

**T.C.  
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
HİDROBİYOLOJİ BİLİM DALI**

**GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİ İLE TUZLARININ DENİZ  
KESTANESİ EMBRİYONİK GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Hasan Hüseyin ÖZÇİFTÇİ**

**Danışman  
Dr. Öğretim Üyesi Fatma KOÇBAŞ**



**MANİSA-2019**

**Hasan  
Hişeyin  
ÖZÇİFTÇİ**

**GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİ İLE TUZLARININ DENİZ KESTANESİ EMBRİYONİK  
GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**2019**

## TEZ ONAYI

Hasan Hüseyin ÖZÇİFTÇİ tarafından hazırlanan "GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİ İLE TUZLARININ DENİZ KESTANESİ EMBRİYONİK GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI " adlı tez çalışması 20/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

**Danışman** **Dr. Öğretim Üyesi Fatma KOÇBAŞ** .....  
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

**Jüri Üyesi** **Prof. Dr. Rahime ORAL** .....  
Ege Üniversitesi

**Jüri Üyesi** **Prof. Dr. Kamil KOÇ** .....  
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

## **TAAHHÜTNAME**

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

**Hasan Hüseyin ÖZÇİFTÇİ**



## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
İÇİNDEKİLER .....	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	II
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	III
TABLO DİZİNİ .....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	16
2.1. Literatür özeti.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. <i>Arbacia lixula</i> Biyolojisi.....	26
3.1.2. Kimyasallar.....	31
3.1.2.1. Gümüş ve Gümüş Nitrat (AgNO <sub>3</sub> ).....	32
3.1.2.2. Gümüş Nanopartikülleri (AgNP).....	35
3.2. Yöntemler.....	40
3.2.1. Biyotest canlısının toplanması.....	40
3.2.2. Test Ortamının Hazırlanması.....	41
3.2.3. Konsantrasyonların hazırlanması.....	43
3.2.4. Biyotestler.....	44
3.2.5. Gümüş Nanopartiküllerinin Ölçümü.....	48
3.2.6. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	51
4.1. Bulgular .....	51
4.2. Tartışma .....	60
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	65
KAYNAKLAR .....	66
ÖZGEÇMİŞ .....	77

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ag	: Gümüş
AgNO <sub>3</sub>	: Gümüş nitrat
AgNP	: Gümüş nanopartikülü
CdSO <sub>4</sub>	: Kadmiyum II sülfat
EC	: Etkili Konsantrasyon (Effective Concentration)
FDS	: Filtre edilmiş deniz suyu
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
LC	: Letal Konsantrasyon ( Lethal Concentration)
LOEC	: Herhangi bir etkinin gözlemediği en düşük konsantrasyon
M	: Molar
mg/kg	: Miligram/kilogram
MIC	: Minimum Engelleyici Konsantrasyon
Nm	: Nanometre
NOEC	: Hiçbir etkinin gözlenmediği konsantrasyon
NP	: Nanopartikül
ppm	: Milyonda bir
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
XANES	: X Işını Soğurma Yakın Kenar Spektroskopisi
µg	: Mikrogram
µg/cm <sup>3</sup>	: Mikrogram/santimetreküp
µg/L	: Mikrogram/Litre
µg/mL	: Mikrogram/mililitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
°C	: Santigrad derece

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 1.1: Nanopartikül üretiminde kullanılan yaklaşımlar .....	6
Şekil 1.2: Nanoboyutta parçacık üretim yöntemleri .....	7
Şekil 1.3: Çevredeki nanopartiküllerin şematik gösterimi .....	8
Şekil 1.4: AgNP' lerinin ton/yıl olarak simülasyon sonuçları .....	11
Şekil 3.1.1.1: <i>A. lixula</i> türünün Akdeniz kıyılarında dağılışı .....	27
Şekil 3.1.1.2: Deniz kestanesi embriyogenesi .....	30
Şekil 3.1.2.1: AgNP' lerin genel görüntüsü <100 nm (a), <150 nm (b) ve Taramalı Elektron Mikroskopundaki <100 nm (c), <150 nm (d) boyutlarındaki AgNP' lerinin görüntüleri .....	31
Şekil 3.2.1.1: <i>A. lixula</i> ' nın üstten ve yandan görünüşü .....	40
Şekil 3.2.1.2: Örnek toplama alanı .....	41
Şekil 3.2.2.1: Dişi (A) ve erkek (B) <i>A. lixula</i> bireylerinin iç genel görünümü ...	42
Şekil 3.2.2.2: <i>A. lixula</i> ' nın gametlerinin elde edilmesi .....	42
Şekil 3.2.3.1: Sonikasyon düzeneği genel görüntüsü .....	44
Şekil 3.2.4.1: Embriyogenesiz için deney ortamı ve polisitilen kaplar .....	45
Şekil 3.2.4.2: Sperm ve yumurtaların sulu ortamdaki görüntüleri .....	46
Şekil 3.2.4.3: <i>A. lixula</i> embriyogenesizinde görülen morfolojik değişiklikler: a: Normal Pluteus b: P1 anomalileri c: P2 anomalileri d: ölü bireyler .....	47
Şekil 3.2.5.1: JEOL JSM-6390LV marka Taramalı Elektron Mikroskopu .....	49
Şekil 3.2.5.2: Hazırlanan numunelerin örnek kapsülüne (a), kapsülün SEM' a yerleştirilmesi (b) .....	50
Şekil 4.1.1.1: Kontrol grubunda görülen <i>A. lixula</i> pluteus larvalarının genel Görünüşü .....	52
Şekil 4.1.1.2: Normal bireyler ve farklı konsantrasyonlardaki değişimler .....	53

## TABLO DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Tablo 1.1: AgNP' nin Avrupa ve ABD' deki farklı çevresel bölümlerdeki tahmini çevresel konsantrasyonları ve risk katsayı değerleri.....	13
Tablo 1.2: Gümüş nanopartiküllerinin tatlı sulardaki tahmini çevresel konsantrasyonu.....	13
Tablo 3.1.2.2.1: AgNP içeren ürünler ve yüzdeleri .....	36
Tablo 3.2.4.1: Larval gelişimsel anormalliklerin belirlenmesinde kullanılan morfolojik ölçütler.....	47
Tablo 3.2.4.2: <i>A. lixula</i> embriyoları üzerine sublethal etkilerini belirleyebilmek için toksisite değerlendirme kriteri.....	48
Tablo 4.1.1: 72 saatlik embriyogenesis sonunda AgNO <sub>3</sub> , <100 nm ve <150 nm AgNP' leri için pluteus safhasına ulaşan bireylerde görülen ani etkilerin gözlemlendiği konsantrasyonlar. ....	53
Tablo 4.1.2: Embriyogenesis süresince AgNO <sub>3</sub> , <100 nm AgNP, <150 nm AgNP konsantrasyonlarının en yüksek ve ani değişimlerinin görüldüğü pluteus anormalileri ve toksik konsantrasyonları .....	54
Tablo 4.1.3: AgNO <sub>3</sub> konsantrasyon artışına bağlı olarak görülen <i>A. lixula</i> popülasyonunda görülen morfoljik anormalilerin % oranları.....	56
Tablo 4.1.4: <100 nm AgNP' lerinin konsantrasyon artışına bağlı olarak görülen <i>A. lixula</i> popülasyonunda görülen morfoljik anormalilerin % oranları.....	57
Tablo 4.1.5: <150 nm AgNP' lerinin konsantrasyon artışına bağlı olarak görülen <i>A. lixula</i> popülasyonunda görülen morfoljik anormalilerin % oranları....	58
Tablo 4.1.6: AgNO <sub>3</sub> ve AgNP' lerin EC50 Değerleri.....	59



## TEŞEKKÜR

Çalıőmamın her aőamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren danışman hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Fatma KOÇBAŞ' a, bilgi ve tecrübesini paylaőan Sayın Prof. Dr. Rahime ORAL'a, nanopartikül ölçümlerinde destek veren öğretim üyesi Sayın Prof.Dr. Ahmet VARİLCİ ve Prof.Dr. Ercan YILMAZ' a, öğrenim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen ve hep yanımda olan aileme yürekten teşekkür ederim.

Hasan Hüseyin ÖZÇİFTÇİ  
Manisa, 2019



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİ İLE TUZLARININ DENİZ KESTANESİ EMBRİYONİK GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hasan Hüseyin ÖZÇİFTÇİ

Manisa Celal Bayar Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Fatma KOÇBAŞ

Son yıllarda gündemde olan nanopartiküller sağlık, otomotiv, gıda, giyim, tekstil, elektronik ve kozmetik gibi çok farklı alanlarda kullanılmaktadır. Nanopartiküller dünyada birçok ülke büyük bütçelerle ve kalkınma planlarına alarak desteklediği konuların başında gelmektedir. Gümüş ve gümüş nanopartikülleri geçmişten günümüze farklı alanlarda özellikle sağlık ve askeri alanda çok fazla kullanılmaktadır. Üretilen nanopartiküllerin çevreye olan etkileri araştırılmamaktadır. Gümüş nanopartiküllerinin çevredeki etkileri yeni araştırılmaya başlanmıştır. Gümüş iyonlarının, gümüş nanopartiküllerden *Arbacia lixula* embriyolarına göre daha toksik olduğunu ifade edildi. *A. lixula*' da (18 ° C'de 72 saat inkübasyon) EC50 değerleri iyonik gümüş için 42.5 µg/L, <100 nm nanogümüş için 1958.8 g/L ve <150 nm nanogümüş için 0.3 M olarak saptandı. Sonuç olarak, *A. lixula* embriyoları, deniz suyuna dağılmış nanopartiküllerin potansiyel etkilerini test etmek için hassas ve güvenilir bir modeli temsil etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:**(*Arbacia lixula*, gümüş nanopartikülleri, AgNO<sub>3</sub>, embriyotoksosite)

2019, 89 sayfa

## **ABSTRACT**

**M.Sc. Thesis**

### **INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF NANOPARTICLES AND SALT OF SILVER ON EMBRYONIC DEVELOPMENT OF SEA URCHIN**

**Hasan Hüseyin ÖZÇİFTÇİ**

**Manisa Celal Bayar University  
Graduate School of Applied and Natural Sciences  
Department of Biology**

**Supervisor: Ast. Prof. Dr. Fatma KOÇBAŞ**

Nanoparticles, which are on the agenda in recent years, are used in many different fields such as health, automotive, food, clothing, textile, electronics and cosmetics. Many countries in the world are one of the main topics that they support by taking large budgets and development plans on nanoparticles. Silver and silver nanoparticles are widely used in different fields from past to present, especially in health and military fields. The environmental effects of the produced nanoparticles are not investigated. The environmental effects of silver nanoparticles have just started to be investigated. We reported that silver ions are more toxic than silver nanoparticles to *Arbacia lixula* embryos. EC50 were 42,5 µg/L for ionic silver, 1958,8 µg/L for <100 nm nanosilver and 0.3 M for <150 nm nanosilver in *A. lixula* (72 h incubation at 18°C). In conclusion, *A. lixula* embryos represents a sensitive and reliable model for testing potential effects of nanoparticles that are dispersed in sea water.

**Keywords:( *Arbacia lixula*, silver nanoparticles, AgNO<sub>3</sub>, embryotoxicity )**

**2019, 89 pages**

## 1. GİRİŞ

Günümüzün en büyük problemlerinin başında gelen kirlilik; sanayileşme, hızlı nüfus artışı, yoğun pestisit kullanımı, deterjan kirliliği, petrol kirliliği, radyoaktif kirlilik, taşımacılık gibi kirleticilerin yanında teknolojiye yeni gelişmeler sonucu ortaya çıkan yeni ürünlerden kaynaklanan diğer kirleticiler bulunmaktadır. Son yıllarda ön plana çıkan nanopartiküller ve nanoteknoloji çok farklı alanlarda kullanılmasına rağmen çevresel etkilerinin belirlenmesi ve toksisite çalışmalarına yeni başlanmış olup yarattığı çevre sorunları tam olarak bilinmemektedir.

**Nanopartiküller (NP);** 100 nm' den küçük en az bir boyutlu partikül maddeler olarak tanımlanır [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ]. “ Nano ” ön eki Yunanca nanos kelimesinden gelmekte olup “ Nanometre ” ise bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri ( $1 \times 10^{-9}$  m) olarak ifade edilir [9, 10]. 1-100 nm boyutlu, oldukça büyük yüzey alanı olan, yapısal ve yapısal olmayan uygulama alanları bulunan, kimyasal olarak oldukça hafif malzeme şeklinde özelliklere sahip partikül maddeler NP' lerdir [11].

Nanopartiküller kuantum boyut etkileri, elektronik yapısının boyut bağımlılığı, yüzey atomlarının benzersiz karakterizasyonu ve yüksek yüzey/hacim oranı gibi farklı ve üstün özellikler sergilediği belirtilmiştir [12]. Bu özelliklerden dolayı nanopartiküller biyolojik sistemlere kolayca giriş yapabilirler. Bu nedenlerle biyo ölçümlerde NP' ler çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Bu kullanım amaçlarından bazıları aşağıdaki gibidir [13]:

1. Miktar tayinlerinde radyoaktif işaretlemeyi veya organik fluroforu elimine etmek için NP'ler tercih edilebilir. Bu amaçla en çok metal NP' ler ve kuantum noktaları kullanılır.
2. NP' ler solüsyonlardaki biyolojik ölçümler için substrat olarak kullanılabilir.

3. Tanısal ölçümlerde sinyal iletici olarak etki gösteren NP' ler biyolojik örneğin işaretlenmesini elimine ettikleri için kullanılır.
4. Fonksiyonel nanomateryaller biyolojik reaksiyonların katalizi gibi işlevleri yürütmek için partiküllerin spesifik kimyasal ve fiziksel özelliklerini kullanırlar.

Nanopartiküllerin farklı özelliklerine göre sınıflandırmaları olmasına rağmen kimyasal bileşimine göre sınıflandırılma aşağıdaki gibidir [14]:

- 1- Nanomateryaller (dendrimerler)
- 2- Metal nanomateryaller (Au gibi)
- 3- Metal oksitler (TiO<sub>2</sub> ve ZnO gibi)
- 4- Yarı İletkenler (kuantum noktaları)

Nanoteknoloji kavramını ilk defa ortaya koyan Dr. Richard Feynman ile 1959 yılında başladığı kabul edilmektedir. Norio Taniguchi tarafından 1974 yılında ise, “İleri düzey duyarlılıkla mevcut teknolojilerin küçültülmesine dayalı bir teknoloji” tanımı ile nanoteknolojiyi ilk olarak tanımlamıştır. Daha sonra 1981 yılında atomların doğrudan görüntülerini veren Taramalı Tünelleme Mikroskopunun ve 1986 yılında atomik kuvvet mikroskopunun keşfi ile biyolojik materyallerin de nano ölçüde yüzey özelliklerinin incelenebilmesinin mümkün olduğu görülmüş ve nanometre boyutlarda bilime yönelmenin yanında bu alanda gelişmeler ivme kazanmıştır. Nano üretiminin babası olarak kabul edilen Richard Smalley ve birkaç araştırmacı 1990 yılında 60 karbon atomunun simetrik biçimde sıralanmasıyla elde edilen futbol topu şeklindeki “fullerene” moleküllerini geliştirmişlerdir. Bu molekül; nano büyüklüğünde, plastikten daha hafif çelikten kuvvetli, elektrik ve ısı geçirgen bir yapıya sahip bu buluşları ile 1996 yılında Nobel Kimya ödülünü almışlardır. Daha sonraki yıllarda ve günümüzde birçok araştırma yapılmış ve yapılmaktadır. 20. yüzyılın son çeyreğinde

ise doğada bulunmayan yeni nano yapıların atomsal düzeyde tasarlanarak sentezlenmesi devri başlamıştır [15].

Nanoteknoloji 1999 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde nanoteknoloji alanında yürütülen araştırma, geliştirme ve ticarileştirme faaliyetlerinin artırma, geliştirme ve ticarileştirme amacını taşıyan ilk resmi hükümet programı olan, Ulusal Nanoteknoloji Adımı (National Nanotechnology Initiative) ile başlatılmıştır. Daha sonra ise Çin, Japonya, Avrupa Birliği, Tayvan, Singapur, İsrail, İsviçre ve Güney Kore gibi ülkeler teknoloji yarışında geri kalmamak için büyük araştırmalar yapmaktadırlar [15, 16]. Ülkemizde ise nanoteknolojinin önemi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM) Projesi ile başlamıştır. Bilkent Üniversitesi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Ege Üniversitesi, Koç Üniversitesi, Sabancı Üniversitesi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Erciyes Üniversitesi gibi kurumlarda ve özel sektör kuruluşlarında birçok çalışma sürdürülmektedir. Ayrıca Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından hazırlanan 2023 vizyon programında da nanoteknoloji önemli yer tutmaktadır [9].

Nanoteknoloji, son yüzyılın en büyük araştırma alanı olarak çıkmakta olup [17, 18, 19, 20] metrenin milyarda biri büyüklüğündeki maddelerin anlaşılması, kontrol edilmesi, atomsal seviyede değiştirilip işlevsel hale getirilmesi ve 100 nanometre (nm) boyutunda orta ölçekli özelliklere sahip cihazların geliştirilmesi ve kullanılması ile ilgilidir [10, 21, 22, 23, 24]. Nanoteknoloji sayesinde ürünlerin iletkenlik, yüksek dayanıklılık, korozyon koruması, su ve kir tutmama, çizik direnci gibi yeni işlev ve özellikler kazanmaktadır. Bu nedenle son dönemde kozmetik, elektronik, ilaç endüstrisi, enerji üretimi, gıda, spor malzemeleri, biyoloji, fizik, kimya, tıp gibi birçok uygulama alanları olan yeni bir bilim dalıdır [7, 8].

Nanoteknolojinin evrensel, çok disiplinli, geleneksel olanı bozması ve olanaklar teknolojisi olması en önemli özellikleridir [9]. Bunların ışığında nanoteknolojinin başlıca kullanım amaçları aşağıdaki gibidir [9, 11]:

1. Nanometre ölçekli yapıların analizi ve imalatı
2. Nano ölçekli cihazların geliştirilmesi
3. Nano hassasiyetli cihazların geliştirilmesi
4. Nanometre boyutunda yapıların fiziksel özelliklerinin anlaşılması
5. Alışıldandan farklı ve üstün malzeme özellikleri/üretim sürelerinin elde edilmesi
6. Daha dayanıklı, hafif ve hızlı yapılar
7. Daha az malzeme ve enerji kullanımı
8. Çevre sorunlarına yeni çözümler üretilmesi
9. Uygun yöntemler bulunarak makroskopik ve nanoskopik dünya arasındaki bağın kurulması.
10. Pratik uygulamalar için başlangıç koşullarının optimize edilmesi

Nanoteknolojinin yer bulduğu kullanım alanları ise şu şekilde sıralanabilir [9]:

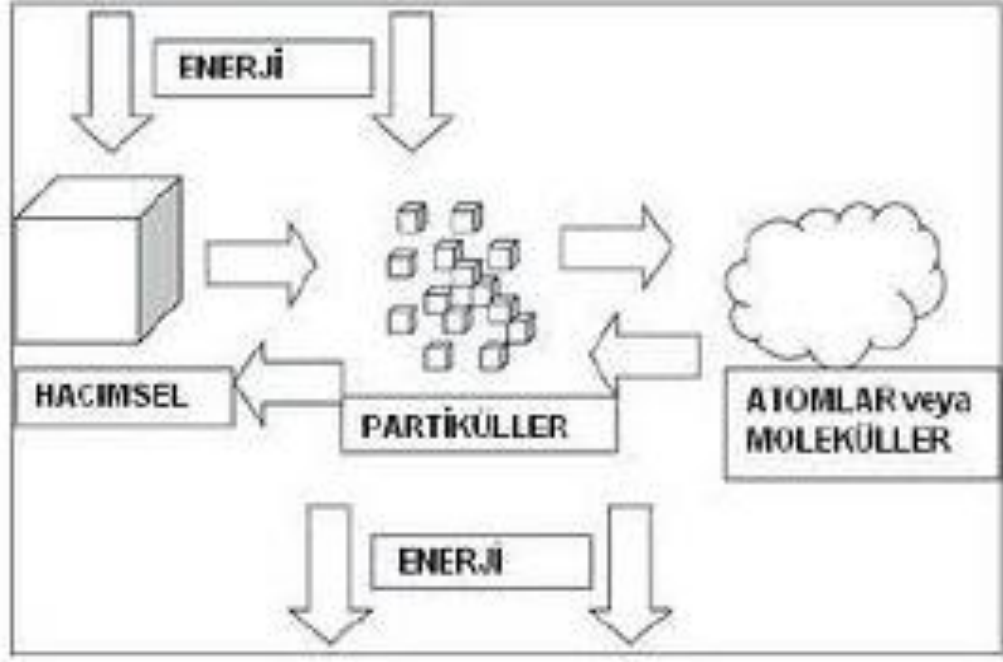
1. **Otomotiv** : Hava ve yağ filtreleri, cilalar, motor yağı, çizilmez yüzey, araba cilası, hava temizleyicileri, yakıt tüketimini iyileştirmek için katalizörler, lastikler vb.
2. **Giyim ve tekstil** : Buruşmaz ve leke tutmaz giysiler, antibakteriyel ve koku önleyici giysiler, antibakteriyel kumaş, UV' ye dayanıklı ve koruyucu giysiler, alev geciktirici kumaşlar.
3. **Kozmetik**: Cilt kremleri ve nemlendiriciler, cilt temizleyicileri, güneş kremleri, makyaj malzemeleri, makyaj gidericiler.
4. **Elektronik**: Piller, elektronik görüntüleyiciler, organik ışık yayan LEDler, veri hafızası, antibakteriyel ve statik önleyici kaplamalar (klavye, mouse, cep telefonları), DVD kaplamaları, MP3 oynatıcıları, bilgisayar işlemcileri ve çipler.
5. **Besin ve Besin Takviyeleri**: Enerji içecekleri, besin takviyeleri, gıda saklama kapları, antibakteriyel mutfak eşyaları, kesme tahtaları, plastik ambalajlar, Nano-çay, kanola aktif yağı vb.
6. **Ev**: Antibakteriyel mobilya ve minderler, antibakteriyel kaplamalı aletler, filtreler, hava temizleyicileri, kendi kendini temizleyen cam, antibakteriyel UV dayanıklı boyalar, ütüler, elektrikli süpürgeler, güneş pilleri, temizlik ürünleri, dezenfektan spreyleyler, yumuşatıcı.

7. **Kişisel Bakım/ Sağlık:** İşitme cihazları, kontak lensler, vücut yıkama, suni deri, implant, diş macunu, şampuanlar, saç kremleri, deodorantlar, böcek kovucular, antibakteriyel kremler, bandaj vb.
8. **Spor Ekipmanları:** Golf topları ve sopaları, tenis raketleri ve topları, beysbol sopaları, Hokey sopaları, kayaklar ve snowboardlar, kayak cılası, bisiklet parçaları, dalgıç kıyafeti, ayakkabı tabanlıkları, antibuğu kaplamalar.
9. **Oyuncaklar ve Çocuk Eşyaları:** Leke dirençli peluş oyuncaklar, antibakteriyel bebek emzikleri, kupalar ve şişeler, oyun kutuları, antibakteriyel doldurulmuş oyuncaklar

Nanopartiküllerin karakteristik özellikleri; nanopartikül, nanokristal ya da nano katman düzeyinde gerçekleşmesi nedeniyle nanoteknolojinin en önemli kısmını nanopartiküllerin sentezi oluşturduğu rapor edilmiştir [21].

Nanopartikül üretiminde kullanılan yöntemler; aşağıdan yukarıya “Bottom Up” ve yukarıdan aşağıya “Top Down” olarak adlandırılan yaklaşımlardır (Şekil 1.1). Yukarıdan aşağıya nanopartikül üretim yönteminde hacimsel malzemeye dışarıdan mekaniksel ve/veya kimyasal işlemler ile enerji verilmesi sonucunda malzeme nano boyutta parçalara ayrılması prensibine dayanmakta olup buna mekanik öğütme ve aşındırma yöntemi en genel örneklerdir. Aşağıdan yukarıya yaklaşımında ise atomik veya moleküler boyuttaki yapıları kimyasal reaksiyonlar ile büyütme ve partikül oluşumunun gerçekleşmesi olarak ifade edilmektedir. Bu yaklaşıma ise en iyi örnek ise gaz yoğunlaştırma tekniğidir [12].



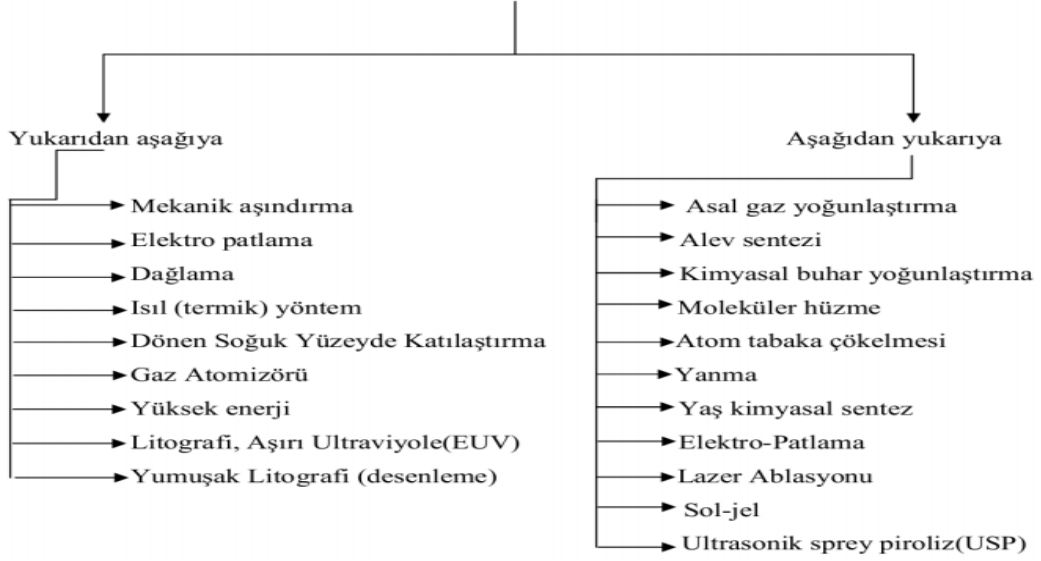


Şekil 1.1: Nanopartikül üretiminde kullanılan yaklaşımlar [12].

Partikül üretiminde yukarıda kullanılan yöntemlerin dışında mekanik enerji kullanılması gibi fiziksel özelliklerin de öne çıkarıldığı yöntemler olan fiziksel ve kimyasal reaksiyonların gerçekleştiği yöntemler ise kimyasal temelli olarak kabul edilmektedir (Şekil 1.2). Bu yöntemlerin başlıcaları ise aşağıdaki gibidir [25, 12]:

1. Kimyasal Buhar Yoğunlaştırma Yöntemi
2. Hidrojen Redüksiyon Yöntemi
3. Asal Gaz Yoğunlaştırma (AGY) Yöntemi
4. Mikroheterojen Sistemlerden Nanopartikül Üretimi
5. Alev Sentezi Yöntemi
6. Mekanik Aşınma Yöntemi
7. Ultrasonik Sprey Piroлиз (USP) Yöntemi
8. Diğerleri

## ÜRETİM YÖNTEMLERİ



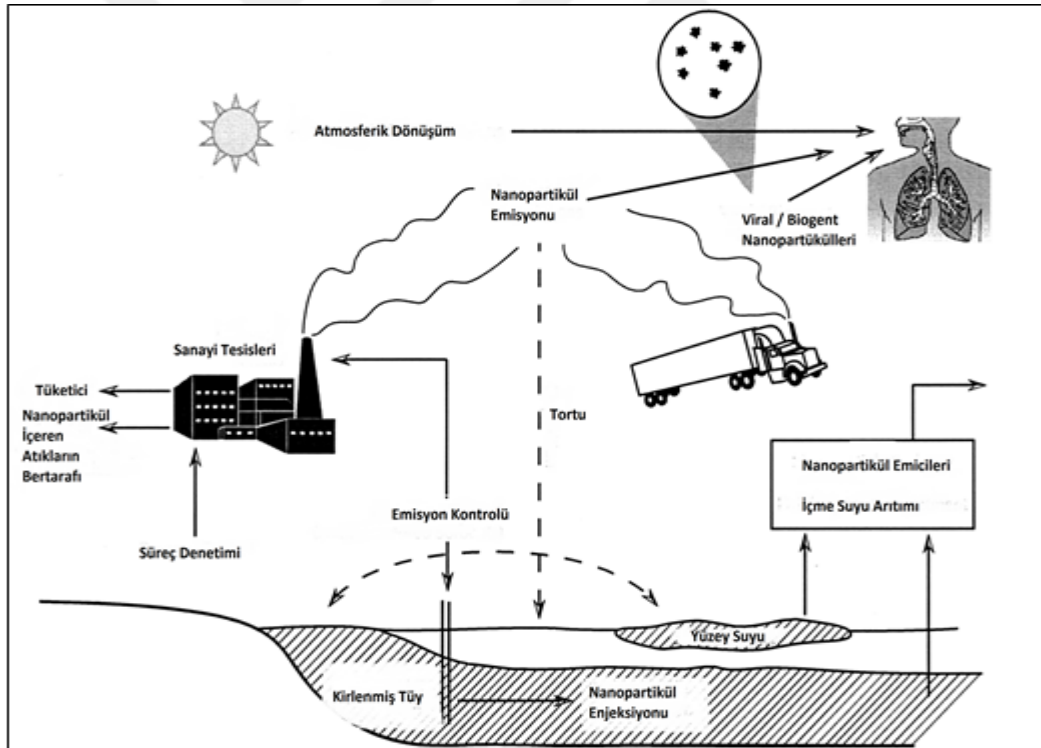
Şekil 1.2: Nanoboyutta parçacık üretim yöntemleri [26].

Nanopartiküller yukarıdaki yöntemlerin yanında canlı organizmalar kullanılarak da sentezlenebilmektedir. Bunlara örnekler ise *Penicilium fellutanu* ve *Aspergillus niger* mantar türlerinden, *Sargassum wightii* ve *Sargassum muticum* alg türlerinden, *Callyspongia diffusa* sünger türü gibi canlı materyalleri kullanarak nanopartikül biyosentezi gerçekleştirilebilir [27, 28, 29, 30, 31].

NP üretiminde kullanılan fiziksel ve kimyasal yöntemler ile kısa sürede yüksek çözünürlükte, istenilen küçüklükte NP üretilmesine rağmen toksisitesinin yüksek olması, partikül kararlılıklarının iyi olmaması, yeni teknolojilerin pahalı olması gibi nedenlerle daha iyi ve verimli teknolojilerin araştırmaları devam etmektedir. Buna dayanarak canlılarla olan araştırmalar artmıştır. Yeşil nanoteknoloji olarak tanımlanan toksik içeriği az, çevre dostu canlı hücrelerden NP üretim esasına dayanır. Yeşil nanoteknoloji ile insan sağlığına zararsız, atık ürünler problemini azaltacak çalışma yöntemlerini ifade etmektedir [15]. Bunlara örnek olarak AgNP' lerinin yeşil nanoteknoloji ile fizyokimyasal yöntemlerin sakıncalarını gideren gümüş tuzları üzerinde çalışmak için, bakterilerin, mantarların, mayaların, alglerin veya bitki

özlerinin, indirgeyici ve/veya stabilize edici olarak kullanılması hedeflenmiştir [32]. Bu amaçla *Aloe vera*, *Camellia sinensis* (çay), *Azadirachta indica* (ihlamur), *Acalypha indica* (hint ısırganı), *Jatropha curcas* (hint fıstığı), örnek verilebilir. Gümüş nanopartikül üretiminde kullanılan bazı bitkiler; *Allium sativum*, *Acalypha indica*, *Boswellia ovalifoliolata*, *Camelia sinensis*, *Calotropis procera*, *Catharanthus roseus*, *Citrus sinensis peel*, *Coleus aromaticus*, *Melia azedarach*, *Memecylon edule*, *Mentha piperit*, *Nelumbo nucifera*, *Rhododendron dauricum*, *Syzygium cumini*, *Trachyspermum copticum*' dur [15].

Çeşitli yollarla üretilen nanopartiküller toprak ve su yolu ile denize ve okyanuslara ulaşmakta ve çevre sorunlarını oluşturmaktadır (Şekil 1.3) [33].



Şekil 1.3: Çevredeki nanopartiküllerin şematik gösterimi [34].

NP içeren ürünlerin miktarı ve görüntülenmesi ile ilgili bilgilerin ve nanopartiküllerin nasıl taşındığının tam olarak bilinmemesinden dolayı NP'lerin mevcut üretimi, yayılması ve akış kat sayısını tahmin etmenin çok zor olduğu görülmektedir. Günümüzde 100 nm' den büyük moleküller temel alınarak modelleme ve teoriler ortaya atılmasına rağmen 100 nm' nin altına inildiğinde ise yapılan modellemeler ve teoriler yetersiz kalmaktadır. Bu noktada nanoteknoloji devreye girmekte olup atom ve moleküllere yeni fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler kazandırmaktadır. Modelleme çalışmalarının çok fazla yapılamamasındaki temel sorun, biyolojik ortam ya da çevredeki nanopartikülün karakterizasyonu ve tanımını yapmak için gerekli olan in-situ tekniklerin ve ekipmanların eksik olmasından kaynaklanmaktadır [35].

Nanopartiküllere maruz kalmanın değerlendirilmesi için hem ölçüm (fiziksel, kimyasal ve biyolojik) hem de modelleme gerekmektedir. Nanoteknoloji ve sürdürülebilir teknolojiler için çevresel risk değerlendirilmesinin ve ekotoksikolojik çalışmaların yapılması en başta gelen kriter olmaktadır [36].

Nanoteknolojik gelişmeler sonucunda her gün yeni bir ürün geliştirilmektedir ve kullanım alanları artmaktadır. İnsan ve çevre kalitesini artmasını sağlarken aynı zamanda insan ve çevre için büyük tehlikeler yaratmaktadır. İnsan tarafından solunması durumunda veya hava ile maruz kaldığında deri yolu ile veya solunum yoluyla deri yoluyla hücrelere oradan da değişik doku ve organlara ulaşabilmekte olup serbest radikal oluşumlara sebebiyet vereceği göz ardı edilmemelidir. Aynı şekilde sucul ekosisteme ulaşan nanopartiküller zararlı organizmaları yok ederken yararlı organizmaları da yok ettiği bilinmektedir. Sucul ortamda balık ve diğer canlıları da aynı şekilde etkileyeceği kaçınılmazdır [11].

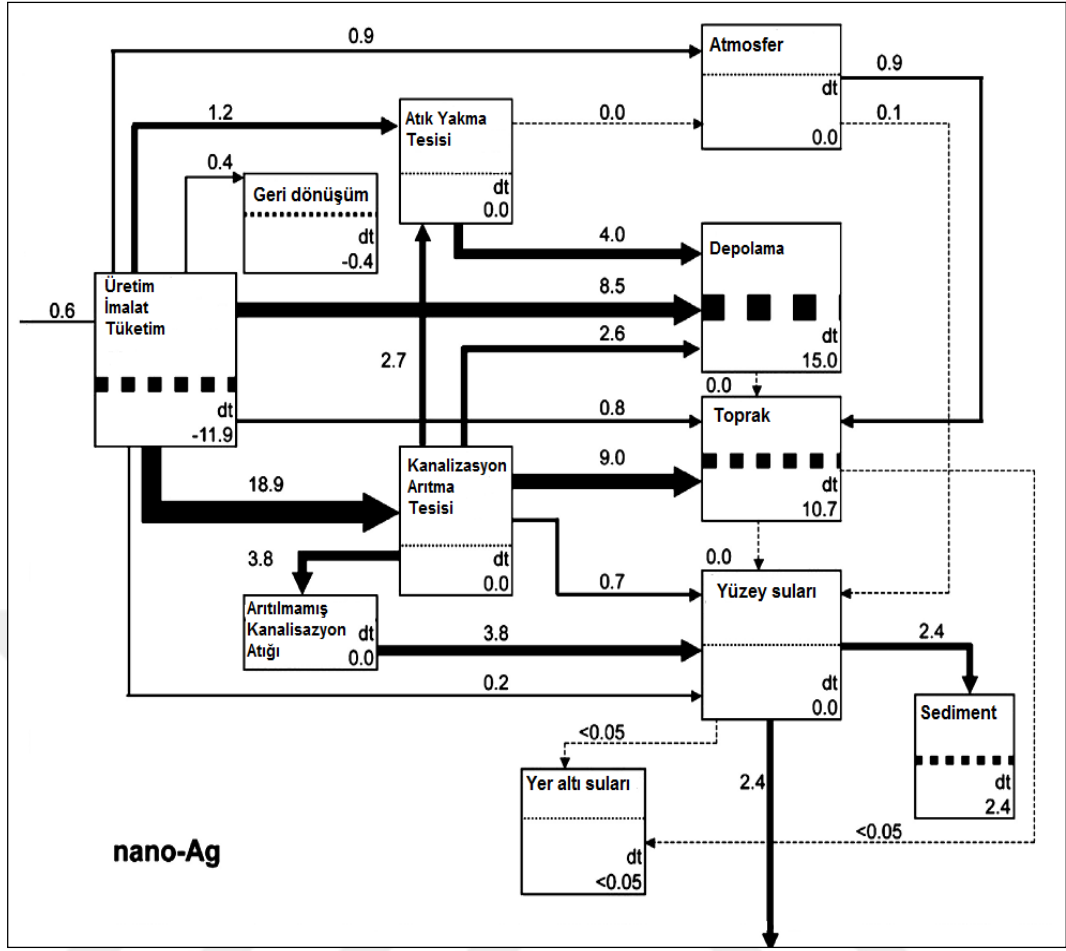
Nanoteknolojideki gelişmeye bağlı olarak çalışmamızın konusunu da oluşturan gümüş ve AgNP ile yapılan çalışmalar artmıştır. Gümüş ilk başlarda gümüş nitrat, gümüş sulfadiazin, gümüş zeolit olarak formlarında kullanılmıştır. Eski çağlardan beri kullanılan gümüş süte ömrünü raf ömrünü uzatmak için, suyun içine atılarak eklendiğinde antibakteriyal olarak suyun dezenfeksiyonunda, ülser ve yanık

tedavilerinde, göz damlalarında kullanılmaktadır. Antifungal ve antiviral özelliklerinden dolayı gümüş sülfadiazin *S. aureus*, *E. coli*, *Klesiella* sp. ve *Pseudomonas* sp. gibi bakterilere karşı etkili olduğu bildirilmiştir [15]. Gümüş nanopartiküllerinin gümüş tuzlarından üstün olduğu ve gümüş iyonlarından daha düşük toksisitede olduğunu kanıtlanmıştır. AgNP' lerin yüksek antibakteriyel özellikleri fizikokimyasal (boyut, morfoloji, yük, kararlılık vb.) özelliklerine bağlıdır. AgNP' ler ticari olarak tüm nanortiküllerin %50' sini oluşturduğu pazar araştırmalarında görülmüştür. Antibakteriyel ve antifungal özellikleri ile tekstil, su arıtımı, ziraat, boya sanayi, kakatli yiyecek ve içecek sektöründe AgNP kullanımı gittikçe artmaktadır [37, 38]. Arya ve arkadaşlarının (2019) yaptığı AgNP ile boyut antibakteriyel etki çalışmasında 5, 7 ve 10 nm AgNP' leri denenmiş ve 5 nm AgNP' ün daha etkili olduğunu ifade etmişlerdir [37].

Gümüş, diğer antibakteriyel metaller olan kurşun ve cıva gibi insana karşı toksik etki yapmaz. Yine bu metaller gibi kansere neden olma ya da sinir sistemine zarar verme gibi etkileri olmadığı bilinmektedir. Bu yüzden gümüş en çok kullanılan antibakteriyel ajandır [39, 40, 41].

Gümüşün antibakteriyel özelliği gümüş miktarı ve serbest gümüş oranı ile ilişkilidir. Metalik gümüş vücuttan atılabilir ancak deri, nem ve yara sıvısı ile reaksiyona girerse iyonize olur. İyonize gümüş doku proteinlerine bağlanan, hücre bozuklukları ve ölümlere yol açan ve bakteriyel hücre duvarında yapısal değişiklikler oluşturan bir reaktiftir. Ayrıca gümüş bakteriyel DNA ve RNA bağlanarak bakteriyel replikasyonu inhibe edebilir [42, 43].

Çalışma materyalimizi de oluşturan gümüş nanopartikülleri çeşitli tüketim ürünlerinden kaynaklanan çevreye AgNP bulaşma yollarının simülasyon sonuçları Şekil 1.4' te gösterilmiştir [5].



Şekil 1.4: AgNP' lerinin ton/yıl olarak simülasyon sonuçları [5].

AgNP, sprey ve temizlik malzemelerinin kullanılmasıyla ve nanopartikül içeren ürünlerin aşınması yoluyla atmosfere bulaşmaktadır. Toprağa AgNP girişi ise ağır metal iyonları, poliklorlanmış hidrokarbonlar, pestisitler ve radyoaktif ile kontamine olmuş toprakların iyileştirilmesi için kullanılan uygulamalardan ve boyalar, temizlik malzemeleri, sprey kullanımı sonucu yol yüzeyinden toprağa geçtiği tahmin edilmektedir. Buna ek olarak havadaki AgNP birikimi ve atmosferik yayılımı da AgNP' lerinin toprağa başka bir giriş yolu olarak gösterilebilir. Yüzey sularına AgNP' lerinin girişi; atmosferik çökme, topraktan süzülme, atık su deşarjları ile olmaktadır [44]. Dünya çapında yıllık 63 ton nano gümüşün suya giriş yaptığı tahmin edilirken sucul ortamlardaki nano gümüşün konsantrasyonu ise 0.03 - 0.32  $\mu\text{g/L}$  aralığında olduğu tahmin edilmektedir [45, 46]. Johari ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı çalışmada piyasada bulunan ürünlerin % 23.52' si nano gümüş içerdiği bildirilmiştir

[47]. AgNP' lerinin sucul ortama önemli bir diğer giriş kaynağı ise nano gümüş içeren çorapların yıkama sularının çevreye yayılması ile olmaktadır ([48] ve 2008 yılında yapılan çalışmada da çorapların gram başına 1360 µg AgNP içerdiği belirtilmiştir [49]).

NP' ler biyolojik membranlardan rahatlıkla geçip organ, doku, hücre ve protein düzeyinde ters etkilere sebep olabilmekte [50] ve nanoboyutlu yapılarından dolayı mikropartiküler sistemlere kıyasla hücre içine daha fazla alındığı bildirilmiştir [51].

AgNP' nin Avrupa ve ABD' deki değişik ortamlarda olası çevresel konsantrasyonları ve risk katsayı değerleri Tablo 1.1' de; tatlı sulardaki tahmini çevresel konsantrasyonu Tablo 1.2' de belirtilmiştir.

Tablo 1.1: AgNP' nin Avrupa ve ABD' deki farklı çevresel bölümlerdeki tahmini çevresel konsantrasyonları ve risk katsayı değerleri [5].

	Avrupa		ABD	
	Konsantrasyon ( mod değeri )	Risk katsayısı ( RQ)	Konsantrasyon ( mod değeri )	Risk katsayısı ( RQ)
Toprak	22.7		8.3	
İşlenmiş kanalizasyon atık çamuru	1581		662	
Yüzey suyu	0.7	1.1	0.1	0.2
Kanalizasyon arıtma tesisi atığı	42.5	61.1	21.0	30.1
Kanalizasyon arıtma tesisi çamuru	1.7		1.6	
Sediment	952		195	
Hava	0.008	< 0.0005	0.002	<0.0005

Tablo 1.2: Gümüş nanopartiküllerinin tatlı sulardaki tahmini çevresel konsantrasyonu [52].

Ortam	Birim	Minimum	Orta	Maksimum
Nehir suyu	ng/L	40	140	320
Nehir sedimenti	mg/kg	2	6	14



NP' lerin toksik etkileri partikül boyutu, aglomerasyon/agregasyon derecesi, şekli, boyutu, yüzey alanı, kimyasal kompozisyonu, kristal yapısı, yüzey kimyası, yüzey yükü, miktarı, çözünürlüğü gibi fiziko-kimyasal parametrelere bağlıdır. NP' lerin hücredeki toksik etki mekanizması henüz kesinlik kazanmasa da elde edilen bulgular aşağıdaki gibidir [50]:

1. Genel olarak reaktif oksijen türlerinin ( ROT ) oluşumuna,
2. Mitokondriyal fonksiyonlarda hasarlara,
3. Hücre ve plazma membran geçirgenliğinde artışa,
4. Apoptoz ya da nekroz yoluyla hücre ölümüne,
5. Gen ve protein düzeyinde etkileşimlere sebep olabilmektedir.

NP' lerin çok farklı alanlarda kullanılmasına rağmen toksik ve ekotoksikolojik etkilerini anlama gereklilik nedeni NP toksisitelerinin büyük sorun oluşturmaya devam etmesinden kaynaklanmaktadır [53]. Ekotoksikolojik veriler kıyasal bir bölgenin kontrol stratejilerinin belirlenmesinde fiziksel, kimyasal, biyolojik ve mikrobiyolojik izlemelerden bir öneme sahip olup, bölgenin kirliliğinin belirlenmesi için iki parametreye bakılması gerektiği bildirilmiştir. Bunlar [54].;

1. Hangi kirleticinin var olduğunu saptamak
2. Biyota üzerine bu kirleticilerin olası etkilerini araştırmak

Bu parametreleri değerlendirebilmek için model canlılara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu model canlılardan biri Ekinodermler olup kirleticili toksisitesini değerlendirmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Ekinodermlerden deniz kestaneleri de deniz suyu kalitesinin değerlendirilmesi, ekoloji, biyoloji, embriyoloji, toksikoloji ve biyolojik mineralizasyon gibi çeşitli çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır [55, 56, 57, 58].

Deniz kirliliğinin izlenmesi çalışmalarında ve biyotestlerin etkisinin belirlenmesinde avantajlara sahip olduğu için deniz kestanesi larval biyotestinin ilk dört biyotest arasında yer almaktadır. Deniz kestaneleri embriyoları ve gametleri ile gerçekleştirilen biyotestlerin sağladığı avantajlar aşağıdaki gibidir [54]:

1. Metazoan organizma ile çalışma olanağı vermektedir.
2. Üreme başarısı, embriyogenesisiz ve mitotik aktivite üzerinde çok sayıda biyolojik sonuç gözlemlenebilmektedir.
3. Test organizmasını neredeyse tüm yıl boyunca elde etmek mümkündür.
4. Yüksek üreme yeteneği nedeniyle tek seferde çok sayıda embriyo elde etmek mümkündür.
5. Hızlı ve duyarlı cevaplar alınabilmektedir.
6. Maliyet çok düşüktür ve pahalı ekipman gerektirmemektedir
7. Bu test sistemi kozmopolitandır.
8. Sub-letal toksisitenin belirlenmesine olanak sağlamaktadır.
9. Temel alınacak literatür boldur.
10. Öğrenilmesi kolaydır.
11. Veriler istatistikî analizler için uygundur.

Yapılan literatür taramasında *A. lixula*'nın embriyonik gelişimi üzerine AgNP ve AgNO<sub>3</sub>'ün etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmanın amacı ise <100 nm ve 100> nm boyutlarındaki AgNP'ün değişik konsantrasyonları ile AgNO<sub>3</sub>'ün deniz biyotası üzerine etkilerini *A. lixula* deniz kestanesinin larvalarını kullanarak belirlemektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Literatür özeti

Nanopartiküller ile ilgili yapılan ilk çalışmalar derleme çalışmalarıdır. Denizel nanotoksosite ile ilgili çalışmalar son yıllarda başlamıştır. Gümüş nanopartikülleri ile ilgili yapılan çalışmaların bazıları ise şunlardır:

Desai ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptıkları çalışmada Caco-2 hücrelerinin içerisine nanopartiküllerin girişi ile mikroparçacıkların çapı (0.1  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$  ve 10  $\mu\text{m}$ ) arasındaki ilişkisi ve etki yüzdeleri araştırılmış olup etki 0.1  $\mu\text{m}$  > 1  $\mu\text{m}$  > 10  $\mu\text{m}$  şeklinde sıralanmıştır [59].

2004 yılında Sondi ve Salopek-Sondi tarafından yapılan çalışmada AgNP' lerin antimikrobiyal etkisi *Escherichia coli* gram negatif bakterisi kullanılarak araştırılmıştır. 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^{-3}$  konsantrasyonda AgNP' lerinin bakteriyel büyümeyi %70 oranında durdurduğu, 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^{-3}$  konsantrasyonda bakteriyel kolonilerin büyümesinde önemli oranda azaldığı, kolonilerin agar plakların kenarlarına yerleştiği ve 50 – 60  $\mu\text{g}/\text{cm}^{-3}$  konsantrasyonda ise bakteri büyümesinin %100 oranında inhibe ettiği rapor edilmiştir. Bu elde edilen sonuçlara göre AgNP' lerin çok etkili bir bakteri öldürücü olduğu bulunmuştur [60].

AgNP' lerin antimikrobiyal etkileri üzerine yapılan bir başka çalışmada ise *E. coli* ve *Staphylococcus aureus* kullanılmıştır. AgNP' lerinin *S. aureus* üzerinde büyümeyi engelleyici etkisi az iken *E. coli* üzerinde çok düşük konsantrasyonlarda dahi inhibe edici özelliği göstermiştir. *E. coli* ye karşı MIC (Minimum Inhibitory Concentration = Minimum Engelleyici Konsantrasyonu) değerinin 3.3 nM - 6.6 nM arasındaki değerler olduğu görülmüştür. Pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise 33 nM AgNP konsantrasyonunun mayalara karşı benzer büyümeyi engelleyici etki

göstermiştir. En yüksek büyümeyi engelleyici konsantrasyonun 13.2 nM olduğu ve AgNP' lerinin mayalara karşı MIC değerinin 6.6 nM - 13.2 nM arasında olduğu rapor edilmiştir [61].

2008 yılında Navarro ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise AgNO<sub>3</sub> ve AgNP' lerinin *Chlamydomonas reinhardtii* üzerindeki EC<sub>50</sub> değeri 188 nM, 2 saat için ise 184 nM olduğu ve AgNP' leri için ise 1 saat sonunda 3300 nM, 2 saat sonunda 1049 nM olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre *C. reinhardtii* AgNO<sub>3</sub>' ın AgNP' lerine göre yaklaşık olarak 18 kat daha toksik olduğu bildirilmiştir [62].

AgNP' lerinin *Daphnia pulex* üzerine 48 saatlik sürede toksik etkisine bakıldığında 40 µg/L olduğu rapor edilmiştir. Nanometal toksisitesinin duyarlılığının, türler arasında farklılık gösterdiği ve filter-feeding beslenen omurgasızların zebra balığı gibi daha büyük organizmalara göre daha hassas olduğu ifade edilmiştir [63].

Zebra balığı (*Danio rerio*) embriyoları yapılan bir başka çalışmada ise AgNP toksisitesinin konsantrasyona bağlı olmasının yanında kalp atış hızının düşmesi, yüksek ölüm oranı, zebra balığı embriyolarında yumurtadan çıkma gecikmeleri toksisite göstergeleri arasında olduğu bildirilmiştir [64].

Zebra balığı ile yapılan bir başka çalışmada ise 3, 10, 50, 100 nm boyutlarındaki AgNP' ün toksik etkisi incelenmiş ve LC<sub>50</sub> değerlerinin 3 nm için 93 µM, 10 nm için 126 µM, 50 nm için 127 µM ve 100 nm için ise 137 µM olduğu rapor edilmiştir [65].

Chae ve arkadaşları tarafından 2009 yılındaki çalışmada AgNP ve AgNO<sub>3</sub>' ın Japon medeka balığı (*Oryzias latipes*) üzerine toksik etkileri araştırılmıştır. AgNP' leri için LC<sub>50</sub> konsantrasyonunun 34.6 ± 0.9 µg/L, AgNO<sub>3</sub> için 36.5 ± 1.8 µg/L, hem AgNP hem de AgNO<sub>3</sub> için ise 25 µg/L konsantrasyonda ölümlerin görülmeye başladığı

belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *O. lapites* için AgNP' lerin AgNO<sub>3</sub>' a göre daha toksik olduğu gösterilmiştir [66].

Ringwood ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan çalışmada AgNP' lerinin *Crassostrea virginica* embriyoları üzerine etkisi araştırılmış ve düşük konsantrasyonlarda embriyonik gelişim üzerine toksik etkileri olduğunu belirtilmiştir. Ayrıca Metalloproteinler (MT) gen ekspresyonu hem embriyolar hem de yetişkin bireyler üzerinde değerlendirilmiş olup 0.16 µg/L konsantrasyonda AgNP' lerine maruz kalan yetişkin ve embriyolarda Metalloproteinler mRNA düzeylerinde bir artışın olduğu gözlenmiştir [67].

<50 nm boyutundaki AgNP' lerinin ve AgNO<sub>3</sub> 'in genotoksik ve ekotoksik değerlendirmeleri 0.1, 1, 2, 4, 8 ve 50 µg/L konsantrasyonlarda tatlı su kabuklusu olan *Daphnia magna* ile yapılmıştır. 2 µg/L ve üzerindeki konsantrasyonlarda tüm *D. magna* bireylerinin öldüğü bildirilmiştir. 1 ve 1.5 µg/L konsantrasyonda AgNP ve AgNO<sub>3</sub>' a maruz kalan bireylerde DNA zincir kırıklarında önemli artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca AgNP' lerinin AgNO<sub>3</sub>' a göre çok az daha toksik olduğu belirtilmiştir [68].

2011 yılında Bilberg ve arkadaşları tarafından Zebra balığı (*D. rerio*) üzerine AgNP' leri ile AgNO<sub>3</sub>' in toksik etkisi araştırılmıştır. Erkek zebra balığı bireylerinin 48 saat boyunca AgNP' lerine maruz kalması sonucunda oluşan akut toksisitenin LC<sub>10</sub> değeri 57 µg/L iken LC<sub>50</sub> değeri ise 84 µg/L iken olarak bulunmuştur. 44.5 - 216 nm arasında AgNP içeren ortamda 48 saat boyunca maruz bırakılan zebra balıklarında ise LC<sub>50</sub> değeri 7.07 µg/L olarak bildirilmiştir. AgNO<sub>3</sub> için LC<sub>50</sub> değeri 24 saatte 28 µg/L, 48 saatteki 25 µg/L olduğu rapor edilmiştir [69].

2011 yılında Knight tarafından *Echinarachnius perma* ile yapılan çalışmada AgNO<sub>3</sub>' ün akut toksisitesi değerlendirilmiş ve normal koşullar altında döllenme başarısı ile AgNO<sub>3</sub> eklendikten sonraki döllenme başarısı karşılaştırılmıştır. AgNO<sub>3</sub>'

ın  $10^{-9}$  M konsantrasyonda kontrol grubuna oranla %20 - 30 oranında azalma olduğu belirtilmiştir [55].

Yeşil makro alglerden olan *Ulva lactuca* 48 saat süresince farklı konsantrasyonlardaki AgNP ve AgNO<sub>3</sub>' a maruz bırakılmıştır. AgNP 15 µg/L' den daha yüksek konsantrasyonda toksik etki görülürken AgNO<sub>3</sub> ise 2.5 µg/L gibi düşük konsantrasyonda toksik etki göstermiştir. Böylece *U. lactuca* için AgNO<sub>3</sub>' ün AgNP' lere göre daha toksik olduğu gösterilmiştir [70].

Sucul omurgasızlardan olan *D. magna* üzerine 35 nm boyutundaki AgNP' lerin 0 – 10 mg/L konsantrasyon aralığında 96 saatteki ölüm oranları araştırılmıştır. Çalışmada ölüm oranları 0.1 mg/L' de %56.7 ± 23.3 ve 1 mg/L' da ise %100 olarak bulunmuştur. Buna göre AgNP' lerinin çevreye yayıldıktan sonra sucul omurgasızlar için zararlı olduğu bildirilmiştir [71].

2012 yılında Asghari ve arkadaşları tarafından çalışmada *D. magna* 48 saat boyunca AgNP' lerin ve AgNO<sub>3</sub>' in farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılması sonucunda meydana gelen yüzme anormallikleri incelenmiştir. Bu çalışmada AgNP' lerinden 15.83 nm çapında olanları nAg1, 129 nm çapında olanlara nAg2 ve 161 nm çapında olanlar ise nAg3 olarak adlandırılmıştır. EC<sub>50</sub> değerleri nAg1 için 0.004 mg/L, nAg2 için 0.002 mg/L, nAg3 için 0.187 mg/L ve AgNO<sub>3</sub> için 0.0023 mg/L olarak bildirilmiştir. Aynı sürede %100 ölüme neden olan konsantrasyonlar ise nAg1 için 0.006 mg/L, nAg2 için 0.00325 mg/L, nAg3 için 0.275 mg/L ve AgNO<sub>3</sub> için 0.0032 mg/L olarak bulunmuştur. nAg1 için 0.001 mg/L konsantrasyonda normal yüzme davranışları görülürken bunun üzerindeki konsantrasyonlarda düzensiz yüzme, nAg2 için çoğunlukla dibe göç ve su yüzeyinde hareketsiz kalma hali, nAg3 için 0.1 mg/L konsantrasyonda düzensiz yüzme, bunun üstündeki konsantrasyonlarda ise dibe göç ve su yüzeyinde hareketsiz kalma hali görüldüğü rapor edilmiştir. AgNO<sub>3</sub> için 0.001 mg/L konsantrasyonda anormal yüzme oranının %6.6 olduğu belirtilmiştir. Ayrıca AgNO<sub>3</sub> için sadece dibe göç ve su yüzeyinde hareketsiz kalma görüldüğü bildirilmiştir [72].

*Paracentratus lividus* türünde AgNP' lerin birikimi üzerine yapılan çalışmada 51 saat süreyle 0.3 mg/L AgNP ye maruz kalan larvalar incelenmiştir. Bu incelemelerin X-Ray Near Edge Structure (XANES) ve Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) kullanılarak yapıldığı belirtilmiştir. XANES sonuçları AgNP' lerin toplanmasının kükürt ve Oksijen/Azot ligandları ile kompleks ve oksitlenmiş olabileceği gösterilmiştir. FTIR ölçümlerinde ise nanopartiküle maruz kalan deniz kestanelerinde aşırı sülfat varlığı ve iskeletlerinden kalsit kaybı olduğu rapor edilmiştir [56].

Jiang ve arkadaşları tarafından 2012 yılında su mercimeği (*Spirodela polyrhiza*) ile AgNO<sub>3</sub> ve AgNP ile yaptıkları çalışmada AgNO<sub>3</sub> AgNP' den daha toksik olduğu bulmuşlardır. Kuru ağırlıkta EC50 değeri AgNO<sub>3</sub> için 17.67 ve AgNP için 13.39 ise ölçmüşlerdir [73].

*Eisenia andrei* türü solucan kullanılarak AgNP ve AgNO<sub>3</sub> ile ilgili çeşitli denemeler yapılmıştır. Solucanlarda AgNP' lerinden gelen Ag' ün AgNO<sub>3</sub>' tan gelen Ag iyonu alımından daha yüksektir. Dokulardaki Ag miktarının doza bağlı olmadığı ifade edilmiştir. Ayrıca solucanlarda Ag miktarının artmasının üremeyi durdurucu bir etki yapmadığı açıklanmıştır [74].

Gökkuşığı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) farklı yaşam evrelerinde (larva, genç bireyler ve eleutheroembriyolar) AgNP' lerin farklı konsantrasyonlardaki (100, 32, 10, 3.2, 1, 0.32, 0.1, 0.032 mg/L) toksik etkileri araştırılmıştır. 96 saat sonunda LC50 değerleri eleutheroembriyolar için 0.25 mg/L, larvalar için 0.71 mg/L ve genç bireyler için de 2.16 mg/L olarak bulunmuştur. Genç bireylerde %100 ölüme neden olan en düşük AgNP konsantrasyonunun 3.2 mg/L, eleutheroembriyolarda ise 1 mg/L olduğu bulunmuştur. Bu yaşam evrelerinde NOEC değerleri (No Observed Effect Concentration = Hiçbir etkinin gözlenmediği konsantrasyon) eleutheroembriyos için 0.01 mg/L, larvalar için 0.32 mg/L ve genç bireyler için ise 1 mg/L iken LOEC

değerleri (Lowest Observed Effect Concentration = Herhangi bir etkinin gözlemlendiği en düşük konsantrasyon) eleutheroembriyoları için 0.08 mg/L, larvalar için 0.36 mg/L ve genç bireyler için 1.60 mg/L olarak rapor edilmiştir. AgNP'lerine maruz kalan balıklarda solungaçlarda mukus salgısının arttığı ve yüksek AgNP konsantrasyonlarında (>1 mg/L) balıkların solungaç yüzeylerinde mukus-nano gümüş karışımı olduğu belirtilmiştir [75].

AgNP'lerinin bakterilerin gelişimi üzerine yapılan çalışmada *E. coli* için 5 mm, *Proteus mirabilis* ve *Salmonella typhi* için 4 mm, *Salmonella paratyphi* için ise 3 mm'ye kadar gelişim olduğu belirlenmiştir. Bu elde edilen sonuçlar AgNP'lerinin antimikrobiyal kontrol sistemleri ve tıbbi cihazlarda kullanılan çeşitli mikroorganizmaların büyümesini engellemede inhibitör olarak kullanılabileceği gösterilmiştir [31].

2013 yılında Oukarroum ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada AgNP'lerinin toksik etkileri sucul bir bitki olan *Lemna gibba*'nın büyüme ve hücre canlılığı belirlenerek araştırılmıştır. Bunun için AgNP'lerinin farklı konsantrasyonları (0, 0.01, 0.1, 1 ve 10 mg/L) incelenmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. AgNP'lerine 1 ve 10 mg/L konsantrasyonda maruz kalan bitkinin yapraklarında %40 - 45 azalma olduğu, 10 mg/L konsantrasyonda büyümeyi %44 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca yaprak sayısına bakılarak belirlenen EC<sub>50</sub> değeri 9.36 mg/L olarak rapor edilmiştir. *L. gibba* bitkisindeki toplam Ag miktarları ise: 0.01 mg/L' de  $7.72 \times 10^{-3}$  mg/mg, 0.1 mg/L' de  $9.5 \times 10^{-3}$  mg/mg, 1 mg/L' de  $11.3 \times 10^{-3}$  mg/mg, 10 mg/L' de  $17.5 \times 10^{-3}$  mg/mg olarak rapor edilmiştir. Bu sonuçlar da bitkideki Ag alım miktarının sulu çözelti içindeki AgNP miktarına bağlı olarak değiştiğini ve hücre canlılığına bakıldığında ise kontrol grubuna göre 10 mg/L AgNP konsantrasyonunda %80 oranında azalma meydana geldiği gösterilmiştir [76].

Massarsky ve arkadaşları tarafından 2013 yılındaki çalışmada zebra balığı (*D. rerio*) üzerinde AgNP ve AgNO<sub>3</sub>'ün toksik etkileri değerlendirilmiştir. Zebra balıklarında 96 saat maruziyetten sonra LC<sub>50</sub> değerleri AgNP için 1.18 µg/L, AgNO<sub>3</sub>



için 0.07 µg/L olarak belirtilmiştir. Bu sonuca göre zebra balıklarında AgNO<sub>3</sub>' in AgNP' lerine göre daha toksik olduğu gösterilmiştir [77].

*P. lividus* deniz kestanesinin erkeklerinden elde edilen spermler 0.0001 - 1 mg/L arasında değişen konsantrasyonlarda AgNP içeren deniz suyuna maruz bırakılmış ve döllenme yeteneğini etkilemediği belirtilmiştir. Buna ek olarak, larvaların enzimatik aktiviteleride ölçülmüş ve asetilkolinesteraz (AChE) ile propionilkolinesteraz (PrChE) aktivitesinin AgNP ye maruz kalan tüm konsantrasyonlarda değiştiği ve nörotoksik hasarlara neden olduğu gösterilmiştir [78].

*P. lividus* üzerine AgNP' lerin aynı konsantrasyondaki AgNO<sub>3</sub>' dan daha toksik olduğu gösterilmiştir. 0.03 mg/L konsantrasyona maruz kalan larvalarda gelişim gecikmesi, kaybolmuş vücut simetrisi, dengesiz yüzme davranışları, kısa/düzensiz kollar gibi farklılıklar olduğu belirtilmiştir. 0.3 mg/L konsantrasyondaki AgNP ile muamele edilen larvaların yaklaşık olarak %93' ünde geç prizma/erken pluteus gibi gelişim kusurları, %70' inden fazlasında ise kısa kollar ve küçük kalsit spiküllere sahip olduğu ve 3 mg/L konsantrasyonda ise larvalarda hiçbir embriyonun blastula/gastrula safhasına ulaşamadığı bildirilmiştir [47].

Yapılan bir diğer çalışma ise Gökkuşuğu alabalığında (*O. mykiss*) 11. ve 21. gündeki AgNP' lerinin birikimi ve histopatolojik etkileri araştırılmasıdır. Bu çalışmada toz gümüş (pAgNP) ve kolloidal gümüş (cAgNP) olmak üzere 2 farklı form kullanılmış solungaç, bağırsak, karaciğer ve böbreklerdeki histolojik değişiklikler ile solungaç, bağırsak karaciğer ve kaslarda birikimi incelenmiştir [51].

Küçük tatlı ve tuzlu su balıklarının solungaçları üzerine AgNP ve AgNO<sub>3</sub>' in etkisini belirlemek için yapılan çalışmada iki farklı konsantrasyon kullanılmıştır. AgNO<sub>3</sub> için 1.3 ve 3.7 µg/L, AgNP için 15 ve 39 µg/L konsantrasyona maruz bırakılmıştır. AgNO<sub>3</sub>' in 1.3 µg/L konsantrasyonda toplam mukus goblet hücre

sayısını yükselterek tedavi sağladığı belirtilirken AgNP' lerinin de en yüksek toksisiteye sahip olduğu bildirilmiştir [79].

Zebra balığı (*D. rerio*) balıklarının solungaçları üzerine AgNP' lerinin öldürücü konsantrasyonlarda histopatolojik etkilerinin araştırıldığı çalışmada AgNP' lerine 4 gün maruz kalmanın sonucu olarak vakuolizasyon, anevrizma, hiperplazi, ödem, füzyon, hipertrofi ve nekroz gibi yaralanmalara neden olmaktadır. 0.015 mg/L konsantrasyonda solungaç filamentleri ve ikincil lamellerin çapında artış olduğu belirtilmiştir. Zebra balıkları solungaçlarında nekroz ve füzyon gibi en ağır yaralar 0.0015 mg/L konsantrasyonda gözlenmiştir. 0.0015 mg/L konsantrasyonda hücre çoğalması filament epitellerinin uzamasına yol açmıştır. Bulgular zebra balığı solungaçlarındaki hasarın büyüklüğünün AgNP' lerinin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak arttığı gösterilmiştir [80].

Biyolojik fonksiyonları bozma özelliği olan antropojenik kirletici maddeler sucul ekosisteme değişik kaynaklardan gelmektedir. Uzun vadeli sucul ekosistemlerin sürdürülebilirliği açısından kirleticilerin etkileri potansiyel açıdan çevresel risk teşkil etmektedir. Larvalar diğer gelişim evreleri bu etkilerin mekanizmalarını belirlemek için kullanılabilir [81].

2017 yılında Sayed ve Younes tarafından Afrika yayın balığı (*Clarias gariepinus*) ile yapılan çalışmada 25, 50, 75 ve 100 mg/L 10 nm AgNP' e maruz bırakılarak immunohistolojik biyobelirteçler olarak melanomakrofaj merkezlerini incelemişlerdir. Sonuç olarak, Ag-NP' lere maruz kalma sonucunda dokularda değişikliklere bağlı olarak oksidatif strese muhtemel bir artış olduğunu göstermişlerdir [82].

Hou ve arkadaşları tarafından 2017 yılında *D. magna* ile yapılan çalışmada 40 ve 110 nm boyutlar ve farklı yüzey kaplamaları ile (Sodyum sitrat ve polivinylpyrrolidone, PVP) AgNP etki mekanizmaları araştırılmıştır. Sodyum sitrat

kaplı AgNP'ü PVP kaplı AgNP' den 40 nm AgNP ise 110 nm AgNP' den daha toksik olduğunu ortaya koymuştur [83].

Deniz mikroalgi olan *Dunaliella salina* ile Johari ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada artan tuzluluğun AgNP'leri ve AgNO<sub>3</sub> canlı üzerine toksik etkilerini azalttığı görülmüştür. Ayrıca AgNP'leri ve AgNO<sub>3</sub> toksisitenin zamana ve konsantrasyon artışına bağlı olduğunu bildirmişlerdir. AgNO<sub>3</sub>' in AgNP' lerine göre bütün tuzluluk testlerinde daha toksik olduğunu ifade etmişlerdir [84].

2018 yılında yayınlanan bir derleme çalışmasında AgNP' lerin oksidatif çözünmesinden kaynaklı ortama Ag<sup>+</sup> salınımı olduğu için bakteriler, algler başta olmak üzere birçok sucul organizmaları etkileyebileceği ifade edilmiştir. Bunun yanında AgNP' lerin proteinlerle de etkileştiği gösterilmiştir. AgNP' lerin alg hücrelerde etkisi; fotosentetik enzimleri ters yönde etkilenmesi, toplam klorofil içeriğindeki zamansal azalma, hücre çeperine zarar vermesi ve kromozomal anormalliklerin görülmesi şeklinde ortaya çıktığı bildirilmiştir [85].

Pham tarafından 2018 yılında model organizma olarak tatlısu yeşil algi *Scenedesmus acuminatus*, deniz diatomu *Chaetoceros gracilis* ve mikrokrustacea *Daphnia lumholtzi* kullanılarak AgNP' lerinin akut ve kronik toksisitesi araştırılmıştır. Büyüme inhibisyonları için EC50 değerleri *S. acuminatus* için 38.5 µg/L ve *C. gracilis* için 24.3 µg/L bulunmuştur. *D. Lumholtzi* için AgNP' lerinin LC50 değeri 24 saat için 69.3 µg/L ve 48 saat için ise 57.6 µg/L olduğunu, 21 gün kronik maruz kalmada ise 0.1 - 5 µg/L arasında bulmuştur. AgNP kronik etkileri *D. Lumholtzi* için hayatta kalma, büyüme, üreme için 0.5 µg/L ve üst konsantrasyonlarda görülmeye başladığı ifade edilmiştir [86].

2019 yılında Pecoraro ve arkadaşları 40 yetişkin *D. rerio* ile yaptıkları bir çalışmada 30 gün süresince 50 nm boyutunda AgNP' e 8, 45 ve 70 µg/L

konsantrasyonlar olarak maruz bırakılmış ve kornea epitelinde herhangi bir değişiklik lezyonun olmadığı tespit etmişlerdir [87].

2019 yılında yapılan bir çalışmada da AgNP (M-Ag, NM300K ve NM302) ve AgNO<sub>3</sub>' ün *Raphidocelis subcapitata* üzerine toksisitesini test etmişlerdir %50' sini etkileyen konsantrasyon sırası ile AgNO<sub>3</sub> > M-Ag > NM300K > NM302. Bunlardan da AgNO<sub>3</sub> için 7.09, Mesogümüş 9.7 mg/L ve NM300K için ise 24.18 mg/L şeklinde olduğunu bildirmişlerdir [88].

Pham tarafından 2019 yılında yaptığı bir çalışmada tropikal tatlısı ve deniz mikroalgleri üzerine AgNP' lerinin etkilerinin araştırıldığı çalışmada tatlısu algleri üzerine deniz alglerinden daha fazla toksisite gösterdiğini bulmuştur. AgNP uygulandıktan 72 saat sonra EC50 değeri *Scenedesmus* sp. için 89.92 ± 9.68 µg/L *Thalassiosira* sp. için ise 107.21 ± 7.43 µg/L olduğu bildirilmiştir [89].

Carrasco-Quevedo ve arkadaşlarının 2019 yılında *Saccostrea glomerata* (kaya istiridyesi) ile yaptığı çalışmada AgNP' ün etkileri araştırılmıştır. AgNP NM300K (20 ± 5 nm) 12.5 ve 125 µg/L, kontrol ve pozitif kontrol (12.5 µg/L AgNO<sub>3</sub>) denemişlerdir. 125 µg/L AgNP > 12.5 µg/L AgNP ~ 12.5 µg/L AgNO<sub>3</sub> iken biyoakümülyasyonda tam tersi eğilim göstermiştir [90].

### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Materyal

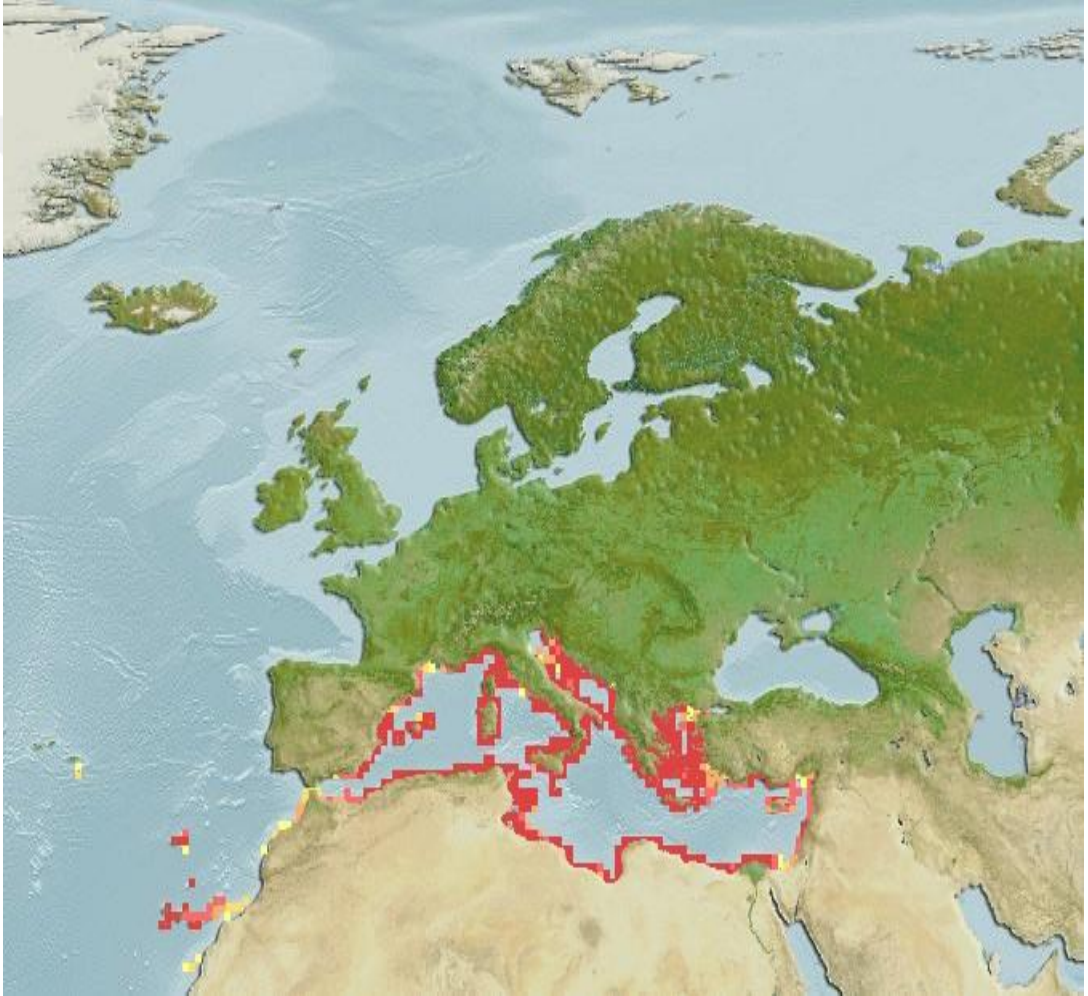
Deniz kestaneleri biyoloji, çevresel çalışmalar, toksikoloji gibi birçok alanda kullanılmasının yanında özellikle embriyolojik çalışmalarda önemli bir canlı materyal olup hem ekosistemdeki görevleri hem de gonadlarının ekonomik olarak kullanılması açısından önem taşımaktadır [91, 92]. Kara deniz kestanesi olarak bilinen *Arbacia lixula* embriyoları üzerine 100 nm> ve 150 nm> boyutlarındaki AgNP' leri ve AgNO<sub>3</sub>' in embriyotoksik etkileri araştırılmıştır.

##### 3.1.1. *Arbacia lixula* Biyolojisi

Eski çağlarda Echinoidea (Deniz kestaneleri) sınıfı üyelerine kestane veya kirpiye benzediği için "Echinos" terimi kullanılmıştır [96]. Echinoidea sınıfı içinde yer alan *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758)' nin sistematik kategorideki yeri aşağıdaki gibidir [93].

<b>Phylum</b>	: Echinodermata (Derisidikenliler)
<b>Classes</b>	: Echinoidea (Deniz kestaneleri)
<b>Ordo</b>	: Regularia (Düzenli deniz kestaneleri)
<b>Subordo</b>	: Echinicea
<b>Familya</b>	: Arbaciidae
<b>Genus</b>	: <i>Arbacia</i>
<b>Species</b>	: <i>Arbacia lixula</i>

*A. lixula*, Akdeniz kıyılarında sığ ve sert zeminlerde yaygın bir şekilde yaşam alanına sahiptir ve Güney Akdeniz kıyılarında da en bol bulunan ekinoidlerden birisidir (Şekil 3.1.1.1). Bunun dışında Atlantik Okyanusu' nun sadece Güney Yarımküresi' nde, Brezilya ve Angola kıyılarında bulunur [94, 95, 96]. Türkiye' de ise Ege ve Akdeniz kıyılarında sahilden 50 metre derinliklere kadar *P. lividus* ile birlikte makroalg türlerinin bulunduğu taşlık zeminlerde gruplar halinde yaşadığı bilinmektedir [97, 98].



Şekil 3.1.1.1: *A. lixula* türünün Akdeniz kıyılarında dağılışı [99].

*A. lixula*' da vücut oral taraftan basılmış yani hemisferik tiptedir. Peristom çok büyük olup çıplak bir zarla çevrilmiştir. Peristom etrafında beş adet küçük plakçık (ambulakral plak) yer almaktadır ve bu plaklar üzerinde vantuzlar bulunmadığından sırt kısmında yabancı cisimlere rastlanmaz [91, 100].

Tüp ayaklar iskeletin ambulakral bölgesinden beş çift sıra halindeki porlardan çıkarak vücutta geniş yayılış gösterir. Tüp ayakların bulunduğu bölgeler ağza yakın ya da yakın olmayan çizgiler halinde uzanarak simetrik şekilde sıralanmıştır. Bu bölgeler tüp ayaklardan yoksun olan interambulakral bölgeler tarafından birbirinden ayrılır [101].

*A. lixula*' da ağzın bulunduğu kutuba oral, anüsün bulunduğu üst tarafa ise aboral kısım denir. Ağzın etrafında 5 tane interradyal diş yer alır. Sindirim sisteminin ilk kısmında “ Aristo Feneri ” denen çiğneme aygıtı bulunur. Aristo feneri *A. lixula*' da beslenme sırasında kuvvetli kaslar tarafından hareket ettirilen çiğnemeye yarayan dişli yapılardır. Bu aygıt dışarıdan bakıldığında 5 büyük kalkerli plaktan ve dişçiklerden oluştuğu görülür. Aristo fenerinden sonra bukkal boşluk ve yutak gelir. Yemek borusu ise daha dar bir yapıdadır. Bunlardan sonra özofagus ve özofagusla bağırsağın birleştiği yerde kör bağırsak bulunur. Bağırsaklar oldukça uzundur ve ön tarafta ince bağırsak arka tarafta da kalın bağırsak olarak iki kısma ayrılır. Bağırsağın distal ucu, aboral kutba doğru uzanır ve rektuma bağlanır. Kalın bağırsak da bu rektum aracılığıyla anüse açılır [102, 103].

Başta *A. lixula* olmak üzere tüm ekinodermiler de gerçek bir mide bulunmaz. Besinler bağırsakta hem sindirilir hem de emilir. Sinir sistemlerinde ise belirgin bir beyin olmayıp Ektonöral, Hiponöral ve Entonöral olmak üzere üç tane dağınık sinir ağından oluşmaktadır [101].

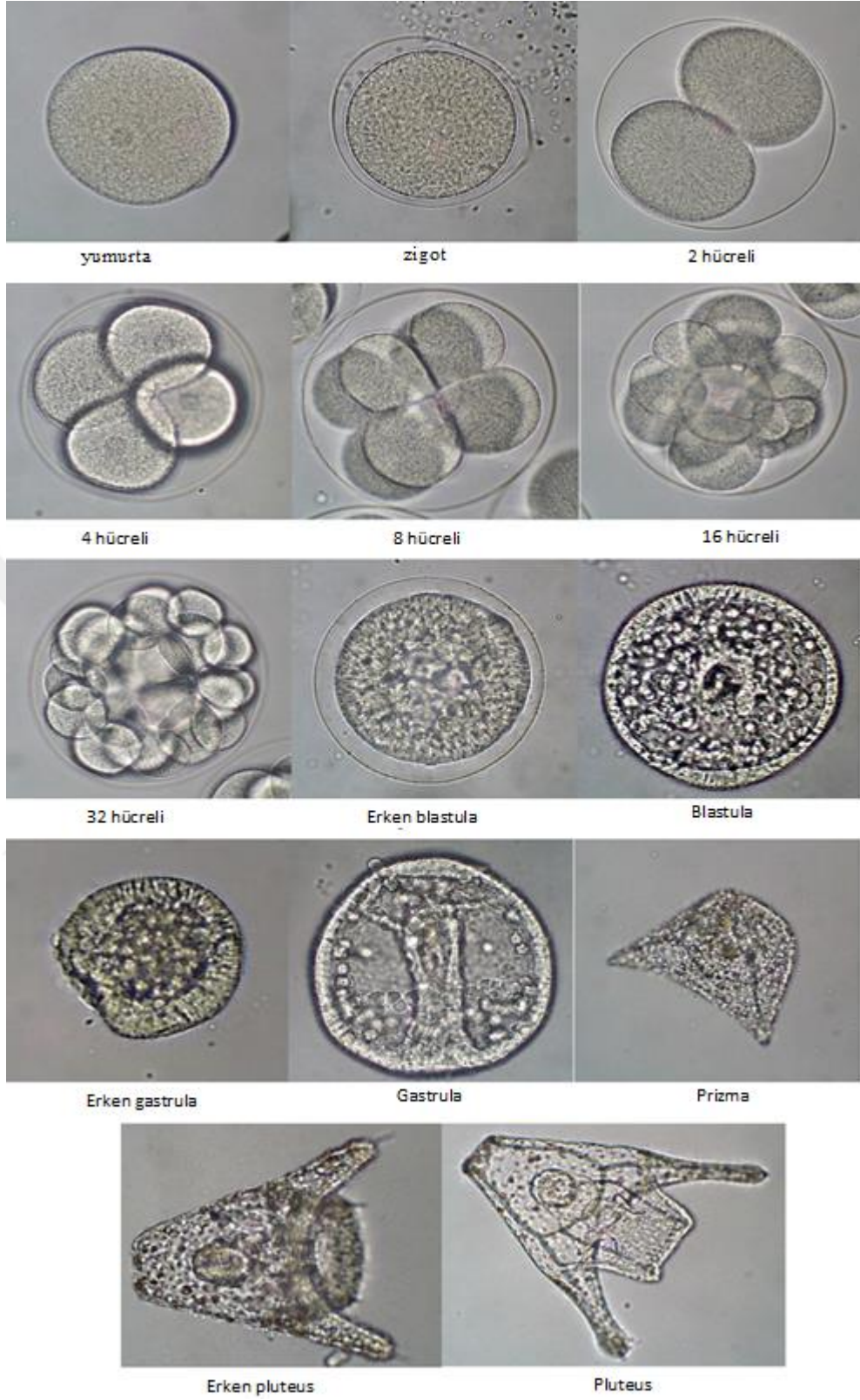
Döllenmeden hemen sonra segmentasyon başlar ve ortalama 60 - 72 saat arasında deniz kestanelerin de tipik olan pluteus larvası görülür. Fertilizasyondan 10

saat sonra blastula safhasına, 20 saat sonra gastrula safhasına ve 45 saat sonra da prizma aşamasına geldiği bilinmektedir (Şekil 3.1.1.2). Döllenmeden sonra meydana gelen bölünmeler holoblastik (eşit bölünme) şeklindedir [97, 100].

*A. lixula* bireylerinin tamamı ayrı eşeylidir ve eşeyssel dimorfizm göstermezler. Eşeyssel bezler interambulakral bölgenin altına, kabuğun anal kısmının altında küçük foliküllerden oluşmuş beş kitle halinde bulunurlar. Gonad kaslarının kasılması ile gametler deniz suyuna bırakılır ve döllenme su içerisinde gerçekleşir [102, 103]. Gonad verimliliğinde de suyun sıcaklığından çok ortamdaki besin miktarına ve kalitesine bağlıdır. Ancak besinin sınırsız olduğu koşullarda suyun sıcaklığı gonadların gelişimi üzerine etkili hale gelmektedir [98].

Deniz kestanesi gonadları Japon deniz ürünleri pazarında kestanenin türüne ve yıl içindeki durumuna bağlı olarak kg başına 400 dolar gibi yüksek fiyata alıcı bulabilmektedir. *A. lixula* türünün ekonomik olarak fazla değeri bulunmamakla birlikte Japonya ve Pasifiklerde yumurtaları insanlar tarafından tüketilmektedir [98, 100].

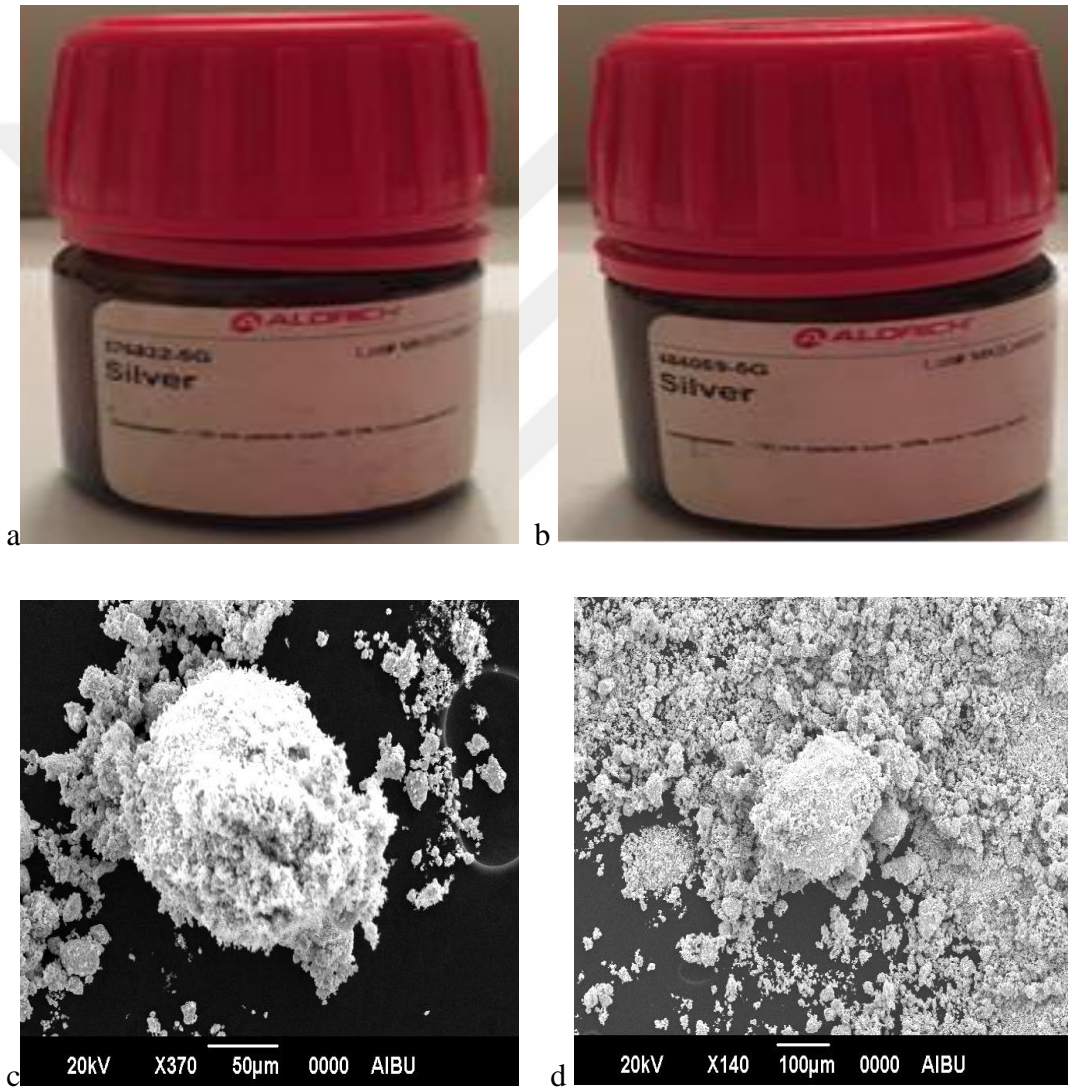




Şekil 3.1.1.2: Deniz keşanesi embriyogenesisi [104].

### 3.1.2. Kimyasallar

Biyotestlerde kullanılan <100 nm AgNP (576832-5G, CAS NO: 7440.22.4 MW: 107.87 g/mol) ve <150 nm AgNP (484059-5G, CAS NO: 7440.22.4 MW: 107.87 g/mol) ile AgNO<sub>3</sub> Sigma Aldrich' den ticari olarak temin edilmiştir (Şekil 2.2.3.1).



Şekil 3.1.2.1: AgNP' lerin genel görüntüsü <100 nm (a), <150 nm (b) ve Taramalı Elektron Mikroskopundaki <100 nm (c), <150 nm (d) boyutlarındaki AgNP' lerinin görüntüleri.

### 3.1.2.1. Gümüş ve Gümüş Nitrat (AgNO<sub>3</sub>)

Gümüş (Ag) atom numarası 47, atomik kütlesi 107.87, elektronik yapılanması  $4d^{10} 5s^1$ , yoğunluğu  $10.5 \text{ g/cm}^3$ , erime noktası  $960 \text{ }^\circ\text{C}$ , kaynama noktası  $2170 \text{ }^\circ\text{C}$  olan ve periyodik tabloda geçiş elementlerinin yer aldığı 1B grubunda yer alan bir elementtir [105].

Gümüş doğada serbest veya bileşik halde bulunan beyaz renkli bir metaldir. Bileşiklerinde ise +1 değerliğe sahiptir [106]. Ayrıca gümüş, ışığı çok iyi yansıtan, dövülebilen, sünek bir metaldir. Atmosferde oksitlenmeye karşı büyük bir mukavemet gösterir. Asitlere ve birçok organik maddeye karşı da dayanıklıdır. Saf gümüş kolay paslanmaz ve elektrik ile ısıyı çok iyi iletir. Fakat çok yumuşak olup, mekanik kuvvete karşı direnci azdır [107]. Gümüş birçok özelliği bakımından altına benzer. Ancak altına göre daha az asil bir element olduğundan, çözeltiye geçme ve yeniden çökme eğilimi daha yüksektir [108].

Gümüş plütonik veya subvolkonik evrelerde genelde damarlar şeklinde seyrek olarak stoklar ve imprenye cevherleşmeler halindedir. Gümüş yatakları olarak işletilen yataklar çoğunlukla altın metalleri ile birlikte bulunmaktadır ve gümüşün en büyük rezervleri altınla birlikte olan yataklarda (Batı Amerika, Mezozoik-Tersiyer magmatizmasına bağlı olarak) bulunmaktadır. Gümüş altından başka kurşun ve bakır'ın elde edilmesi sırasında yan ürün olarak elde edilir. Gümüş yan ürün olarak 50 - 100 g/ton kadar elde edilir. Dünya gümüş üretiminin yaklaşık yarısı bu şekilde diğer metallerin kazanılması sırasında yan ürün olarak elde edilir [108].

Devlet Planlama Teşkilatı (DPT)'nin 2001 yılındaki verilerine göre, Türkiye'deki işletilen tek gümüş yatağı olan, Kütahya - Gümüşköy gümüş yatağı  $178 \text{ g/ton Ag}$  tenörlü, 21.5 milyon ton rezerve sahiptir. Bu da 3827 ton metal gümüş rezervine eşdeğerdir. Gümüşköy dışındaki işletilebilir altın yataklarındaki gümüş rezervi ile

potansiyel sahalardaki ve gümüşün yan ürün olarak bulunduğu sahalardaki gümüş rezervi de 2913 ton metal gümüş civarındadır [109].

**Gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>)** İngilizce “ Lunar caustic ”, Latince “ Lapis infernale” ve Fransızca “Pierre infernale ” gibi farklı terimler ile bilinmekte ve katı formda kullanılmaktadır [110].

AgNO<sub>3</sub> kokusuz, renksiz veya beyaz renkli, iyi çözülebilen kristal bir tuz olarak tanımlanmıştır. Fotoğrafçılıkta, ilaçlarda, ayna üretimi, saç boyalarında, mürekkep ve gümüş kaplamalarda kullanılmaktadır.

Gümüşün suda çözünen önemli tuzlarından biriside gümüş nitrattır. AgNO<sub>3</sub> kaynama noktası 440 °C, yoğunluğu 4.350 g/cm<sup>3</sup> olan katı halde bulunan beyaz renkli bir bileşiktir [111].

AgNO<sub>3</sub>' ın kolay çözünmesinin yanında vücuda girdiğinde zehirleyici, kolayca gümüşe indirgenebilmesi ve deride iz bırakması gibi özellikleri olduğu bildirilmiştir [112].

Avrupa Parlamentosu ve Konseyinin (EC) No 1272/2008 tüzüğüne göre AgNO<sub>3</sub> dört farklı kategoride sınıflandırılmıştır. Bu kategoriler ise [113].;

1. H314 (Kategori 1B): deri aşınması, ciddi derecede yanıklar ve göz hasarına neden olma
2. H400 (Kategori 1): Akut su zehirliliği, Sudaki yaşam için çok zehirlidir
3. H410 (Kategori 1): Kronik su zehirliliği, uzun süreli etkilerle sudaki yaşam için çok zehirlidir
4. H272 (Kategori 2): Yükseltgen katılar, Yangını körükleyebilme

AgNO<sub>3</sub> toksik ve çürütücü bir bileşiktir. Yüksek konsantrasyon da bu bileşiğe maruz kalmak insanlar için son derece sakıncalıdır. Çünkü AgNO<sub>3</sub>' ı göze temas ettirmek ciddi kornea yanıklarına, buharının solunması baş ağrısı, baş dönmesine, yutulması halinde de mide rahatsızlığı, kusma, ishal ve narkoza neden olmaktadır. Yüksek konsantrasyonlar da ise uyuşukluk, bilinç kaybı, koma ve hatta ölümle bile sonuçlanabilir. Günlük 50 - 200 ppm arasında AgNO<sub>3</sub>' e maruz kalmak aşırı doz olarak kabul edilirken 2 g öldürücü konsantrasyon olarak belirtilmiştir [114].

Gümüş iyonlarının öldürücü etkinliği son yıllarda yapılan çalışmalarla açıklığa kavuşmuştur. Bu çalışmalarda gümüş iyonlarının proteinlerin SH gruplarıyla bağ yaptığı belirlenmiştir. Gümüşün proteinler üzerindeki bu etkisi nedeni ile hücre DNA' sı, hücre sitoplazması, hücre duvarı proteinleriyle reaksiyona girerek antibakteriyel, antifungal ve antiviral etki gösterdiği bildirilmiştir [115].

1700' li yıllarda AgNO<sub>3</sub> kemik, perianal abse, tükürük bezi gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktaydı. 19. yüzyılda granülasyon dokular yara yüzeyinin üzerinde kabuk oluşumunu desteklemek için AgNO<sub>3</sub> kullanılarak yaralardan uzaklaştırılmıştır. AgNO<sub>3</sub>' ın çeşitli konsantrasyonları taze yanıkların tedavisinde kullanılmıştır. 1940' larda penisilinden sonra bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde gümüşün kullanımı açıklanmıştır. Yanık tedavisi için %0.5 AgNO<sub>3</sub> kullanımı açıklandığında 1960' lı yıllarda gümüş tekrar gündeme gelmiştir. 1968 yılında AgNO<sub>3</sub> geniş spektrumlu antibakteriyel madde olarak görev yapan ve yanık tedavisi için kullanılan gümüş sülfadiazinli krem yapmak üzere sülfanamidler ile birleştirilmiştir [40].

İyonik gümüş 5 ve 70 µgAg/L (0.05 - 0.65 mM) aralığındaki değerlerde solungaç osmoregülasyonu bozması ve düşük LC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu için tatlı su balıkları için en toksik metallere birisi olduğu rapor edilmiştir [79].

### 3.1.2.2. Gümüş Nanopartikülleri (AgNP)

Nanopartiküllerden Metal nanopartikülleri içerisinde sınıflandırılanlardan birisi de Gümüş nanopartikülleri (AgNP)' dir. AgNP' leri küresel görünümlü olup zaman zaman bazı bölgelerde zincir yapıda olan toz formları da bulunabilir. Zincir yapıda olan AgNP' ler de elektrik özelliği daha iyi olduğu bildirilmiş olup 60 - 90 °C aralığındaki sıcaklıklarda iletkenliğinin de arttığı bildirilmiştir [116]. Ayrıca AgNP' lerin fizikokimyasal özelliklerin başında yüksek elektrik, optik ve ısı iletkenliği, kimyasal stabilite, katalitik aktivite ve doğrusal olmayan optik davranışının yanında antibakteriyel özellikleri olduğu da belirtilmiştir [5, 117]. Bu başlıca özelliklerinden dolayı AgNP' lerin geniş bir kullanım alanı vardır. Bu kullanım alanları ise bilgisayar teknolojisi, hafıza kartları, hidrojen üretimi ve bataryalar, televizyon teknolojisi, elektronik cihazlar, mobil iletişim araçları, optik sistemler, sensörler, dedektörler, lazerler, biyoanaliz sistemleri, ayrıştırma teknolojileri, atık suların bioremedasyonu, farmakoloji, tıpta görüntüleme teknolojisi ve tıbbi malzemeler, filtre sistemleri, yapıştırıcılar, parlatici maddeler, boyalar, Tekstil, otomobil endüstrisi, inşaat malzemeleri, çocuk oyuncakları, gıda paketlenmesi, kişisel bakım ürünleri, temizlik işlemleri ve diğerleri olarak sıralanabilir [69, 118, 119, 120].

Günlük hayatta kullanılan ve içerisinde çeşitli nanopartikülleri içeren 1015 temel ürün belirlenmiştir. Bu ürünlerden 259 ürünün AgNP içerdiği saptanmıştır. Genel olarak AgNP içeren bu ürünler ve oranları Tablo 3.1.2.2.1' de gösterilmiştir [5].

Gümüş nanopartikülleri insan, hayvan ve çevre üzerine potansiyel etkileri ve tüketici ürünlerde yaygın kullanımı nedeniyle toksikolojik çalışmalarda en önemli nanomateryallerden birisidir. Ancak sucul ortam için yeterli bilgi olmamasına rağmen AgNP' lerin çeşitli yollarla çevreye yayıldığında insan ve hayvanlar için toksik olabileceği düşünülmektedir. Ancak AgNP' lerinin toksisite mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak zebra balığı ile yapılan çalışmalar düşük konsantrasyonlardaki AgNP' leri embriyolarda gelişim gecikmesi, anormal vücut eksenleri, bükülmüş notokorda, hasarlı gözler ve kavisli kuyruk gibi çeşitli morfolojik

değişikliklere neden olurken yüksek konsantrasyonlarda embriyolarda ölümlerin olduğu belirtilmiştir [56].

Tablo 3.1.2.2.1: AgNP içeren ürünler ve yüzdeleri [5].

<b>Nano-Ag İçeren Ürünler</b>	<b>Oranları (%)</b>
Kremler ve Kozmetik Ürünleri	32.4
Sağlık Ürünleri	4.1
Tekstil ve Giyim	18.0
Hava ve su filtreleri	12.3
Ev eşyaları	16.4
Deterjanlar	8.2
Diğerleri	8.6

Gümüş nanopartikülleri cilt teması, kirlenmiş içme suyunun içilmesi, sebze ya da diğer gıda maddeleri üzerinden absorbe edilmesi ile balık ve kabuklu deniz ürünlerinin gıda olarak tüketilmesi sonucu insanlara geçmektedir [121]. Ayrıca AgNP'lerin ter bezleri ya da iğne delikleri yoluyla vücuda girdiği tahmin edilmektedir [122]. AgNP'lerinin insan sağlığı üzerine faydalı etkilerinin olduğu kanıtlanmamasına rağmen insanlar için nispeten zararsız olarak kabul edilmektedir. Ancak yüksek oranda gümüş bileşenlerine (AgNP, AgNO<sub>3</sub> gibi) maruz kalmak deride mavimsi renk oluşumu olarak adlandırılan ve geri dönüşü olmayan “ argyria ” ya neden olmaktadır. Argyria hastalığına kısa sürede teşhis konulmazsa ileride bunun manik depresif psikoza aynı anda geliştirebileceği ve ardından da aort anevrizma kopması ile ölüme neden olabileceği belirtilmiştir [5].

Gümüş iyonlarının ve tuzlarının antimikrobiyal etkileri çok iyi bilinmesine rağmen AgNP' lerinin mikroorganizmalar üzerine etkileri ve mikrobiyal mekanizmaları açık bir şekilde ortaya konmamıştır [61]. Sadece AgNP' lerinin hijyenik işlem amacıyla tekstil, gıda saklama kapları, çamaşır makinesi, tıbbi cihazlar, diş fırçası ve yara sargıları üzerine antimikrobiyal ajan özelliği gösterdiği bilinmektedir [56, 79]. Bu özelliklerin nanopartiküllerin yüzey alanı ile ilişkili olduğu, partikül boyutunun küçülmesinin dolayısıyla yüzey alanının artışının antibakteriyel aktivite için daha fazla etki sağladığı belirlenmiştir [123, 124]. AgNP' lerin en etkili antibakteriyel özelliğinin 25 nM boyutunda olduğu bildirilmiştir [124]. AgNP' lerin antibakteriyel etkilerinin partikül boyundaki azalma ile antimikrobiyal etkilerinin arttığı belirtilmesi de bunun bir kanıtıdır [125].

Gümüş nanopartiküllerinin boyutunun küçülmesi ile yüzey alanı artmakta ve buna bağlı olarak antibakteriyel özelliği de artmaktadır. Partikül boyutunun küçülmesi ile AgNP' leri bakterilere nüfuz ederek öldürücü etkilerini gerçekleştirmektedir. AgNP' leri bu etkiyi 2 şekilde göstermektedir [126].

- 1- DNA' ya bağlanarak bakterilerin çoğalmasını engellemekte
- 2- Bakterilerin elektron taşıma sistemindeki (solunum sisteminin) metabolik enzimlerinin sülfhidril gruplarına bağlanmakta ve onların inaktivasyonuna neden olmaktadır.

Buna ek olarak AgNP' lerinin inhibitör ve bakterisidal özelliği de vardır. AgNP' ler katalizör olarak rol aldığı tek hücreli bakteri, virüs ve mantarlarda oksijen metabolizmaları için gerekli enzimlerin çalışmasını durdurduğu bildirilmiştir. İnsan enzimlerine ve vücut kimyasına zarar vermeden tek hücrelilerin ölümüne neden olarak vücutta hastalığa sebep olan organizmaları yok etmektedir [127].



Çeşitli çalışmalar AgNP' lerin bakterisidal etkilerini göstermiştir. Bakterisidal etkiye çözülmüş gümüş iyonlarından ziyade AgNP' lerinin kendine has özelliklerinin neden olduğu belirtilmiştir [128]. AgNP' lerin bu bakterisidal etkileri nanopartikülün konsantrasyonuna ve en başta bakteri konsantrasyonuna bağlı olduğu ifade edilmiştir [129].

AgNP' lerin medikal plastiklerde ve gıda işleminde antimikrobiyal kullanımının iki ana nedeni vardır. Bunlardan biri, bakterilerin ve mantarların nesnenin fiziksel özellikleri üzerindeki etkilerini durdurmak, diğeri ise enfeksiyon kaynağı olabilecek zararlı bakterilerin gelişimini önlemektir [123]. Ayrıca Suresh ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada 4 nm boyutundaki AgNP' lerine gram pozitif bakterilerin gram negatif bakterilere göre daha duyarlı olduğunu bildirilmiştir [130].

AgNP' lerinin insanlar üzerine antibakteriyel aktiviteleri belirlemek için *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* patojenlerine karşı araştırmalar yapılmıştır [31].

AgNP' leri mikroorganizmalar ile daha iyi temas sağlayan geniş yüzey alanları nedeniyle diğeri tuzlara göre daha etkili antimikrobiyal etki göstermektedir. Bu etkiyi de bakteri hücresinin zarına bağlanıp bakteri içine nüfuz ederek gerçekleştirir. Bakteri hücre zarı sülfür içeren proteinler içerir ve AgNP' leri DNA gibi fosfor içeren bileşiklerle birlikte hücre içindeki bu proteinler ile etkileşime geçer. AgNP' leri bakteri hücrelerinin içine girdiğinde bakteri yığınının merkezinde düşük molekül ağırlıklı bölge oluşturur DNA' yı gümüş iyonlarından korumuş olur. AgNP' leri hücrenin ölümü ile sonlanan solunum zinciri ve hücre bölünmesi olaylarını engellerler. Bu olayı da bakterisidal etkiyi arttırmak için bakterinin içerisine gümüş iyonlarının yayılmasını sağlayarak gerçekleştirirler [60, 131,132, 133].

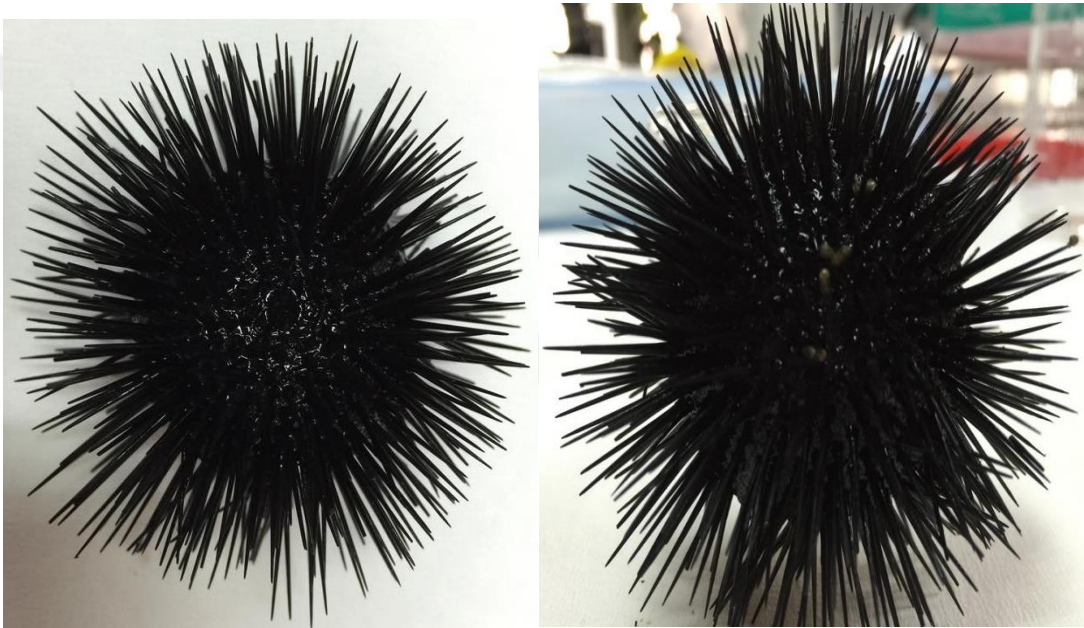
Bitkilerle (*Erwinia carotovora subsp. atroseptica* ve *Alternaria alternata*) yapılan çalışmada AgNP' leri bitki patojenlerine karşı mükemmel antimikrobiyal aktivite göstermiştir [134].



## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Biyotest canlısının toplanması

Bu çalışmada kullanılan *A. lixula*'nın ergin bireyleri (Şekil 3.2.1.1) Seferihisar (38°07'57.2" N 26°50'07.2" E)' dan Ege Denizi infralittoral bölgede kayalık zemin üzerinde yaşayan doğal ortamlarından el ile toplanmıştır (Şekil 3.2.1.2). Bu örnekleme bölgesi endüstri, sanayi ve şehirleşmeden uzak kirliliğin olmadığı denizel ortam olduğu için seçilmiştir.



Şekil 3.2.1.1: *A. lixula*'nın üstten ve yandan görünüşü.



Şekil 3.2.1.2: Örnek toplama alanı.

### 3.2.2. Test Ortamının Hazırlanışı

Biyotestlerde kullanılacak deniz kestanesi gonadlarının eldesi ve embriyoların kültüre alınmasında Pagano ve arkadaşları (1986) tarafından belirtilmiş olan metot esas alınmıştır [135].

Ergin *A. lixula* bireylerinin ektodermal iskeleti sivri uçlu makas yardımıyla periferal olarak kesildikten sonra iç organlar çıkartılarak temizlenmiştir (Şekil 3.2.2.1). Daha sonra dişi bireyler su dolu beherin üzerine, erkek bireylerde kuru beherin üzerine bırakılarak gametler elde edilmiştir (Şekil 3.2.2.2). Yumurtalar Filtre Edilmiş Deniz Suyu (FDS) içine alınırken spermler kuru olarak +4 °C' de buzdolabında saklanmıştır.



A

B

Şekil 3.2.2.1: Dişi (A) ve erkek (B) *A. lixula* bireylerinin iç genel görünümü



A

B

Şekil 3.2.2.2: *A. lixula*'nın gametlerinin elde edilmesi A) Dişi birey B) Erkek birey

Yumurtalar deniz suyu içinde döllenebilirliklerini birkaç saat koruyabildiği halde spermier deniz suyunda canlılıklarını çok kısa sürede kaybetmektedirler. Kuru olarak saklanan spermier oldukça stabildir [136].

Çalışmada kullanılan aletler her kullanımdan önce tatlı su ile yıkanmıştır. Böylece dişi bireylerin sperm ile döllenişmesi önlenmiştir. Yumurtalar 100 µm göz açıklığındaki filtreden geçirilerek 250 mL' lik cam beherlere alınmıştır. Bu yumurtalar mikroskopta incelenerek en iyi olgunluğa ulaşanlar seçilmiştir. Böylece gametler (yumurta ve sperm) biyotest için hazır hale gelmiştir.

*A. lixula* embriyolarının kültüre alınmasında ve denemelerde doğal yaşam ortamından alınan filtre edilmiş deniz suyu (FDS) kullanılmıştır. Deniz suyu her denemeden önce alınmış ve taze olarak kullanılmıştır.

### 3.2.3. Konsantrasyonların Hazırlanması

*A. lixula* embriyolarının gelişimi üzerine AgNP' leri ve AgNO<sub>3</sub>' in etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada ilk denemelerde geniş konsantrasyon aralıkları incelenmiştir. En etkili test aralığı embriyoların öldüğü en yüksek ve en az etkilendiği konsantrasyonlar arasından seçilmiştir. Böylece embriyotoksisite denemelerine başlamadan önce hazırlanmak istenen final toksisite test konsantrasyonları elde edilmiştir.

Deneme süresince negatif kontroller (blank) sadece filtre edilmiş deniz suyu (FDS) ve pozitif kontroller ise 2.5x10<sup>-4</sup> M CdSO<sub>4</sub> (Kadmiyum II sülfat) kullanılmıştır. Denemelerde kullanılan FDS, *A. lixula*' nın yaşam ortamından alınmıştır.



Hazırlanan AgNP konsantrasyonları 30 dakika sonikasyona maruz bırakılarak tüplerde homojen bir karışım elde edilmiştir (Şekil 3.2.3.1). Denemelerde Molar (M) derişim kullanılmıştır.



Şekil 3.2.3.1: Sonikasyon düzeneği genel görüntüsü.

#### 3.2.4. Biyotestler

*A. lixula* embriyoları ile yapılan denemeler kontrol grubu ve 10 mL toksikant içeren altılı polistiren kaplarda gerçekleştirilmiştir. Bu kaplar steril ve her deneme için tek kullanımlık olup tekrar kullanılmamıştır. Denemeler 6 tekrarlı olarak 2 kere yapılmıştır. Embriyotoksisite testleri in vitro sperm eklenmesi işleminden sonra yumurtaların tamamının dölleniş döllenişmediği mikroskohta bakılarak değerlendirilmiştir. Embriyoların gelişimi  $18 \pm 1$  °C' de döllenişme gerçekleştiğinden 10 dakika sonra başlayıp 72 saat sonunda pluteus larval safhasına kadar devam ettirilmiştir (Şekil 3.2.4.1).

Deneme öncelikle 20  $\mu$ L konsantre kuru sperm 50 mL FDS içinde aktif olması sağlandı. Bu sperm solusyonundan 1 mL alınarak yumurtaların bulunduğu 250 mL FDS içerisine eklenmiştir (Şekil 3.2.4.2). Bu gamet karışımı yumurtaların zarar görmemesi için hafifçe karıştırılarak zigot oluşumu sağlanmıştır. Oluşan zigot süspansiyonundan 1 mL alınarak daha önceden hazırlanmış olan negatif kontrol grubu ile belli oranlarda toksikant içeren 9 mL FDS içine ilave edilmiştir.



Şekil 3.2.4.1: Embriyogenesis için deney ortamı ve polistiren kaplar.





Şekil 3.2.4.2: Sperm ve yumurtaların sulu ortamdaki görüntüleri.

Embriyoların mikroskopta incelenebilmesi için hareketlerini yavaşlatmak amacıyla 3 - 4 damla  $10^{-4}$  M Krom sülfat damlatılmıştır.

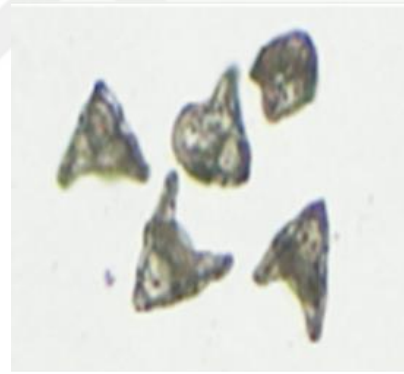
Her konsantrasyondan 100 birey aşağıda belirtilen morfolojik ölçütlere göre değerlendirilmiştir (Tablo 3.2.4.1).

Tablo 3.2.4.1: Larval gelişimsel anormalliklerin belirlenmesinde kullanılan morfolojik ölçütler [137].

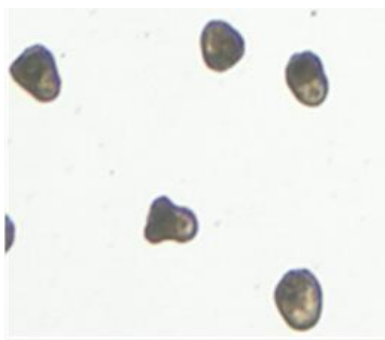
GELİŞİMSEL BOZUKLUKLAR	MORFOLOJİK ÖLÇÜTLER
N ( NORMAL )	Normal Pluteus
G ( GECİKMIŞ )	Boyut $\leq \frac{1}{2}$ normal larva
P1 ( PATOLOJİK )	İskelet ve sindirim sistemi bozuklukları veya pigmentasyona sahip pluteus larvaları
P2 ( PATOLOJİK 2 )	Pluteus safhasına ulaşmamış larvalar (anormal blastula veya gastrula)
Ö ( ÖLÜ )	Ölü embriyo veya larva



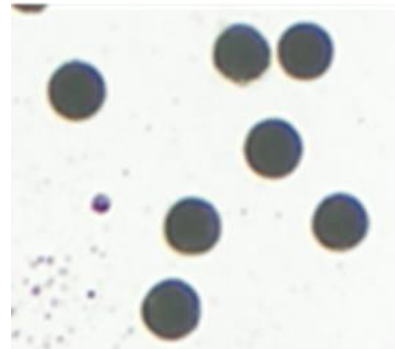
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 3.2.4.3: *A. lixula* embriogenesisinde görülen morfolojik değişiklikler: a: Normal Pluteus b: P1 anomalileri c: P2 anomalileri d: ölü bireyler.

>100 nm ve >150 nm AgNP' lerin ve AgNO<sub>3</sub>' ın *A.lixula* embriyoları üzerine sublethal etkilerini belirleyebilmek için ise Woelke' nin 1965 yılında yayınladığı toksisite değerlendirme kriterleri temel alınmıştır ( Tablo 3.2.4.2 ) [138].

Tablo 3.2.4.2: *A. lixula* embriyoları üzerine sublethal etkilerini belirleyebilmek için toksisite değerlendirme kriterleri [138].

<b>% Anormal Larva</b>	<b>Toksisite</b>
< %5	Toksik değil
% 5-15	Az toksik
>% 15	Toksik
>%50	Lethal eşik
>% 90	Lethal

### **3.2.5. Gümüş Nanopartiküllerinin Ölçümü**

Taramalı Elektron Mikroskopunun (SEM) çalışması temel olarak yüksek voltajda hareketleri hızlandırılan elektronların örneğin üzerine düşürülmesi prensibine dayanmaktadır. Elektronlar numunenin yüzeyi taradıktan sonra numune ile elektronlar arasında bir etkilenme oluşmaktadır. Bu etki uygun algılayıcılar tarafından toplanmakta ve sinyal güçlendiricilerden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmaktadır. Böylece SEM' de görüntü elde edilmektedir [139].

Bu çalışmada AgNP boyutlarının ölçümü ve fotoğraflanması Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen - Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü bünyesinde bulunan SEM Laboratuvarında JEOL JSM-6390LV marka Tarayıcı Elektron Mikroskobu' nda yapılmıştır ( Şekil 3.2.5.1 ).



**Şekil 3.2.5.1:** JEOL JSM-6390LV marka Taramalı Elektron Mikroskobu.

AgNP' leri siyah çift taraflı band üzerine yapıştırıldıktan sonra 1 cm' lik numune kaplarının üzerine yerleştirilmiştir. Görüntü almak için numuneler örnek kapsülüne konmuştur ve SEM Mikroskobuna yerleştirilerek AgNP' lerin boyutlarının görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 3.2.5.2).



**a**

**b**

**Şekil 3.2.5.2:** Hazırlanan numunelerin örnek kapsülüne (a), kapsülün SEM' a yerleştirilmesi (b).

### **3.2.6. Verilerin İstatistiksel Analizleri**

72 saat sonundaki  $EC_{50}$  değerleri Probit analizi yapılarak hesaplanmıştır. İstatistiksel analizlerde ise SPSS 10' versiyonu kullanılmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. BULGULAR

Yapılan çalışmada *Arbacia lixula* deniz kestanesi embriyoları üzerine farklı ( $1 \times 10^{-7}$ ,  $2.5 \times 10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $2.5 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $2.5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-5}$  M) konsantrasyonlarda <100 nm AgNP, <150 nm AgNP' leri ve AgNO<sub>3</sub>' ın toksik etkileri araştırılmıştır.

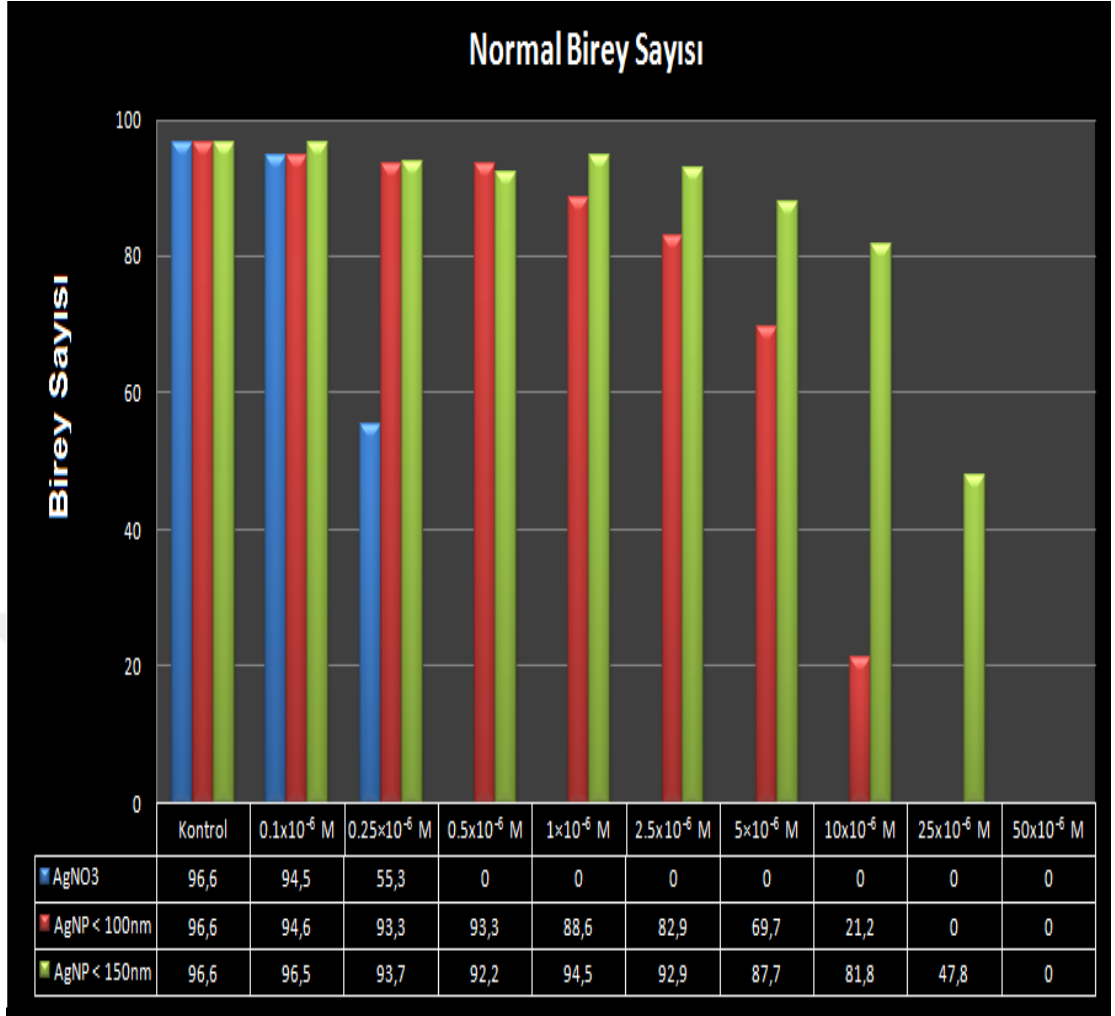
*A. lixula* embriyogenesi süresince toksik etkiler morfolojik ölçütlerdeki anormallikler incelenmiştir. Bu anormallikler Pagano ve arkadaşları (1983)' nin belirlediği kriterlere göre N (normal birey), P1 (Larval bozukluk), P2 (Gelişim durması) ve D (Ölü larva veya embriyo) olarak değerlendirilmiştir.

72 saatin sonunda normal pluteus safhasına ulaşan *A. lixula* embriyolarının oranı  $96.6 \pm 0.6$  olarak bulunmuştur (Şekil 4.1.1).

Kontrol gruplarında normal pluteusların canlı kalma yüzdesi ortalama %96.6 iken bu orandan **ani düşüşler** AgNO<sub>3</sub> için  $2.5 \times 10^{-7}$  M konsantrasyonda, <100 nm AgNP' leri için  $1 \times 10^{-5}$  M konsantrasyonda, <150 nm AgNP' leri için ise  $2.5 \times 10^{-5}$  M konsantrasyonda gözlenmiştir (Şekil 4.1.2, Tablo 4.1.1).



**Şekil 4.1.1:** Kontrol grubunda görülen *A. lixula* pluteus larvalarının genel görünüşü (Orijinal).



Şekil 4.1.2: Normal bireyler ve farklı konsantrasyonlardaki değişimler.

Tablo 4.1.1: 72 saatlik embriyogenesis sonunda AgNO<sub>3</sub>, <100 nm ve <150 nm AgNP'leri için pluteus safhasına ulaşan bireylerde görülen ani etkilerin gözlemlendiği konsantrasyonlar.

Kimyasal	Ani Etkinin Gözlemlendiği Konsantrasyon
AgNO <sub>3</sub>	2.5x10 <sup>-7</sup> M
<100 nm AgNP	1x10 <sup>-5</sup> M
<150 nm AgNP	2.5x10 <sup>-5</sup> M



Bu çalışma sonucunda *A. lixula* embriyonik gelişimi üzerine toksik etki yapan konsantrasyonlar incelendiğinde  $2.5 \times 10^{-7}$  M konsantrasyon  $\text{AgNO}_3$  için,  $1 \times 10^{-5}$  M konsantrasyon  $<100$  nm AgNP için ve  $2.5 \times 10^{-5}$  M konsantrasyon ise  $<150$  nm AgNP için olduğu bulunmuştur (Tablo 4.1.2).

Tablo 4.1.2: Embriyogenezis süresince  $\text{AgNO}_3$ ,  $<100$  nm AgNP,  $<150$  nm AgNP konsantrasyonlarının en yüksek ve ani değişimlerinin görüldüğü pluteus anormalileri ve toksik konsantrasyonları

Kimyasallar	En yüksek etkilerin gözleendiği Konsantrasyon (M)			Ani Değişimlerin Gözlenen Konsantrasyon(M)		
	P1	P2	Ö	P1	P2	Ö
$\text{AgNO}_3$	$5 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-6}$	$2.5 \times 10^{-6}$	$2.5 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-7}$	$2.5 \times 10^{-6}$
$<100$ nm AgNP	$1 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$	$2.5 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-6}$	$2.5 \times 10^{-5}$	$2.5 \times 10^{-6}$
$<150$ nm AgNP	$5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-5}$	$2.5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-5}$

Nanopartiküller açısından değerlendirildiğinde  $1 \times 10^{-5}$  M konsantrasyondan itibaren P1 anormalileri,  $5 \times 10^{-5}$  M konsantrasyondan itibaren P2 anormalileri, ölü larva ve embriyo sayısının ise  $2.5 \times 10^{-5}$  M konsantrasyondan itibaren  $<100$  nm AgNP boyutunda belirgin olarak görülmeye başlandığı bulunmuştur. Benzer şekilde

$2.5 \times 10^{-5}$  M konsantrasyondan itibaren P1 anormalileri,  $5 \times 10^{-5}$  M konsantrasyondan itibaren P2 anormalileri, ölü larva ve embriyo sayısının ise  $1 \times 10^{-5}$  M konsantrasyondan itibaren  $<150$  nm AgNP' de görülmüştür.

Bu elde edilen nanopartikül sonuçları ile de  $<100$  nm AgNP boyutundaki toksik etkilerin  $<150$  nm AgNP' lerden önce gözlenmeye başlanması toksik etkilerin partikül büyüklüğüne bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Partikül boyutu büyüdükçe toksitenin azaldığı bulunmuştur.

AgNO<sub>3</sub> için anormaliler değerlendirildiğinde P1 için  $2.5 \times 10^{-7}$  M, P2 için  $5 \times 10^{-7}$  M ve Ölü embriyo veya larvalar için  $2.5 \times 10^{-6}$  M konsantrasyon olarak bulunmuştur. Bu yapılan çalışmanın sonucunda AgNO<sub>3</sub> en toksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Toksikite açısından ilk sırada AgNO<sub>3</sub>' in daha sonra  $<100$  nm AgNP ve  $<150$  nm AgNP' ün geldiği bulunmuştur.

Farklı konsantrasyonlara maruz kalan *A. lixula* embriyolarında görülen morfolojik anormali yüzdeleri ve dağılımları AgNO<sub>3</sub> için Tablo 4.1.3' te,  $<100$  nm AgNP için Tablo 4.1.4' te ve  $<150$  nm AgNP için ise Tablo 4.1.5' te verilmiştir.

Tablo 4.1.3: AgNO<sub>3</sub> konsantrasyon artışına bağlı olarak görülen *A. lixula* popülasyonunda görülen morfoljik anormallerin % oranları.

<b>Konsantrasyon</b>	<b>Normal</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>D</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	96.6±0.6	3.3±0.6	5.6±3.9	2.8±2.8
<b>1x10<sup>-7</sup> M</b>	94.5±0.8	5.5±0.8	0.0±0.0	0.0±0.0
<b>2.5x10<sup>-7</sup> M</b>	55.3±1.5	44.5±11.4	0.9±0.4	8.3±8.3
<b>5x10<sup>-7</sup> M</b>	0.0±0.0	59.8±12.2	39.8±12.1	0.3±0.2
<b>1x10<sup>-6</sup> M</b>	0.0±0.0	33.3±10.5	66.7±10.5	0.0±0.0
<b>2.5x10<sup>-6</sup> M</b>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100±0.0
<b>5x10<sup>-6</sup> M</b>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100±0.0
<b>1x10<sup>-5</sup> M</b>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100±0.0
<b>2.5x10<sup>-5</sup> M</b>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100±0.0
<b>5x10<sup>-5</sup> M</b>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	100±0.0

Tablo 4.1.4: <100 nm AgNP' lerinin konsantrasyon artışına bağlı olarak görülen *A. lixula* popülasyonunda görülen morfoljik anormallerin % oranları.

<b>Konsantrasyon</b>	<b>Normal</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>D</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	96.6±0.6	3.3±0.6	5.6±3.9	2.8±2.8
<b>1x10<sup>-7</sup> M</b>	94.6±1.1	5.3±1.1	0.0±0.0	0.0±0.0
<b>2.5x10<sup>-7</sup> M</b>	93.3±1.2	6.7±1.1	0.3±0.1	0.0±0.0
<b>5x10<sup>-7</sup> M</b>	93.3±1.4	6.6±1.4	8.3±8.3	0.0±0.0
<b>1x10<sup>-6</sup> M</b>	88.6±2.3	11.1±2.2	0.3±0.2	0.0±0.0
<b>2.5x10<sup>-6</sup> M</b>	82.9±7.7	9.5±1.3	0.0±0.0	8.3±8.3
<b>5x10<sup>-6</sup> M</b>	82.9±7.7	29.3±2.1	0.0±0.0	0.2±1.1
<b>1x10<sup>-5</sup> M</b>	21.2±2.4	74.6±3.2	4.5±1.7	0.6±0.3
<b>2.5x10<sup>-5</sup> M</b>	0.0±0.0	20.9±2.8	78.3±2.7	0.4±0.2
<b>5x10<sup>-5</sup> M</b>	0.0±0.0	0.0±0.0	98.7±0.6	1.3±0.6

Tablo 4.1.5: <150 nm AgNP' lerinin konsantrasyon artışına bağlı olarak görülen *A. lixula* popülasyonunda görülen morfoljik anormalilerin % oranları.

<b>Konsantrasyon</b>	<b>Normal</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>D</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	96.6±0.6	3.3±0.6	5.6±3.9	2.8±2.8
<b>1x10<sup>-7</sup> M</b>	96.5±0.8	3.5±0.8	0.0±0.0	0.0±0.0
<b>2.5x10<sup>-7</sup> M</b>	93.7±1.0	5.6±1.0	0.3±0.1	0.0±0.0
<b>5x10<sup>-7</sup> M</b>	92.2±1.2	14.3±6.9	0.0±0.0	0.0±0.0
<b>1x10<sup>-6</sup> M</b>	94.5±1.5	5.3±1.5	0.2±0.1	0.0±0.0
<b>2.5x10<sup>-6</sup> M</b>	92.9±1.4	7.0±1.4	8.3±8.3	0.0±0.0
<b>5x10<sup>-6</sup> M</b>	87.7±1.7	11.7±1.9	0.2±0.2	0.0±0.0
<b>1x10<sup>-5</sup> M</b>	81.8±2.2	18.1±2.2	0.2±0.2	8.3±8.3
<b>2.5x10<sup>-5</sup> M</b>	47.8±3.5	52.8±3.8	1.1±0.9	0.0±0.0
<b>5x10<sup>-5</sup> M</b>	0.0±0.0	64.3±8.7	34.3±8.9	0.2±0.1

Yapılan bu çalışmada *A. lixula* embriyoları üzerine AgNO<sub>3</sub> ve AgNP' leri (<100 nm ve <150 nm) için EC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. EC<sub>50</sub> değeri; AgNO<sub>3</sub> için 0.3x10<sup>-6</sup> M, <100 nm AgNP için 5.7x10<sup>-6</sup> M ve <150 nm AgNP için ise 1.8x10<sup>-5</sup> M' dir (Tablo 4.1.6). Bu sonuçlara göre AgNO<sub>3</sub>' in AgNP' lerine göre daha toksik olduğu bulunmuştur. EC<sub>50</sub> değerlerine göre kimyasalların toksik etkileri büyükten küçüğe doğru AgNO<sub>3</sub> > 100 nm AgNP > 150 nm AgNP şeklindedir.

Tablo 4.1.6: AgNO<sub>3</sub> ve AgNP' lerin EC50 Değerleri

<b>Kimyasallar</b>	<b>EC50 Değeri</b>
AgNO <sub>3</sub>	3x10 <sup>-7</sup> M
<100 nm AgNP	5.7x10 <sup>-6</sup> M
<150 nm	1.8x10 <sup>-5</sup> M

## 4.2. TARTIŞMA

Günümüzde en önemli teknolojik gelişme konularının başında nanopartiküller gelmektedir. Nanopartiküller en çok askeri, sağlık ve sanayi alanlarında kullanılmaktadır. Buna karşılık nanopartiküllerin çevresel etkileri ile ilgili çalışmalar sınırlı hatta yok denecek kadar azdır. Bu alanda sucul ekosistemler üzerine yapılan çalışmalar ise son dönemde başlanmış olup çok az sayıdadır.

Nanopartiküllerle *Artemia salina* [140], *Daphnia magna* [72], bazı omurgasızlar, balık ve alg türleri [66] ile ilgili çalışmalar olduğu görülmektedir. Daha çok çalışmaların yeşil nanoteknoloji ile nanopartikül üretimi ile ilgili olduğu ve bu alana yoğunlaştığı görülmektedir.

Tatlısu ve denizel nanotoksikoloji ile ilgili çalışmalar son yıllarda yapılmaya başlanmıştır. Denizel kirlilik ve toksisite çalışmaları için gösterge türlerden olan deniz kestanesi ile ilgili 2013 yılında Siller ve arkadaşları tarafından *P. lividus* ile yapılmış bir çalışmaya rastlanılmıştır. AgNP toksisitesinin belirlendiği *A. lixula* ile çalışmaya rastlanılmamış fakat diğer canlılarla yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bu alanda çalışma olmaması gelecekte nanopartiküller açısından en önemli çalışma alanlarından birisinin deniz nanoekotoksikolojisi olacağını göstermektedir.

AgNP' lerinin deniz kestaneleri üzerine embriyotoksik etkilerinin araştırıldığı tek çalışma Siller ve arkadaşları tarafından 2013 yılında *P. lividus* türü ile yapılmıştır. Bu çalışmada 0.03, 0.003 ve 0.0003 mg/L konsantrasyonlarda AgNO<sub>3</sub>' in, 3, 0.3 ve 0.003 mg/L konsantrasyonlarda ortalama boyutu 5 - 35 nm olan AgNP' lerinin toksik etkileri araştırılmıştır. Düşük konsantrasyonda 24 saat sonunda AgNP' lerine maruz kalan *P. lividus* larvalarında gözlenen deforme sayısı incelenmiş ve %20' den daha düşük olduğu bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada ise 72 saatlik toksisite denemeleri sonunda <100 nm AgNP ve <150 nm AgNP' leri için *A. lixula* larvalarında gözlenen deforme oranı ise %5 - 6 arasında bulunmuştur. Bu durum NP' lerin boyutunun artması

ile canlı vücuduna girişinin azaldığını ve buna paralel olarak NP' lerinin toksik etkilerinin azaldığını göstermiştir. *P. lividus* kontrol grupları 48 saat sonunda normal pluteus larva aşamasına ulaşırken 0.3 mg/L konsantrasyonda AgNP' lerine maruz kalan embriyolar prizma safhasında kaldığı ya da erken pluteus safhasına ulaşabildiğini rapor etmişlerdir [58]. Yaptığımız çalışmada kontrol gruplarında ise *A.lixula* embriyoları 72 saat sonunda %96.6 başarı oranı ile normal pluteus safhasına ulaşma gözlenirken larval bozukluklar <100 nm AgNP için  $10 \times 10^{-6}$  M, <150 nm AgNP için  $50 \times 10^{-6}$  M ve AgNO<sub>3</sub> içinde  $0.5 \times 10^{-6}$  M konsantrasyonlarda gözlenmiştir.

AgNP' lerine maruz kalan *P. lividus* larvaları için karakteristik olan kısa kol ve küçük kalsit spekül deformasyonları 48 saat sonunda larvaların %70' inden fazlasında gözlenirken [58] bizim çalışmamızda bu deformasyonlar <100 nm ve <150 nm AgNP için  $50 \times 10^{-6}$  M ve AgNO<sub>3</sub> için  $1 \times 10^{-6}$  M konsantrasyonda görülmüştür.

<100 nm AgNP ve <150 nm AgNP' lerinin EC<sub>50</sub> değerleri hesaplandığında boyutu küçük olanların toksik etkisinin daha fazla olduğu görülmektedir. NP boyutu küçüldükçe canlı vücudunda birikimini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalara örneklerden birisi Zebra balığı üzerine Bar-llan ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan araştırma olup 3, 10, 50, 100 nm boyutlarındaki AgNP' lerin toksik etkisi araştırılmış ve LC<sub>50</sub> değerlerinin 3 nm için 93 µM, 10 nm için 126 µM, 50 nm için 127 µM ve 100 nm için ise 137 µM olduğu bildirilmiştir. Diğer bir çalışma ise 2012 yılında Asghari ve arkadaşları tarafından *Daphnia magna* ile yapılmıştır. Bu çalışmada EC<sub>50</sub> değerlerinin 15.83 nm AgNP için 0.004 mg/L, 129 nm AgNP için 0.002 mg/L, 161 nm içinde 0.187 mg/L olduğu rapor edilmiştir. *Lemna gibba* su bitkisi ile yapılan çalışmada da 50 nm boyutundaki AgNP' lerin EC<sub>50</sub> değeri  $9.36 \pm 2.36$  olarak bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre AgNP' lerin sucul ortamlarda canlılığı tehdit eden bir risk olduğu görülmektedir [76].

Bu sonuçlar karşılaştırıldığında aynı kirleticilerin farklı türler üzerine farklı toksik etki yapabileceği göstermekte olup NP' lerin boyutunun toksisite üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.



2014 yılında Garcia-Alonsa tarafından yapılan çalışmada *Platynereis dumerilii* üzerine AgNP' lerinin toksisitesi araştırılmıştır. Çalışmada sitrat (cit-AgNP), hümitik asit (HA-AgNP) ve AgNO<sub>3</sub> kullanılmış ve AgNP' lerin AgNO<sub>3</sub>' a göre daha toksik olduğu vurgulanmıştır [141].

Zebra balıkları ile yapılan çalışmada da yukarıdaki sonuçlara paralel olarak AgNP' lerinin konsantrasyonu arttıkça zebra balıklarının normal gelişim oranında düşme ve ölü sayısında artış görülmüştür. 0.19 nM üzerindeki konsantrasyonlarda zebra balığı embriyolarında ölü ve deforme görölme oranının maksimum olduğu ifade edilmiştir [142]. Bu çalışmada da hem <100 nm AgNP hem de <150 nm AgNP' lerinde konsantrasyon artışına bağılı olarak normal pluteus görölme oranında azalma olduğu bulunmuştur.

AgNP' lerin çeşitli yollar ile deniz suyuna bulaştığı ve gümüşün tuz formuna geçebildiği bilinmektedir. Gümüşün en önemli tuz formu AgNO<sub>3</sub> olup AgNP' lerine göre daha toksik olabilmektedir. Yaptığımız çalışmada AgNO<sub>3</sub>' ın <100 nm AgNP' lerine göre 19 kat, <150 nm AgNP' lerine göre de 60 kat daha toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızın aksine Siller ve arkadaşları da AgNP' lerinin AgNO<sub>3</sub>' a göre daha toksik olduğunu bildirmişlerdir. *P. lividus* embriyoları üzerine 3 mg/L AgNP konsantrasyonunun toksik etkisi 0.03 mg/L Ag iyon konsantrasyonuna göre daha yüksek olurken aynı sonuç 0.3 mg/L AgNP ile 0.03 mg/L Ag iyonlarına maruz kalan embriyolar içinde gözlenmiştir. Bu sonuçlar AgNO<sub>3</sub> ile karşılaştırılan AgNP' leri boyutunun önemini ortaya çıkarmaktadır. Siller ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kullanılan AgNP' lerin boyutunun küçük olması (5 - 35 nm) *P. lividus*' da daha fazla birikim yaptığı rapor edilmiştir. Bunun sonucu olarak AgNP' lerin toksik etkisi AgNO<sub>3</sub>' a göre daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamız da kullanılan AgNP' lerin daha büyük olması (<100 nm ve <150 nm) nedeni ile AgNP' lerin toksik etkisini daha düşük bulunmuştur.

AgNO<sub>3</sub> ve AgNP ile ilgili bu çalışmamız sonuçlarımıza paralellik gösteren başka çalışmalarda bulunduğu görülmüştür. 2013 yılında Massarsky ve arkadaşları

tarafından zebra balığı için yapılan çalışmada  $\text{AgNO}_3$ ' ın  $\text{AgNP}$  ye göre yaklaşık 17 kat daha toksik olduğu ifade edilmiştir [77]. Diğer çalışma ise *Daphnia magna* ile 2012 yılında Asghari ve arkadaşları tarafından yapılmış ve  $\text{AgNO}_3$ ' ın 161 nm boyutundaki  $\text{AgNP}$ ' lerine göre 81 kat daha toksik olduğu bildirilmiştir. Navarro ve arkadaşları tarafından 2008 yılında  $\text{AgNO}_3$  ve  $\text{AgNP}$ ' lerinin *Chlamydomonas reinhardtii* üzerindeki toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmada da  $\text{AgNO}_3$ ' ın  $\text{AgNP}$ ' lerine göre 18 kat daha toksik olduğunu ifade etmiştir. 0 - 100  $\mu\text{g/L}$  aralığında hazırlanan  $\text{AgNP}$  (<100 nm) ve  $\text{AgNO}_3$  konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Ulva lactuca* için 48 saat sonunda  $\text{AgNP}$ ' leri için 15  $\mu\text{g/L}$ ,  $\text{AgNO}_3$  için ise 2.5  $\mu\text{g/L}$  konsantrasyonlarda toksik etkiler gözlenmiştir [70].

$\text{AgNO}_3$ ' ın toksik etkisinin gösterildiği bir çalışma 2011 yılında Knight tarafından  $\text{AgNO}_3$ ' ın *E. perma* gametlerinin döllenme başarısını üzerine yapılmıştır.  $10^{-9}$  M konsantrasyonda kontrol grubuna oranla %20 - 30 oranında azalma olduğu belirtilmiştir [55]. Bizim çalışmamızda da farklı konsantrasyonlarda  $\text{AgNO}_3$ ' a maruz kalan *A. lixula* gametlerinin döllendiği ancak normal pluteus safhasına ulaşan birey sayılarının değişkenlik gösterdiği görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $0.25 \times 10^{-6}$  M da normal pluteus safhasına ulaşan birey sayısında yaklaşık %50 azalma olduğu tespit edilmiştir. Böylece  $\text{AgNO}_3$ ' ın canlıların normal gelişimi üzerine olumsuz etkileri olduğu belirtilmiştir.

$\text{AgNP}$ ' leri ve  $\text{AgNO}_3$ ' ın *Eisenia fetida* solucanlarının üremesi üzerine benzer toksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca solucanlarda gümüş alımının daha çok  $\text{AgNP}$ ' lerinden gerçekleştiği ve Ag alımının konsantrasyon artışına bağlı olduğu belirtilmiştir. Kuru toprakta 60, 120 ve 200 mg/kg  $\text{AgNP}$  konsantrasyonları diğer grup olarak normal toprağa  $\text{AgNP}$  ve  $\text{AgNO}_3$  ayrı ayrı; 15, 30, 60, 120 ve 200 mg/kg konsantrasyonlarda eklenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre  $\text{AgNO}_3$ ' ın  $\text{AgNP}$ ' lerine göre daha toksik olduğu görülmektedir. Kuru toprakta  $\text{AgNP}$   $\text{EC}_{50}$  74.3 mg/kg normal toprakta 80.0 mg/kg;  $\text{AgNO}_3$  için ise kuru toprakta 46.9, normal toprakta ise 42.2 mg/kg olarak bulunmuştur.

Ale ve arkadaşları 2019 yılında midye *Mytilus galloprovincialis* ile AgNP etkilerini araştırmışlardır. Midyelerin yumuşak dokularında gümüş bulduklarını rapor etmişlerdir. *M. galloprovincialis* türünde olduğu gibi bizim çalışmamızda da AgNO<sub>3</sub> tuzu AgNP'lerden toksik çıkmıştır. [143].

Çevredeki NP'lerin hareketlilik, reaktivite, ekotoksisite ve birikimi açısından risk değerlendirmelerinin yapılması gerekmektedir. Çünkü endüstriyel ve evsel uygulamalarda NP'lerin kullanımının artması bu materyallerin çevreye yayılmasına yol açmaktadır. AgNP'leride antibakteriyel özelliğinden dolayı tüketici ürünlerinde artan bir şekilde kullanılmaktadır. Böylece çevreye AgNP'lerinin yayılımı artmakta ve bu durum ekolojik açıdan endişelere yol açmaktadır. Ekotoksikolojik çalışmalardan elde sonuçlar AgNP'lerinin genellikle yüksek konsantrasyonlarda ortamdaki organizmalar üzerine toksik etkilere sahip olduğunu göstermektedir [144, 145, 146].

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

AgNP' lerinin uzun zaman çevrede kalabileceği ve kalıcılık oluşturabilecek potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Sucul ekosistemlerin korunması dünyanın geleceği açısından büyük önem arz etmektedir. Sucul canlılar üzerine toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmaların az olduğu düşünüldüğünde çalışmamızın literatüre büyük fayda sağlayacağı kanısındayız.

Çevre sorunların çözümünde en önemli parametrenin çevre ile ilgili kamuoyu ve çevre bilinci oluşturmak olduğu son zamanlarda iyice ortaya çıkmaktadır. Yeni çıkan ürünler üretilirken aynı zamanda toksikolojik kriterlerin belirlenmesi için firmaların araştırma laboratuvarlarını da kurmalarının faydalı olacağı kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

- 1- Christian, P., Von der Kammer, F., Baalousha, M., Hofmann, Th. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology*. 2008. DOI 10.1007/s10646-008-0213-1.
- 2- Environmental Protection Agency (EPA). Nanotechnology White Paper, U.S. Environmental Protection Agency Report EPA 100/B-07/001, Washington DC 20460, 2007, USA.
- 3- Handy, R.D., Owen, R., Valsami-Jones, E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, and future needs, *Ecotoxicology*. 2008, 17(5):315-325. doi: 10.1007/s10646-008-0206-0
- 4- Ramsden, C.S., Smith, T.J., Shaw, B.J., Handy, R.D. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. *Ecotoxicology*. 2009, 18: 939-951.
- 5- Fabrega, J., Luoma, S.N., Tyler, C.R., Galloway, T.S., Lead, J.R. Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment, *Environmental International*. 2011, 37:2. 517-531. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.10.012>
- 6- Weinberg, H., Galyean, A., Leopold, M. Evaluating engineered nanoparticles in natural waters. *Trends in Analytical Chemistry*. 2011, Vol:30 No:1.
- 7- Berk, S., Akkurt, İ. Nanopartikül: Geleceğin korkulu rüyası. *Tuberk Toraks*. 2012. 60(2): 180-184.
- 8- Çağlar, A.B., Saral, S. Kozmetolojide Toksikite Sorunu, *Türk Dermatoloji Dergisi*. 2014, 4: 248 – 251.
- 9- Açık, Z., Güven, S. Nanoteknoloji, Çevre ve Aile, Tüketici Yazıları III . ISBN: 978-605-88778-2-5. (Editörler: Müberra Babaoğlu, Arzu Şener, Esna Betül Buğday, H.Ü. TÜPADEM). Hacettepe Üniversitesi Tüketici - Pazar - Araştırma - Danışma Test ve Eğitim Merkezi. 2012, 142–170.
- 10- Perker, Z. S. Nanoteknoloji ve yapı malzemesi alanına etkileri. *Engineering Sciences*. 2010, 1A0114, 5, (4), 639-648.
- 11- Yazıcı, E. Ultrasonik sprey piroliz tekniğiyle küresel gümüş nanopartiküllerinin üretimi. (Danışman: Sebahattin GÜRME) İstanbul Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü metalürji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı. 2009. Yüksek Lisans tezi. 1-106.
- 12- Gürmen, S., Ebin, B. Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri-1, *Metalurji Dergisi*, 2008, No. 150, 08/2008, ISSN: 1300-4824 TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası

- 13- Portakal, O. Biyolojik Ölçümler ve Nanopartiküller. Türk Biyokimya Dergisi. 2008, 33(1): 35-38.
- 14- Krysanov, E.Y., Pavlov, D.S., Demidova, T.B., Dgebuadze, Y.Y. Effect of Nanoparticles on Aquatic Organisms. Biology Bulletin. 2010, Vol:37 No:4 406-412.
- 15- Beykaya, M. Çağlar, A. Bitkisel Özümler Kullanılarak Gümüş-Nanopartikül (AgNP) Sentezlenmesi ve Antimikrobiyal Etkinlikleri Üzerine Bir Araştırma. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi. 2016. 16. 631-641.
- 16- Süfer, Ö., Karakaya, S. Gıda Endüstrisi ve Nanoteknoloji: Durum Tespiti ve Gelecek. Akademik Gıda. 2011. 9(6). 81-88.
- 17- Khan, I., Saeed, K., Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arabian Journal of Chemistry. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- 18- Üçüncü Tunca, E. Nanoteknolojinin temeli nanopartiküller ve nanopartiküllerin fitoremediasyonu. Ordu Üniv. Bil. Tek. Derg. 2015, Cilt:5, Sayı:2, 2015,23-34.
- 19- Fu, P.P., Xia, Q., Hwang, H-M., Ray, P. C., Yu, H. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. Journal of Food and Drug Analysis. 2014, 22. 64-75.
- 20- Béteky, P., Rónavári, A., Igaz, N., Szerencsés, B., Tóth, I. Y., Pfeiffer, I., Kiricsi, M., Kónya, Z. Silver nanoparticles: aggregation behavior in biorelevant conditions and its impact on biological activity. International Journal of Nanomedicine. 2019, 14. 667–687.
- 21- Mc Lean Nanoparticles and nanotechnology research, M.C. Rocco (Editor-in-Chief). Journal of Nanoparticles Research. 1999. 1: 1-6
- 22- Özdoğan, E., Demir, A., Seventekin, N. Nanotechnology and its applications in textile industry, Tekstil ve Konfeksiyon 2.006, 3: 159 – 168.
- 23- Özkan, Y. Nanopartiküllerin Akuatik Organizmalar Üzerindeki Toksik Etkisi, 2012, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi.
- 24- Demirbilek, M.E. Tarımda ve Gıdada Nanoteknoloji. Journal of Food and Feed Science-Technology. 2015, 15: 46 – 53
- 25- Liu, X., Liang, X., Zhang, N., Qiu, G., Yi, R. Selective synthesis and characterization of sea urchin-like metallic nickel nanocrystals. Materials Science and Engineering B. 2006, 132: 272-277.
- 26- <https://seferbas.com/nano-malzemeler-icin-uretim-yontemleri/nan0-malzeme-uretim-yontemleri/>
- 27- Kathiresan, K., Manivannan, S., Nabeel, M.A., Dhivya, B. Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2009, 71: 133 – 137.

- 28- Gade, A.K., Bonde, P., Ingle, A.P., Marcato, P.D., Duran, N., Rai, M.K. Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*. 2008,2(3): 1 – 5.
- 29- Shanmugan, N., Rajkamal, P., Cholan, S., Kannadasan, N., Sathishkumar, K., Viruthagiri, G., Sundaramanickam, A. Biosynthesis of silver nanoparticles from the marine seaweed *Sargassum wightii* and their antibacterial activity against some human pathogens. *Applied Nanoscience*. 2013, DOI 10.1007/s13204013-71-4.
- 30- Azizi, S., Namvar, F., Mahdavi, M., Ahmad, M.B., Mohamad, R. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Brown Marine Macroalga, *Sargassum Muticum* Aqueous Extract. *Materials*. 2013, 6: 5942 – 5950.
- 31- Vasanthabharathi, V., Kalaiselvi, V., Jayalakshmi, S. Biosynthesis of silver nanoparticles from marine sponge *Callyspongia diffusa* associated – *P. fluorescens* BCPBMS-1. *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.*, 2013, 5 (1): 40-48.
- 32- Akter, M., Sikder, Md. T., Rahman, Md. M., Ullah, A. K. M, A., Hossain, K. F.B., Banik, S., Hosokawa, T., Saito, T., Kurasaki, M. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research*. 2018, 9. 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.008>.
- 33- Matranga, V., Corsi, Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: Model organisms and molecular approaches. *Marine Environmental Research*. 2012 76: 32 – 40.
- 34- Biswas, P., Wu, C.Y. Nanoparticles and the Environment. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 2005, 55: 708 – 746.
- 35- Karateke, M., Güngür, E., Demir, A. Nonateknoloji ve Tekstil Sektöründe Uygulamaları, Ulusal Meslek Yüksekokulları Öğrenci Sempozyumu, 2010, 21-22 Ekim 2010-Düzce.
- 36- Dağlıoğlu, Y., Özkan Yılmaz, H. Nanopartikül Karakterizasyon Yöntemleri ve Ekotoksisite Deneylerindeki Önemi. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*. 2018. 1: 1-17. DOI:10.7240/marufbd.346547.
- 37- Nartop, P. Biyosentetik gümüş nanopartiküllerinin *Pyracantha coccinea* bitkisinin gövde eksplantlarının yüzey sterilizasyonunda kullanımı. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilim Dergisi*. 2017, 23(6), 759-761. doi: 10.5505/pajes.2016.04809.
- 38- Arya, G., Sharma, N., Mankamna, R., Nimesh, S. Chapter 6: Antimicrobial Silver Nanoparticles: Future of Nanomaterials. *Microbial Nanobionics, Nanotechnology in the Life Sciences*. (Ed. R. Prasad), 2019. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16534-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16534-5_6).
- 39- Baloğlu, A. Alüminyum Alaşımlarına Anodik Oksit Filmi İçerisine Gümüş Katılması Yolu İle Antibakteriyel Özellik Kazandırılması, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 2008, Yüksek Lisans Tezi.
- 40- Rai, M., Yadav, A., Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. 2009, 27: 76 – 83.
- 41- Martinez-Gutierrez, F., Olive, P.L., Banuelos, A., Orrantia, E., Nino, N., Sanchez, E.M., Ruiz, F., Bach, H., Av-Gay, Y. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium

- nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2010, 6: 681 – 688.
- 42- Landsdown, A.B. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. *Journal of Wound Care*. 2002, 11(4): 1252 – 130.
- 43- Castellano, J.J., Shafii, S.M., Ko, F., Donate, G., Wright, T.E., Mannari, R.J. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *International Wound Journal*. 2007, 4(2): 114- 122. Fabrega, J., Renshaw, J.C., Lead, J.R. Interactions of Silver Nanoparticles with *Pseudomonas putida* Biofilms. *Environmental Science & Technology*. 2009, 43: 9004-9009.
- 44- Scown, T.M., van Aerle, R., Tyler C.R. Review: Do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment?. *Critical Reviews in Toxicology*. 2010, 40(7): 653-670.
- 45- Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S. Global life cycle release of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticles Research*. 2013, 15: 1692.
- 46- Batley, G.E., Kirby, J.K., and McLaughlin, M.J. Fate and risk of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. *Accounts of Chemical Research*. 2013, 46: 854 – 862.
- 47- Johari, S.A., Kalbassi, M.R., Yu, I.J., Lee, J.H. Chronic effect of waterborne silver nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histopathology and bioaccumulation. *Comparative Clinical Pathology*. 2014, DOI 10.1007/s00580-014-2019-2.
- 48- Bilberg, K., Malte, H., Wang, T., Baatrup, E. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology*. 2010, 96: 159-165
- 49- Benn, T.M., Westerhoff, P. Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics. *Environmental Science & Technology*. 2008, 42(11): 4133 – 4139.
- 50- Abudayyak, M., ve Özhan, G. Metal Bazlı Nanopartiküllerin Üreme ve Gelişim Üzerine Toksik Etkileri. *Türk Toksikoloji Derneği Yayın Organı*. 2013, 36: 5-6.
- 51- Derman, S., Kızılbey, K., Akdeste, Z.M. Polymeric Nanoparticles, *Journal of Engineering and Natural Sciences, Sigma*. 2013, 31: 107- 120
- 52- Blaser, S.A., Scheringer, M., MacLeod, M., Hungerbühler, K. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of the Total Environment*. 2008, 390: 396-409
- 53- Koca, F.D., Duman, F. Genotoxic and cytotoxic activity of green synthesized TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Applied Nanoscience*. 2019. 9.5.815–823.
- 54- Oral, R. İzmir Körfezi'nin Ekolojik Olarak Stresli Bölgelerinin Toksikitesi. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*. 2003, 20(3-4): 461-466.
- 55- Knight, O. Acute toxicity of silver nitrate to in vitro fertilization of the sand dollar, *Echinarachnius parma*, Studies by Undergraduate Reserchers at Guelph. 2011, Vol:4 No:2, 71 – 74.
- 56- Piticharoenphum, S., Imlöh, M.L., Salome, M., Cotte, M., Kaulich, B., Gianoncelli, A., Mendis, B.G., Bangert, U., Poolton, N.R.J., Horrocks, B.R., Brümmer, F., Medakovic, D. Agglomeration of Silver Nanoparticles



- in Sea Urchin. International Journal, of Environmental pollution and Remediation.. 2012, Volume:1 Issue:1.
- 57- Kutluyer, F., Aksakal, E. Sucul Model Organizmalar ve Biyoteknolojide Kullanımı. Anadolu Journal of Agricultural Sciences. 2013, 28(2): 101-107.
- 58- Siller, L., Lemloh, M.L., Piticharoenphun, S., Mendis, B.G., Horrocks, B.R., Brümmer, F., Medakovic, D. Silver nanoparticle toxicity in sea urchin *Paracentratus lividus*. Environmental Pollution. 2013,178: 498-502.
- 59- Desai, M.P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R.J., Amidon G.L. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. Pharmaceutical Research. 1997, 14: 1568 – 1573
- 60- Sondi, I., Salopek-Sondi, B. Silver Nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. Coli as a model for Gram-negative bacteria. Journal of Colloid and Interface Science. 2004, 275: 177 – 182.
- 61- Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.Y., Kim, Y.K., Lee, Y.S., Jeong, D.H., Cho, M.H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles, Nanomedicine: Nanotechnology. Biology and Medicine. 2007, 3: 95 – 101.
- 62- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., Behra, R. Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. Environmental Science & Technology. 2008, 42(23): 8959 – 8964.
- 63- Griffitt, R.J., Luo, J., Bonzongo, J.C., Barber, D.S. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. Environmental Toxicology and Chemistry. 2008, 27(9): 1972-1978. doi: 10.1897/08-002.1.
- 64- Asharani, P.V., Wu, Y.L., Gong, Z., Valiyaveetil, S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models, Nanotechnology, 2008, 19: 255102 ,1-8.
- 65- Bar-Ilan, O., Albrecht, R.M., Fako, V.E., Furgeson, D.Y. Toxicity Assessment of Multisized Gold and Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos. 2009, Small: DOI: 10.1002/sml.200801716 , Vol:5 No:16. Pg: 1897-1910.
- 66- Chae, Y.J., Pham C.H., Lee, J., Bae, E., Yi, J., Gu M.B. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Aquatic Toxicology. 2009, 94: 320-327
- 67- Ringwood, A.H., McCarthy, M., Bates, T.C., Carrol, D.L. The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. Marine Environmental Research. 2010, 69:1. 549-551. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.10.011>
- 68- Park, S.Y., Choi, J. Geno- and ecotoxicity evaluation of silver nanoparticles in freshwater crustacean *Daphnia magna*. Environmental Engineering Research. 2011, 15(1): 23 – 27.
- 69- Bilberg, K., Hovgaard, M.B., Besenbacher, F., Baatrup, E. In vivo Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver ions in Zebrafish (*Danio rerio*), Hindawi Publishing Corporation Journal of Toxicology. 2012, Article ID 293784, 9 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/293784>
- 70- Turner, A., Brice, D., Brown, M.T. Interactions of silver nanoparticles with the marine makroalga. *Ulva lactuca*, Ecotoxicology. 2011, 21: 148 – 154.
- 71- Gaiser, B.K., Biswas, A., Rosenkranz, P., Jepson, M.A., Lead, J.R., Stone, V., Tyler, C.R., Fernandes, T.F. Effects of silver and cerium dioxide micro-

- and nano-sized particles on *Daphnia magna*. Journal of Environmental Monitoring. 2011, 13: 1227 – 1235.
- 72- Asghari, S., Johari, S.A., Lee, J.H., Kim, Y.S., Jeon, Y.B., Choi, H.J., Moon, M.C., Yu, I.J. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. Journal of Nanobiotechnology. 2012, 10:14
- 73- Jiang, H-S., Li, M., Chang, F-Y., Li, W., Yin, L-Y . Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO<sub>3</sub> toxicity to *Spirodela polyrhiza* Environmental Toxicology and Chemistry., 2012, Vol. 31, No. 8, 1880–1886.
- 74- Schlich, K., Klawonn, T., Terytze, K., Hund-Rinke, K. Effects of silver nanoparticles and silver nitrate in the earthworm reproduction test. Environmental Toxicology and Chemistry. 2013, 32(1): 181 – 188.
- 75- Johari, S.A., Kalbassi, M.R., Soltani, M., Yu, I.J. Toxicity comparison of colloidal silver nanoparticles in various life stage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* ). Iranian Journal of Fisheries Sciences. 2013, 12(1): 76 – 95.
- 76- Oukarroum, A., Barhoumi, L., Pirastru, L., Dewez, D. Silver Nanoparticles Toxicity Effects on Growth and Cellular Viability of the Aquatic Plant *Limma gibba*. Environmental Toxicology and Chemistry .2013, 32(4): 902 – 907.
- 77- Massarsky, A., Dupuis, L., Taylor, J., Eisa-Beygi, S., Strek, L., Trudeau, V.L., Moon, T.W. Assessment of nanosilver toxicity during zebrafish (*Danio rerio* ) development. Chemosphere. 2013, 92: 59 – 66.
- 78- Gambardella, C., Aluigi, M.G., Ferrando, S., Gallus, L., Ramoino, P., Gatti, A.M., Rottigni, M., Falugi, C. Developmental abnormalities and changes in cholinesterase activity in sea urchin embryos and larvae from sperm exposed to engineered nanoparticles. Aquatic Toxicology. 2013, 130-131: 77-85.
- 79- Hawkins, A.D., Thornton, C., Kennedy, A.J., Bu, K., Cizdziel, J., Jones, B.W., Steevens, J.A., Willett, K.L. Gill Histopathologies Following Exposure to Nanosilver or Silver Nitrate. Journal of Toxicology and Environmental Health. 2015, 78: 301 – 315.
- 80- Mansouri, B., Johari, S.A. Effects of Short-Term Exposure to Sublethal Concentration of Silver Nanoparticles on Histopathology and Electron Microscope Ultrastructure of Zebrafish ( *Danio rerio* ) Gills. Iranian Journal of Toxicology. 2015, Vol:10 No:1.
- 81- Corsi, I. and Marques-Santos, L. F., Chapter:6: Ecotoxicology in marine environments: the protective role of ABC transporters in sea urchin embryos and larvae. In. Evolutionary Ecology of Marine Invertebrate Larvae. (Edited by Tyler J. Carrier, Adam M. Reitzel, and Andreas Heyland) Oxford University Press (2018). 269-283. DOI: 10.1093/oso/9780198786962.003.0018

- 82- Sayed, A. H., Younes, A. M. H. Melanomacrophage centers in *Clarias gariepinus* as an immunological biomarker for toxicity of silver nanoparticles. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 2017, 5. 97–104.
- 83- Hou, J., Zhou, Y., Wang, C., Li, S., Wang, X. Toxic Effects and Molecular Mechanism of Different Types of Silver Nanoparticles to the Aquatic Crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* 2017. 51, 12868-12878.
- 84- Johari, S.A., Sarkheil, M., Tayemeh, M. B., Veisi, S. Influence of salinity on the toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) in halophilic microalgae, *Dunaliella salina*. *Chemosphere*. 2018. 209, 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.098>.
- 85- Yalçın Duygu, D. Metal Nanopartiküllerin Mikroalgler Üzerine Olan Etkileri ve Uygulamaları. *BŞEÜ Fen Bilimleri Dergisi*. 2018, 5(2), 112-117.
- 86- Pham, T-L. Toxicity of Silver Nanoparticles to Tropical Microalgae *Scenedesmus acuminatus*, *Chaetoceros gracilis* and Crustacean *Daphnia lumholtzi*. *Turk. J. Fish.& Aquat. Sci.* 2018, 19(12), 1009-1016. [http://doi.org/10.4194/1303-2712-v19\\_12\\_03](http://doi.org/10.4194/1303-2712-v19_12_03).
- 87- Pecoraro, R., Salvaggio, A., Scalisi, E.M., Iaria, C., Lanteri, G., Copat, C., Ferrante, M., Fragal, G., Zimbone, M., Impellizzeri, G., Brundo, M.V. Evaluation of the effects of silver nanoparticles on *Danio rerio* cornea: Morphological and ultrastructural analysis. *Microscopy Research and Technique*. 2019.;1–5. DOI: 10.1002/jemt.23280.
- 88- Klaiven, M., Macken, A., Oughton, D.O. Growth inhibition in *Raphidocelis subcapita* e Evidence of nanospecific toxicity of silver nanoparticles. *Chemosphere*. 2212019.785-792. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.055>.
- 89- Pham, T-L. Effect of Silver Nanoparticles on Tropical Freshwater and Marine Microalgae. *Hindawi Journal of Chemistry*. 2019, Volume 2019, Article ID 9658386. 1-7. <https://doi.org/10.1155/2019/9658386>.
- 90- Carrazco-Quevedo, A., Romer, I., Salamanca, M. J., Poynter, A., Lynch, I., Valsami-Jones. E. Bioaccumulation and toxic effects of nanoparticulate and ionic silver in *Saccostrea glomerata* (rock oyster). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019. 179 (2019) 127–134.
- 91- Ertüz, M. İ. Türkiye Denizlerinde Rastlanan Deniz Kestaneleri (Echinoidea), Et ve Balık Kurumu Genel Müdürlüğü, 1968, Cilt:XVI Sayı:7 . 8-15
- 92- Özvarol, Y., Turna, İ.İ. Determination of Some Biological Properties of *Paracentratus lividus* (Lamarck, 1816) in Antalya Gulf Shores. *Journal of Applied Biological Sciences*. 2009, 3(1): 55 – 58.
- 93- Özvarol, Y. Antalya Körfezi kıyılarındaki deniz kestanelerinden *Paracentratus lividus* (Lamarck, 1816) ve *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758)'nın (Echinoidea) bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 2003, Yüksek lisans tezi,
- 94- Bulleri, F., Benedetti-Cecchi, L., Cinelli, F. Grazing by the sea urchins *Arbacia lixula* L. And *Paracentratus lividus* Lam. in the Northwest Mediterranean, *Journal of Experiment Marine Biology and Ecology*. 1999, Vol: 241 Issue: 1 81-95

- 95- Gianguzza, P., Visconti, G., Gianguzza, F., Vizzini, S., Sara, G., Dupont, S. Temperature modulates the response of the thermophilus sea urchin *Arbacia lixula* early life to CO<sub>2</sub>-driven acidification. Marine Environment Research. 2013, 1-8
- 96- Lessios, H.A., Lockhart, S., Collin, R., Sotil, G., Sanchez-Jerez, P., Zigler, K.S., Perez, A.F., Garrido, M.J., Geyer, L.B., Bernardi, G., Vacquier, V.D., Haroun, R., Kessing, B.D. Phylogeography and bindin evolution in *Arbacia*, a sea urchin genus with an usual distribution. Molecular Ecology 2012, 21: 130 – 144
- 97- Geldiay, R., Kocataş, A. Deniz Biyolojisine Giriş (6. Baskı), Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, Yayın No:64 551-553. 2006,
- 98- Lök, A., Köse, A. Urla-İskele' den Toplanan Deniz Kestanelerinin (*Paracentratus lividus*, *Arbacia lixula*) Gonodosomatik İndeks Değişimi. Ege University Journal of Fisheries&Aquatic Science. 2006, 23(1-2): 7-11.
- 99- [https://www.aquamaps.org/receive.php?type\\_of\\_map=regular](https://www.aquamaps.org/receive.php?type_of_map=regular)
- 100- Koçbaş, F. *Arbacia lixula* (LINNAEUS 1758)' nın embriyonik gelişim safhaları üzerine kalay (Sn)' ın toksik etkilerinin araştırılması, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü .1999, Yüksek Lisans Tezi
- 101- Pechenik, J.A. Biology of the Invertebrates (Omurgasızlar Biyolojisi) 6. Baskıdan Çeviri, (Çeviri Editörleri: Sözen, M., Kandemir, İ., Hasbenli, A., ve Matur, F.). 2013, 509-513.
- 102- Demirsoy, A. Yaşamın Temel Kuralları. Omurgasızlar=Invertebrata (Böcekler Dışında), Cilt II. Kısım I. 1998, 1045-1058
- 103- Salman, S. Omurgasız Hayvanlar Biyolojisi Kitabı 2006, ISBN: 975-8982-04-4, 447-470.
- 104- <http://emorphogenetics.blogspot.com/2009/08/circuit-diagram-for-sea-urchin.html>
- 105- Petering, H.g., McClain, C.J. Silver, metals and Their Compounds in the Environment (Edited by Ernest Merian). 1991, 1191 – 1198.
- 106- Demir, M. Analitik Kimya Uygulaması Kitabı (Nitel Analiz Laboratuvarı Kitabı). 2000, Üçüncü Baskı. 35-35
- 107- Babaarslan, O., Erbil, Y. Fonksiyonel Tekstil Ürünleri Üzerine Ştapel Gümüş Takviyeli Karışım İpliklerin Tasarımı ve Üretimi, Tekstil ve Konfeksiyon Sektöründe II. Ar-Ge Proje Pazarı Platformu. 2010.
- 108- <http://www.haddemetal.com/tr/Download/Altin%20ve%20Gumus%20Rezervleri.pdf>, 12.05.2014
- 109- Devlet Planlama Teşkilatı (DPT). Madencilik özel ihtisas komisyonu metal madenler alt komisyonu değerli metaller çalışma grubu raporu. 2001.
- 110- Klasen, H.J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns, Part I early uses. Burns. 2000, 30: 1 – 9.
- 111- [www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=TR&language=tr&productNumber=209139&brand=SIAL&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3DSilver%2Bnitrate%26interface%3DProduct%2520Name%26N%3D0%2B%26mode%3Dmode%2520matchpartialmax%26lang%3Den%26region%3DTR%26focus%3DproductN%3D0%2520220003048%2520219853286%2520219853261](http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=TR&language=tr&productNumber=209139&brand=SIAL&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3DSilver%2Bnitrate%26interface%3DProduct%2520Name%26N%3D0%2B%26mode%3Dmode%2520matchpartialmax%26lang%3Den%26region%3DTR%26focus%3DproductN%3D0%2520220003048%2520219853286%2520219853261), 16.03.2014
- 112- Çetinkaya, Ö. Nitratlı Çözeltilerden Gümüş Geri Kazanımında Sementasyon Koşullarının Belirlenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen

- Bilimleri Enstitüsü Seramik Mühendisliği. 2003. Yüksek Lisans Programı. Yüksek Lisans Tezi.1-89.
- 113- Regulation ( EC ) no 1272 / 2008 of the European Parliament and of the Council, 2008, Official Journal of the European Union.
- 114- <http://www.silverperoxide.com/Documents/Danger%20of%20silver%20nitrate.pdf>, 25.04. 2014
- 115- Güneş, M.E., Borum,A.E., Özakın, C., Girişin, A.O., Aydın, L. A New Technic: Efficacy of Nano-Silver Coating of Honey Bee Hives Against Some Microorganisms. Bee Science. 2012, 12(1): 23-30.
- 116- Türker, M. Asal Gaz Yoğunlaştırma Metodu ile Nanoboyutlu Ag Tozlarının Üretimi ve Özelliklerinin Değerlendirilmesi. Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences. 2002, 26: 147-154.
- 117- Esmeray, E., Özata, O. Nanopartiküllerin Çevre Mühendisliği Alanında Kullanımı ve Temel Laboratuvar Malzemeleri ile Gümüş Nanopartikül (AgNPs) Sentezi. Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi, (16), 2019, 521-527. DOI: 10.31590/ejosat.570308.
- 118- Guzman, K.A.D., Taylor, M.R., Banfield, J.F. Environmental risk of nanotechnology: national nanotechnology initiative funding, 2000-2004. Environmental Science Technology. 2006, 40: 1401 – 1047.
- 119- Yıldız, N. Gümüş Nanopartiküllerinin Liken Özü İle Biyosentezi, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu. 2011.
- 120- Baran, M.F. *Prunus avium* kiraz yaprağı özütü ile gümüş nanopartikül (AgNP) sentezi ve antimikrobiyal etkisinin incelenmesi. DÜMF Mühendislik Dergisi 2019. 10:1: 221-227. DOI: 10.24012/dumf.487255.
- 121- Moore, M.N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?. Environmental International. 2006, 32: 967-976.
- 122- Panyala, N.R., Pena-Mendez, E.M., Havel, J. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health?. Journal of Applied Biomedicine 20.08, 6: 117 – 129
- 123- Kandaz, M., Sözbilir, M. Anti-Bakteriyel Boyar kaplama Çözeltisi Hazırlanması, TÜBİTAK-BİDEB Kimya Lisans Öğrencileri (Kimyagerlik, Kimya Öğretmenliği, Kimya Mühendisliği) Araştırma Projesi eğitim Çalıştayı. 2011, KİMYA – 2 ÇALIŞTAYI. 2011 pp: 5 – 7.
- 124- Özcan, M.A. Gümüş Nanopartiküller ve Kanatlı Hayvan Beslemede Kullanımına Yönelik Çalışmalar. Tavukçuluk Araştırma Dergisi. 2014, 11(2): 16-20.
- 125- Panacek, A., Kvitek, L., Prucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., Sharma, V.K., Nevecna, T., Zboril, R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. Journal of Physical Chemistry B. 2006, 110: 16248 - 16258
- 126- Bozacı, E., Akar, E., Altınışık, A., Demir, A., Seki, Y., Özdoğan, E. Yeni Bir Hidrojel/Gümüş Nanokompozitin Sentezi ve Antibakteriyel Aktivitesinin Araştırılması, 2014, XIII. Uluslararası İzmir Tekstil ve Hazır Giyim Sempozyumu, 2-5 Nisan 2014.

- 127- Bulut, E. Gümüş Nanopartiküllerinin Polifenollerle Sentezi ve Karakterizasyonu, Sakarya üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 2007, Yüksek Lisans Tezi.
- 128- Fabrega, J., Renshaw, J.C., Lead, J.R. Interactions of Silver Nanoparticles with *Pseudomonas putida* Biofilms. Environmental Science & Technology. 2009, 43: 9004-9009.
- 129- Veerapandian, M., Lim, S.K., Nam, H.M., Kuppannan, G., Yun, K.S. Glucosamine-functionalized silver glyconanoparticles: characterization and antibacterial activity. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2010, 398: 867 – 876.
- 130- Suresh, A.K., Pelletier, D.A., Wang, W., Moon, J.W., Gu, B., Mortensen, N.P., Allison, D.P., Joy, D.C., Phelps, T.J., Doktycz, M.J. Silver nanocrystallites: biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an evaluation of their comparative toxicity on gram-negative and gram-positive bacteria. Environmental Science & Technology. 2010, 44: 5210 – 5215.
- 131- Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N., Kim, J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Journal of Biomedical Materials Research. 2000,52(4): 662 – 668.
- 132- Morones, J.R., Elechiquerra, J.L., Camacho, A., Kouri, J.B., Ramirez, J.T., Yacaman, M.J. The bactericidal effects of silver nanoparticles. Nanotechnology. 2005, 16(10): 2346 – 2353
- 133- Song, H.Y., Ko, K.K., Oh, L.H., Lee, B.T. Fabrication of silver nanoparticles and their antimicrobial mechanisms. European Cells and Materials. 2006, 11(1): 58.
- 134- Abbas, A., Naz, S.S., Syed, S.A. Antimicrobial activity of silver nanoparticles (AgNPs) against *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* & *Alternaria alternata*. Pak. J. Agri. Sci., 2019, Vol. 56(1), 113-117. DOI:10.21162/PAKJAS/19.3886.
- 135- Pagano, G., Cipollaro, M., Corsale, G., Esposito, A., Ragucci, E., Giordino, G.C., Trief, N. M. The sea urchin: Bioassay for the assessment of damage from environmental contaminants, Community Toxicity Testing, 1986, ASTM STP 920, John Cairns, Jr., Ed., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 66 – 92i.
- 136- Hörstadius, R.D. Experimental Embryology of Echinoderms, Oxford University Press, Ely House, London W. 1., 1973, page:1- 122
- 137- Pagano, G., Esposito, A., Bove, P., Angelis, M., Rota, A., Giordano, G. G. The effects of hexavalent and trivalent chromium on fertilization and development in sea urchins. Environmental Research. 1983, 30: 422 – 452.

- 138- Türkçü, N. *Paracentratus lividus* (Lamarck, 1816) embriyonik gelişimi üzerine farklı sıcaklıkların çinko ve kadmiyum toksisitesi, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Enstitüsü, 2014, Yüksek Lisans Tezi.
- 139- Şahan, N. Faz Değiştiren Maddelerin Nano Malzemelerle Kullanımının Araştırılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı. 2011. Yüksek Lisans Tezi.
- 140- Falugi, C., Aluigi, M.G., Faimali, M., Ferrando, S., Gambardella, C., Gatti, M., Ramoino, P. Dose Dependent Effects of Silver Nanoparticles on Reproduction and Development of Different Biological Models. *Environmental Quality*. 2012, 8: 61 – 65.
- 141- Garcia-Alonso, J., Rodriguez-Sanchez, N., Misra, S.K., Valsami-Jones, E., Croteau, M.N., Luoma, S.N., Rainbow, P.S. Toxicity and accumulation of silver nanoparticles during development of the marine polychaete *Platynereis dumerilii*. *Science of the Total Environment*. 2014, 476-477; 688 – 695.
- 142- Lee, K.J., Nallathamby, P.D., Browning, L.M., Osgood, C.J., and Xu, X-H. N. In Vivo Imaging of Transport and Biocompatibility of Single Silver Nanoparticles in Early Development Zebrafish Embryos. *ACS Nano*. 2007,1(2): 133 – 143.
- 143- Ale, A., Liberatori, G., Vannuccini, M.L., Bergami, E., Ancora, S., Mariotti, G., Bianchi, N., Galdopórpora, J.M., Desimone, M. F., Cazenavea, J., Corsi, I. Exposure to a nanosilver-enabled consumer product results in similar accumulation and toxicity of silver nanoparticles in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*. 211, 46-56
- 144- Maynard, A.D. *Nanotechnology: A Research Strategy for Addressing Risk*, Woodrow Wilson International Center for Scholars, Washington.DC. 2006,
- 145- Nowack, B., Bucheli, T.D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environmental, *Environmental Pollution*. 2007, 150: 5-22.
- 146- Dobias, J., Bernier-Latmani, R. Silver Release from Silver nanoparticles in Natural Waters. *Environmental Science & Technology*. 2013, 47: 4140 – 4146.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hasan Hüseyin ÖZÇİFTÇİ  
Doğum Yeri ve Yılı : Beyşehir, 1987  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : hasanhuseyinozciftci@gmail.com

### Eğitim Durumu

Lise : Vali Mustafa Vecdi Gönül Lisesi, 2005  
Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2010  
Yüksek Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2019

### Mesleki Deneyim

Kurum bilgisi : Akuvatur Su Ürünler 2015 - 2016  
Kurum bilgisi : Agromey Gıda ve Yem San. Tic. A.Ş 2016 - 2017  
Kurum bilgisi : Lezita Balık A.Ş 2017 - (halen)

### Yayınları

Koçbaş, F., Arslan, N., Özçiftçi, H. H., Oral, R. Monitoring of Heavy Metals in Izmit Bay Coast Using Algae (*Gracilaria gracilis*) as a Bioindicator. The 23rd Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC Europe), 12-16 Mayıs, 2013, Glasgow.

Koçbaş, F., Anıl, B.N., Özçiftçi, H. H., Oral, R. Concentration of Heavy Metals from Iskenderun Bay (Turkey) Using *Patella* sp. (Gastropoda:Mollusca). The 23rd Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC Europe), 12-16 Mayıs, 2013, Glasgow.

Özçiftçi, H. H., Koçbaş, F., Arslan, N., Oral, R. Heavy Metal Levels In *Patella* sp. The 23rd Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC Europe), 12-16 Mayıs, 2013, Glasgow.



Koçbaşı, F., Yıldırım, E., Özçiftçi, H. H., Oral, R. Heavy Metal Levels In *Patella caerulea* In The Mersin Coast Of The Mediterranean Sea, Turkey. The 23rd Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC Europe), 12-16 Mayıs, 2013, Glasgow.

Özçiftçi, H.H., Koçbaşı, F., Oral, R. Effects of Silver Nanoparticles and Silver Nitrate on Early Embryos of the Sea Urchin *Arbacia lixula*. The 7 th International Nanotoxicology Congress (NANOTOX 2014), 23-26 Nisan, 2014, Antalya.

Koçbaşı, F., Bayer, S., Özçiftçi, H.H., Oral, R. Determination of Heavy Metals in Marine Gastropods of Çanakkale ( Turkey ). The 2nd International Conference on Environmental Science and Technology (ICOEST'2014), 14-17 Mayıs, 2014, Antalya.

Koçbaşı, F., Arslan, N., Özçiftçi, H. H.. İzmit Körfezi' nde ( Marmara Denizi ) Dağılım Gösteren Yeşil Alg *Ulva lactuca* Türünde Ağır Metal Birikimi. Ekoloji 2012 Sempozyumu, 3-5 Mayıs, 2012, Kilis.

Koçbaşı, F., Anıl, B.N., Özçiftçi, H. H.. İskenderun Körfezi' nden Örneklenen *Patella* sp Türünde Cu, Zn, Pb ve Cd Düzeylerinin Belirlenmesi. Ekoloji 2012 Sempozyumu, 3-5 Mayıs, 2012, Kilis.

Koçbaşı, F., Evsen, E., Özçiftçi, H. H.. Tekirdağ Kıyılarında Dağılım Gösteren İki Makroalg Türünde (*Cystoseira barbata*( Phaeophyta), *Ulva lactuca* (Chlorophyta)) Ağır Metal Birikimi. Ekoloji 2012 Sempozyumu, 3-5 Mayıs, 2012, Kilis.

Koçbaşı, F., Yıldırım, E., Özçiftçi, H. H.. Mersin Körfezi' nden Örneklenen *Monodonta* sp.' de Ağır Metal Düzeylerinin Belirlenmesi. Ekoloji 2012 Sempozyumu, 3-5 Mayıs, 2012, Kilis.

Özçiftçi, H.H., Koçbaşı, F., Oral, R. Investigation of Toxic Effects of Silver Nanoparticles (>100 nm) and Silver Nitrate on Embryogenesis of the Sea Urchin *Arbacia lixula*. The 10th National Conference on Nanoscience and Nanotechnology (NanoTR-10), 17-21 Haziran, 2014, İstanbul.