T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANOPARTİKÜLLERİN MİKROALGAL BÜYÜME ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DİLEK ÖZTAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. DİDEM ÖZÇİMEN

İSTANBUL, 2016

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANOPARTİKÜLLERİN MİKROALGAL BÜYÜME ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dilek ÖZTAY tarafından hazırlanan tez çalışması 18.11.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Fatma Gülen İSKENDER

İstanbul Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ

Yıldız Teknik Üniversitesi

ÖNSÖZ

"Nanopartiküllerin Mikroalgal Büyüme Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması" başlıklı bu çalışma; Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Bu araştırma konusunun belirlenmesi, planlanması ve sonuçlandırılması aşamalarında beni yönlendiren, yardıma ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan Yük. Biyomüh. Benan İNAN'a ve Biyomüh. Anıl Tevfik KOÇER'e, ayrıca lisans öğrenimimden bu yana her anımda yanımda olan sevgili arkadaşım Yük. Biyomüh. Sedanur KELEŞ ve değerli desteklerinden dolayı Sai Manoj PRAKHYA'ya teşekkür ederim.

Hayatımın her anında maddi ve manevi desteklerini aldığım, sonsuz özveri ve fedakârlıkla beni bu günlere getiren aileme en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Kasım, 2016

Dilek ÖZTAY

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ vii

KISALTMA LİSTESİ viii

ŞEKİL LİSTESİ ix

ÇİZELGE LİSTESİ x

ÖZET xi

ABSTRACT xiii

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 3
1.3 Orjinal Katkı 4

BÖLÜM 2

MİKROALGLER 5

2.1 Mikroalgal Büyümeyi Etkileyen Faktörler 6
2.1.1 Işık şiddeti 7
2.1.2 Fotoperiyot 7
2.1.3 Sıcaklık 8
2.1.4 pH 8
2.1.5 Karıştırma/Havalandırma 8
2.1.6 Tuzluluk 9
2.1.7 Kontaminasyon 9
2.2 Mikroorganizma Büyüme Kinetiği 9
2.2.1 Kesikli Sistemde Mikroorganizma Büyüme Kinetiği 10

BÖLÜM 3

NANOPARTİKÜL 15

3.1 Metal Oksit Nanopartiküllerin Toksisite Mekanizması 15
3.1.1 Oksidatif Stres 17
3.1.2 Koordinasyon Etkisi 18
3.1.3 Homeostazik Olmayan Etkiler 18
3.2 Titanyum Dioksit (TiO_2) 18
3.2.1 Nano TiO_2'nin Fotokatalitik Etkisi 19
3.2.2 TiO_2 Nanopartiküllerinin Antimikrobiyal Özellikleri 20
3.3 Gümüş (Ag) 20
3.3.1 Gümüş Nanopartiküllerinin Antimikrobiyal Özellikleri 21
3.4 Nanopartiküllerin Mikroalglere Etkisini İnceleyen Çalışmalar 22

BÖLÜM 4

MATERYAL VE YÖNTEM 29

4.1 Materyal ve Cihazlar 29
4.1.1 Mikroalg Türü 29
4.1.1.1 *Chlorella minutissima*'nın Sistematiği 29
4.1.2 Nanopartikül Türleri 30
4.1.2.1 TiO_2 Nanopartikülü 31
4.1.2.2 Ag Nanopartikülü 31
4.1.3 Işık Kaynakları 31
4.1.4 Besin Ortamı 31
4.1.5 Kullanılan Cihazlar 32
4.2 Yöntem 33
4.2.1 *Chlorella minutissima*'nın Kültür Ortamı 33
4.2.2 Nanopartiküllerin Eklenmesi 34
4.3 Analitik Ölçümler 34
4.3.1 Optik Yoğunluk (OD) 34
4.3.2 Klorofil-a ve Beta Karoten Miktarı 35
4.3.3 Karbonhidrat Miktarı 36
4.3.4 Toplam Yağ İçeriği Analizi 37
4.3.5 Kuru Ağırlık Tayini 38

BÖLÜM 5

DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA 39

5.1 Optik Yoğunluk (OD) Analizi 39
5.1.1 Mikroalg Büyüme Kinetiğinin İncelenmesi 41
5.2 Klorofil-a ve Beta-karoten Miktarının Belirlenmesi 46
5.3 Toplam Karbonhidrat Miktarı Analizi 52
5.4 Toplam Yağ İçeriği Analizi 56
5.5 Kuru Ağırlık Analizi 58

BÖLÜM 6

SONUÇ VE ÖNERİLER 60

KAYNAKLAR 63

ÖZGEÇMİŞ 69

SİMGE LİSTESİ

µ	Spesifik büyüme hızı
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
A	Absorbans (soğurma) değeri
cm^3	Santimetreküp
g	Gram
K_d	Ölüm hızı
L	Litre
Lux	Aydınlanma şiddeti
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
^oC	Santigrat cinsinden sıcaklık derecesi
rpm	Karıştırma hızı, dakikada dönme sayısı
t_d	İkilenme zamanı
v/v	Hacimce
w/w	Ağırlıkça
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

AgNP	Gümüş Nanopartikül
ATP	Adenozin Trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
MDA	Malondialdehit
NP	Nanopartikül
OD	Optik Yoğunluk
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
TAG	Triaçilgliserol
TiO_2	Titanyum Dioksit
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1 Bazı mikroalg türleri 6
Şekil 2. 2 Mikroorganizma büyüme eğrisi 11
Şekil 2. 3 Kesikli kültürde hücrelerin çeşitli fazlardaki spesifik büyüme hızları 11
Şekil 2. 4 Spesifik büyüme hızının (μ) hesaplanması 13
Şekil 3. 1 Nanopartiküllerin toksisite mekanizmaları 16
Şekil 4. 1 *Chlorella minutissima* türünün ışık mikroskobu altındaki görüntüsü 30
Şekil 4. 2 TiO_2 ve Ag nanopartikülleri 30
Şekil 4. 3 Mikroalg üretimi için 150 rpm'de çalışan çalkalamalı inkübatör 33
Şekil 4. 4 Analizlerde kullanılan PG Instrument T60 model UV spektrofotometre 35
Şekil 4. 5 Fenol-sülfürik asit yöntemi ile karbonhidrat tayini için farklı glukoz konsantrasyonlarında hazırlanmış çözeltiler 37
Şekil 4. 6 Yağ ekstraksiyonundaki mikroalgler 37
Şekil 4. 7 Soxhlet ekstraktörüne alınan biyokütle ve rotary evaporatör 38
Şekil 4. 8 Santrifüj sonrası süperenatant kısmı atılmış etüvden çıkarılan örnekler 38
Şekil 5. 1 TiO_2 nanopartikülü içeren örneklerin zamana karşı çizilen OD_{680} değerleri grafiği 40
Şekil 5. 2 Ag nanopartikülü içeren örneklerin zamana karşı çizilen OD_{680} değerleri grafiği 40
Şekil 5. 3 TiO_2 NP içeren örneklerin K_d değeri hesaplama grafikleri 41
Şekil 5. 4 Ag NP içeren örneklerin K_d değeri hesaplama grafikleri 42
Şekil 5. 5 TiO_2 NP içeren örneklerin klorofil-a değerleri (μg/ml) 46
Şekil 5. 6 TiO_2 NP içeren örneklerin beta-karoten değerleri (μg/ml) 46
Şekil 5. 7 Ag NP içeren örneklerin klorofil-a değerleri (μg/ml) 49
Şekil 5. 8 Ag NP içeren örneklerin beta-karoten değerleri (μg/ml) 49
Şekil 5. 9 Standart glukoz grafiği 52
Şekil 5. 10 Kültürlere TiO_2 NP eklendikten sonra ve durağan fazda yapılan ölçümler arasındaki yüzde (%) değişim 53
Şekil 5. 11 Kültürlere Ag NP eklendikten sonra ve durağan fazda yapılan ölçümler arasındaki yüzde (%) değişim 54
Şekil 5. 12 Kültürlerin kuru ağırlığındaki değişim 59

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1 Mikroalg yetiştirme koşulları..... 7
Çizelge 3. 1 Mikroalgal organizmalara nanopartiküllerin etkisini inceleyen literatür çalışmaları.....23
Çizelge 4. 1 Bold basal medium bileşimi..... 32
Çizelge 4. 2 *Chlorella minutissima* için optimum ortam parametreleri.....34
Çizelge 4. 3 Standart glukoz konsantrasyon değerleri..... 36
Çizelge 5. 1 NP eklenen örneklerin hesaplanan µ değerleri (gün^{-1})..... 41
Çizelge 5. 2 Hesaplanan kinetik parametrelerin tablosu 42
Çizelge 5. 3 TiO_2 NP içeren kültürlerin klorofil-a ve beta-karoten miktarları 47
Çizelge 5. 4 Ag NP içeren kültürlerin klorofil-a ve beta-karoten miktarları..... 48
Çizelge 5. 5 TiO_2 içeren örneklerin glukoz miktarları..... 53
Çizelge 5. 6 Ag NP içeren örneklerin glukoz miktarları..... 54
Çizelge 5. 7 Kültürlerin yağ içeriği (% kuru ağırlık)..... 56
Çizelge 5. 8 Kuru ağırlık miktarları..... 58

ÖZET

NANOPARTİKÜLLERİN MİKROALGAL BÜYÜME ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dilek ÖZTAY

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Nanopartikül malzemelerin nano boyutlarına bağlı olarak farklılaşan benzersiz yapısal özellikleri ve son yıllarda endüstriyel alanlarda yoğun olarak kullanılması ile çevreye salınarak hava, toprak ve su ortamına karışması, bu malzemelerin ekosistemler ve canlı hücreler üzerindeki etkilerinin tespit edilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Nanopartiküllerin (NP) canlılar üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalar oldukça sınırlıdır. NP'lere maruz kalma konusunda risk altında bulunan sucul çevrelerde NP'nin su ortamındaki davranışlarını, suda yaşayan organizmalar tarafından vücuda alınma kapasitesini ve oluşabilecek potansiyel toksik etkilerini belirleme konusunda hâlen çok az bilgi mevcuttur.

NP'lerin çevremizde oluşturduğu risklerin belirlenebilmesi için öncelikle suda yaşayan organizmalar üzerindeki etkilerinin detaylı olarak araştırılması gerekmektedir. NP'lerin su ortamlarına girişleri ve su ekosisteminde birincil üretici olan alglerin büyümelerine olan zararları üzerine yapılan çalışmaların sınırlı olması bu konu hakkında güncel araştırmaları başlatmıştır.

Bu tez çalışmasında, farklı konsantrasyonlardaki (0-50 mg/L) TiO_2 ve Ag nanopartiküllerin *Chlorella minutissima* büyüme kinetiği üzerine etkileri incelenmiştir. Bu kapsamda mikroalg kültürleri farklı konsantrasyonlarda nanopartiküllere maruz

bırakılarak spesifik büyüme hızı ve ölüm hızı değerleri hesaplanmış ve çeşitli biyokimyasal analizler (klorofil-a, karbonhidrat vs.) gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, her iki nanopartikül türünün de tüm konsantrasyon değerlerinde, büyüme kinetiğine ve hücrelerin biyokimyasal kompozisyonuna önemli ölçüde etki ettiğini göstermiştir. TiO_2 ve Ag nanopartiküllerinin *C. minutissima* üzerine toksisitesinin konsantrasyona bağımlı olarak arttığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: TiO_2, Ag, nanopartikül, *Chlorella minutissima*, mikroalg, metal stresi

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF NANOPARTICLES ON MICROALGAL GROWTH

Dilek ÖZTAY

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Assoc.Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN

Each nanomaterial has unique structural properties and these properties vary depending on their size. Their increasingly intensive industrial usage during the last few years has contaminted air, water and soil as these nanomaterials get easily dissolved in them. Hence, it is necessary to investigate the possible effects of nanomaterials on eco systems and livings cells.

There are only a few studies that have investigated the effects of nanoparticles on living beings. There is little information available about the aqautic behaviour of these nanoparticles, their potential toxic effects on aquatic organisms and the capacity with which they might be ingested or penetrate into the organisms.

In order to get a holistic picture of the environmental hazards caused by nanoparticles, it is important to investigate their effect on acquatic organisms as well. The limited number of studies on the entrance of nanoparticles through water and the negative effects of algae's growth have driven the research in this direction.

In this study, the effects of titanium dioxide and silver nanoparticles with different concentrations (0-50 mg/L) on *Chlorella minutissima* growth kinetics were investigated. Within this framework, the specific growth rate and death rate of microalgae cultures exposed to different concentrations of nanoparticles were

calculated and various biochemical analyzes (chlorophyll-a, carbohydrates, etc.) were conducted. The experimental results have demonstrated that, all studied concentrations of both TiO_2 and Ag nanoparticles affect the growth kinetics and biochemical composition of microalgal cells significantly. It is found that toxicity on *C. minutissima* by TiO_2 and Ag nanoparticles increased concentration-dependently.

Keywords: TiO_2, Ag, nanoparticle, *Chlorella minutissima*, microalgae, metal stress

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Teknolojinin en hızlı gelişen alanlarından biri olan nanoteknoloji sayesinde, nanomalzemeler endüstride geniş kullanım alanı bulmuş ve nano boyutta geliştirilen ürünler gündelik yaşamımıza hızla girmiş, 1990 yılından itibaren yapılarının manipüle edilebilmeye başlanmasıyla birlikte endüstriyel anlamda yaygın kullanımları artmıştır. Sergiledikleri eşsiz özelliklerden ve amaca göre değiştirilebilen atom dizilimlerinden dolayı hem endüstriyel hem de bilimsel açıdan kullanılmaya son derece elverişli olan nanopartiküller (NP), günümüz üretim teknolojilerinin doğal bir parçası olmuş ve dolayısıyla da derinlemesine araştırılması gereken bir bilimsel inceleme konusu haline gelmiştir.

Nanoteknolojinin hızlı bir şekilde gelişmesiyle insan sağlığı, çevre ve ekonomi üzerine istenmeyen etkilerin olabileceği öngörülmektedir. Son yıllarda nanopartiküllerin endüstriyel seviyede üretimindeki artış ve tıp, medikal cihazlar, kozmetik, katalizör, atık su arıtımı ve ağır metal biyoremediasyonu gibi alanlarda ticari uygulamalarının artması bu maddelerin doğaya büyük miktarlarda salınımını kaçınılmaz kılmaktadır. Ancak nanopartiküller üzerindeki toksikolojik bilginin yeterli olmaması, nanomalzemelere maruz kalındığında oluşabilecek riskin değerlendirilmesini zor hale getirmektedir. Bu risklerin değerlendirilebilmesi için literatürde nanopartiküllerin memeli hayvanlar, sucul ortam organizmaları ve bitki gelişimi gibi alanlardaki potansiyel toksik etkilerini inceleyen çalışmalar başlamıştır. Su kaynaklarının doğrudan ve dolaylı bir şekilde

kontamine olma riski sebebiyle, NP'lerin suda yaşayan organizmalar üzerine potansiyel toksisitesi ileri boyutta mutlaka araştırılmalıdır.

Yapılan literatür taraması nanopartiküllerin canlılar üzerindeki etkilerinin ağırlıklı olarak toksik olduğunu göstermiştir. Kahru ve Dubourguier tarafından [1] hazırlanan bir çalışmada bakteriler, mayalar, nematodlar, balıklar, algler, eklembacaklı kabuklular ve siliatlara uygulanan titanyum dioksit (TiO_2) nanopartiküllerinin farklı dozları karşılaştırılmış ve canlı ölümlerinin, en düşük nanopartikül dozlarında algler ve eklembacaklı kabuklular olduğu görülmüştür.

Son yıllarda, içerdiği değerli metabolitler ve diğer biyokütle kaynaklarına göre sahip olduğu avantajlar, biyoteknolojik çalışmaların algal kültür teknolojilerine yönelmesine sebep olmuştur. Mikroalgler, hücre içinde depoladıkları değerli moleküller sayesinde; sağlık koruyucu ve gıda takviyesi, hayvan yemi, toprak yapısını iyileştirici özellikleri sebebiyle gübre olarak, doğal gıda boyası, kozmetik alanı gibi farklı alanlarda kullanılabildikleri gibi ayrıca metal bağlama yetenekleri sayesinde atık suların biyolojik arıtımında kullanılabilirler [2].

Algal biyokütle kullanımı içeren sistemlerin kurulabilmesi geniş alan ve yüksek malî destek gerektirmektedir. Bu gibi problemlerin çözümü ile algal teknoloji araştırmaları, yakın gelecekte insanlığı tehdit eden çevre kirliliği ve açlık gibi sorunlar ile sentetik kimyasalları kullanmanın getirdiği problemlere etkili ve ekonomik çözümler sağlayacaktır. Algal biyoteknolojinin gelecekteki uygulama alanları ile ilgili yapılan çalışmalar devam etmektedir [3].

Metal NP'ler su ekosisteminin birincil üreticileri olan alglerin büyümesini ve fotosentetik aktivitesini inhibe ederek, hücre zarını parçalayarak, enzimatik aktiviteyi değiştirerek, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasını indükleyerek ve DNA hasarına neden olarak toksik etki göstermektedir. NP'lerin suda yaşayan organizmalara toksik etki mekanizması henüz tam olarak belirlenmemiş olmakla birlikte, son yıllarda bu konularda yapılan çalışmalar ile mekanizma aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

TiO_2 gibi bazı metal oksit NP'ler, fotoreaktif maddeler olarak bilinmektedir. Bu maddeler su ortamında güneş ışığına maruz kaldıkları zaman fotoreaktif nanopartiküllerin toksisite karakteristikleri değişebilmektedir. Fotoreaktif maddeler ile

yaratılan stres mikroalg türlerinde lipid, protein ve nükleik asitlerin parçalanmasına sebep olan reaktif oksijen türlerinin üretilmesine ve diğer yandan bu strese karşı koruma mekanizmalarının aktif duruma geçmesine neden olmaktadır. Ayrıca, yüksek şiddetteki ışıktan kaynaklanan stresi azaltmak için hücreler triaçilgliserol (TAG) biriktirme yoluna gitmektedir. Titanyum dioksit (TiO_2) hem görünür ışık hem de UV ışığı absorbe edebilme özelliğinden dolayı güneş koruyucuları, diş macunları ve kozmetik ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Son yıllarda en fazla ilgi gören nanopartiküllerden bir diğeri de gümüş nanopartiküllerdir. Gümüş nanopartiküller (AgNP) bilim ve teknoloji alanındaki potansiyel uygulama alanları ile dikkatleri üzerine toplamaktadır. AgNP'ler geliştirilen ısıl, mekanik, elektronik, manyetik ve optik özellikleri sayesinde çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Arıtma sistemleri, dijital kayıt sistemleri, biyosensör uygulamalarında nano aygıt sistemleri, biyokimyasal ve farmasötik süreçlerde antimikrobiyal ajan özelliği ile AgNP'ler öncü rol oynamaktadır [4].

TiO_2 ve Ag nanopartiküllerin ticari uygulamalarındaki artış, bu maddelerin çevreye etkilerinin araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Bu çalışmada, nanopartikül malzemelerin çevresel ve ekonomik faydaları ispatlanmış olan algal mikroorganizmaların büyümesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Nanopartikül malzemeler endüstride kullanımları son derece artmış olan, sucul çevreye taşındıkları tespit edilmiş, potansiyel toksik özellikleri olan maddelerdir. Yapılan literatür taraması sonucunda; nanopartikül maddelerin algler üzerine etkilerinin araştırıldığı fakat algal mikroorganizmalar ile ilgili çok kısıtlı bilginin bulunduğu tespit edilmiştir. Tez çalışması sonucunda literatürdeki bilgi eksikliğinin doldurulmasına ve gelecekteki potansiyel uygulamalara katkı yapmak hedeflenmiştir.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışma, ticari açıdan öneme sahip farklı nanopartiküllerin mikroalgal büyüme kinetiği üzerine etkilerini belirlemek amacıyla ele alınmıştır. Buna ek olarak, nanopartiküllerin mikroalgal biyokütlenin biyokimyasal kompozisyonuna olan etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda, mikroalg kültürleri farklı konsantrasyonlarda

nanopartiküllere maruz bırakılarak büyüme kinetiği incelenmiş ve biyokimyasal analizleri yapılmıştır.

1.3 Orjinal Katkı

Yapılan literatür taraması sonucunda; nanopartikül maddelerin algler üzerine etkilerinin araştırıldığı, fakat algal mikroorganizmalar ile ilgili çok kısıtlı bilginin bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında, nanopartiküllerin bu tezde çalışılan mikroalg türünün büyümesi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmanın olmadığı görülmüştür. Gerçekleştirilen tez çalışması, titanyum dioksit ve gümüş nanopartiküllerin *Chlorella minutissima* mikroalginin büyümesine ve biyokimyasal yapısına olan etkisinin araştırılması ve büyüme kinetiklerinin incelenmesi ile literatüre orijinal katkı sağlayacaktır. Tez çalışması sonucunda literatürdeki bilgi eksikliğini doldurmak ve gelecekteki potansiyel uygulamalara katkı yapmak hedeflenmiştir.

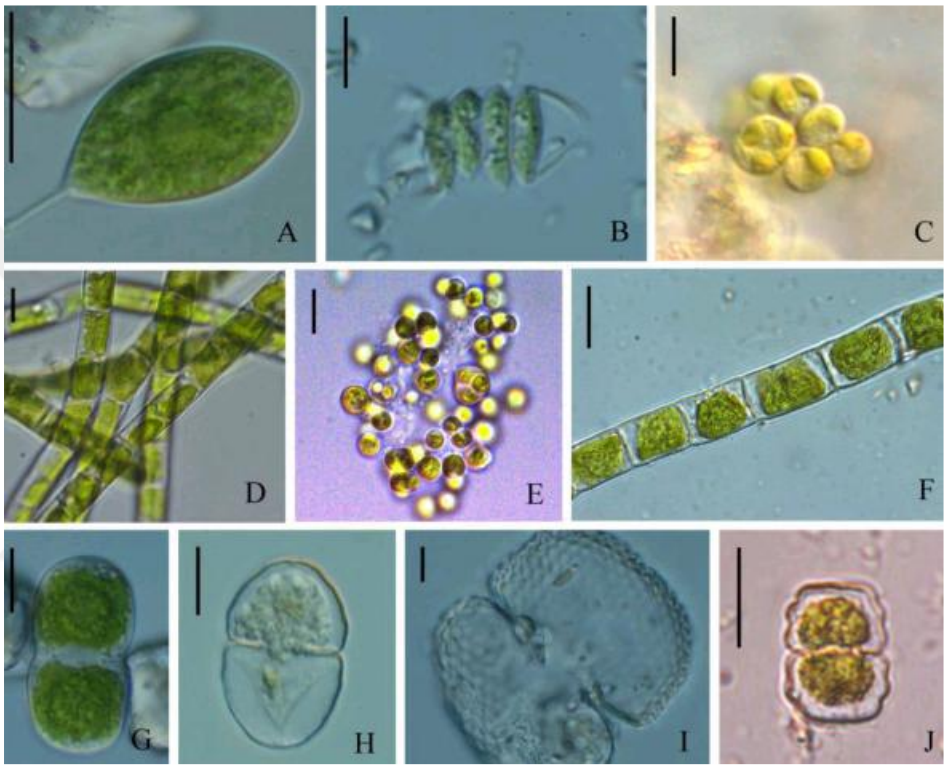
BÖLÜM 2

MİKROALGLER

Dünya üzerinde bulunan toplam bitki biyokütlesinin üçte birini algler oluşturmaktadır. Tahmini olarak belirtilen mikroalg türü sayısı 200.000 ile 800.000 arasında olmasına rağmen şimdiye kadar 50.000 tür tanımlanmıştır. Doğada besin zincirinin ilk halkasını oluşturan algler, fotosentez yoluyla ışığı absorbe ederek inorganik maddeleri organik maddelere çeviren basit yapılı sucul mikroorganizmalardır. Prokaryotik ve ökaryotik mikroalg türleri vardır. Mavi-yeşil alg olarak bilinen siyanobakteriler prokaryot olup, diğer alg türleri ökaryotik canlılardır. Pek çok alg türü yapısında protein, vitamin, karbonhidrat, antioksidan ve doymamış yağ asidi bulundurduğu için yüksek bir besin değerine sahiptir. Üstelik aynı genişlikte bir alanda ve aynı miktarda su ile yetiştirilen çoğu tarım ürününden çok daha fazla besinsel öneme sahiptirler. Alglerin fotosentez ile çevreye yapmış olduğu katkının yanı sıra fotosentez dışında gerçekleştirdiği bir diğer fonksiyon ise, içinde bulundukları suyun organik maddelerini büyük miktarda arttırmalarıdır. Bu yolla suda yaşayan canlıların besinlerini arttırmaktadırlar. Dolayısıyla alglerin bulunduğu sular son derece verimli ve diğer canlıların yaşaması için oldukça elverişlidir. Algler, kimyasal madde ve besin üretiminin yanında atık su arıtımında da kullanılırlarken ortamdaki diğer hayvanlar ve özellikle de balıklar için önemli bir besin kaynağıdırlar. Son çalışmalar alglerin daha çok polisakkaritler, yağlar, proteinler, karotenoidler, pigmentler, vitaminler, steroller, enzimler, antibiyotikler ve pek çok diğer kimyasallar (ya da öncülleri), hidrojen, hidrokarbonlar gibi farklı bileşiklerin üretiminde kullanıldığını göstermektedir [5].

Mikroalgler fotosentez yaparak oksijen ve organik bileşikleri üretir, bu aşamada karbon kaynağı olarak atmosferdeki CO_2'i kullanırlar. Mikroalgler hızlı bir biçimde çoğalırlar,

yaşam döngüleri çok uzun değildir, genetik modifikasyonları kolay ve hızlıdır. Biyokütlelerinin doğrudan hasat edilip kullanılması mümkündür. Bazı mikroalglerin içeriğinde yüksek miktarda bulunan metabolitler ticari değere sahiptir [6]. Mikroalgal biyokütle yeniden kullanılabilir, yetiştirilmesi için geniş bir alana ihtiyaç duyulmaz ve tuzlu sulardan verimsiz topraklara kurulacak havuzlara kadar geniş bir çevrede ve marjinal koşullarda yetiştirilebilirler [7]. Bu nedenle biyokütle kaynağı olarak mikroalgler diğer kaynaklara göre oldukça avantajlıdır.



Şekil 2.1 Bazı mikroalg türleri A: *Characium guttula*; B: *Scenedesmus quadricauda*; C: *Chlamydomonas reinhardtii*; D: *Klebsormidium flaccidum*; E: *Chlorella vulgaris*; F: *Ulothrix variabilis*; G: *Actinotaenium cucurbita*; H: *Cosmarium laeve*; I: *Co. quadratum*; J: *Co. Regnellii* [8]

2.1 Mikroalgal Büyümeyi Etkileyen Faktörler

Işık şiddeti, ışık periyodu, sıcaklık, tuzluluk, pH, karıştırma gibi birçok farklı parametre mikroalgal büyümeyi etkilemektedir. Bu nedenle, mikroalgal büyümeyi etkileyen parametrelerin optimize edilmesi ve kültivasyon (yetiştirme) sürecinde de devamlılığının sağlanması gerekmektedir. Mikroalg yetiştirme koşulları Çizelge 2.1'deki gibidir [9].

Çizelge 2.1 Mikroalg yetiştirme koşulları [9]

Parametre	**Aralık**	**Optimum**
Sıcaklık (°C)	16-27	18-24
Tuzluluk (g L^{-1})	12-40	20-24
Işık şiddeti (lux)	1000-10,000	2500-5000
Fotoperiyot (aydınlık:karanlık, saat)	- -	16:8 (minimum) 24:0 (maksimum)
pH	7-9	8,2-8,7

2.1.1 Işık şiddeti

Bütün fotootrofik organizmalarda büyüme hızı, besin alımı ve tüm metabolik aktiviteler ışığın kalitesi, şiddeti ve foto periyoduna bağlıdır. Işığın varlığı mikroalgin fotosentetik aktivitesini gerçekleştirebilmesi için şarttır ve ışık şiddetinin artması ile fotosentetik aktivite eşik değere gelinceye kadar artar ve bu noktada doygunluğa ulaşılır. Yüksek yoğunluktaki ışık, kloroplastlardaki ışık reseptörlerine zarar vererek foto inhibisyona neden olur ve organizmanın dengesi bozularak geri dönülmez zararlar meydana gelebilir. Uzun periyotlarda yüksek şiddette ışığa maruz kalmak biyokütle ve karotenoid miktarını artırırken klorofil miktarının azalmasına sebep olmaktadır [9]. Işık yoğunluğunun azalması durumunda genellikle, hücrelerdeki klorofil-a ve ışığı tutan pigmentler (klorofil-b, klorofil-c, fitobiliproteinler ve birincil karotenoidler) artmaktadır [10].

2.1.2 Fotoperiyot

Mikroalgal hücrelerin büyümesi ve fotosentetik aktivitesi fotoperiyodun uzunluğuna bağlıdır ve türe bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Karanlık ve aydınlık sürelerin döngüsü fotosentez, besin metabolizması ve organik bileşenlerin sentezini önemli oranda etkilemektedir. Fotoperiyodun uzaması ile algal büyümede artış görülür.

Fotosentetik prodüktivite ışık ve karanlık (I/K) frekansından etkilenir ve genellikle 1-10 Hz aralığında biyokütle artışı meydana gelir. Düşük I/K frekanslarında (1 Hz'den düşük frekanslar) büyüme prodüktivitesini azaltırken, yüksek I/K frekanslarında (20 Hz'den büyük frekanslar) hücrelere zarar verebilmektedir [9].

2.1.3 Sıcaklık

Sıcaklık, mikroalgal büyümede önemli bir rol oynar ve metabolik aktivitelerde değişiklik göstererek, enzim kinetiğini etkileyerek, biyomoleküllerin yapısını değiştirerek vs. alg büyümesine doğrudan etki gösterir. Sıcaklığa bağlı büyüme çevresel koşullara göre logaritmik ya da lineer olabilmektedir. Sıcaklık toleransına göre mikroalgleri iki gruba ayırmak mümkündür. Öritermal (eurythermal) grubu geniş bir ısı aralığını tolere edebilen türlerdir. Stenotermal grubu ise sıcaklık değişimine karşı hassas olan türlerden oluşmaktadır [9]. Genel olarak mikroalg üretimlerinde 16-27°C arasındaki sıcaklıklar tercih edilmektedir. 16°C'den düşük sıcaklıklar üremeyi yavaşlatırken, 35°C'den yüksek sıcaklıklar genellikle öldürücü etki göstermektedir [11].

2.1.4 pH

Her mikroalg türünün, üreyebildiği spesifik olarak belirli bir pH aralığı bulunmaktadır. Birçok alg türünün üreyebildiği pH değeri 7-9 aralığındadır [12]. Algal kültür ortamının pH'ı nitrat ve fosfat gibi elzem besinlerin alımının düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Biyokimyasal metabolitlerin iyonizasyonu, fosfatların presipitasyonu, çözünürlük ve iz elementlerin kullanımı gibi olaylar pH'a bağımlıdır. Dahası, bazı mikroalg türleri pH'a duyarlıdır. Karışık türlerden oluşan popülasyonlarda pH'a duyarlı alglerin türlerinin devamını sağlayabilmeleri ortamın pH'ına bağlıdır [9].

2.1.5 Karıştırma/Havalandırma

Karıştırma, mikroalg kültürlerinde, sıcaklık, ışık vb. parametrelerin ortamda optimum düzeylerde sağlanmasında anahtar role sahiptir. Karıştırma sayesinde alglerin dibe çökmesi önlenir ve kültürdeki hücreler homojen olarak dağılım gösterir. Böylece kültürdeki tüm hücrelerin, ışık ve besin maddelerinden eşit şekilde faydalanması sağlanır, ısıl tabakaların oluşumu önlenir. Kültür ortamı ile hava arasındaki gaz

transferinin (CO_2, O_2) düzenlenmesi sağlanır. Karıştırma, kültür sisteminin ölçeğine göre, günlük olarak tüpler ve erlenlerde el ile; torbalar ve tanklarda havalandırma ile; havuzlarda pompalar yardımı ile yapılır [12].

2.1.6 Tuzluluk

Mikroalgler sahip oldukları rijit yapıdaki hücre duvarları sayesinde geniş bir aralıktaki tuzlulukta yaşamlarını devam ettirebilirler. Kültür ortamında tuz konsantrasyonunun eşik değeri aşması fotosentezin ve büyümenin inhibe olmasına sebep olur. Ekstrem tuz koşullarında ise plazmoliz veya hücrede patlama meydana gelebilir. Birçok mikroalg türü için optimum tuz konsantrasyon aralığı 20-24 g/L'dir [9].

2.1.7 Kontaminasyon

Mikroalgal büyümeyi etkileyen bir diğer sınırlayıcı faktör kontaminasyondur. Açık sistemlerde hem kimyasal hem de biyolojik kontaminasyon riski yüksektir. Alglerin ürettiği çeşitli metabolitler büyüme ortamında birikebilmektedir. Yapılan bazı çalışmalar, alg tarafından üretilen 15-hidroksieikosapentanoik asit, palmitoleik asit, palmitik asit ve tekli doymamış oleik asit gibi maddelerin ortamda birikerek büyümeyi inhibe ettiğini göstermiştir. Kimyasal ya da biyolojik olarak kontamine olan biyokütlenin insan ya da hayvanlar tarafından tüketilmesi uygun değildir, yalnızca enerji üretimi için kullanılabilir. Mantar, bakteri, virüs, protozoa, zooplankton ve istenmeyen alg türleri biyolojik kontaminantlar olarak kabul edilmektedir [9].

2.2 Mikroorganizma Büyüme Kinetiği

Endüstriyel ölçekte bir üretimin planlanması sırasında en uygun tür olarak üretilecek mikroorganizmanın belirlenmesi, mikroorganizmanın fizyolojik özelliklerinin tespiti, ortam faktörlerine bağlı değişimi ve teknolojik açıdan en uygun reaktörün şekillendirilmesi gerekir.

Özellikle saf kültür ve bileşimi iyi bilinen substrat kullanılan sistemlerde matematiksel modelleme yapmak olanaklıdır. Karışık kültürün kullanıldığı veya atık su arıtımında olduğu gibi substrat bileşiminin karmaşık olduğu durumlarda pratik tecrübe olayların yorumlanması yönünden büyük önem taşır [13].

2.2.1 Kesikli Sistemde Mikroorganizma Büyüme Kinetiği

Mikroorganizmaların büyümesi belirli kurallara tabidir. Bu sebeple, bazı koşullar altında inkübasyon sonunda beklenen hücre sayısı ve biyokütle miktarı önceden belirlenebilir. Mikroorganizma büyümesi değişik fazlarda gerçekleşmektedir [13], [14].

A. Hazırlık fazı (lag-faz): Hücre bölünmesinin olmadığı bu faz, ilk hücre bölünmesi gerçekleşinceye kadar sürer. Aşılanan hücre sayısında değişiklik meydana gelmez. Besin ortamından su ve substratlar alınarak RNA, ribozom ve protein biyosentezinde (özellikle enzim biyosentezinde) kullanılır. Bu sebeple, hücre çoğalması gözlenmediği halde biyokütle artar [13].

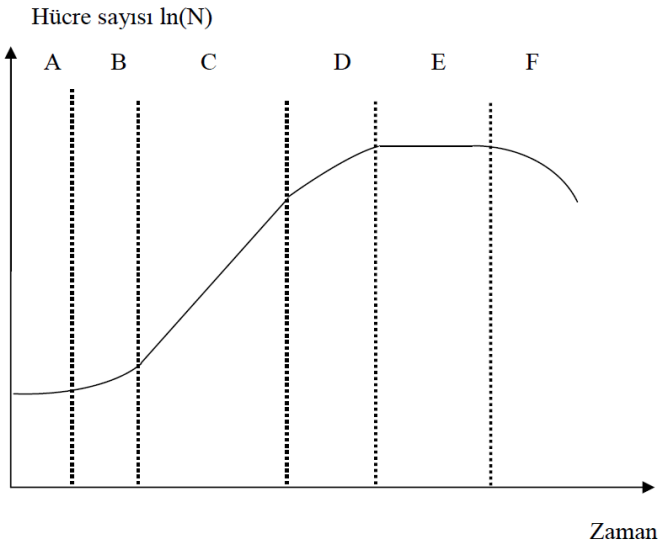
B. Uyum ve hızlanma fazı: Bu fazda hücre çoğalması başlar ama yavaş ilerler, artış eksponansiyel (logaritmik) olarak gerçekleşmez. DNA miktarı artar, enzim biyosentezi devam eder ve hücrelerdeki RNA miktarında önemli artış meydana gelir. Bazı bakımlardan benzerlik gösterdikleri için çoğu kez A ve B fazları birlikte değerlendirilir. Bu iki fazın süresi (T_{lag}), aşılamadan itibaren kültürün log-fazına geçmesine kadarki süredir [13].

C. Logaritmik faz: Bu fazda büyüme hızı pratik olarak sabittir ve maksimum değere erişmiştir. DNA sentezi RNA sentezine göre daha fazladır. Hücreler diğer fazlara göre daha küçük olup hücrelerin kuru kütlesinin, hücre sayısına oranı diğer fazlardan daha düşüktür. Bu fazdaki hücre çoğalması kolayca hesaplanabilir [13].

D. Yavaşlama fazı: Bu fazda hücre çoğalma hızı sürekli olarak azalır. Buna karşın hücre sayısı ve biyokütle artışı devam eder. Bu fazda çok değişik yaşlarda hücreler bulunabilir. Logaritmik olarak çoğalan küçük hücreler yanında, çok yavaş veya hiç üremeyen düşük DNA ve yüksek protein içerikli büyük hücreler ve ölü hücreler de bulunur. Toksik metabolik ürünlerin oluşması, substratın tükenmesi, viskozite artışı nedeniyle O_2 temininin zorlaşması gibi sebeplerden dolayı logaritmik fazdan üreme hızının düşük olduğu yavaşlama fazına geçiş olmaktadır [15].

E. Durgunluk fazı: Bu fazda yeni oluşan ve ölen hücre sayısı dengelenmiştir. Toplam hücre sayısı sabit kalır ve biyosentezler daha çok sekonder metabolit üretimine yöneliktir [13].

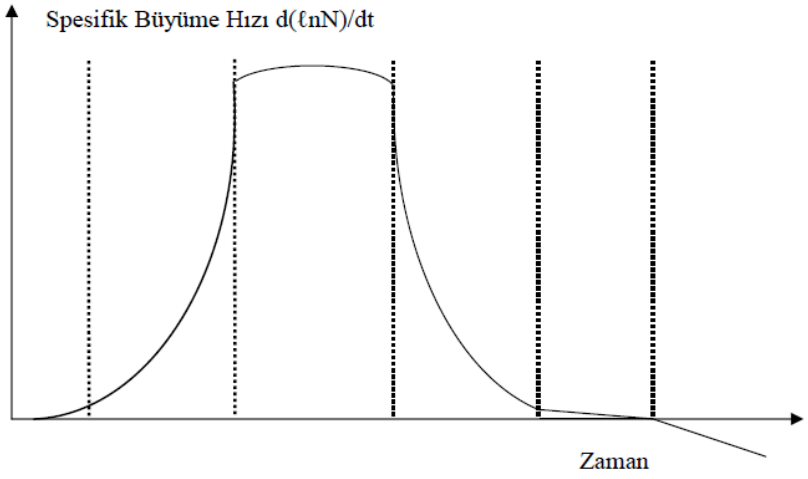
F. Letal faz (Ölüm fazı): Ölen hücrelerin sayısı yeni oluşan hücre sayısından daha fazladır. Otoliz sebebiyle ortamın yoğunluğu ve viskozitesinde azalma meydana gelir.



Şekil 2.2 Mikroorganizma büyüme eğrisi

Hücrelerin spesifik büyüme hızı, büyüme eğrisinin birinci türevi alınarak hesaplanır. Spesifik büyüme hızı, birim zamanda toplam hücre sayısına kıyasla hücre sayısındaki artış olarak ifade edilir [13].

$$\frac{d\ln N}{dt} = \frac{d\ln N}{dN} \cdot \frac{dN}{dt} = \frac{1}{N} \cdot \frac{dN}{dt} \ (saat^{-1}) \qquad (2.1)$$



Şekil 2.3 Kesikli kültürde hücrelerin çeşitli fazlardaki spesifik büyüme hızları [13]

Şekil 2.3'den de görüldüğü üzere hazırlık fazında üreme hızı sıfır olup başlangıç fazında sürekli artar ve logaritmik fazda maksimum değere ulaşır. Yavaşlama fazında hızla azalmaya başlar ve durgunluk fazında sıfıra yaklaşır. Sonunda ölüm fazında negatif

değerlerle azalmaya başlar. Logaritmik fazda spesifik üreme hızı sabit ve maksimum değerdedir.

N_t/N_0 ile zaman arasında çizilen grafik logaritmik bir eğridir. Zaman skalası ortalama generasyon süresi cinsinden dilimlenirse, her dilim hücre sayısının bir kat artması durumunu ifade eder ve $N_t/N_0 = 2^n$ şeklinde yazılabilir. Burada 'n' söz konusu zaman diliminde hücrelerin kaç kez bölündüklerini belirtir.

Hücre sayısının deneysel olarak tespitinin zor olması sebebiyle hücre büyümesi biyokütledeki artış vasıtasıyla izlenir. Biyokütlenin (X) başlangıçtaki değere kıyasla artışının logaritması ile zaman arasında çizilen grafik bir doğrudur [13].

$$X = X_0 \cdot 2^n = X_0 \cdot 2^{t/g} \text{ (g/L)} \quad (2.2)$$

Burada;

n: Hücre bölünme sayısı

t: İnkübasyon süresi

g: Ortalama generasyon süresidir. (2.2)'nin logaritması alındığı takdirde;

$$lnX = \frac{t}{g} \cdot ln2 + lnX_0 \quad (2.3)$$

eşitliği elde edilir.

Biyokütleye göre diferansiyel alınırsa;

$$\frac{dlnX}{dx} = \frac{ln2}{g} \cdot \frac{dt}{dX} = \frac{1}{X} \quad (2.4)$$

elde edilir. (2.4) yeniden düzenlenirse,

$$\frac{ln2}{g} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \mu\ (saat^{-1}) \quad (2.5)$$

eşitliği elde edilir.

(2.5)'in integrali alındığı zaman,

$$X_t = X_0 \cdot e^{\mu t} \quad (2.6)$$

denklemi elde edilir.

Bu denklemde,

X_t: t zaman sonra elde edilen biyokütle konsantrasyonunu

X_0: Logaritmik büyümenin başladığı andaki biyokütle konsantrasyonunu

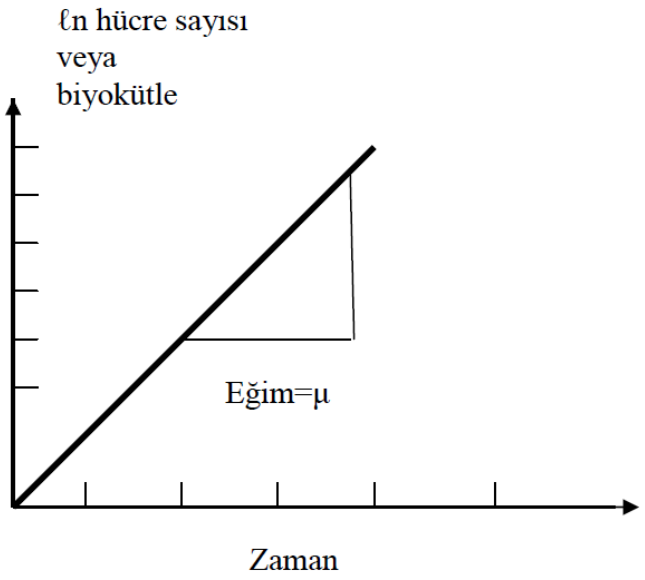
e: Doğal logaritma tabanını gösterir.

Bu denklemin de doğal logaritması alınırsa ($\log_e$=ln),

$$\ln X_t = lnX_0 + \mu t \quad (2.7)$$

denklemi elde edilir.

(2.7) denklemi, y = ax+b gibi bir doğru denklemidir. Denklemdeki a değeri bu doğrunun eğimini vermektedir. Biyokütle konsantrasyonunun doğal logaritmasının zamana karşı grafiği çizildiği takdirde elde edilen doğrunun eğimi spesifik gelişme hızını (μ) değerini verir [16].



Şekil 2.4 Spesifik büyüme hızının (μ) hesaplanması [16]

μ; hücrelerin spesifik büyüme hızı olup hücre kütlesinin toplam biyokütleye göre birim zamandaki artışı şeklinde ifade edilir. Generasyon süresi (g) ortamdaki tek bir hücrenin bir kez bölünmesi için gerekli zaman olarak tanımlanır. μ ise kültürdeki tüm hücreleri kapsar [13], [15].

Mikroorganizma büyüme hızı aşağıdaki formül ile gösterilir [14], [17].

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2.8)$$

Burada;

t: Zaman (saat)

μ: Spesifik gelişme hızı (saat^{-1})

X : Biyokütle miktarı (g/L)'dır.

Biyokütlenin zamana bağlı değişimi,

logaritmik fazda, $\frac{dx}{dt} = \mu X$ (2.9)

durgun fazda, $\frac{dx}{dt} = 0$ (2.10)

ölüm fazında, $\frac{dx}{dt} = -kX$ (2.11)

şeklindedir.

Bu eşitliklerde;

k= Spesifik ölüm hızı (saat^{-1}) ve

X= Toplam biyokütle miktarı (g/L)'dır [13].

BÖLÜM 3

NANOPARTİKÜL

Nanopartiküller, çapı 100 nanometreden küçük parçacıklar olarak tanımlanmaktadır. Parçacığın boyutunun azalmasıyla birlikte, yüzeyde kalan atomların baskın davranışlar sergilemesi, partikülün daha aktif olmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle, bu partiküller diğer malzemeler ile kolaylıkla etkileşime girebilmektedir [18].

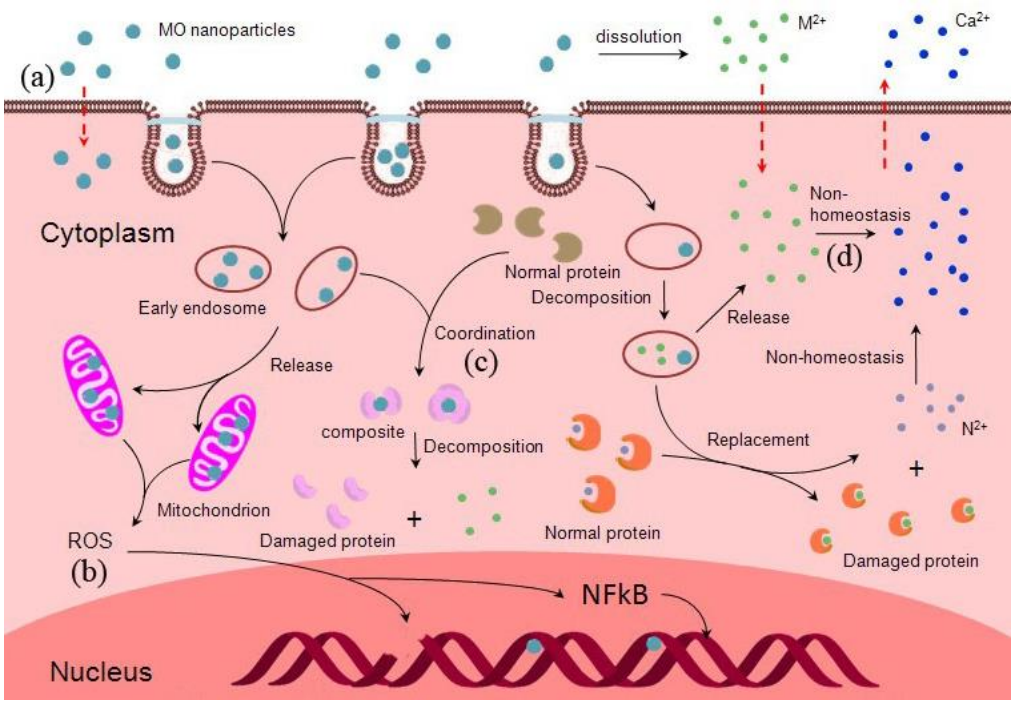
Son yıllarda nanopartiküllere gösterilen ilginin sebebi, maddelerin nano boyuta indirgendiklerinde, kimyasal reaktiflik, optik ve manyetik, yapısal ve mekanik özelliklerinin yığın yapılarından çok farklı olmasından kaynaklanmaktadır [19]. Örneğin TiO_2 ve ZnO nano boyuta indirgendiğinde şeffaf hale gelmekte, bu sebeple UV ışınlarını absorbe edebilmekte ve yansıtabilmektedirler [20]. Bu farklılıklar ise; yüksek yüzey-hacim oranları ve nano boyutlu yapılarda ortaya çıkan kuantum alan etkilerinden kaynaklanmaktadır [18]. Nanopartiküllerin bu özelliklerinden faydalanılarak atom dizilimlerini manipüle etmek ve dolayısı ile çeşitli yeni malzemeler üretmek, birbirinden çok farklı endüstriyel alanlarda bu partiküllerden faydalanmak mümkündür.

3.1 Metal Oksit Nanopartiküllerin Toksisite Mekanizması

Metal oksit nanopartiküllerin organizmalara ve çevreye karşı toksik oldukları bilinmektedir. Bu konudaki çalışmalar henüz başlangıç aşamalarında olduğu için toksisite mekanizmaları kesin olarak aydınlatılamamıştır. Metal oksit NP'lerin toksisite mekanizmaları NP'lerin biyomoleküller ile etkileşimine dayanmaktadır. Bunlar temel olarak proteinlerin yapısında meydana gelen değişiklik, enzimatik aktivite kaybı, fibrilasyon ve tiyol grupları ile bağlanmaları içermektedir. Metal NP'lerin hücrelere olan

toksik etkisi oksidatif stres, koordinasyon etkisi ve homeostaz olmayan etkiler şeklinde üç mekanizma ile açıklanmaktadır (Şekil 3.1).

Metal NP'lerin hücreye girişi Şekil 3.1 (a)'da gösterilmiştir. Küçük boyuttaki NP'ler iyon kanalları ve taşıyıcı proteinler vasıtası ile membrandan direkt olarak geçebilmektedir. Bazı NP'ler endositoz yoluyla vezikül içerisinde hücreye girebilmektedir. NP'lerden salınan iyonlar ise iyon/voltaj kapılı kanallar ile hücre içerisine girebilmektedir. Metal oksit NP'lerin indüklemesi ile hücre içinde oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkisi Şekil 3.1 (b)'de gösterilmektedir. NP'ler doğrudan mitokondri gibi oksidatif organellerle etkileşime girebilir, redoks aktif proteinleri ROS oluşumunu stimüle edebilir veya iyonlar çeşitli kimyasal reaksiyonlar vasıtasıyla ROS oluşumunu indükleyebilir. ROS, DNA zincirlerinin kırılmasına sebep olarak gen ekspresyonunu etkilemektedir. Ayrıca, metal iyonlar biyomoleküller ile şelat oluşturabilmekte ve bazı spesifik metalloproteinlerin metalleri ile yer değiştirerek proteinlerin inaktivasyonuna sebep olabilmektedir (Şekil 3.1 (c)). İyonların konsantrasyonundaki artış hücre içi metal katyon dengesini bozarak toksisiteye neden olmaktadır (Şekil 3.1 (d)) [21].



Şekil 3.1 Nanopartiküllerin toksisite mekanizmaları. (a) Hücreye giriş; (b) Hücre içinde ROS etkisi; (c) Koordinasyon etkisi; (d) Homeostazik olmayan etki [21]

3.1.1 Oksidatif Stres

NP'lerin temel toksikolojik etkisi ROS oluşumu ve oksidatif stresin meydana gelmesinden kaynaklanmaktadır. Çok az miktarda metal NP'nin hücre içine girmesi, yüksek miktarlarda ROS üretimine sebep olabilmektedir. NP'lerin ROS oluşumunu indüklemesi, lizozomun asidik ortamına maruz kalması ile ya da oksidatif organellerle etkileşime girmesi ile direkt olarak gerçekleşebilmektedir. NP'ler geniş yüzey alanına ve yüksek reaktiviteye sahip olduklarından dolayı biyomoleküllerle çok kolay bir şekilde etkileşebilmektedir. Bu süreç boyunca kimyasal reaksiyonlar gerçekleşmekte ve ROS birikimine ve oksidatif strese neden olan süperoksit anyon (O^{2-}), hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksitin oluşumu artmaktadır. ROS molekülleri biyomoleküller ile etkileşime girerek reaktif oksijenin üretimi ve biyolojik sistemlerdeki detoksifiye/onarım mekanizmaları arasındaki dengeyi bozmaktadır.

NP kaynaklı ROS üretimi çeşitli biyolojik cevapların oluşumunu tetiklemektedir. Metal oksit NP'lerin oksidatif stres etkisi zebrafishler üzerinde çalışılmıştır. Yapılan çalışmada NP formlarının yığın formlarına göre hidroksil radikalini ve oksidatif stres kaynaklı hasarı önemli ölçüde artırdığı görülmüştür. ·OH radikali ROS türleri içerisindeki en toksik yapıdır ve bütün hücresel bileşenleri oksidasyona uğratabilmektedir. Metal oksit NP kaynaklı ·OH'ın hücre dışında üretimi, hücre membranına zarar vererek organizmaya toksik etki göstermektedir.

NP kaynaklı oksidatif stresin hücrede hasar meydana getirmesi yaygın mekanizma olarak kabul edilmektedir. Metal oksit NP'ler hücre içine girdiklerinde oksidan-antioksidan mekanizma arasındaki dengeyi bozmakta ve aşırı oksidatif strese maruz kalan hücre antioksidan mekanizması işleyememektedir. ROS üretiminin artması DNA'da hasar oluşumuna ve ölüm reseptörlerinin ekspresyonunda artışa sebep olmaktadır. Lizozomda meydana gelen ROS artışı ise DNA'da nokta mutasyonlarının meydana gelmesine veya DNA'nın tek ya da çift zincirinde kırılmalara neden olmaktadır. Hücrenin oksidatif strese gösterdiği bir diğer yanıt ise hücre içine Ca^{2+} iyonlarının salınımıdır. Ca^{2+} iyonlarının salınımı mitokondriyal pertürbasyona ve hücre ölümüne sebep olmaktadır [21].

3.1.2 Koordinasyon Etkisi

Metal oksit NP'ler ve proteinler arasındaki etkileşimler koordinasyon ve kovalent olmayan bağlanmaları içermektedir. NP-protein bağlanması proteinin yapısında değişikliğe sebep olmaktadır. Metal katyonlar protein katlanmasında ve bağlanmasında rol almaktadır. Metal bağlanma bölgelerinde meydana gelecek mutasyonlar, proteinin yapısında/aktivitesinde azalmaya veya tamamen kaybına neden olabilmektedir. Organizmalardaki biyomoleküllerin birçoğu metal iyonlar ile şelat oluşturabilen koordinasyon atomlarına (çoğunlukla O ve N) sahiptir. Biyomoleküllerin koordinasyon atomları aktif bölgelerinde yer almaktadır. Bu nedenle biyomoleküller ile oluşan koordinasyon, biyomoleküllerin inaktivasyonuna ve dolayısıyla toksisiteye neden olmaktadır. Farklı metal iyonları proteinlerin farklı bağlanma bölgelerine ve farklı afinitelerle bağlanmaktadır. Koordinasyon etkisi doğrudan ve dolaylı olarak DNA hasarına neden olabilmektedir. NP'lerin DNA veya DNA ile ilgili proteinlerle direkt etkileşimi genetik materyalde fiziksel hasara neden olmaktadır. Hücresel sinyal moleküllerine NP'lerin bağlanması ile kaskad aktivasyonu gerçekleşmekte ve DNA parçalanması ve hücre ölümü indüklenmektedir [21].

3.1.3 Homeostazik Olmayan Etkiler

Cu ve Zn gibi iyonlar homeostazinin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu metal iyonlarının hücresel konsantrasyonunun artması veya azalması homeostazik mekanizmanın işleyişinin bozulmasına neden olmaktadır. Hücrenin tolere edebileceği limit değerin üzerine çıkıldığı zaman toksisite meydana gelmektedir [21].

3.2 Titanyum Dioksit (TiO_2)

TiO_2, molekül ağırlığı 79,87 gram olan beyaz toz yapısında ve yarı iletken özellik gösteren bir maddedir. Kokusuzdur. 1855^oC erime noktasına sahip maddenin rutil, anataz ve brokit olmak üzere üç farklı kristal yapısı bulunmaktadır. Bu yapıların üçü de aynı kimyasal formül (TiO_2) kullanılarak tanımlanır. Anataz ve rutil formlar fotokatalitik özellik göstermektedir [22].

Yarı iletkenler arasında en yüksek fotokatalitik etki gösteren TiO_2 suda çözünmez, kolay elde edilebilir, yüksek kırma indisine ve geniş bir bant aralığına sahip, ekonomik bir maddedir. Sahip olduğu bu özelliklerinden dolayı lityum pillerinde anot olarak, antibakteriyel olarak, kemik implantlarında biyosensör ve biyouyumlu malzeme olarak, gıda maddeleri, kozmetikler ve boyalarda beyaz pigment olarak farklı uygulama alanlarına sahiptir [23]. TiO_2'nin dezavantajı, foto-bozunmadan sonra ayrılma ve yeniden kullanılmasında ortaya çıkan bazı güçlüklerden kaynaklanmaktadır [24]. Geniş pH aralığında yüksek fotokimyasal kararlılık gösteren TiO_2, aynı zamanda UV ışını altında antimikrobiyal özellik de göstermektedir.

3.2.1 Nano TiO_2'nin Fotokatalitik Etkisi

Titanyum oksit ışığı absorpladığı takdirde elektronlar (e^-) ve pozitif boşluklar (h^+) meydana gelir. Sıradan maddelerde elektronlar ve pozitif boşluklar hemen birleşirken TiO_2'de ise bu birleşme daha yavaş şekilde gerçekleşir. Titanyum oksitin diğer bir önemli özelliği, iletkenlik bandındaki uyarılmış elektronların indirgeme gücünün pozitif boşlukların güçlü oksidatif parçalayıcı gücünden daha küçük olmasıdır. Dolayısı ile yarı iletken yüzeyine adsorplanacak madde ilk önce elektron boşlukları ile etkileşime girecektir.

Fotokatalizörün yüzeyindeki su içeriği absorplanmış su olarak ifade edilir ve su, pozitif boşluklar tarafından yükseltgendiği zaman güçlü oksidatif parçalama gücüne sahip hidroksi radikalleri ($\cdot OH^-$) oluşur. Oluşan hidroksi radikalleri organik madde ile tepkimeye girer. Ortamda oksijen bulunuyorsa, organik bileşikteki ara radikaller ve oksijen radikal zincir reaksiyonuna uğrar ve bazı durumlarda oksijen tükenir. Böyle durumlarda, organik madde parçalanır ve en son basamakta da CO_2 ve suya dönüşür. Bazı koşullarda organik madde pozitif boşluklarla direkt olarak tepkimeye girebilir ve sonuçta oksidatif parçalanma meydana gelir. Bu esnada oksijen içeren havanın indirgenmesi ile de bir çift tepkime meydana gelir. Oksijenle kolayca indirgenebilir bir madde ise hidrojen üretimi yerine oksijen indirgenmesi meydana gelir ve oksijenin indirgenmesi ile süperoksit anyonu (O_2^{*-}) oluşur.

$O^- + 2H^+ \rightarrow 2\cdot OH$

Süperoksit anyonu oksidatif reaksiyondaki ara ürünlere saldırarak peroksit, hidrojen peroksit ve su meydana getirir [25].

3.2.2 TiO_2 Nanopartiküllerinin Antimikrobiyal Özellikleri

TiO_2 yaygın olarak kullanılan yarı iletken bir fotokatalizördür. Işık ile aktive edildiği zaman meydana gelen fotokatalitik etkisi ile su ve havanın temizlenmesi gibi birçok farklı çevresel uygulamada kolaylıkla kullanılabilmektedir. Yapılan son araştırmalarda nano boyutta TiO_2'nin Polivirus 1, Hepatit B virüsü, kompleks Herpes virüsü ve MS2 bakteriyofajını öldürebildiği rapor edilmiştir. Genellikle 100 ile 1000 ppm konsantrasyon aralığındaki nano TiO_2'lerin bakterisidal özellik gösterdiği saptanmıştır. Parçacık boyutu, yoğunluğu ve kullanılan ışığın dalga boyu da TiO_2'nin antimikrobiyal etkisini değiştiren önemli parametrelerdir [26].

TiO_2'nin antimikrobiyal etkinliği; reaktif oksijen türlerinin (ROS), görünür ya da UV-A ışını altında sırasıyla oksidatif ve indirgeyici yolakları kullanarak peroksit oluşturabilen, üretimi ile ilişkilidir [27].

Huang vd. [28], fotokatalitik reaksiyonların, hücre geçirgenliğini arttırarak, hücre içindeki hücre ölümüne neden olan komponentlerin hücre dışına çıktığını gözlemlemişlerdir. Sunada vd. [29], UV ışınına maruz bırakılan TiO_2 filmlerin *E. coli* hücrelerinin iki aşamada ölümüne neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Birinci aşamada, yüzeyde oluşan reaktif oksijen türleri (·OH, HO_2·, H_2O_2), *E. coli* hücresinin dış membranını, kısmen parçalamakta ve dış membran bu etki meydana geldikten sonra, reaktif oksijen türleri, sitoplazmik zara penetre olarak hücre ölümüne neden olurlar.

3.3 Gümüş (Ag)

Gümüş, atomik ağırlığı 107,8 gram olan, beyaz ve parlak metalik bir elementtir. Yüksek elektriksel ve ısıl iletkenliğe sahip olması nedeniyle çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [30]. Son yıllarda potansiyel uygulama alanlarının çokluğu sayesinde en fazla ilgi gören nanopartiküller arasında gümüş nanopartiküller (Ag NP) gelmektedir. Yığın formda bulunan gümüşe göre Ag NP'lerin olağanüstü fiziksel ve kimyasal özellikleri bu maddelerin önemini ve kullanım alanlarını artırmaktadır [31].

Mekanizması tam olarak anlaşılamamasına rağmen, gümüşün birçok farklı uygulama alanı içerisinde hijyen amaçlı kullanılan dezenfektan özelliği önemli bir yer tutmaktadır [30].

Nano boyutta gümüş, önemli ölçüde değişik fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler sergilemektedir. Gümüş metal ve kaplama insan vücudunda makul düzeyde kullanıldığı takdirde herhangi bir yan etki oluşumu gözlenmez. Virüs, bakteri, mantar gibi patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olan gümüşün fazla miktarda kullanımı yalnız insan vücuduna zararlı değildir. Suda yaşayan organizmalar ve topraktaki mikroorganizmalar için de fazlası toksik etki göstermektedir [30].

3.3.1 Gümüş Nanopartiküllerinin Antimikrobiyal Özellikleri

Gümüş iyonları ve bileşikleri, antimikrobiyal özellik göstermeleri sebebiyle geniş bir kullanım alanına sahiptir. Fakat toksisite mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılmamıştır [26]. Gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal özellikleri boyutlarına bağlı olarak değişmektedir. Boyutu küçük olan partiküller, daha fazla antimikrobiyal etkiye sahiptir [32]. Literatürde bu olay iki şekilde açıklanmaktadır. Küçük partiküller hücre duvarından daha kolay ve hızlı geçerek daha etkin antimikrobiyal etki gösterir. Diğer yandan küçük partiküllerin yüzey alanının hacmine oranla fazla olması, daha fazla antimikrobiyal aktiviteye sahip olmasına sebep olur [33]. Partiküllerin şekli de onların antimikrobiyal özelliğini etkileyen bir başka parametredir. Gümüş nanopartiküller küre, çubuk veya üçgen şeklinde farklı antimikrobiyal etki sergilemektedir. Pal vd. tarafından [34] yapılan bir çalışmada, üçgen şeklinde olan gümüş nanopartiküllerin küre şeklinde olan partiküllere göre, küre şeklinde olan partiküllerin de çubuk şeklinde olanlara göre daha fazla antimikrobiyal etki gösterdiği ortaya konmuştur. Antimikrobiyal etki, partikülerin aktif yönü ne kadar fazla ise, o oranda artmaktadır. Gümüş nanopartikülleri proteinlerin tiyol grupları ile etkileştiğinde enzimleri inaktifleştirerek ikincil reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadırlar. Fosfolipit yapıdaki hücre zarında bulunan fosfat ve sülfür gruplarına bağlanarak hücre zarının yapısını ve geçirgenliğini değiştirmekte, hücresel oksidasyon ve solunum proseslerini etkilemektedir [26]. Ayrıca, DNA molekülü ile reaksiyona girmesi sonucu hücre ölümü

(apoptosis) meydana gelmektedir [35]. UV ışınları ile aktifleşen Ag NP'ler, virüs ve bakterileri etkisiz hale getirebilmektedirler [26].

3.4 Nanopartiküllerin Mikroalglere Etkisini İnceleyen Çalışmalar

Mikroalgal organizmalara nanopartiküllerin etkisini inceleyen literatür çalışmaları Çizelge 3.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1 Mikroalgal organizmalara nanopartiküllerin etkisini inceleyen literatür çalışmaları

ÇALIŞMANIN ADI	YIL	ALG TÜRÜ	NP	ÇALIŞMANIN AMACI	KOŞULLAR	SONUÇ	REF.
Effects of TiO_2 nanoparticles on ROS production and growth inhibition using freshwater green algae pre-exposed to UV irradiation	2015	*Pseudokirchneriella subcapitata*	TiO_2	Anataz formda nano TiO_2'nin UV altında ROS üretimine etkisinin incelenmesi.	24±2°C, UV ile ön işlem (3 saat beyaz floresan ışık, 0, 0.2, 2, 10, 50, 250 mg/L NP konsantrasyonu	Nano- TiO_2'nin filtreli ve filtresiz UV koşullarında ROS üretimini indüklediği görülmüştür. UV filtreli ve filtresiz kültürlerde 3 saat süreyle yapılan ön işlemde algal büyümenin azaldığı belirlenmiştir. Görünür ışık koşullarında 50 kat daha düşük konsantrasyonda NP'lerin toksik etkisi gözlenmesi sebebiyle ROS üretiminin UV ile direkt bağlantılı olmadığı tespit edilmiştir.	[36]
Toxic Effect of Silver and Platinum Nanoparticles Toward the Freshwater Microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*	2014	*Pseudokirchneriella subcapitata*	Ag, Pt	Gümüş ve platinyum NP'lerin *P. Subcapitata* büyümesine ve fotosentetik pigmentlere etkisini incelemek.	25°C, pH 8, Pt NP partikül boyutu ≤50 nm ve 5, 10, 15, 20, 25 mg/L, Ag NP partikül boyutu ≤100 nm ve 1, 2, 3, 4, 5 mg/L	Kültürün optik yoğunluğu (OD), hücre sayısı ve klorofil içeriği arasında çok iyi derecede korelasyon bulunmuştur. AgNP ≥5 mg/L ve Pt NP ≥25 mg/L'nin algal büyümeyi tamamen inhibe ettiği belirlenmiştir. Ag NP'nin Pt NP'ye göre daha toksik olduğu bulunmuştur.	[37]
Combined toxicity of two crystalline phases (anatase and rutile) of Titania nanoparticles towards freshwater microalgae: *Chlorella sp.*	2014	*Chlorella sp.*	TiO_2	Anataz ve rutil (TiO_2) formların ayrı ayrı ve kombin şekilde UV-C altında mikroalg türüne etkisini incelemek.	23°C, pH 7,76, 0.25, 0.5 ve 1 mg/L NP konsantrasyonu, UV-C radyasyonu, BG-11 medium, 3000 lux floresan lamba (16s/8s)	NP kristalinitesinin oksidatif stresi etkileyen parametrelerden biri olduğu görülmüştür. TEM görüntülerinden anataz yapının nükleus ve hücre membranını parçaladığı, rutil yapının ise kloroplast ve diğer organellere hasar verdiği tespit edilmiştir. Kombin etkinin daha zararlı olduğu bulunmuştur. Anataz ve rutil formun hücre büyümesini hemen hemen aynı miktarda etkilediği ama klorofil, ROS üretimi ve membran bütünlüğünü farklı etkilediği gözlenmiştir.	[38]

Çizelge 3.1 Mikroalgal organizmalara nanopartiküllerin etkisini inceleyen literatür çalışmaları (devamı)

Enhancing lipid productivity of *Chlorella vulgaris* using oxidative stress by TiO_2 nanoparticles	2014	*Chlorella vulgaris*	TiO_2	NP ile oksidatif stres koşulları yaratarak lipid içeriğini arttırmak.	25°C, 120 rpm karıştırma, 170 µmoles/m^2/s, TAP medium, 0, 0.1, 1, 2.5, 5 g/L NP konsantrasyonu	TiO_2 NP'nin agregasyon oluşturması ve gölgeleme etkisiyle maksimum spesifik büyüme hızını düşürdüğü kaydedilmiştir. UV-A ışını altında 5 g/L TiO_2 NP koşullarında klorofil miktarında azalma görülmüştür. YAME kompozisyon analizinde eş zamanlı biçimde lipid birikimi ve dekompozisyonu gerçekleştiği tespit edilmiştir. 2 gün süreli 0.1 g/L TiO_2 koşullarında en yüksek YAME içeriği ve verimliliği elde edilmiştir.	[39]
Toxicity of nano- TiO_2 on algae and the site of reactive oxygen species production	2014	*Karenia brevis*, *Skeletonema costatum*	TiO_2	NP ile oksidatif stres koşulları yaratarak lipid içeriğini arttırmak.	22±1°C, beyaz floresan ışık: 12,000 lux, ışık döngüsü 14:10 s, F/2 medium; 0, 5, 10, 20, 30 mg/L NP konsantrasyonu	Bu çalışmada TiO_2 NP'lerin *K.brevis and S. costatum* türlerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Anti-oksidatif enzimlerin seviyesindeki değişimin oksidasyon ve antioksidasyon arasındaki dengeyi bozduğu görülmüştür. ROS üretimi lipid oksidasyonuna neden olmuş ve algal büyümeyi inhibe etmiştir. Elektron taşıma zincirindeki inhibitörler K. brevis'teki ROS üretim ve birikim yerinin kloroplast olduğunu göstermiştir. *S. costatum* türünde ROS üretim yeri hâlâ bilinmemektedir.	[40]
Interaction of TiO_2 nanoparticles with the marine microalga *Nitzschiaclosterium*: Growth inhibition, oxidative stress and internalization	2014	*Nitzschia closterium*	TiO_2	Nano/yığın form karşılaştırması, sitotoksik etkinin antioksidan enzimlerin aktiviteleri ile belirlenmesi, ROS oluşumu, NP'lerin hücre içine alınma ihtimalinin araştırılması.	20±1°C, 3500 lux, 12:12 s, F/2 medium, 21 nm parçacık: 5, 10, 20, 40, 80,100 mg/L, 60 nm parçacık: 10, 20,40, 80, 160, 240, 360 mg/L	Sonuçlar partikül boyutu azaldıkça TiO_2 NP toksisitenin arttığını göstermiştir. 5 mg/L TiO_2 NP (21 nm) oldukça toksik bulunmuştur. Antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT ve POD) ilk olarak indüklenmiş, sonrasında inhibe olmuştur. Bu enzimlerdeki azalma ile birlikte MDA ve ROS üretimi artmış ve membran bütünlüğü bozulmuştur.	[41]

Çizelge 3.1 Mikroalgal organizmalara nanopartiküllerin etkisini inceleyen literatür çalışmaları (devamı)

Ecotoxicity of Ag-Nanoparticles on Two Microalgae, *Chlorella Vulgaris* and *Dunaliella Tertiolecta*	2013	*Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta*	Ag	AgNP'nin alg türlerine toksik etkisini araştırmak.	25°C, sürekli ve sabit aydınlanma (100 mmol/m^2/s), BG11 medium, 0, 10, 50, 100, 200 mg/L konsantrasyonları	100 ve 200 mg/L AgNP'nin her iki tür için de oldukça toksik olduğu, SOD, CAT ve POD aktivitelerini düşürdüğü ve ROS oluşumu ile MDA seviyesini arttırdığı bulunmuştur. *C. vulgaris*'te *D. tertiolecta*'ya göre 4-9 kat daha fazla SOD aktivitesi gözlenmiş, *D. tertiolecta*'nın AgNP'ye daha hassas olduğu görülmüştür.	[42]
Cytotoxicity of TiO_2 nanoparticles and their detoxification in a freshwater system	2013	*Scenedesmus obliquus*	TiO_2	Düşük derişimlerdeki TiO_2 NP'nin farklı aydınlanma koşullarında (UV ışığı ve karanlık) alg üzerine etkisinin araştırılması.	Beyaz floresan lamba 3000 lux ve karanlık koşullar, aydınlanma süresi 16/8 s, BG11 medium	Her iki koşulda da (aydınlık ve karanlık) hücre sayında önemli oranda azalma, ROS üretimi ve membran geçirgenliğinde artış gözlenmiştir. Işık ile muamele edilen kültürlerde daha fazla ROS üretimi ve membran bütünlüğünün bozulması dolayısıyla daha yüksek sitotoksisite tespit edilmiştir. Fiziksel adsorpsiyon ve NP'lerin içeri alımının karanlık koşullarda sitotoksisiteye neden olduğu belirlenmiştir.	[43]
Effect of Silver Nanoparticles on Growth of Eukaryotic Green Algae	2012	*Pithophora oedogonia*, *Chara vulgaris*	Ag	Nano Ag'nin alg türlerinin büyümesine etkisini incelemek.	22±1°C, 2000 lux beyaz floresan lamba (günde 16 saat), soil-water biphasic medium, bold's basal medium, 0.5, 1, 3, 5 mM	Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında her iki türde de klorofil içeriğinde önemli derecede azalma görülmüştür. *C. vulgaris*'teki düşüş *P. oedogonia*'ya göre daha fazla olmuştur. Yüksek konsantrasyona bırakılan kültürlerde kloroplastların parçalandığı ve kromozomal anomalilerin gerçekleştiği tespit edilmiştir.	[44]

Çizelge 3.1 Mikroalgal organizmalara nanopartiküllerin etkisini inceleyen literatür çalışmaları (devamı)

Effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on green algae under visible, UVA, and UVB irradiations: No evidence of enhanced algal toxicity under UV pre-irradiation	2012	*Pseudokirchneriella subcapitata*	ZnO, TiO_2	ZnO ve TiO_2 NP'lerin görünür, UVA ve UVB ışık altında alg üzerine etkisini araştırmak.	24±1°C, ışık koşulları: görünür ışık, 1000 lux, OECD medium (pH 7.7), 0, 0.5, 1, 3, 10 mg/L NP konsantrasyonu	Her üç koşul altında farklı ışık koşullarının gözlenmiştir. UVA ve UVB kültürlerde toksisitede artış TiO_2 NP'lerin fotokatalitik aralığın her ikisinde de işlem olarak UV toksisitede artış olmadığı toksisitenin yalnızca Zn^{2+} gözlenmiştir.	mikroalg büyümesi inhibe olmuş, büyümeyi etkilemediği gözlenmiştir. Bu, ZnO ve görünür özelliğinin UV ve görünür kaynaklıdır. Ön uygulanan kültürlerde de algal salınımından kaynaklı olduğu	[45]
Toxilogical effects of nanometer titanium dioxide (nano-TiO_2) on *Chlamydomonas reinhardtii*	2012	*Chlamydomonas reinhardtii*	TiO_2	Nano-TiO_2'nin algal fotosentez büyümeye etkisinin incelenmesi.	25±1°C, 55 µE/m^2/s veakkor lamba (12s/12s), 21 nm partikül boyutu, 0, 0.1, 1, 10, 20, 100 mg/L NP koşulları	Nano-TiO_2'nin fotosentetik verimi ve algal büyümeyi inhibe ettiği, bununla beraber alg içeriğindeki klorofil-a miktarında değişim görülmezken karotenoid ve klorofil-b içeriğinde artış gözlenmiştir. MDA seviyesinde artış, hücrelerde hasar, kloroplast organellerde parçalanma ve plazmoliz tespit edilmiştir.		[46]
Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*	2011	*Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta*	Ag	50 nm'ye kadar olan AgNP'nin alg türlerine toksik etkisini araştırmak, hücre duvarı olan ve olmayan iki tür üzerinde nanopartikül etkisini incelemek.	24°C, sürekli ve sabit aydınlanma (100 mmol/m^2/s), 3 farklı mediumu [nanopure water (pH 6,8), BG-11 (pH 7) ve McLachlan (pH 6)], 0, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/L NP konsantrasyonları	AgNP'lerin toksisitesinin türde de büyümeye negatif etki, hücre sayısında azalma, ROS oluşumu, lipid peroksidasyonu gözlenmiştir. AgNP'lerin farklı kültür ortamlarında farklı davranışlar sergilediği bulunmuştur. En fazla agregat oluşumu McLachlan besiyerinde tespit edilmiştir. pH agregat oluşumunu dolayısıyla toksisiteyi etkilemiştir. *C. vulgaris* hücre duvarına sahip olmasından dolayı *Dunaliella tertiolecta*'ya göre agregasyondan daha fazla etkilenmiştir. ROS ve MDA oluşumu *Dunaliella tertiolecta* türünde daha fazla olmuştur.		[47]

Çizelge 3.1 Mikroalgal organizmalara nanopartiküllerin etkisini inceleyen literatür çalışmaları (devamı)

Ecotoxicity study of titania (TiO_2) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.*	2011	*Scenedesmus sp.* *Chlorella sp.*	TiO_2	Mikron ve nano boyuttaki taneciklerin mikroalg üzerine toksik etkisinin incelenmesi.	25°C, beyaz floresan lamba: 3000 lux, ışık döngüsü 12:12 s, Bold basal medium, pH:6.8, 3, 6, 12, 24, 48, 96, 192 mg/L NP koşulları	Titanyum partiküllerinin nano formda oldukça toksik olduğu görülmüştür. Konsantrasyona bağımlı olarak büyümede inhibisyon ve klorofil miktarında azalma gözlenmiştir. FTIR çalışmaları partiküller ile hücre duvarındaki yüzey aktif bölgelerinin etkileşimini ortaya koymuştur.	[48]
Studies on toxicity of aluminum oxide (Al_2O_3) nanoparticles to microalgae species: *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.*	2011	*Scenedesmus sp.* *Chlorella sp.*	Al_2O_3	Mikron ve nano boyuttaki taneciklerin mikroalg üzerine toksik etkisinin incelenmesi.	25 °C, 50 nm ve 5 µm partikül boyutu, 3, 6, 12, 24, 48, 96 ve 192 mg/L NP koşulları, 12s:12s 5000 lux aydınlanma koşulları, BB medium	Alüminanın her iki formda alg hücrelerine toksik olduğu, nano formdaki taneciklerin hücreler için daha toksik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Konsantrasyona bağımlı olarak klorofil miktarındaki azalışın gölgeleme etkisinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Çalışma süresince nanopartikül agregasyonundaki artış hidrodinamik çapın artışıyla doğrulanmıştır. Algal türlerin agregasyonu artırdığı tespit edilmiştir.	[49]
Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella sp.*	2010	*Chlorella sp.*	TiO_2, Al_2O_3, SiO_2, ZnO	Farklı NP'lerin toksisitesinin incelenmesi ve nano, yığın (bulk), çözünmüş iyon formlarının etkisinin karşılaştırılması.	25°C, karanlık ve ışıklı ortam (70 µmoles/m^2/s), SE medium, 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 1000 mg/L NP konsantrasyonu	Al_2O_3, SiO_2, ve TiO_2 (rutil) NP'lerin önemli oranda toksisite oluşturmadığı, nano-ZnO ve nano-TiO_2 (anataz) yapıların mikroalgal büyümeyi önemli derecede inhibe ettiği gözlenmiştir. ZnO ve TiO_2 (anataz) nano yapıların yığın formlarına göre oldukça toksik olduğu belirlenmiştir. Kültürlerde agregasyonun ve iyon salınımının meydana gelmesi toksisiteyi etkileyen diğer nedenlerden olduğu bulunmuştur. Karanlık ortamda yapılan deneylerde de ROS üretimi gözlenmiştir.	[50]

Çizelge 3.1 Mikroalgal organizmalara nanopartiküllerin etkisini inceleyen literatür çalışmaları (devamı)

Biotoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*	2010	*Chlorella vulgaris*	NiO	NiO NP toksisitesinin değerlendirilmesi. Algal kültürde çözünürlük ve agregasyonunun incelenmesi.	24 °C, 12s:12s aydınlanma, f/2 medium, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50 mg/L NP koşulları	Sonuçlar NiO nanopartiküllerinin büyümeyi inhibe ederek ve morfolojik değişikliklere sebep olarak biyotoksisiteye neden olduğunu göstermiştir. Gölgeleme etkisi, agregat oluşumu ve bunun yanı sıra ortama salınan Ni iyonlarının biyotoksisiteden sorumlu olduğu görülmüştür. Aynı zamanda, canlı alg hücrelerinin NP agregasyonunu artırdığı ve NiO nanopartiküllerinin sıfır değerlikli nikele indirgendiği saptanmıştır.	[51]
Algal testing of titanium dioxide nanoparticles—Testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability	2009	*Pseudokirchneriella subcapitata*	TiO_2, Cd	Farklı parçacık boyutlarının algsürekli ışıma algisini (80-105 µE/m^2/s), pH ve Cd elementi ile birlikte TiO_2'nin etkisinin araştırmak.	20±1°C, 200 rpm, koşullarında incelemek 7.4-7.8, farklı partikül boyutları 10, 30, ve 300 nm, 16 farklı konsantrasyonu (0.6-250 mg/L)	Algal büyüme inhibisyonu her üç partikül boyutunda da görülmüştür, fakat mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. Etkinin doza bağımlı olduğu ve olmadığı her iki çalışmada da toksik etki TiO_2 varlığında Cd biyoyararlanımı azaldığı göstermiştir. TiO_2 için toksisitede azalma gözlenmiştir.	[52]
Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*	2008	*Chlamydomonas reinhardtii*	TiO_2, kuantum noktaları (QDs)	NP ve kuantum noktalarının alg üzerine etkisini araştırmak.	CM medium, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg/L konsantrasyonu	Büyüme kinetikleri, NP ve QD etkisinde büyümedeki inhibisyonun ilk 2 ve 3. günlerde gerçekleştiğini göstermiştir. NP ve QD'a maruz kaldıktan 6 saat sonra lipid peroksidasyonu gerçekleşmiştir. *Chlamydomonas reinhardtii* türü için QD'lerin nanopartiküllere göre daha toksik olduğu belirlenmiştir.	[53]

BÖLÜM 4

MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 Materyal ve Cihazlar

4.1.1 Mikroalg Türü

4.1.1.1 *Chlorella minutissima*'nın Sistematiği

Alem: Protista (Bitkiler ve Hayvanlar)

Bölüm: Chlorophyta (Yeşil algler)

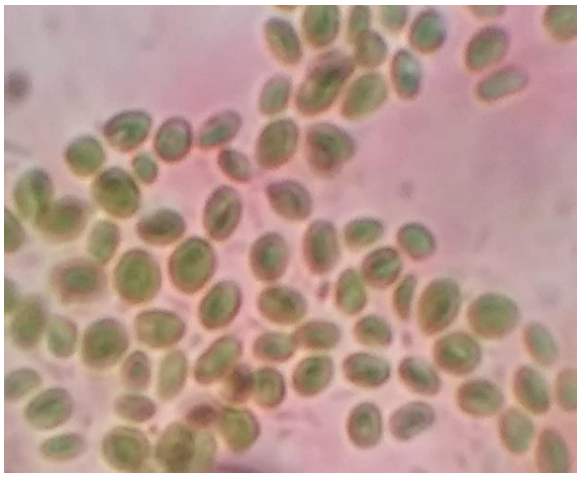
Sınıf: Chlorophycae

Takım: Chlorococcales

Aile: Oocystaceae

Cins: Chlorella

Tür: *Chlorella minutissima*

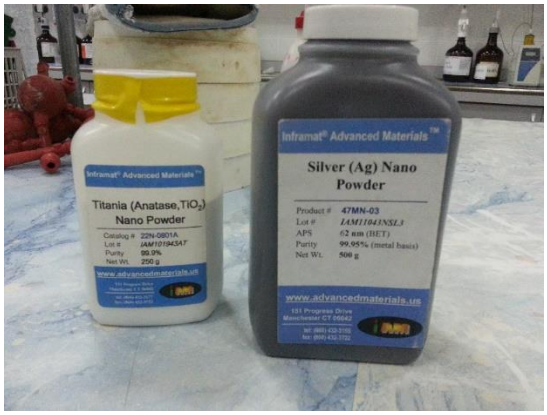


Şekil 4.1 *Chlorella minutissima* türünün ışık mikroskobu altındaki görüntüsü

Chlorella minutissima hızlı bir büyüme oranı ile tek hücreli ökaryotik alg ve biyokütle üretimi için yaygın olarak kullanılan mikroalg türüdür. Chlorophyta bölümüne ait *Chlorella minutissima* küresel şekilde olup, klorofil a ve b'ye sahiptir, kamçısı yoktur ve bitkiler gibi nişasta sentezler. *Chlorella minutissima* aminoasitler ve çoklu doymamış yağ asitleri bakımından da zengindir, bu özelliği mikroalgi sağlık sektöründe, gıdalar ve ilaçlarda potansiyel olarak yararlı kılar. Potansiyel alg türleri arasında, *Chlorella minutissima* yüksek lipid içeriğine (kuru ağırlık biyokütle %10-57) sahiptir ayrıca atık suların arıtılması çalışmalarında kullanılmaktadır [54].

4.1.2 Nanopartikül Türleri

Çalışmalarda ticari olarak satılan Inframat Advanced Materials marka TiO_2 ve Ag nanopartikülleri kullanılmıştır.



Şekil 4.2 TiO_2 ve Ag nanopartikülleri

4.1.2.1 TiO_2 Nanopartikülü

Materyal: Titanyum dioksit nano tozu, anataz

Formül: TiO_2

Teknik Özellikleri: %99,9; anataz, birincil boyut büyüklüğü ~ 40 nm (SEM ve BET için yüzey alanı), BET çoklu-nokta spesifik yüzey alanı (SSA) >40 m^2/g, yoğunluk 3,89 g/cm^3, Erime Nok. 1830-1850 ^oC, Kaynama nok. 2500-3000 ^oC

4.1.2.2 Ag Nanopartikülü

Materyal: Gümüş

Formül: Ag

Teknik Özellikleri: %99,95, ortalama boyut büyüklüğü 40-90 nm, yoğunluk 10,49 g/cm^3, Erime nok. 961,8 ^oC, Kaynama nok. 2162 ^oC

4.1.3 Işık Kaynakları

Işık kaynağı olarak iki adet OSRAM L marka (18 W/77) fluora pembe ışıklı floresan lamba kullanılmıştır.

4.1.4 Besin Ortamı

Chlorella minutissima için Sigma-Aldrich firmasından tedarik edilen Bold Basal ortamı kullanılmıştır.

Çizelge 4.1 Bold basal medium bileşimi

Stok	**Stok solüsyonu**	**ml/L**
KH_2PO_4	8,75 g/500 ml	10 ml
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	12,5 g/500 ml	1 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	37,5 g/500 ml	1 ml
$NaNO_3$	125 g/500 ml	1 ml
K_2HPO_4	37,5 g/500 ml	1 ml
NaCl	12,5 g/500 ml	1 ml
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	10 g/L	1 ml
KOH	6,2 g/L	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	4,98 g/L	1 ml
H_2SO_4 (konsantre)	1 ml /L	
İz metal solüsyonu	-	1 ml
H_3BO_3	5,75 g/500 ml	0,7 ml
F/2 vitamin solüsyonu (opsiyonel)	-	1 ml

4.1.5 Kullanılan Cihazlar

- Spektrofotometre (PG 60 Instrument UV-Vis Spektrofotometre)
- Mikroskop (Olympus CH40)
- Stok Kültür Saklama Dolabı (Arçelik)
- Analitik Terazi (KERN PFB)

- Shaker (WISE Shake SHO-1D)
- Santrifüj (Sigma 2-16KL)
- İnkübatör (Kerman Lab)

4.2 Yöntem

4.2.1 *Chlorella minutissima*'nın Kültür Ortamı

Chlorella minutissima saf kültür dolabındaki tüplerden alınarak 250 ml'lik erlenmeyerlere 150 ml hacminde %10'luk (v/v) olacak şekilde ekilmiştir ve besin ortamı olarak Bold Basal (BBM) ortamı kullanılmıştır. Saf alg kültüründen 15 ml, 50/1 BBM'den 3 ml alınarak son hacmin 150 ml'ye tamamlanması için 132 ml distile su ilave edilmiştir. Son olarak tüplere ekstra CO_2 ilavesi yapılmıştır.

Mikroalg üretimi 150 rpm'de çalışan çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Alg gelişimi için özel dizayn edilmiş inkübatörde erlenmeyerlere eşit mesafede 18 watt'lık fluora özelliğe sahip pembe renkli floresan lamba yerleştirilmiştir ve ortam sıcaklığı 25±3 °C'ye ayarlanmıştır. Çalışma sürekli ışıklanma koşullarında sürdürülmüştür.



Şekil 4.3 Mikroalg üretimi için 150 rpm'de çalışan çalkalamalı inkübatör

Chlorella minutissima için optimum ortam parametreleri Çizelge 4.2'deki gibi belirlenmiştir.

Çizelge 4.2 *Chlorella minutissima* için optimum ortam parametreleri

Ortam Koşulu	***Chlorella minutissima***
Aydınlatma (lux)	6500(±)300
Sıcaklık (^{o}C)	27
Tuzluluk (%)	Değişken
pH	7-9
Besi Ortamı	Bold Basal Medium
Doğal Ortamı	Tatlı su
Karıştırma	150 rpm
Absorbans	680 nm

4.2.2 Nanopartiküllerin Eklenmesi

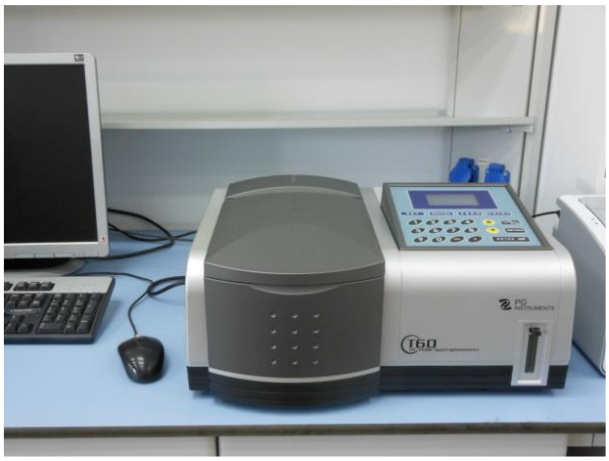
Büyümeye bırakılan alg örneklerinin optik yoğunluk ölçümleri yapılmış ve logaritmik evreye girişleri takip edilmiştir. Bu evreye gelmeleri yaklaşık 2 hafta sürmüştür. Kültürler logaritmik evre içerisindeyken (14. günde) TiO_2 ve Ag nanopartikülleri farklı konsantrasyonlarda (0, 5, 10, 25 ve 50 mg/L) erlenmeyerlere eklenmiş ve OD (optik yoğunluk) ölçümlerine, karbonhidrat ve klorofil analizlerine devam edilmiştir.

Kontrol grubu, farklı konstantrasyonlarda örneklere eklenen TiO_2 ve Ag nanopartiküllerinin *Chlorella minutissima* büyümesi üzerindeki etkisinin izlenmesini sağlayacaktır.

4.3 Analitik Ölçümler

4.3.1 Optik Yoğunluk (OD)

Optik yoğunluk ölçümü *Chlorella minutissima* için deneme başında spektrum taraması yapılarak elde edilmiş dalga boylarında yapılmıştır. Çalışma süresince *Chlorella minutissima* gelişimi 680 nm'de takip edilmiştir.



Şekil 4.4 Analizlerde kullanılan PG Instrument T60 model UV spektrofotometre

Üretimi yapılan mikroalglerin optik yoğunluklarının belirlenmesinde gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümler PG 60 Instrument UV-Vis Spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.3.2 Klorofil-a ve Beta Karoten Miktarı

Klorofil-a ve beta-karoten spektrofotometrik yönteme göre aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır. 5 ml örnek tüplere alınarak, santrifüjde çöktürme işlemi yapılmış, ardından üzerinde kalan fazla su dökülmüştür. Üzerine 5 ml aseton ilave edildikten sonra, ultrasonik banyoya konularak 5 dakika süre ile homojenize edilmiştir. Elde edilen örnek, 50-60 ^{o}C suyun içerisinde 5 dakika süre ile bekletilmiş, ardından vorteks yardımıyla 15 saniye karıştırma işlemi yapılmıştır. Elde edilen ekstrakt tekrar santrifüj ile ayrılmıştır. Santrifüjden çıkan örneklerin üzerinde kalan sıvı, spektrofotometrede 666 nm ve 475 nm dalga boyunda okunmuş, aşağıda verilen formül ile klorofil-a ve beta-karoten miktarı tespit edilmiştir.

Klorofil a (µg/ml) = 13,9 A_{666} [55]

A_{666} 666 nm okunan absorbans (soğurma) değeri

Beta-karoten (µg/ml) = 4,5 A_{475} [56]

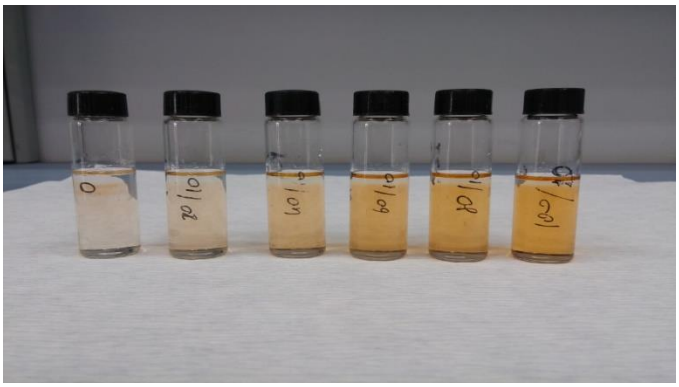
A_{475} 475 nm okunan absorbans değeri

4.3.3 Karbonhidrat Miktarı

Yarı asetal veya yarı ketal formundaki monosakkaritler indirgen özelliktedirler. Bu karbonhidratlar birçok yükseltgen tarafından oksitlenirken sakkaroz trehaloz tipi disakkaritler etkilenmezler. Karbonhidrat tayininde fenol-sülfürik asit yöntemi yaygın olarak kullanılır. Bu yöntemde, derişik mineral asitler karbonhidratlardan su çekerek furan aldehitleri açığa çıkarırlar. Furan aldehitler de fenoller ile karakteristik boyar maddeler oluştururlar [57]. Bu çalışmada da mikroalg içerisindeki toplam karbonhidrat içeriği fenol-sülfürik asit yöntemi ile saptanmıştır. Fenol reaktifi, 20 g distile suya 80 g fenol ilave edilerek %80 (w/w) olacak şekilde hazırlanmıştır. Karbonhidrat analizi için standart olarak glukoz kullanılmıştır. Standart eğrisini oluşturmak için tüplerin içerisinde Çizelge 4.3'de verilen farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış glukoz çözeltilerine 0.05 ml fenol reaktifi ilave edilmiş ardından 5 ml H_2SO_4 eklenmiştir (Şekil 4.5) [58]. Tüpler oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra, alınan örneklerin PG Instruments T60 model UV spektrofotometrede 490 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen verilerle standart eğri grafiği oluşturularak mikroalgin içindeki toplam karbonhidrat miktarı hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3 Standart glukoz konsantrasyon değerleri

	µg glukoz/ml					
	0	10	20	30	40	50
Glukoz stok çözeltisi (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Saf su (ml)	2	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0



Şekil 4.5 Fenol-sülfürik asit yöntemi ile karbonhidrat tayini için farklı glukoz konsantrasyonlarında hazırlanmış çözeltiler

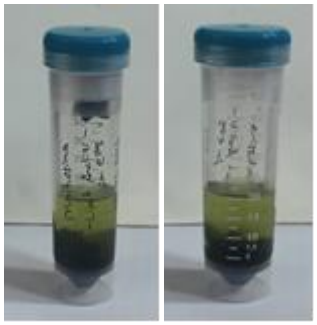
4.3.4 Toplam Yağ İçeriği Analizi

Mikroalg içeriğindeki yağ miktarı soxhlet metodu kullanılarak belirlenmiştir. Yöntemde soxhlet ekstraktörüne alınan biyokütle çözücü ile ekstrakte edildikten sonra kullanılan çözücü rotary evaporatör ile ortamdan uzaklaştırılır. Elde edilen yağ tartılarak miktarı tayin edilir.

1 g kurutulmuş alge 20 ml metanol eklenir. Oda sıcaklığında 48 saat 120 rpm'de karıştırılarak mikroalgin yağı metanolde çözündürülür. İki gün sonunda oluşan karışım süzülür, sıvı kısmından metanol rotary evaporatör ile ayrılır. Kalan yağ tartılarak % yağ içeriği belirlenir.

% yağ miktarı = [(W_{son} – W_{dara}) / $W_{örnek}$] x 100

Bu formülasyonda W_{son}, ekstraksiyon sonrası kalan yağ ve ekstraksiyon kabının toplam kütlesi; W_{dara}, ekstraksiyon kabınının kütlesi; $W_{örnek}$ ise ekstraksiyonda kullanılan mikroalgin kütlesidir.



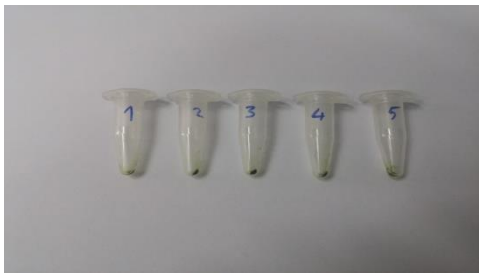
Şekil 4.6 Yağ ekstraksiyonundaki mikroalgler



Şekil 4.7 Soxhlet ekstraktörüne alınan biyokütle ve rotary evaporatör

4.3.5 Kuru Ağırlık Tayini

Örneklerin kuru biyokütle ağırlığını belirlemek amacıyla, boş eppendorf tüpler etüvde 55 ˚C'de 5 dakika kurumaya bırakılır. Etüvden çıkan boş tüp ağırlığı ölçülür. Her bir alg kültüründen 1,5 ml alınarak numaralandırılmış tüplere alınır. 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek tüp içerisinde faz oluşturulur. Süpernatant atılarak kuruması için aynı parametrelerde etüve bırakılır. Tüp içersinde kalan örnekten ölçüm alınır. Daha sonra bu iki ölçüm arasındaki fark alınarak kuru ağırlık ölçümleri yapılır. Bu işlem kültürün ilk günü ve son günü olacak şekilde tekrarlanır.



Şekil 4.8 Santrifüj sonrası süpernatant kısmı atılmış etüvden çıkarılan örnekler

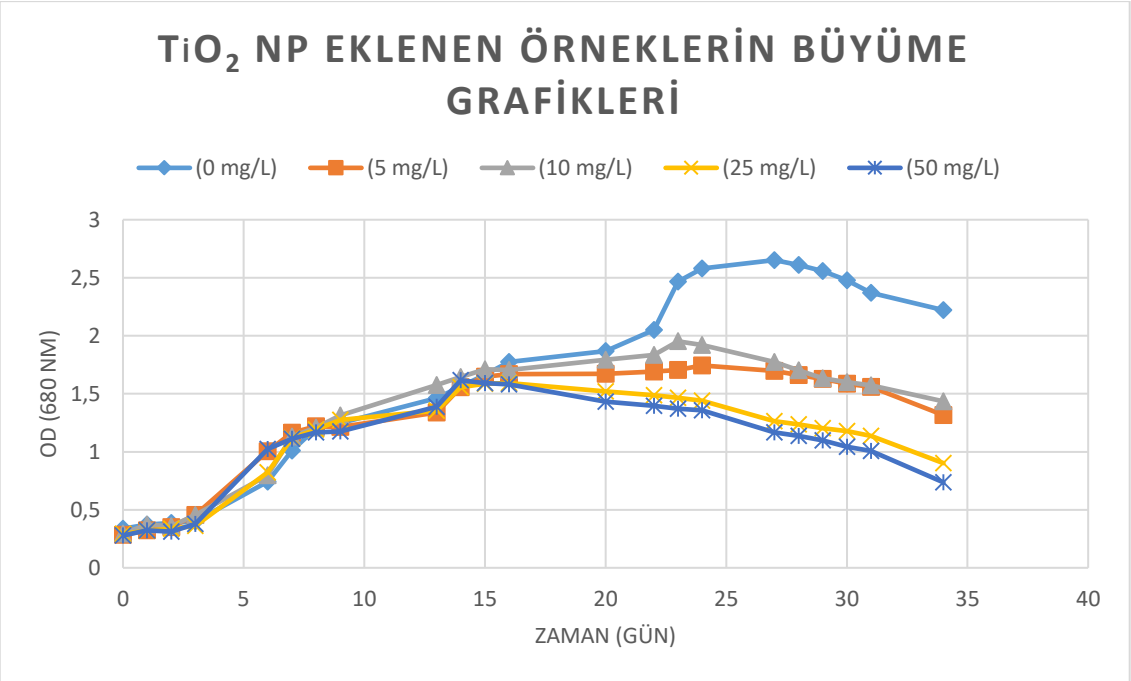
BÖLÜM 5

DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

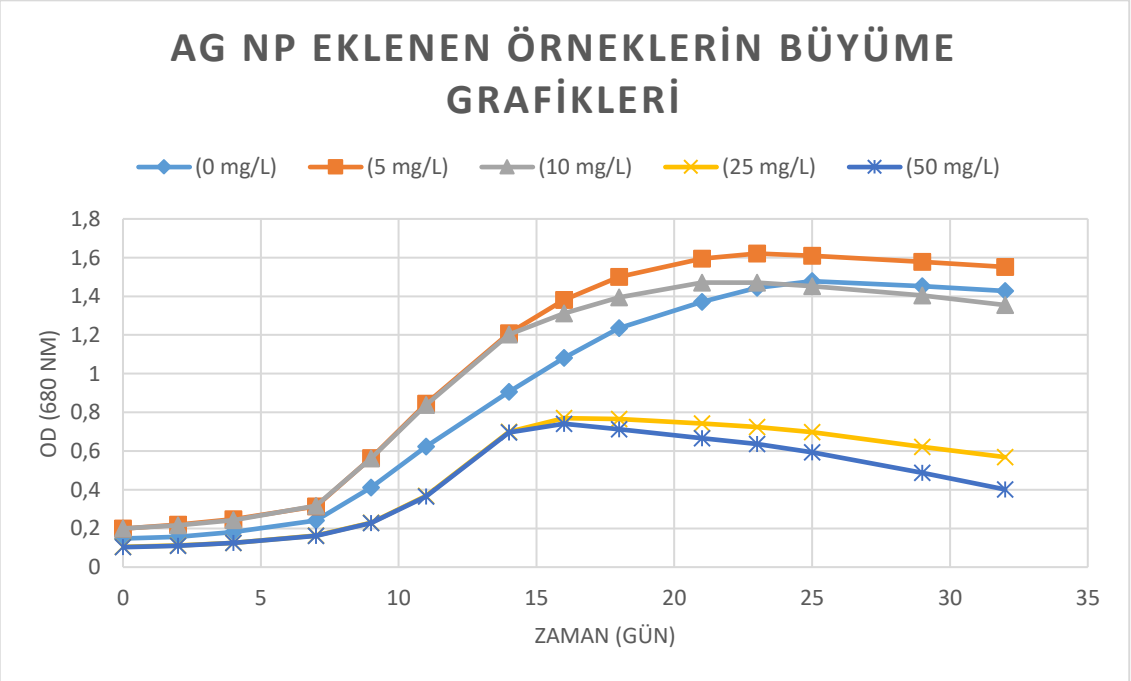
Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalürji Fakültesi Algal Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen, TiO_2 ve Ag nanopartiküllerin *Chlorella minutissima* türü üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yürütülen çalışmada 0, 5, 10, 25 ve 50 mg/L konsantrasyonlarında TiO_2 ve Ag nanopartiküllerinin eklenmesi işlemi uygulanmıştır. Çalışmada optik yoğunluk (OD), klorofil-a (µg L^{-1}), beta-karoten (µg L^{-1}), toplam karbonhidrat miktarı (µg L^{-1}), yağ içeriği (% kuru ağırlık) ve kuru ağırlık (mg/ml) değerleri belirlenmiştir.

5.1 Optik Yoğunluk (OD) Analizi

Ölçümler esnasında kuartz ve tek kullanımlık küvetler kullanılmıştır. Optik yoğunluk düzenli olarak ölçülmüş ve değişimler kaydedilmiştir. Ölçümlerde her mikroalg erlenmeyeri homojen olarak karıştırıldıktan sonra bir pasteur pipeti yardımıyla yaklaşık 3 ml örnek alınmıştır. Alınan örneklerin spektrofotometrede 680 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlenmiştir.



Şekil 5.1 TiO_2 nanopartikülü içeren örneklerin zamana karşı çizilen OD_{680} değerleri grafiği



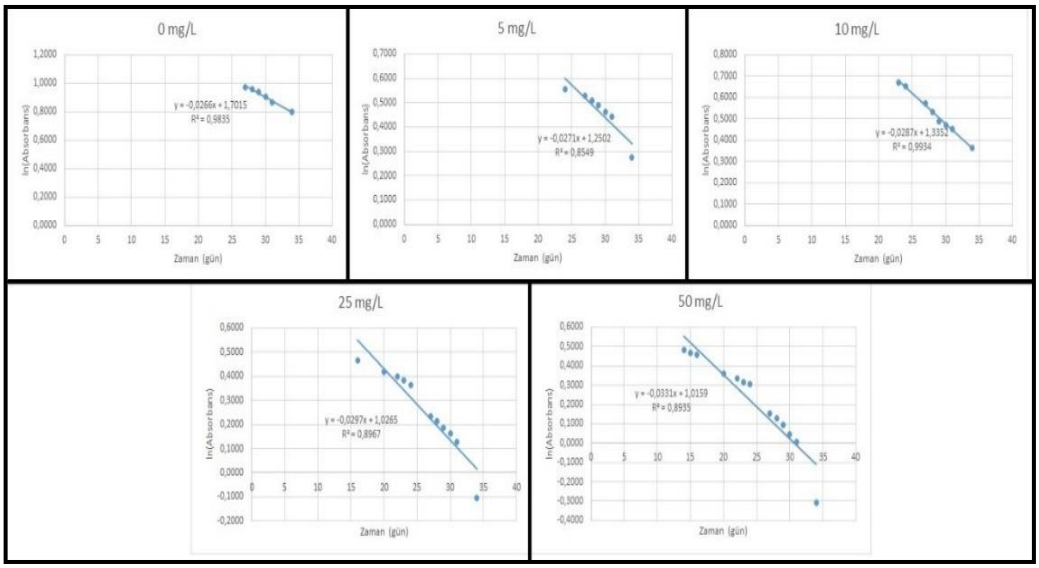
Şekil 5.2 Ag nanopartikülü içeren örneklerin zamana karşı çizilen OD_{680} değerleri grafiği

5.1.1 Mikroalg Büyüme Kinetiğinin İncelenmesi

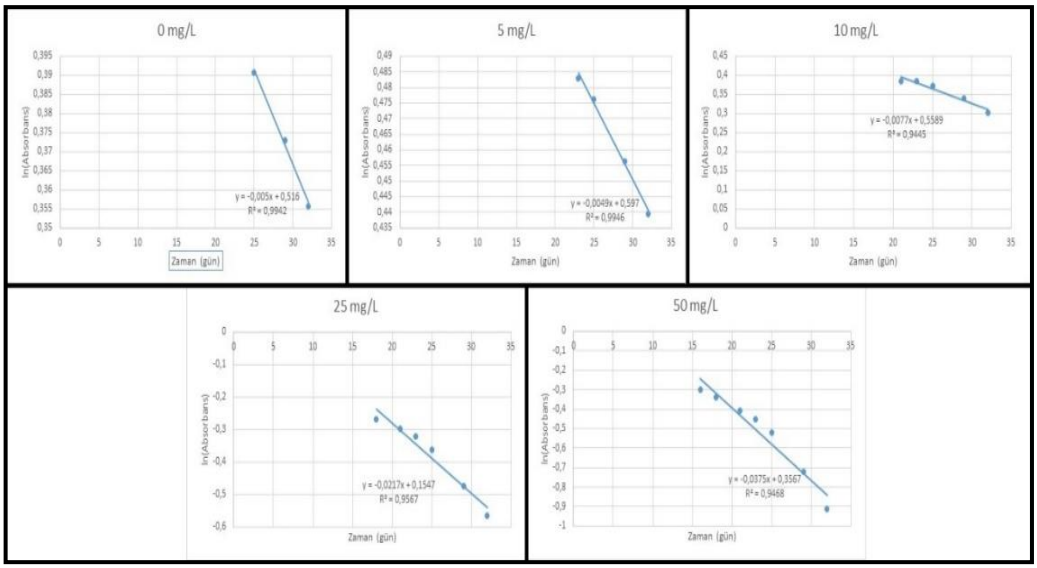
0, 5, 10, 25 ve 50 mg/L TiO_2 ve Ag nanopartikülü içeren her bir örnek için ayrı ayrı kinetik hesaplamalar yapılmıştır. ln(Absorbans)'a karşılık zaman grafiği çizildiğinde elde edilen eğim değerlerinden örneklerin μ (spesifik büyüme hızı) ve K_d (ölüm hızı) değeri hesaplanır. Ayrıca μ değerinden yararlanarak ikilenme zamanı (t_d) bulunur. İkilenme zamanı (t_d=ln2/μ) sadece kültürün büyüme fazı boyunca uygulanır. Her bir örnek için μ, K_d ve t_d değerleri çizilen grafiklerden elde edilen değerlerle hesaplanmıştır (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.1 NP eklenen örneklerin hesaplanan μ değerleri ($gün^{-1}$)

Örnek (mg/L)	**μ ($gün^{-1}$) - TiO_2**	**μ ($gün^{-1}$) - Ag**
0	0,0636	0,0776
5	0,0344	0,0541
10	0,0179	0,0372
25	0,0114	0,0222
50	-0,0109	0,0057



Şekil 5.3 TiO_2 NP içeren örneklerin K_d değeri hesaplama grafikleri



Şekil 5.4 Ag NP içeren örneklerin K_d değeri hesaplama grafikleri

Çizelge 5.2 Hesaplanan kinetik parametrelerin tablosu

TiO_2 NP (mg/L)	**μ (gün^{-1})**	**K_d (gün^{-1})**	**t_d (gün)**	**Ag NP (mg/L)**	**μ (gün^{-1})**	**K_d (gün^{-1})**	**t_d (gün)**
0	0,0636	-0,0266	10,89	0	0,0776	-0,0050	8,93
5	0,0344	-0,0271	20,15	5	0,0541	-0,0049	12,81
10	0,0179	-0,0287	38,72	10	0,0372	-0,0077	18,63
25	0,0114	-0,0297	60,80	25	0,0222	-0,0217	31,22
50	-0,0109	-0,0331	0*	50	0,0057	-0,0375	121,60

* NP ilave edilir edilmez hücreler öldüğü için hesaplanamamıştır.

Kontrol grubunda (0 mg/L TiO_2 NP) hücre sayısı artışı 27. güne kadar devam etmiştir. 27. günden itibaren hücre sayısında azalma gözlenmiştir. μ ve K_d değerleri sırasıyla 0,0636 ve -0,0266 (gün^{-1}) olarak hesaplanmıştır. 5 mg/L TiO_2 NP içeren örneğin 24. güne kadar absorbans değerleri artmış, sonrasında azalma görülmüştür. μ ve K_d değerleri sırasıyla 0,0344 ve -0,0271 (gün^{-1}) olarak hesaplanmıştır. 10 mg/L TiO_2 NP içeren örnekte hücre sayısı artışı 23. güne kadar sürmüştür. μ ve K_d değerleri sırasıyla 0,0179 ve -0,0287 (gün^{-1}) olarak hesaplanmıştır. 25 mg/L TiO_2 NP içeren örnekte hücre

sayısında azalma 16. günden sonra tespit edilmiştir. Sonrasında NP etkisi ile hücre sayısında azalma hızlı bir şekilde gerçekleşmiştir. μ ve K_d değerleri sırasıyla 0,0114 ve -0,0297 (gün^{-1}) olarak hesaplanmıştır. 50 mg/L TiO_2 NP içeren örnekte, kültürlere nanopartikül eklendikten hemen sonraki gün (15. gün) yapılan ölçümde hücre sayısının azaldığı görülmüştür. μ ve K_d değerleri sırasıyla -0,0109 ve -0,0331 (gün^{-1}) olarak hesaplanmıştır.

Kontrol grubunda (0 mg/L Ag NP) hücre sayısında azalma 27. günden itibaren gözlenmiş olup μ ve K_d değerleri sırasıyla 0,0776 ve -0,0050 (gün^{-1}) olarak hesaplanmıştır. 5 mg/L Ag NP içeren örneğin büyüme eğrisi kontrol grubuyla oldukça benzerlik göstermektedir. 5 mg/L Ag NP konsantrasyon değerinin algal büyümeyi olumsuz etkilemediği saptanmıştır. 5 mg/L Ag NP içeren örneğin μ ve K_d değerleri sırasıyla 0,0541 ve -0,0049 (gün^{-1}) olarak hesaplanmıştır. 25 ve 50 mg/L Ag NP içeren örneklerin nanopartiküle maruz kaldıktan sonra absorbans değerlerindeki ani azalış dikkat çekmektedir. K_d değerleri 25 ve 50 mg/L Ag NP içeren örnekler için sırasıyla -0,0217 ve -0,0375 (gün^{-1}) hesaplanmıştır.

Sonuçlar düşük konsantrasyonda (5 ve 10 mg/L) TiO_2 ve Ag NP içeren örneklerin kontrol grubuyla hemen hemen aynı zamanda hücre sayısında azalmanın başladığını göstermektedir. Hesaplanan μ ve K_d değerlerinin de düşük konsantrasyonlarda Ag NP içeren örneklerin kontrol grubunun değerleriyle yakın değerlere sahip olduğu görülmektedir. Buna göre 5 ve 10 mg/L Ag NP'nin *Chlorella minutissima* için fazla toksik etki göstermediği söylenebilir.

Her iki NP türünde de μ değeri NP konsantrasyonu arttıkça azalma gösterirken, K_d değerlerinde NP konsantrasyonuna bağlı olarak artış gözlenmiştir. Hücre sayısındaki azalmanın konsantrasyon arttıkça daha erken gerçekleştiği ve hücrelerin durağan faza daha erken girdikleri tespit edilmiştir. 25 ve 50 mg/L TiO_2 ve Ag NP'nin *Chlorella minutissma* için oldukça toksik olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara bakılarak *C. minutissima* türü için TiO_2 NP'nin Ag NP'ye göre daha toksik olduğu söylenebilir. Bunun TiO_2 NP'nin sahip olduğu fotokatalitik özelliğinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. TiO_2 stresine maruz bırakılan kültürlerde hücre sayısındaki azalmanın daha erken dönemlerde başladığı ve μ değerlerinin Ag NP'ye

maruz bırakılan kültürlerde daha yüksek olduğu görülmektedir. Aynı şekilde, K_d değerleri de Ag NP ile stres yaratılan kültürlerde daha düşük değerdedir. Yalnızca, 50 mg/L Ag NP'ye maruz bırakılan kültürün K_d değeri aynı konsantrasyonda nano TiO_2'ye maruz bırakılan kültürün K_d değerinden büyüktür ve aralarında çok az bir fark bulunmaktadır.

Ağır metaller büyüme hızını düşürerek hücre sayısında azalmalara sebep olmaktadırlar [59]. Nanopartiküllerin meydana getirdiği toksisite mikroalglerin sahip olduğu hücre duvarından kaynaklanabilmektedir [47]. NP'nin mikroalglerle etkileşimi ilk olarak hücre duvarında olmaktadır [41], [49]. Mikroalglerin hücre duvarındaki porların genişliği 5-20 nm arasında değişmektedir. Nanopartiküllerin boyutu hücre duvarındaki porların boyutundan küçük ise endositoz, difüzyon veya taşıyıcı proteinler vasıtasıyla nanopartiküller hücre içerisine alınmaktadır [41]. Daha büyük boyuttaki nanopartiküllerin hücre duvarından geçmesi mümkün değildir [47] ve bu partiküllerin hücre duvarına adsorbe olması hücre ağırlığının 2-3 kat artmasına sebep olmaktadır [40]. Nanopartiküllerin hücre duvarına adhezyonu bazı fiziksel etkilere (hücre duvarının parçalanması, membran bütünlüğünün bozulması vb.) neden olmakta veya besinlerin hücreye alımını azaltabilmektedir [38], [52]. Hücre duvarında agregatların oluşumu mikroalglerin ışıktan faydalanmasını azaltarak (gölgeleme etkisi) mikroalgal büyümeyi inhibe edebilmektedir [40], [49], [60] veya besinlerin taşındığı kanalların tıkanmasına sebep olarak mikroalgler için gerekli besinlerin alımına engel olabilmektedir [40], [47]. Perreault vd. [61] yaptıkları çalışmada hücre duvarı olan *Chlamydomonas reinhardtii* türü mikroalgleri ve aynı türün hücre duvarı olmayan mutantını 48 saat boyunca glikodendrimer ile kaplı altın nanopartiküle maruz bırakmışlardır. Hücre duvarına sahip örnekte yüzeyde büyük agregatların oluşumu gözlenirken hücre duvarı olmayan örnekte agregat oluşumu gözlenmediği kaydedilmiştir.

NP'lerin yüzeyde birikimi yapının bozulmasına yol açarak hücre geçirgenliğinin artmasına sebep olabilmekte ve bu da hücrelerin yaşayabilirliğinin ve pigment miktarının azalmasına sebep olmaktadır [43]. Metzler vd. [62], Sadiq vd. [48] ve Wang vd. [53] yaptıkları çalışmalarda nano TiO_2'nin; Dash vd. [44] Ag NP'nin mikroalgal büyümeyi ve toplam klorofil miktarını azalttığını kaydetmişlerdir [36].

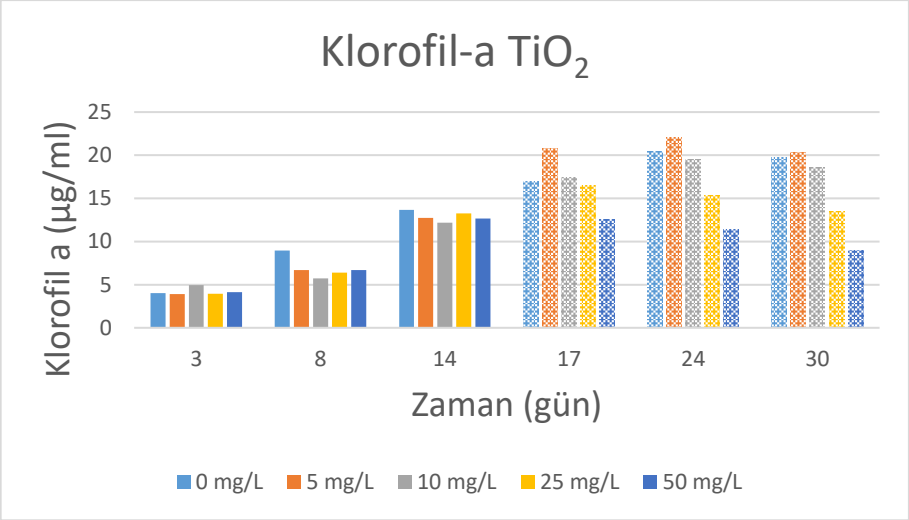
Membran bütünlüğünün bozulması [43] veya hücre duvarının onarımı sırasında daha büyük boyutlarda porların oluşumu NP'lerin hücre içerisine girmesine neden olmaktadır [60]. Nanopartiküllerin çeşitli yollarla içeri alınması ve sonucunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşması ve buna bağlı olarak oksidatif stres oluşumu, ayrıca ·OH serbest radikallerinin oluşumu görülmektedir. Oksidatif stres oluşumu DNA hasarına ve mitokondriye bağımlı olarak apoptozis oluşumuna neden olabilmektedir. ·OH serbest radikalleri de membran hasarına neden olmaktadır. ROS'lar aminoasit, protein, karbonhidrat, nükleik asit ve lipidlere saldırarak (biyomoleküllerin yapısında meydana gelen değişiklik, enzimatik aktivite kaybı, fibrilasyon ve tiyol grupları ile bağlanmaları vb.) bu biyomoleküllere zarar vermektedirler [63]. DNA hasarı, apoptozis ve membran hasarı hücre ölümüne neden olabilmektedir. ROS üretimi hücre içerisindeki antioksidatif enzimlerle korunan pro-oksidasyon/anti-oksidasyon dengesini bozmaktadır. Bu dengenin bozulmasıyla birlikte hücre içerisindeki ROS miktarı daha da artmakta ve aşırı ROS üretimi lipid peroksidasyonunu meydana getirmektedir. ROS'tan kaynaklı lipid peroksidasyonu da algal toksisiteye neden olan temel mekanizmalardan biridir [40]. NP'ler aynı zamanda ekstraselüler toksik etkiler de göstermektedir. Örneğin, görünür ışık koşulları altında TiO_2 NP'ler hücre membranına hasar verebilen ekstraselüler reaktif oksijen türü (ROS) (hidroksil radikali) oluşumuna neden olmaktadır. Kim ve Lee [63] gerçekleştirdikleri çalışmada TiO_2 NP - UV ışını (370 nm) kombinasyonunun mikroalgleri inaktive ettiğini göstermişlerdir. Hazani vd. [42] gerçekleştirdikleri çalışmada yüksek konsantrasyonlarda Ag NP'nin (100 ve 200 mg/L) hücre sayısında azalışın yanı sıra ROS ve malondialdehit (MDA, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan son ürün) miktarında artış, antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz) aktivitelerinin ise önce arttığını daha sonra ise dengenin bozularak azaldığını raporlarmışlardır.

Hücre büyümesinin inhibe olmasına bir diğer sebep de nanopartiküllerin iyon halinde kültür ortamına salınarak hücrelere toksik etki göstermesi olabilir. Ksiazyk vd. [37] ve Dash vd. [44] yaptıkları çalışmada Ag NP'nin toksisitesinin Ag^{2+} iyonlarının salınarak algal hücre ile etkileşime girmesinden kaynaklı olduğunu savunmuşlardır. Bir diğer çalışmada, He vd. Ag [64] iyonunun mikroalgler üzerindeki toksik etkisini görmek amacıyla sistein (güçlü Ag(I) ligandı) kullanmışlar ve sisteinin, Ag(I) ve AgNP'nin

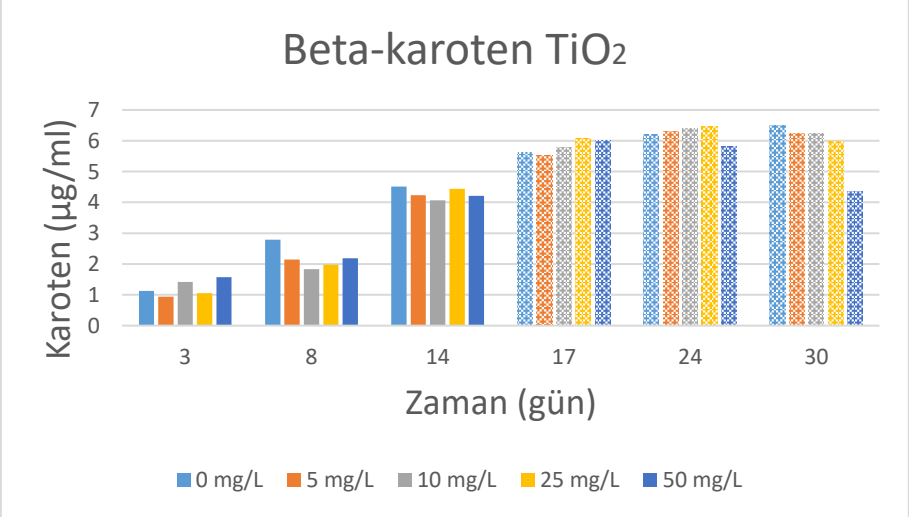
Chattonella marina'nın metabolik aktivitelerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırdığını ve bu nedenle toksisitenin Ag(I) salınımından dolayı gerçekleştiğini raporlamışlardır.

5.2 Klorofil-a ve Beta-karoten Miktarının Belirlenmesi

Çalışmada klorofil-a ve beta-karoten miktarları spektrofotometrik yöntem yardımı ile hesaplanmıştır. Farklı NP konsantrasyon koşullarına maruz bırakılan *Chlorella minutissima* kültürlerindeki klorofil-a ve beta-karoten miktarlarında değişimler inokulasyon gerçekleştirildikten sonraki 3, 8, 14, 17, 24 ve 30. günlerde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 5.3 ve Çizelge 5.4)



Şekil 5.5 TiO_2 NP içeren örneklerin klorofil-a değerleri (µg/ml)



Şekil 5.6 TiO_2 NP içeren örneklerin beta-karoten değerleri (µg/ml)

TiO_2 ile çalışılan kültürlerin kontrol grubunun 3. günde yapılan ilk analizinde klorofil-a ve beta-karoten miktarları sırasıyla 4,0032 ve 1,1295 µg/ml bulunmuştur. Klorofil miktarındaki artışın ilerleyen günlerde devam ettiği on dördüncü gün yapılan ölçümlerde ilk analizin yapıldığı üçüncü güne oranla klorofil miktarında yaklaşık %241 oranında bir artışın meydana geldiği ve klorofil-a değerinin 13,6637 µg/ml olduğu, on yedinci ve yirmi dördüncü günde yapılan ölçümlerde sırasıyla 16,9302 ve 20,4191 µg/ml olan klorofil değerinin inokulasyonu takip eden son klorofil ölçümünün yapıldığı 30. günde kültürdeki hücre sayısının azalmasıyla birlikte 19,7102 µg/ml'ye düştüğü görülmüştür. Beta-karoten miktarının çalışma süresi boyunca arttığı ve son ölçümün yapıldığı günde 6,4890 µg/ml'ye ulaştığı tespit edilmiştir.

Çizelge 5.3 TiO_2 NP içeren kültürlerin klorofil-a ve beta-karoten miktarları

Klorofil-a (µg/ml)					
Gün/Kons	**0 mg/L**	**5 mg/L**	**10 mg/L**	**25 mg/L**	**50 mg/L**
3	4,0032	3,9059	4,9345	3,9615	4,1422
8	8,9655	6,6720	5,7407	6,3801	6,6720
14	13,6637	12,7324	12,1903	13,2467	12,6768
17	16,9302	20,8222	17,4584	16,5132	12,5517
24	20,4191	22,0037	19,4739	15,3456	11,4119
30	19,7102	20,3357	18,5704	13,4274	8,9099
Beta-karoten (µg/ml)					
Gün/Kons	**0 mg/L**	**5 mg/L**	**10 mg/L**	**25 mg/L**	**50 mg/L**
3	1,1295	0,9405	1,4130	1,0575	1,5705
8	2,7900	2,1420	1,8315	1,9800	2,1870
14	4,5180	4,2345	4,0680	4,4370	4,2075
17	5,6160	5,5350	5,7690	6,0660	6,0030
24	6,1965	6,3045	6,3990	6,4710	5,8275
30	6,4890	6,2415	6,2280	5,9625	4,3380

5 mg/L TiO_2 NP eklenen kültürün yapılan ilk analizde klorofil-a ve beta-karoten miktarları sırasıyla 3,9059 ve 0,9405 µg/ml bulunmuştur. Klorofil miktarındaki artışın logaritmik evrede hızla devam ettiği ve kültüre NP eklenmeden hemen önce (14. gün) ve sonrasında yapılan ilk analizde (17. gün) klorofil-a ve beta-karoten miktarında sırasıyla %63,54 ve %30,71 artış gerçekleşmiş ve bu konsantrasyon değerindeki TiO_2 NP'nin klorofil-a ve beta-karoten sentezini indüklediği görülmüştür.

10 mg/L TiO_2 NP eklenen kültürün klorofil-a ve beta-karoten miktarlarının yapılan son analize kadar arttığı ve kültüre NP eklenmeden hemen önce (14. gün) ve sonrasında

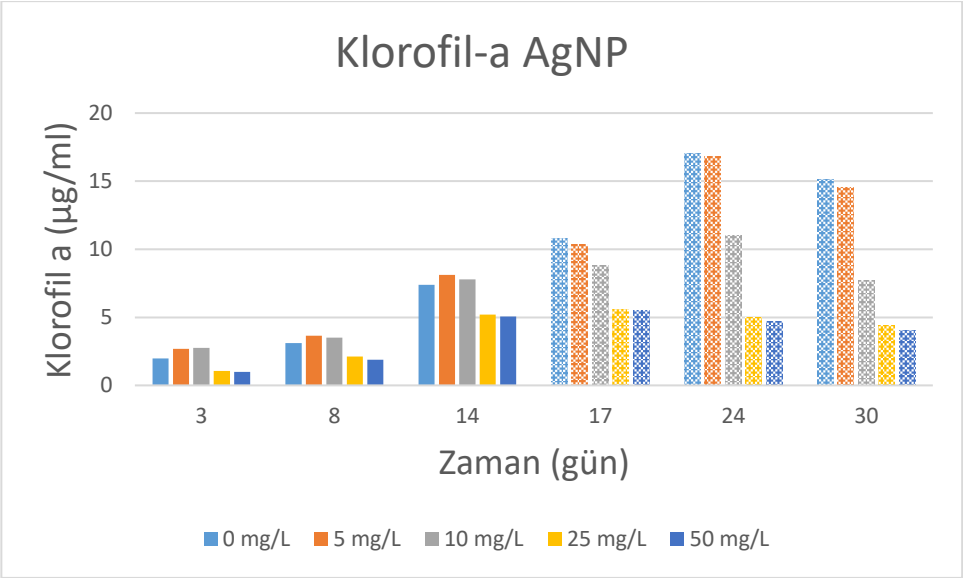
yapılan ilk analizde (17. gün) klorofil-a ve beta-karoten miktarında sırasıyla %43,21 ve %41,81 artış gerçekleştiği bulunmuştur.

25 mg/L TiO_2 NP eklenen kültürün NP'ye maruz kaldıktan sonra yapılan ilk ölçümde klorofil-a ve beta-karoten miktarının sırasıyla %24,65 ve %36,71 arttığı görülmüş ve bu tarihten sonra yapılan ölçümlerde klorofil-a miktarının sürekli olarak azalarak son ölçümde 13,4274 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. NP'nin etkisi ile beta-karoten miktarındaki artış son ölçüme kadar devam etmiş, son ölçümde azalma görülerek 5,9625 µg/ml'ye düştüğü gözlenmiştir.

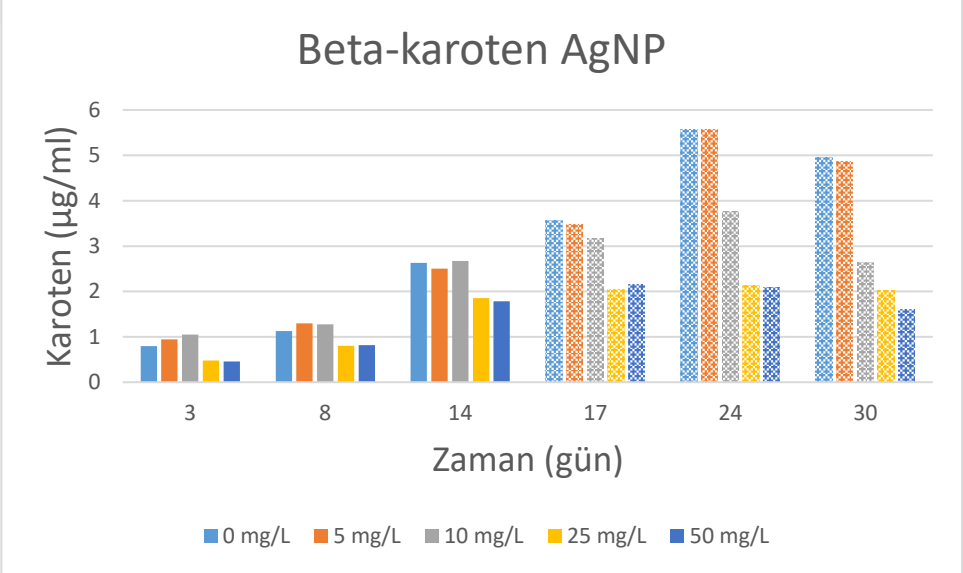
50 mg/L TiO_2 NP eklenen kültürün NP eklenmeden hemen öncesinde ve sonrasında yapılan ilk ölçümde klorofil-a miktarının yaklaşık %1 azalarak 12,6768 µg/ml'den 12,5517 µg/ml'ye düştüğü tespit edilmiştir. Buna karşın beta-karoten miktarında %42,67 artış görülmüştür. Yüksek konstantrasyondaki TiO_2 NP'ye maruz kalan kültürün NP eklendikten sonra çalışma bitimine kadar klorofil-a miktarında sürekli olarak düşüş gözlenmiş, beta-karoten miktarında ise NP stresine karşı hücrelerdeki savunma mekanizmalarının hızlı bir şekilde devreye girmesiyle önce artış görülmüş daha sonra yapılan ölçümlerde ise mekanizmaların yetersiz kaldığı beta-karoten miktarının azalması sebebiyle anlaşılmıştır.

Çizelge 5.4 Ag NP içeren kültürlerin klorofil-a ve beta-karoten miktarları

Klorofil-a (µg/ml)					
Gün/Kons	**0 mg/L**	**5 mg/L**	**10 mg/L**	**25 mg/L**	**50 mg/L**
3	1,9738	2,6827	2,7522	1,0564	0,9869
8	3,1136	3,6557	3,5028	2,1128	1,8765
14	7,3809	8,1176	7,7979	5,1986	5,0596
17	10,7725	10,3277	8,7848	5,5461	5,5044
24	17,0275	16,8190	11,0088	4,9901	4,7260
30	15,0954	14,5116	7,7284	4,4063	4,0449
Beta-karoten (µg/ml)					
Gün/Kons	**0 mg/L**	**5 mg/L**	**10 mg/L**	**25 mg/L**	**50 mg/L**
3	0,7965	0,9450	1,0485	0,4770	0,4545
8	1,1295	1,2960	1,2780	0,8055	0,8190
14	2,6280	2,5065	2,6730	1,8540	1,7865
17	3,5550	3,4785	3,1635	2,0520	2,1510
24	5,5800	5,5755	3,7575	2,1240	2,0790
30	4,9545	4,8600	2,6415	2,0205	1,5975



Şekil 5.7 Ag NP içeren örneklerin klorofil-a değerleri (µg/ml)



Şekil 5.8 Ag NP içeren örneklerin beta-karoten değerleri (µg/ml)

Ag NP ile çalışılan kültürlerin kontrol grubunun üçüncü günde yapılan ilk analizinde klorofil-a ve beta-karoten miktarları sırasıyla 1,9738 ve 0,7965 µg/ml bulunmuştur. Klorofil-a miktarındaki artışın ilerleyen günlerde devam ettiği, on dördüncü günde klorofil-a değerinin 7,3809 µg/ml olduğu, on yedinci ve yirmi dördüncü günde yapılan ölçümlerde sırasıyla 10,7725 ve 17,0275 µg/ml olan klorofil değerinin inokulasyonu takip eden son klorofil ölçümünün yapıldığı otuzuncu günde kültürdeki hücre sayısının azalmasıyla birlikte 15,0954 µg/ml'ye düştüğü tespit edilmiştir. Beta-karoten miktarının deneme süresi boyunca arttığı ve son ölçümün yapıldığı günde 6,4890 µg/ml'ye ulaştığı bulunmuştur.

5 mg/L Ag NP eklenen kültürün yapılan ilk analizde klorofil-a ve beta-karoten miktarları sırasıyla 3,6557 ve 1,2960 µg/ml bulunmuştur. Klorofil miktarındaki artışın 24. güne kadar hızla devam ettiği ve kültüre NP eklenmeden hemen önce (14. gün) ve sonrasında yapılan ilk analizde (17. gün) klorofil-a ve beta-karoten miktarında sırasıyla %27,22 ve %38,78 artış gerçekleşmiş ve 17. gün sonunda klorofil-a ve beta-karoten miktarının sırasıyla 10,3277 ve 3,4785 µg/ml olduğu bulunmuştur. 5 mg/L konsantrasyon değerindeki Ag NP'nin klorofil-a ve beta-karotene etkisi kontrol grubuyla paralellik göstermektedir.

10 mg/L Ag NP eklenen kültürün nanopartikül atılmadan önce ve sonrasında yapılan analizde klorofil-a ve beta-karoten miktarında sırasıyla %12,65 ve %18,35 artış gözlenmiştir. Klorofil-a miktarı 24. günde 11,0088 µg/ml'ye ulaşmış ve 30. günde 7,7284 µg/ml'ye düşmüştür. Beta-karoten miktarının 24. günde en yüksek değeri olan 3,7575 µg/ml'ye ulaştığı tespit edilmiştir.

25 mg/L Ag NP'ye maruz bırakılan kültürün NP eklendikten sonra yapılan ilk ölçümde klorofil-a ve beta-karoten miktarının sırasıyla %6,68 ve %10,68 arttığı görülmüş ve bu tarihten sonra yapılan ölçümlerde klorofil-a miktarının sürekli olarak azalarak son ölçümde 4,4063 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Ag NP stresi ile beta-karoten miktarındaki artış son ölçüme kadar devam etmiş, son ölçümde azalma görülerek 2,0205 µg/ml'ye düştüğü gözlenmiştir.

50 mg/L Ag NP eklenen kültürde 17. güne kadar klorofil-a miktarında artış gözlenmiş, NP etkisi ile klorofil-a sentezinde azalma gerçekleşmiş ve yapılan son analizde klorofil-a miktarının 4,0449 µg/ml'ye düştüğü görülmüştür. NP stresine dolayısıyla beta-karoten miktarında 17. güne kadar sürekli olarak artış tespit edilmiş, sonraki ölçümlerde ise azalma gözlenerek 30. günde 1,5975 µg/ml'ye düştüğü gözlenmiştir.

Yüksek yapılı bitkiler, siyanobakterler ve yeşil alglerde, fotosentez mekanizmasının diğer metabolik proseslere göre ağır metal stresinden kaynaklı toksisiteye daha duyarlı olduğu görülmüştür.

Metalin fotosentezde görev alan enzimlerin aktivitelerini engellemesi, doğrudan fotosentez mekanizmasına zarar vermesi ve iyon dağılımını ya da membran geçirgenliğini değiştirmesi fotosentez mekanizmasını etkilemektedir [65].

Bitkilerde metallerin oluşturduğu stres nedeniyle fotosentezin inhibisyonu, tilakoid membranın yapısal bütünlüğünün bozulması, elektron taşınım sisteminin engellenmesi ve klorofil pigmentlerinin yapısında bozulmalar meydana gelmektedir. Yapılan çalışmada yüksek konsantrasyonda TiO_2 ve Ag NP etkisinde *Chlorella minutissima* türündeki klorofil-a pigmentinin miktarının azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca, çalışmada NP etkisinde *C. minutissima*'da hücre sayısının azaldığı saptanmıştır. Hücre sayısındaki bu azalma, *C. minutissima*'daki klorofil içeriğindeki azalmanın sebeplerinden biri olabilir.

C. minutissima'da TiO_2 ve Ag NP etkisi altında klorofil-a miktarlarının konsantrasyona ve zamana bağlı olarak önemli ölçülerde azaldığı ve bu azalışların her iki NP türünün yüksek derişimlerinde (25 ve 50 mg/L) daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç da TiO_2 ve Ag NP'nin yüksek derişimlerinin klorofil-a pigmenti üzerine daha toksik olduğunu göstermektedir. Ayrıca düşük derişimlerde (5 ve 10 mg/L TiO_2) uygulanan metal stresinin klorofil-a sentez mekanizması üzerinde indüktif etki gösterdiği bulunmuştur. Literatürde de benzer bir etki Xia vd. [41] gerçekleştirdiği bir çalışmada görülmüştür. Düşük konsantrasyonlardaki (1, 5 ve 10 mg/L) TiO_2 NP'nin algal büyümeyi arttırdığı, bunun ROS üretiminden kaynaklı hormetik bir yanıt olabileceği rapor edilmiştir. Oksidatif stres kaynaklı ROS üretimi, bitkilerde toplam antioksidan kapasitesi ve fotosentez hızının artmasını stimüle edebilmektedir.

Fotosentetik pigment analizi kolayca yapılabilir ve de metal stresinin ölçülmesinde yaygın olarak kullanılır [40], [65]. Yapılan çalışmada *Chlorella minutissima*'daki fotosentetik pigment konsantrasyonlarının yüksek derişimlerde TiO_2 ve Ag NP etkisi altında azaldığı gözlenmiştir. *Chlorella minutissima*'daki TiO_2 ve Ag NP etkisinde klorofil pigmenti miktarlarındaki azalışlar klorofil biyosentez prosesinin bozulmasının, klorofil biyosentezinde yer alan enzimlerin inhibe edilmesinin ya da klorofil parçalanmasının sonucu olabilir. Ağır metallerin klorofil pigment biyosentezini ve bu proseste yer alan enzimleri inhibe ettiği kaydedilmiştir [65].

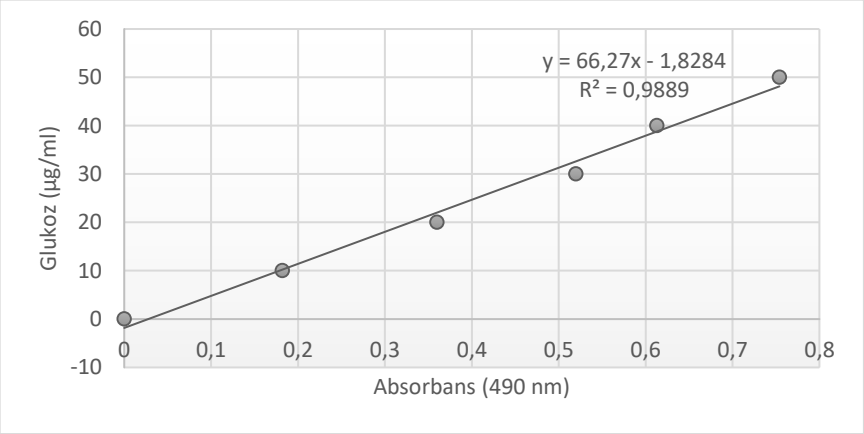
Kontrol grubunda *Chlorella minutissima*'daki klorofil-a miktarı büyüme ile doğru orantılı olarak günler arasında önemli olacak bir şekilde artarken TiO_2 ve Ag NP etkisinde bu miktarların azalması, *Chlorella minutissima*'daki TiO_2 ve Ag NP stresinin bir sonucu olarak gerçekleşmiştir. Literatürde, alglerde klorofil miktarındaki azalışın

kültürün yoğunluğundaki bir değişikliğe de bağlı olarak kaynaklanabileceği belirtilmektedir [66].

Fotosentetik mikroorganizmalarda fotooksidatif strese yanıt olarak antioksidan enzimler ve moleküllerde (askorbat, glutatyon, karotenoidler, tokoferoller vb.) artış meydana gelmektedir [39]. Yürütülen çalışmada yüksek konsantrasyonlarda nanopartiküllere maruz kalan kültürlerde belirgin bir şekilde beta-karoten artışı gözlenmiştir. Stres şartları altında karotenoid içeriğindeki artışın algal hücrelerin geliştirdikleri bir korunma mekanizması olduğu ileri sürülmüştür [67]. Dolayısı ile klorofil içeriğinde azalma olduğu belirlenen gruplarda beta-karoten içeriğinin artması mikroalgleri metal nanopartiküllerin zararlı etkilerinden korumak amaçlı geliştirilen mekanizmaları tetiklediği düşünülebilir [68]. Bu sonucun, stres altında kalan mikroalg kültürleri üzerine yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür [39].

5.3 Toplam Karbonhidrat Miktarı Analizi

Fenol-sülfürik asit yöntemi ile yapılan karbonhidrat tayininde standartlar hazırlanırken %10'luk glukoz çözeltisi hazırlanmıştır. Standartların UV spektrofotometresinde 490 nm'de absorbanslarının ölçümü sonucunda elde edilen değerlerden Şekil 5.9'daki standart glukoz grafiği çizilmiştir.

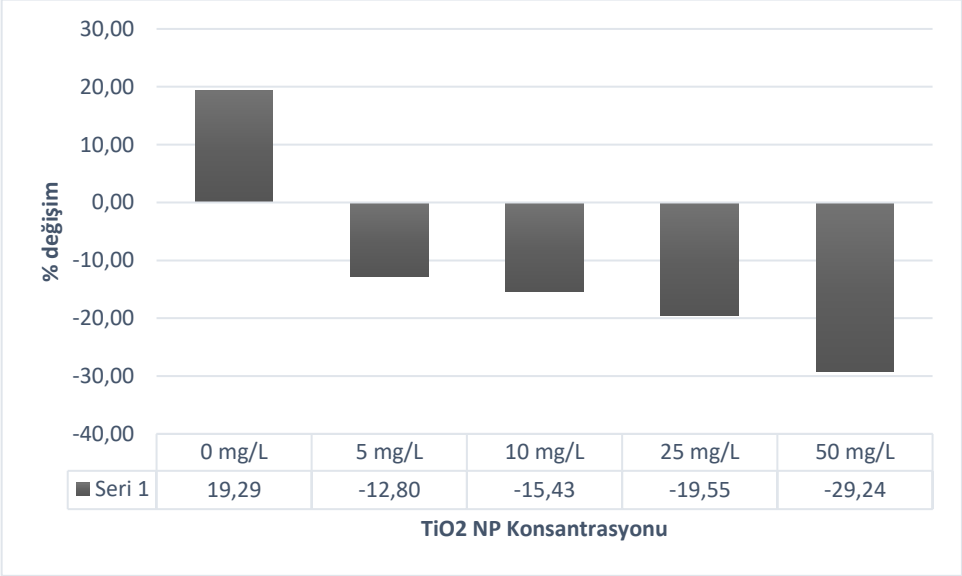


Şekil 5.9 Standart glukoz grafiği

Grafikten elde edilen denklemden yararlanılarak çalışılan örneklerin karbonhidrat içeriği hesaplanmıştır (Çizelge 5.5 ve Çizelge 5.6).

Çizelge 5.5 TiO_2 içeren örneklerin glukoz miktarları

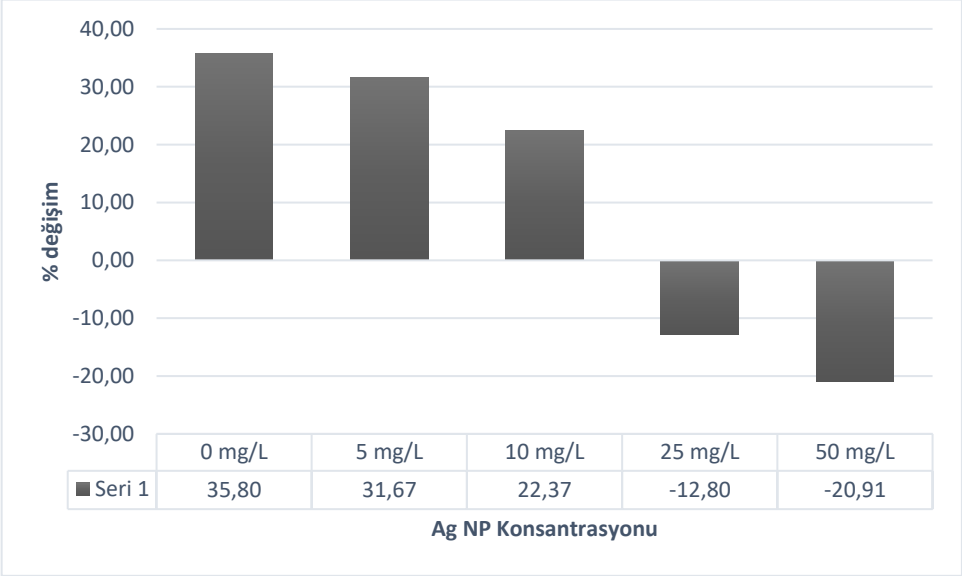
TiO_2 NP içeren örnek (mg/L)	**NP atılmadan önce (µg/ml)**	**NP atıldıktan sonra (µg/ml)**	**Ölüm fazında (µg/ml)**
0	52,5792	106,8544	122,1628
5	59,3388	115,9997	87,5698
10	58,0134	105,1977	64,3090
25	58,0796	105,0651	63,1824
50	51,4526	48,7356	19,7756



Şekil 5.10 Kültürlere TiO_2 NP eklendikten sonra ve durağan fazda yapılan ölçümler arasındaki yüzde (%) değişim

Çizelge 5.6 Ag NP içeren örneklerin glukoz miktarları

Ag NP içeren örnek (mg/L)	NP atılmadan önce (µg/ml)	NP atıldıktan sonra (µg/ml)	Ölüm fazında (µg/ml)
0	39,0601	53,3082	73,1892
5	47,7415	58,8086	74,6471
10	46,7475	56,8868	65,7007
25	34,2887	39,8554	29,0534
50	35,1502	38,6625	25,6073



Şekil 5.11 Kültürlere Ag NP eklendikten sonra ve durağan fazda yapılan ölçümler arasındaki yüzde (%) değişim

TiO_2 ile çalışılan kültürlerin kontrol grubunun karbonhidrat içeriğinin başlangıçtan itibaren 24. güne kadar arttığı ve 24. günde maksimum seviyeye ulaşarak 127,4643 µg/ml olduğu bulunmuştur. 30. günde yapılan ölçümde karbonhidrat içeriğinde azalma gözlenmiş ve 122,1628 µg/ml'ye düşmüştür.

5 mg/L TiO_2 NP eklenen kültürün yapılan ilk analizde karbonhidrat miktarının 34,9514 µg/ml olduğu saptanmıştır.

10 mg/L TiO_2 NP eklenen kültürün NP eklendikten sonra yapılan ilk analizde 105,1977 µg/ml olduğu, daha sonra yapılan analizlerde ise düşüş gösterdiği bulunmuştur.

25 mg/L TiO_2 NP eklenen kültürün NP eklendikten sonra yapılan ilk analizde 10 mg/L eklenen kültürle benzer sonuç göstererek 105,0651 µg/ml olduğu bulunmuş, 24. günde yapılan analizde hızlı bir düşüş yaşanarak 84,5214 µg/ml'ye gerilediği görülmüştür.

50 mg/L TiO_2 NP eklenen kültürün NP eklendikten sonra yapılan ilk analizde karbonhidrat içeriğinde düşüş gözlenmiştir ve çalışma sonlanana kadar azalış devam ederek gerçekleştirilen son analizde minimum seviyeye düşerek 19,7762 µg/ml olarak kaydedilmiştir. Ag NP ile çalışılan kültürlerin kontrol grubunun karbonhidrat içeriğinin başlangıçtan itibaren 30. güne kadar arttığı ve 30. günde maksimum seviyeye ulaşarak 73,1892 µg/ml olduğu bulunmuştur.

5 ve 10 mg/L Ag NP içeren örneklerde 24. güne kadar artış olmasına rağmen konsantrasyona bağlı olarak artışta azalma gözlenmiştir. 5 mg/L Ag NP içeren örnekte karbonhidrat değeri 24. günde 77,4305 µg/ml olarak maksimum değerdeyken, 10 mg/L Ag NP içeren örnekte karbonhidrat değeri 69,6106 µg/ml bulunmuştur.

25 ve 50 mg/L Ag NP içeren örneklerde NP stresinin uygulanmasıyla beraber karbonhidrat içeriği üzerine hemen etki ettiği sonuçlarda görülmektedir. Karbonhidrat miktarında azalma gözlenmiş 25 ve 50 mg/L Ag NP içeren örneklerde minimum değerler sırasıyla 29,0534 ve 25,6073 µg/ml 30. gün yapılan analizde kaydedilmiştir.

Klorofil-a pigmentindeki azalmayla birlikte algal mikroorganizmaların fotosentetik aktivitelerinin de azalması, beraberinde fotosentez sonucu sentezlenen karbonhidrat miktarında azalmanın ortaya çıkacağı sonucunu doğurmaktadır. Gerçekleştirilen çalışmada *Chlorella minutissima*'daki karbonhidrat miktarının yüksek derişimlerdeki (25 ve 50 mg/L) TiO_2 ve Ag NP etkisi altında azaldığı belirlenmiştir. *Chlorella minutissima*'da TiO_2 etkisi altında karbonhidrat miktarındaki azalışların kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm derişim ve sürelerde önemli olduğu ve bu biyolojik moleküllerdeki azalışların düşük derişimlere (5 ve 10 mg/L) oranla yüksek derişimlerde (25 ve 50 mg/L) daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ag NP etkisi altında 5 ve 10 mg/L derişimlerinde karbonhidrat sentezinin kontrol grubuyla paralellik gösterdiği ve 24. güne kadar artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, TiO_2 ve Ag NP'nin yüksek

miktarlarının karbonhidrat biyosentezinden sorumlu prosesleri üzerine olan daha yüksek toksisitesinden kaynaklı olabilir. 30. günde 5, 10, 25 ve 50 mg/L'lik derişimindeki TiO_2 NP içeren kültürlerin karbonhidrat miktarındaki azalışların kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sırasıyla %15,51, %53,89, %33,77 ve %74,39 olduğu bulunmuştur. 30. günde 5, 10, 25 ve 50 mg/L'lik derişimindeki Ag NP içeren kültürlerin karbonhidrat miktarındaki azalışların kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sırasıyla %3,72, %5,91, %19,61 ve %19,41 olduğu bulunmuştur. Bu da *Chlorella minutissima*'nın yüksek derişimlerde Ag NP'ye oranla TiO_2 NP'den daha fazla etkilendiğini göstermektedir.

Büyüme hızının genellikle enerji üretimiyle yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir [69]. Gerçekleştirilen çalışmada hem karbonhidrat miktarında hem de klorofil miktarındaki azalma hücre içi ATP üretimini düşürmüş ve bu da *Chlorella minutissima*'daki büyümeyi engellemiş olabilir. Jouany vd. [70] krom etkisi altında *Chlorella vulgaris*'te hücre içerisinde krom birikimi artarken ATP sentezinin engellendiğini ve bu nedenle mikroalg büyümesinin inhibe edildiğini belirtmişlerdir.

5.4 Toplam Yağ İçeriği Analizi

Kültürlerin durağan fazda yapılan yağ analizi sonuçları Çizelge 5.7'deki gibidir.

Çizelge 5.7 Kültürlerin yağ içeriği (% kuru ağırlık)

	Yağ içeriği (%)	
Konsantrasyon (mg/L)	**TiO_2 NP**	**Ag NP**
0	23,1	23,4
5	25,9	24,1
10	31,4	26,7
25	35,5	31,3
50	38,3	36,6

Metal stresi mikroalgin gelişimini ve lipid üretimini etkileyen faktörlerden biridir. Çizelge 5.5'deki değerlere bakıldığında *C. minutissima* mikroalginde ağır metal stresine cevap olarak öncelikle lipid biriktirildiği görülmektedir. Lipidlerin haricindeki diğer önemli depo moleküller karbonhidratlardır. Lipidlerin depolanması için daha fazla alana ihtiyaç duyulur ve mikroalgler belli bir aşamadan sonra, daha kolay geri dönüştürülebilir bir enerji formu olmasına rağmen hacmini genişletmek yerine karbonhidrat biriktirmeye de başlayabilir veya stresin şekline ve süresine bağlı olarak lipid ile birlikte karbonhidrat da biriktirebilir [68]. Bu veriler karbonhidrat analizi verileri ile birlikte değerlendirildiğinde *C.minutissima* mikroalglerinin TiO_2 NP etkisi altında lipid biriktirmeye yatkın olduğu, Ag NP etkisi altında ise düşük konsantrasyonlarda karbonhidrat artışı ile lipid miktarında ihmal edilebilecek düzeyde artışın gerçekleştiği, yüksek konsantrasyonlarda ise yağ içeriğindeki artışın daha belirgin olduğu görülmektedir. 50 mg/L TiO_2 ve Ag NP'ye maruz kalan kültürlerde metal stresinin yağ içeriklerini (%kuru ağırlık) sırasıyla %38,3 ve 36,6'ya yükselttiği bulunmuştur.

Mikroalglerin lipid içeriğinin arttırılmasına yönelik şimdiye kadar çeşitli stres uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar genel olarak besin açlığı, sıcaklık, ışık, ultraviyole ışın, tuz, pH ve metal stresi uygulamaları ile genetik mühendisliği yaklaşımlarını içermektedir. Kang vd. [39] TiO_2 NP ile *Chlorella vulgaris* üzerinde stres yaratarak lipid içeriğini arttırmayı hedefledikleri çalışmada TiO_2'nin mikroalg büyümesini inhibe ettiğini, klorofil miktarında azalma görülürken lipid birikimin arttığını kaydetmişlerdir. Ren vd. [71] heterotrof bir mikroalg türü olan *Scenedesmus sp.* R-16 ile karanlık koşullarda demir, magnezyum ve kalsiyumun etkisini inceledikleri çalışmada toplam lipid içeriğinin sırasıyla %43,2, %35,0 ve %47,4'e ulaştığını bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada, *Chlorella minutissima* UTEX 2341 heterotrofik koşullar altında bakır ve kadmiyum iyonlarına yüksek direnç göstermiş ve lipid içeriklerinde sırasıyla %93,9 ve %21,1'e kadar artış gözlenmiştir [72]. Liu vd. [73] $1{,}2x10^{-5}$ mol/L $FeCl_3$ ekledikleri kültürlerin toplam lipid içeriğinin kuru ağırlığının %56,6'sına ulaşarak, daha düşük demir konsantrasyonlarına maruz kalan kültürlerden 3-7 kat daha fazla lipid içeriğine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Benzer şekilde, Sibi vd. [74] bakır kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada *Chlorella sp.* (*Chlorella vulgaris, C. pyrenoidosa, C. ellipsoidea, C. emersonii, C. sorokiniana and C. protothecoides.*)

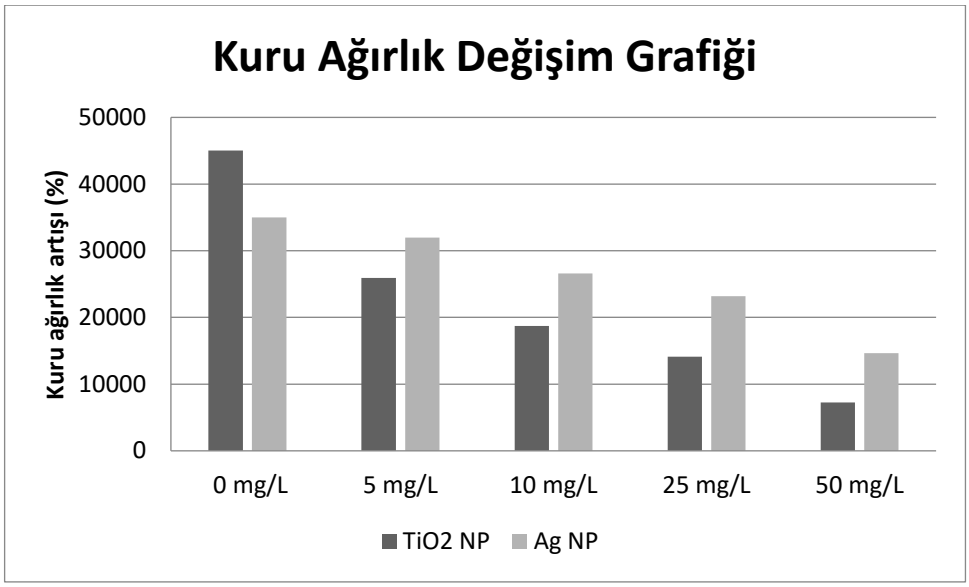
üzerinde ağır metal stresi oluşması sonucunda lipid içeriğinin arttığını ve bu artışın en çok *C.vulgaris* ve *C. prototheco*ides'de gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Elde edilen sonuçların mikroalg üzerinde ağır metal stresinin incelendiği çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür.

5.5 Kuru Ağırlık Analizi

Yürütülen çalışmalarda, TiO_2 ve Ag NP eklenmesinin kültürlerdeki *Chlorella minutissima* ürün verimliliği üzerine etkilerini belirlemek üzere kuru madde miktarı belirlemeleri için ilk ve son gün olmak üzere iki kez kuru ağırlık ölçümü yapılmıştır.

Çizelge 5.8 Kuru ağırlık miktarları

Örnek (mg/L)	**TiO_2 NP Kuru ağırlık (mg/ml) ilk ölçüm**	**TiO_2 NP Kuru ağırlık (mg/ml) son ölçüm**	**Ag NP Kuru ağırlık (mg/ml) ilk ölçüm**	**Ag NP Kuru ağırlık (mg/ml) son ölçüm**
0	0,04	18,053	0,033	11,873
5	0,06	15,626	0,04	12,82
10	0,08	15,053	0,04	10,68
25	0,0534	7,6	0,02	4,66
50	0,08	5,88	0,02	2,946



Şekil 5.12 Kültürlerin kuru ağırlığındaki değişim

İlk ve son gün yapılan kuru ağırlık tayinlerinde elde edilen veriler Şekil 5.12'de gösterilmiştir. Kuru ağırlık tayinlerinden elde edilen değerlere göre örnekler ile kontrol grupları karşılaştırıldığında TiO_2 ve Ag NP'lerin kültüre eklenmesiyle *Chlorella minutissima* kültürlerindeki toplam ağırlığın azaldığı görülmüştür. Total fotosentez verimindeki düşüş dolayısıyla karbonhidrat miktarındaki azalmanın, mikroalglerin büyümelerindeki baskılanma ve lipid içeriğindeki artışın kaynağı olduğu sonucuna varılabilir. Karbonhidrat miktarlarındaki azalış da kültürlerdeki toplam kuru ağırlık miktarının azalması gerektiği sonucunu doğurmaktadır.

BÖLÜM 6

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çok sayıda araştırmada pH, sıcaklık, besin açlığı, ağır metal stresi gibi değişen parametrelere bağlı olarak, mikroalglerin içerdiği pigment, protein gibi biyomoleküllerde ve özellikle de depo ürünlerinin kimyasal yapılarında değişikliklerin meydana geldiği belirlenmiştir. Yürütülen bu çalışmada mikroalg kültürleri farklı konsantrasyonlarda nanopartiküllere maruz bırakılarak büyüme kinetiği incelenmiş; klorofil, karoten, karbonhidrat, yağ ve kuru ağırlık tayinleri yapılmıştır.

- Her iki NP türünde de μ (spesifik büyüme hızı) değeri NP konsantrasyonu arttıkça azalma gösterirken, K_d (ölüm hızı) değerlerinde NP konsantrasyonuna bağlı olarak artış gözlenmiştir.
- Hücre sayısında azalmanın konsantrasyon arttıkça daha erken gerçekleştiği ve hücrelerin durgun faza daha erken girdikleri saptanmıştır.
- Hem konsantrasyona hem de süreye bağlı olarak *Chlorella minutissima*'da gözlenen hücre sayısı azalışı düşük derişimlere (5 ve 10 mg/L) oranla yüksek derişimlerde (25 ve 50 mg/L) daha fazla olmuştur. NP etkisi altında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında *Chlorella minutissima*'daki büyüme hızı belirgin bir şekilde azalmıştır. Özellikle de 25 ve 50 mg/L'lik derişimlerdeki büyüme hızındaki azalış önemli derecede olmuştur.
- 25 ve 50 mg/L TiO_2 ve Ag NP'nin *Chlorella minutissma* için oldukça toksik olduğu belirlenmiştir.
- Ag ve TiO_2 nanopartiküllerinin *Chlorella minutissima* üzerine toksisitesinin konsantrasyona bağımlı olarak arttığı görülmüştür. NP'lerin hücre yüzeyinde

birikimi yapının bozulmasına yol açarak hücre geçirgenliğinin artmasına sebep olabilmekte ve bu da hücrelerin yaşayabilirliğinin ve pigment miktarının azalmasına sebep olmaktadır. Aynı şekilde, hücre duvarında agregatların oluşumu gölgeleme etkisi meydana getirerek mikroalgal büyümeyi inhibe edebilmektedir.

- *Chlorella minutissima* türü için TiO_2 NP'nin Ag NP'ye göre daha toksik olduğu söylenebilir. Bu, TiO_2 NP'nin sahip olduğu fotokatalitik özelliğinden kaynaklanmaktadır. TiO_2 stresine maruz bırakılan kültürlerde hücre sayısındaki azalmanın daha erken dönemlerde başladığı ve μ değerlerinin Ag NP'ye maruz bırakılan kültürlerde daha yüksek olduğu görülmektedir.
- *Chlorella minutissima*'daki fotosentetik pigment konsantrasyonlarının yüksek derişimli TiO_2 ve Ag NP etkisi altında zamana bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. *Chlorella minutissima*'daki TiO_2 ve Ag NP etkisinde klorofil miktarlarındaki azalışlar klorofil biyosentez prosesinin bozulmasının, klorofil sentezinde görevli enzimlerin inhibe edilmesinin ya da klorofil parçalanmasının sonucu olabilir. Ağır metallerin klorofil biyosentezini ve bu proseste görev yapan enzimleri inhibe ettiği bilinmektedir.
- Yüksek konsantrasyonlarda nanopartiküllere maruz kalan kültürlerde NP'ye maruz kalmanın hemen sonrasında belirgin bir şekilde beta-karoten artışı gözlenmiştir. NP stresine karşı hücrelerdeki savunma mekanizmalarının hızlı bir şekilde devreye girmesiyle beta-karoten miktarında önce artış görülmüş, daha sonra ise dengenin bozularak mekanizmaların yetersiz kaldığı beta-karoten miktarındaki azalış sebebiyle anlaşılmıştır. Ag NP'nin karoten biyosentez mekanizması üzerinde daha fazla toksik etki gösterdiği saptanmıştır.
- *Chlorella minutissima*'daki karbonhidrat miktarının yüksek derişimlerdeki (25 ve 50 mg/L) TiO_2 ve Ag NP etkisi altında azaldığı belirlenmiştir. *Chlorella minutissima*'da TiO_2 etkisi altında karbonhidrat miktarındaki azalışların kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm konsantrasyon ve sürelerde önemli olduğu ve bu biyolojik moleküllerdeki azalışların düşük derişimlere (5 ve 10 mg/L) oranla yüksek derişimlerde (25 ve 50 mg/L) daha fazla olduğu gözlenmiştir. Klorofil-a

pigmentindeki azalmayla birlikte algal mikroorganizmaların fotosentetik aktivitelerinin de azalması, beraberinde fotosentez sonucu sentezlenen karbonhidrat miktarında azalmanın ortaya çıkacağı sonucunu doğurmaktadır. Diğer yandan gerek karbonhidrat miktarının ve gerekse klorofil miktarının azalması hücre içi ATP üretimini düşürerek *Chlorella minutissima*'daki büyümeyi engellemiş olabileceği düşünülmektedir.

- *Chlorella minutissima* mikroalglerinin TiO_2 NP etkisi altında lipid biriktirmeye yatkın olduğu, Ag NP etkisi altında ise düşük konsantrasyonlarda karbonhidrat artışı ile lipid miktarında ihmal edilebilecek düzeyde artışın gerçekleştiği, yüksek konsantrasyonlarda ise yağ içeriğindeki artışın daha belirgin olduğu görülmektedir. Ağır metal stresinin lipid sentezini artırdığı bilinmektedir. Lipid sentezini indükleyecek NP konsantrasyon değeri/aralığı belirlenerek mikroalglerin net lipid üretimi daha da artırılabilir. Böylece biyodizel üretimi için bu mikroalgden daha etkin faydalanılabilir.

KAYNAKLAR

[1] Kahru, A. ve Dubourguier, H.C., (2010). ‘‘From Ecotoxicology to Nanoecotoxicology’’, Toxicology, 269: 105-119.

[2] Gökpınar, Ş., Işık, O., Göksan, T., Durmaz, Y., Uslu, L., Ak, B., Önalan, S.K. ve Akdoğan, P., (2013). ‘‘Algal Biyoteknoloji Çalışmaları’’, Yunus Araştırma Bülteni, 4: 21-26.

[3] Becker, E.W., (1994). ‘‘Microalgae Biotechnology and Microbiology’’, Cambridge University Press, Cambridge, 230.

[4] Altınsoy, Ö., (2012). Nanoreaktör Sistemlerinde Gümüş Nanopartikül Sentezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Sivas.

[5] Caswell, M. ve Zilberman, D., Algolculture, http://oregonstate.edu/dept/IIFET/2000/papers/zilberman.pdf, 1 Mart 2016.

[6] Sasson, A., (1997). ‘‘Microalgal Biotechnologies: Recent Developments and Prospects for Developing Countries’’, Biotec Publication, 2542: 76.

[7] Kang, N.K., Lee, B., Choi, G.G., Moon, M., Park, M.S., Lim, J.K. ve Yang, J.W., (2014). “Enhancing Lipid Productivity of *Chlorella vulgaris* Using Oxidative Stress by TiO_2 Nanoparticles”, Korean Journal of Chemical Engineering, 31: 861-867.

[8] Lin, C., Chou, T. ve Wu, J. (2013). ‘‘Biodiversity of Soil Algae in the Farmlands of midTaiwan’’, Biological Studies, 54: 41.

[9] Kim, S.K., (2015). Handbook of Marine Microalgae Biotechnology Advances, 48-51.

[10] Taiz, L. ve Zeiger, E., (2008). Bitki Fizyolojisi Mineral Beslenme; Çeviren: Türkan, İ., Palme Yayıncılık, Ankara.

[11] Sukatar, A., (2002). Alg Kültür Yöntemleri, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitapları Serisi, 184, İzmir.

[12] Coutteau, P., (1996). Microalgae, Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture, FAO Fisheries Technical, 361.

[13] Telefoncu, A., (1995). Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, 152, İzmir.

[14] Bailey, J.E. ve Ollis, D.F., (1986). Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill Book Company, Japan, 984.

[15] Stanbury, P.F. ve Whitaker, A., (1989). Principles of Fermentation Technology, Pergamon Pres, Oxford, 1-24.

[16] Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S. ve Higton, G., (2001). Industrial Microbiology: An Introduction, Marston Book Services Ltd, London, 288.

[17] Boulton, R.B., Singleton, V.L. ve Bisson, L.F., (1996). Principles and Practices of Winemaking, International Thomson Publishing, USA, 604.

[18] Murphy, C.J., (2002). ‘‘Optical Sensing with Quantum Dots’’, Anal. Chem., 74 19: 520-526.

[19] Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan, D.J. ve Shah, S.I., (2005). ‘‘Synthesis and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles’’, J. Nanosci. Nanotechno., 2: 244-249.

[20] Menteş, M., (2009). Metal Gümüş Nanoparçacıklarının Boyuta Bağlı Ergimesinin Moleküler Dinamik Simülasyon Metodu ile İncelenmesi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Edirne.

[21] Chang, Y.N., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J. ve Xing, G., (2012). ‘‘The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles’’, Materials, 5: 2850-2871.

[22] Kominami, H., Kohno, M. ve Kera, Y., (2000). ‘‘Synthesis Brookite Type Titanium Oxide Nano Crystals Inorganic Media’’, Journal Material Chemistry, 10: 1151-56.

[23] Hsu, C.L. ve Sheu, D.C., (2004). Disinfection Ability of TiO_2-containing Coating, Tatung University Science Department of Bioengineering, Yüksek Lisans Tezi, Taipei.

[24] Levent, E., (2008). Titanyum-dioksit Üzerinde Organik Maddelerin Adsorpsiyonu ve Fotokatalitik Bozunması, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

[25] Sayılkan, F., (2007). Nano-TiO_2 Fotokatalizör Sentezi ve Fotokatalitik Aktivitesinin Belirlenmesi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Malatya.

[26] Noberi, C., (2012). Gümüş-Titanyum Dioksit (Ag-TiO_2) Antimikrobiyal Nano Kompozit Tozların Üç Boyutlu Metalik Filtreler Üzerine Elektrokinetik Biriktirme (EKB) Yöntemi Kullanılarak Kaplanması ve Karakterizasyonu, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

[27] Martinez Gutierrez, F., Olive, P.L., Banuelos, A., Orrantia, E., Nino, N., Sanchez, E.M., Ruiz, F., Bach, H. ve Av-Gay, Y., (2010). “Synthesis, Characterization, and Evaluation of Antimicrobial and Cytotoxic Effect of Silver and Titanium Nanoparticles”, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 6: 681-688.

[28] Huang, Z., Maness, P.C., Blake, D.M., Wolfrum, E.J., Smolinski, S.L. ve Jacoby, W.A., (2000). "Bactericidal Mode of Titanium Dioxide Photocatalysis", Journal of Photochemistry and Photobiology A:Chemistry, 2-3: 163-170.

[29] Sunada, K., Watanabe, T. ve Hashimoto, K, (2003). "Studies on Photokilling of Bacteria on TiO_2 Thin Film", Journal of Photochemistry and Photobiology A:Chemistry, 156: 227-233.

[30] Dilaver Adıgüzel, E., (2011). Kitosan-Gümüş Nanotaneciklerinin Dezenfektan Olarak Üretimi ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

[31] Altınsoy, Ö., (2012). Nanoreaktör Sistemlerinde Gümüş Nanopartikül Sentezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Sivas.

[32] Kawahara, K., Tsuruda, K., Morishita, M. ve Uchida, M., (2000). ''Antibacterial Effect of Silver-zeolite on Oral Bacteria Under Anaerobic Conditions'', Dental Materials, 6: 452-455.

[33] Martinez-Castanon, G.A., Nino-Martinez, N., Martines-Gutierrez, F., Martinez-Mendoza, J.R. ve Ruiz, F., (2008). ''Synthesis and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles with Different Sizes'', 8: 1343-1348.

[34] Pal, S., Tak, Y.K. ve Song, J.M., (2007). ''Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*'', Applied and Environmental Microbiology, 6: 1712-1720.

[35] Morones, J.S., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramirez, J.T. ve Yacaman, M.J., (2005). ''The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles, Institute of Physics Publishing'', Nanotechnology, 16: 2346-2353.

[36] Fu, L., Hamzeh, M., Dodard, S., Zhao, Y.H. ve Sunahara, G.I., (2015). ''Effects of TiO_2 Nanoparticles on ROS Production and Growth Inhibition Using Freshwater Green Algae Pre-exposed to UV Irradiation'', Environ. Toxicol. Pharmacol., 39: 1074-1080.

[37] Ksiazyk, M., Asztemborska, M., Steborowski, R. ve Bystrzejewska-Piotrowska, G., (2015). ''Toxic Effect of Silver and Platinum Nanoparticles Toward the Freshwater Microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*'', Bull. Environ. Contam. Toxicol., 94: 554- 558.

[38] Iswarya, V., Bhuvaneshwari, M., Alex, S.A., Iyer, S., Chaudhuri, G., Chandrasekaran, P.T., Bhalerao, G.M., Chakravarty, S., Raichur, A.M., Chandrasekaran, N. ve Mukherjee, A., (2015). ''Combined Toxicity of Two Crystalline Phases (Anatase and Rutile) of Titania Nanoparticles Towards Freshwater Microalgae: *Chlorella sp.*'', Aquat. Toxicol., 161: 154-169.

[39] Kang, N.K., Lee, B., Choi, G.G., Moon, M., Park, M.S., Lim, J. ve Yang, J.W., (2014). ''Enhancing Lipid Productivity of *Chlorella vulgaris* Using Oxidative Stress by TiO_2 Nanoparticles'', Kor. J. Chem. Eng., 5: 861-867.

[40] Li, F., Liang, Z., Zheng, X., Zhao, W., Wu, M. ve Wang, Z., (2015). ‘‘Toxicity of Nano-TiO_2 on Algae and the Site of Reactive Oxygen Species Production’’, Aquat. Toxicol., 158: 1-13.

[41] Xia, B., Chen, B., Sun, X., Qu, K., Ma, F. ve Du, M., (2015). ‘‘Interaction of TiO_2 Nanoparticles with the Marine Microalga *Nitzschia closterium*: Growth Inhibition, Oxidative Stress and Internalization’’, Sci. Total Environ., 508: 525-533.

[42] Hazani, A.A., Ibrahim, M.M., Shehata, A.I., El-Gaaly, G.A., Daoud, M., Fouad, D., Rizwana, H. ve Moubayed, N.M.S., (2013). ‘‘Ecotoxicity of Ag-nanoparticles on Two Microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta’’*, Arch. Biol. Sci., 4: 1447-1457.

[43] Dalai, S., Pakrashi, S., Nimala, M.J., Chaudhri, A., Chandrasekaran, N., Mandal, A.B. ve Mukherjee, A., (2013). ‘‘Cytotoxicity of TiO_2 Nanoparticles and Their Detoxification in a Freshwater System’’, Aquat. Toxicol., 1-11, 138-139.

[44] Dash, A., Singh, A.P., Chaudhary, B.R., Singh, S.K. ve Dash, D., (2012). “Effect of Silver Nanoparticles on Growth of Eukaryotic Green Algae”, Nano-Micro Lett., 3: 158-165.

[45] Lee, W.M. ve An, Y.J., (2013). ‘‘Effects of Zinc Oxide and Titanium Dioxide Nanoparticleson Green Algae Under Visible, UVA, and UVB Irradiations: No Evidence of Enhanced Algal Toxicity Under UV Pre-irradiation’’, Chemosphere, 91: 536-544.

[46] Chen, L., Zhou, L., Liu, Y., Deng, S., Wu, H. ve Wang, G., (2012). ‘‘Toxicological Effects of Nanometer Titanium Dioxide (nano-TiO_2) on *Chlamydomonas reinhardtii*’’, Ecotoxicol. Environ., 84: 155-162.

[47] Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F. ve Popovic, R., (2012). ‘‘Inhibitory Effects of Silver Nanoparticles in Two Green Algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*’’, Ecotoxicol. Environ., 78: 80-85.

[48] Sadiq, I.M., Dalai, S., Chandrasekaran, N. ve Mukherjee, A., (2011). ‘‘Ecotoxicity Study of Titania (TiO_2) NPs on Two Microalgae Species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp.’’, Ecotoxicol. Environ. Safe., 74: 1180-1187.

[49] Sadiq, I.M., Pakrashi, S., Chandrasekaran, N. ve Mukherjee, A., (2011). ‘‘Studies on Toxicity of Aluminum Oxide (Al_2O_3) Nanoparticles to Microalgae Species: *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.’’*, J. Nanopart. Res., 13: 3287-3299.

[50] Ji, J., Long, Z. ve Lina, D., (2011). ‘‘Toxicity of Oxide Nanoparticles to the Green Algae *Chlorella sp.*’’, Chem. Eng. J., 170: 525-530.

[51] Gong, N., Shao, K., Feng, W., Lin, Z., Liang, C. ve Sun, Y., (2011). ‘‘Biotoxicity of Nickel Oxide Nanoparticles and Bio-remediation by Microalgae *Chlorella vulgaris*’’, Chemosphere, 83: 510-516.

[52] Hartmann, N.B., Von der Kammer, F., Hofmann, T., Baalousha, M., Ottofuelling, S. ve Baun, A., (2010). ‘‘Algal Testing of Titanium Dioxide NPs-testing Considerations: Inhibitory Effects and Modification of Cadmium Bioavailability’’, Toxicology, 269: 190-197.

[53] Wang, J., Zhang, X., Chen, Y., Sommerfeld, M. ve Hu, Q., (2008). ‘‘Toxicity Assessment of Manufactured Nanomaterials Using the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*’’, Chemosphere, 73: 1121-1128.

[54] Singh, S.K., Bansal, A., Jha, M.K. ve Jain, R., (2012). Production of Biodiesel From Wastewater Grown *Chlorella Minutissima*, , Dr. B. R. Ambedkar National Institute of Technology Department of Chemical Engineering, Jalandhar.

[55] Sanchez, M.D., Mantell, C., Rodriguez, M., Martinez de la Ossa, E., Lubian, L.M. ve Montero, O., (2005). ‘‘Supercritical Fluid Extraction of Carotenoids and Chlorophyl a’’, Journal of Food Engineering, 66: 245-251.

[56] Zou, N. ve Richmond, A., (2000). ‘‘Light-path Length and Population Density in Photoacclimation’’, Journ. of Applied Phycology, 12: 349-354.

[57] Öztürk Ürek, R., (2003). İmmobilize *Phanerocheate chrysosporium*’dan Mangan Peroksidaz Enziminin Üretimi, İzolasyonu ve Saflaştırılması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir.

[58] Nielsen, S.S., (2003). Food Analysis Laboratory Manual*,* Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

[59] Rai, L.C., Gaur, J.P. ve Kumar, H.D., (1981). ‘‘Phycology and Heavy Metal Pollution’’, Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc., 56: 99-151.

[60] Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao A.J., Quigg, A., Santschi, P.H. ve Sigg, L., (2008). ‘‘Environmental Behavior and Ecotoxicity of Engineered Nanoparticles to Algae, Plants, and Fungi’’, Ecotoxicology, 17: 372-86.

[61] Perreault, F., Dionne, J., Didur, O., Juneau, P. ve Popovic, R., (2011). ‘‘Effect of Cadmium on Photosystem II Activity in *Chlamydomonas reinhardtii*: Alteration of O–J–I–P Fluorescence Transients Indicating the Change of Apparent Activation Energies Within Photosystem II’’, Photosynth. Res., 107: 151-157.

[62] Metzler, D.M., Li, M., Erdem, A. ve Huang, C.P., (2011). ‘‘Responses of Algae to Photocatalytic Nano-TiO_2 Particles with an Emphasison the Effect of Particle Size’’, Chem. Eng. J., 170: 538-546.

[63] Kim, S.C. ve Lee, D.K., (2005). ‘‘Preparation of TiO_2-coated Hollow Glass Beads and Their Application to the Control of Algal Growth in Eutrophic Water’’, Microchem. J., 80: 227-232.

[64] He, D., Jones, A.M., Garg, S., Pham, A.N. ve Waite, T. D., (2011). ‘‘Silver Nanoparticle-Reactive Oxygen Species Interactions: Application of a Charging-Discharging Model’’, J. Phys. Chem., 115: 5461-5468.

[65] Özdiş, Ö., (2005). Krom (VI) Birikiminin *Chlorella vulgaris*’te Hücre Sayısı, Klorofil, Büyüme Hızı, Protein ve Şeker Miktarlarına Etkileri, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana.

[66] Stevenson, R., Bothwell, L. ve Lowe, L., (1996). Algal Ecology, Freshwater Benthic Ecosystems.

[67] Ledford, H.K. ve Niyogi, K.K., (2005). ‘‘Singlet Oxygen and Photo-oxidative Stress Management in Plants and Algae’’, Plant Cell Environ*.,* 8: 1037-1045.

[68] Elibol Çakmak, Z., (2013). Mikroalglerde Nötral Lipid İçeriğinin Artırılması Üzerine Bir Araştırma, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Kırıkkale.

[69] Yang, S., Rudolf, S.S. Wu, K. ve Richard, Y.C., (2002). ‘‘Physiological and Cytological Responses of the Marine Diatom *Skeletonema costatum* to 2,4-dichlorophenol’’, Aquatic Toxicology., 60: 33-41.

[70] Jouany, J.M., Vasseur, P. ve Ferard, J.F., (1982). ‘‘Exotoxicite Directe et Integree du Chrome Hexavalent Sur Deux Niveaux Trophiques Associes: *Chlorela vulgaris* et *Daphnia magna*’’, Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological., 27: 207-221.

[71] Ren, H.Y., Liu, B.F., Kong, F., Zhao, L., Xie, G.J. ve Ren, N.Q., (2014). “Enhanced Lipid Accumulation of Green Microalga *Scenedesmus sp.* by Metal Ions and EDTA Addition”, Bioresource Technology, 169: 763-767.

[72] Yang, J., Cao, J., Xing, G. ve Yuan, H., (2015). “Lipid Production Combined with Biosorption and Bioaccumulation of Cadmium, Copper, Manganese and Zinc by Oleaginous Microalgae *Chlorella minutissima* UTEX 2341”, Bioresource Technology, 175: 537-544.

[73] Liu, Z.Y., Wang, G.C. ve Zhou, B.C., (2008). “Effect of Iron on Growth and Lipid Accumulation in *Chlorella vulgaris*”, Bioresource Technology, 11: 4717-4722.

[74] Sibi, G., Anuraag, T.S. ve Bafila, G., (2014). ‘‘Copper Stress on Cellular Contents and Fatty Acid Profiles in *Chlorella Species*’’, OJBS, 14: 209-217.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Dilek ÖZTAY

Doğum Tarihi ve Yeri : 12.09.1992, Kadıköy

Yabancı Dili : İngilizce, Almanca

E-posta : dilekoztay@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2015
Lise	Fen Bilimleri	Üsküdar Anadolu Lisesi	2010

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2016	Berko İlaç ve Kimya San. A.Ş.	Ruhsatlandırma Asistanı
2013	Ülker Çikolata A.Ş.	Stajyer
2012	Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi	Stajyer

YAYINLARI

Bildiri

1. Öztay, D., Özçimen, D., İnan, B., Koçer, A.T. ve Balkanlı N.E., (2016). ‘‘Nanoparticles Usage as an Innovative Approach for Inducing Lipid Production of Algal Cells’’, 107th AOCS Annual Meeting & Expo, 1-4 May 2016, Utah.