, Y. ve Tian, S. (2009). Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. *Journal of Nanoparticles Research*, 11, 67–75.



EKLER

KISALTMALAR

NMO : Nano-metal oksit

NP : Nanopartikül

EC₅₀ : % 50'ine Etki Eden Konsantrasyon

LC₅₀ : % 50'sini Öldüren Konsantrasyon

Nano-CeO₂ : Nano - seryum oksit

Nano-ZnO : Nano - çinko oksit

Nano-Al₂O₃ : Nano - aluminyum oksit

Nano-HfO₂ : Nano - hafniyum oksit

Nano-Ta₂O₅ : Nano - tantalyum oksit

Nano-SiO₂ : Nano - silisyum oksit