

Farklı Karbon Nanotüplerin Arpa Çimlenmesi Üzerindeki Etkileri

The Effect of Various Carbon Nanotubes on Barley Germination

Hülya Akdemir¹ , Merve Seven² , Şaban Kalay² , Mustafa Çulha² , Andrew J. Harvey² 

¹Department of Molecular Biology and Genetics, Gebze Technical University School of Science, Kocaeli, Turkey

²Department of Genetic and Bioengineering, Yeditepe University School of Engineering, İstanbul, Turkey

Cite this article as: Akdemir H, Seven M, Kalay Ş, Çulha M, Harvey AJ. The Effect of Various Carbon Nanotubes on Barley Germination. Experimed 2019; 9(2): 53-9.

ÖZ

Amaç: Karbon tabanlı nanomalzemelerin en önemlilerinden biri olan karbon nanotüpler (CNT) özellikle biyoloji ve tıp alanında kullanılmaya başlanmıştır. İlaç salımı, kanser tedavisi, biyosensör, biyomedikal görüntüleme ve doku mühendisliğinde kompozit materyaller olarak kullanımları biyomedikal uygulamalarından bazılarıdır. Ancak, yaygın olarak kullanılmaları, bu yapıların çevreye salınması riskini doğurmuştur. Bu nedenle bu çalışmada, farklı özellikteki karbon nanotüplerin arpanın (*Hordeum vulgare* L. 'Zeynelağa') çimlenmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Ticari tek tabakalı karbon nanotüp (SWCNT), çok tabakalı karbon nanotüplere (MWCNT) ek olarak, laboratuvar koşullarında karboksillenmiş çok tabakalı karbon nanotüpler (CCNT) sentezlenmiş ve FTIR spektrokopisi ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, farklı konsantrasyonlardaki (50 ve 100 mg/L) karbon nanotüplerin arpa tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Bulgular: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 3 karbon nanotüpün kullanılan konsantrasyonlarda arpa bitkisinin çimlenmesi üzerinde bir etki yaratmamıştır.

Sonuç: Denenen farklı karbon nanotüplerin arpa çimlenmesi üzerinde doğrudan bir toksik etki yaratmadığı belirlenmiştir. Elde edilen bu verilere ek olarak, gen ekspresyonu düzeyinde bir farklılık olup olmadığının araştırılması da bu materyallerin gerçek etkisinin anlaşılması açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Tek ve çok tabakalı karbon nanotüpler, karboksillenmiş karbon nanotüpler, arpa, biyomedikal uygulama

GİRİŞ

Günümüzde nanobilim, modern bilimdeki en önemli araştırma ve geliştirme alanlarından birisi haline gelmiştir. Nano kelimesi, Yunancada bir milyarıncı anlamına gelmekte olup, en basit anlamda ise nanobilim küçük partiküllü malzemelerin bilimi olarak tanımlanmaktadır (1). Gerçekte nanomateryaller doğada insanların nano ölçek seviyesinde bu

ABSTRACT

Objective: Carbon nanotubes (CNT), one of the most important carbon-based nanomaterials, have started to be used in the fields of biology and medicine. Drug delivery, cancer treatment, biosensors, biomedical imaging and their use as composite materials in tissue engineering are some of the biomedical applications. However, their extensive applications may increase the risk of their being released into the environment. Thus, in this study, we investigated the effects of different carbon on barley (*Hordeum vulgare* L. 'Zeynelağa') germination.

Material and Method: In addition to usage of commercial single-walled carbon nanotubes (SWCNT) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNT), carboxylated multi-walled carbon nanotubes (CCNT) have also synthesized carboxylated multi-walled carbon nanotubes and characterized them with FTIR spectroscopy. Later, we investigated the effect of different concentrations (50 and 100 mg/L) of carbon nanotubes on the germination of barley seeds.

Results: Compared to control groups, treatment of barley seeds with different concentrations of three carbon nanotubes had no effect on barley germination.

Conclusion: It was observed that tested carbon nanotubes have no toxic effect on barley germination. In addition to these data, it is also important to investigate whether there is a difference in the gene expression level in order to understand the actual effect of these materials.

Keywords: Single- and multi-walled carbon nanotubes, carboxylated carbon nanotubes, barley, biomedical applications

maddeleri tanımlayabilmelerinden çok önce var olmalarına karşın, sentetik kimyadaki ilerlemeler özellikle biyolojik nanoteknolojinin gelişmesinde itici güç olmuştur. Böylesine küçük partiküllerin günümüzde temel bilimin ilgisini çekmeyi başarısındaki en önemli neden, bir maddenin erime noktası, elektriksel ya da optik özelliklerinin bu maddenin boyutu nanoskobik olacak kadar küçüldüğünde değişmesinden kaynaklanmaktadır (1). Nanopartiküllerin yeni

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Hülya Akdemir **E-mail:** hakedemir@gtu.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 23.07.2019 **Revision Date/Revizyon Tarihi:** 06.08.2019 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 08.08.2019



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

özelliklerinin belirlenmesi ile teknolojik / ticari gelişim ve uygulamalarında, mikroelektronikten kaplamaya, boyalardan biyoteknolojiye kadar birçok farklı alanda yeni fırsatlar açığa çıkmıştır (1). Ticari piyasadaki uygulamalarına örnek olarak, reçetesiz tıbbi tanı kitlerinde görünür bir belirteç olarak kullanılan altın nanopartiküller verilebilir (2). Bu uygulama, tek bir nanopartikülün eşsiz bir özelliğinin nasıl teknolojik imkana dönüşebileceğinin güzel bir örneğidir. Saf altının makroskobik numuneleri tek bir altın rengini yansıtırken, nanopartikülün büyüklüğü ve şekline bağlı olarak, altın nanopartikülleri gökkuşağının belli başlı tüm renklerini gösterebilir (3). Altın nanopartiküllerinin optik absorpsiyon yoğunlukları aşırı derecede güçlü olup, bir yüzeyde çöktürülürse ya da bir çözeltide süspanse edilirse, bu partiküllerin çok küçük bir miktarı bile çıplak gözle saptanabilir ve bu özellikleri ile altın nanopartikülleri görünür belirteç olarak kullanımda ideal hale gelir (1). Biyomedikal ve biyoteknolojide mikro ve nanopartiküllerin diğer uygulamalarına; enzim enkapsülasyonu, DNA transfeksiyonu, biyosensörler ve ilaç uygulamaları örnek verilebilir. Örneğin, ilaçlar biyobozunur polimerlerden oluşan nanosferler ile birleştirilip uygulanırsa, bu nanosferlerin ayrışması ile ilacın uygun zamanda ortama salınması sağlanır. Bu partikülün parçalanmasına neden olan durum, partikülün içinde bulunan kimyasal bağın doğasının değişmesiyle kontrol edilir. Örneğin, asitte bozunur bağlar kullanıldığında, bu partiküller tümör hücreleri ya da iltihap bölgesinin etrafında var olan asidik mikroçevrelerde parçalanırlar ve bu durum bölgeye özgü ilaç tedavisini mümkün kılar (4). Bir başka çalışmada ise dextran kaplı süperparamagnetik nanopartiküller ile kök hüce ve bağışıklık hücreleri gibi farklı hüce türleri spesifik olarak, yan etkiler olmadan hedeflenebilmiş ve MR görüntüleme ile görüntülenebilmişti (5). Aktif yüzeyli bu nanopartiküller aynı zamanda bir genetik materyalin başka bir hücreye aktarımını sağlayan transfeksiyon işleminde de kullanılabilirler. Örneğin, demir oksit magnetik nanopartiküller aracılığı ile insan metastatik süt bezi hücre hattına RNA aktarımı ve EGFP susturması sağlanmıştır (6).

İnce içecek pipetlerine benzeyen mikro ve nanotüp yapıları ise, küresel nanopartiküllere görece bazı ilginç üstünlükleri nedeniyle biyoteknolojik uygulamalarda, küresel olanlara alternatif olarak kullanılırlar (1). Örneğin, nanotüpün boyutuna göre değerlendirildiğinde nanotüpler büyük iç hacme sahip olup, bu özellikleri sayesinde bu tüplerin içine küçük moleküllerden proteinlere kadar değişen boyutlarda olmak üzere istenilen kimyasal ya da biyokimyasal gruplar doldurulabilir (7). Dahası, nanotüplerin iç ve dış yüzeyleri farklı olduğundan, bu iki kısım kimyasal ya da biyokimyasal olarak farklı şekillerde işlevsel hale getirilebilir. Bu da örneğin, nanotüpün içini belirli bir biyokimyasal ile doldururken, dış yüzeyin kimyasal özelliklerinin de biyo-uyumlu olacak şekilde düzenlenebilme ihtimalini ortaya çıkarır. Sonuçta, nanotüpler uçları açık yapılar olup, bu durum tüp içine ulaşımı ve tüp içine madde eklenmesini çok kolay hale getirir (1).

Bununla birlikte, farklı özellikteki bu nanomateryallerin yaygın kullanımı, bu materyallerin geri dönüşüm proseslerinde ya da atık olarak çevreye salınabilmesine neden olup, insan ve diğer

canlılar için tehdit oluşturabileceğine dair kaygıları arttırmıştır. Literatürde yer alan ilk çalışmalarda, bu nanomateryallerin çeşitli konsantrasyonlarda insan ve hayvanları nasıl etkileyebileceğini anlamak için farklı nanomateryallerin hücre morfolojisi, davranışı ve fonksiyonu ile seçici ölümü üzerindeki etkileri araştırılmıştır (8). Daha sonra yapılan sınırlı sayıda çalışmada, bitki hücre ve dokularında bu nanomateryallerin olası pozitif ve yan etkileri araştırılmış ancak yapılan çalışmalarda kimi zaman çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (9).

Karbon tabanlı nanomalzemeler, benzersiz özellikleri nedeniyle her geçen gün birçok uygulama alanlarında kullanılmaktadır (10). Bu malzemeler, fulleren, nano-onion, nano-cone, nano-horn, karbon dot, karbon nanotüpler, nano-bead, nano-fiber, nanodiamond ve grahpenleri içerir ve boyutlarının yanı sıra yapısal olarak da çok büyük farklılıklar gösterirler (10). Karbon nanotüp (CNT) temelli ilaç salımı, *in vitro* ve *in vivo* kanser terapileri gibi hastalık tedavisindeki uygulamalar için küçük ilaç moleküllerinin, DNA plazmitlerinin, siRNA ve proteinlerin hücre içi salınımı için umut vadetmektedir (11). CNT'lerin benzersiz optik ve elektriksel özellikleri onları çeşitli biyolojik molekülleri tespit etmek için dikkat çekici platformlar haline getirmektedir (12). Tek tabakalı karbon nanotüplerin, güçlü rezonans Raman saçılmasının yanı sıra yakın kızıl ötesi bölgede (NIR) optik absorpsiyon ve fotoluminesans gibi bir çok özgün optik özellik gösterip, bu özellikleriyle farklı biyolojik görüntüleme yöntemlerinde kullanılabilirler (13). Ayrıca, üstün mekanik özelliklere sahip CNT'ler, potansiyel doku mühendisliği iskele malzemeleri olarak da uygulama alanı bulmuşlardır (14). CNT-bazlı nanomalzemeler bu özellikleriyle ümit verici olup, gelecekte hastalık tanısı ve tedavisi için yeni fırsatlar getirebilecektir (11). Tıp alanındaki bu potansiyelinin yanı sıra yine karbon nanotüplerin pestisitler için de potansiyel taşıyıcı sistemler olarak ya da ürün verimini arttırmadaki etkileri ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (15). Karbon nanotüplerin bitkiler üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, tek tabakalı karbon nanotüplerin (SWCNT, single-walled carbon nanotubes), tütün hücre zarı ve duvarını aşarak, hücre içine alınabildiğini göstermiştir. Çok tabakalı karbon nanotüplerle (MWCNT, multi-walled carbon nanotubes) yapılan başka bir çalışmada ise, bunların bitki protoplastları tarafından boyutlarına bağlı olarak, nükleus ve plastitler de olmak üzere önemli hüresel yapılara translokasyonunu kanıtlamıştır (16). Yine MWCNT'lerin tohum kabuğuna nüfuz edebildiği ve bitkilerde su kanallarını düzenleyebildiği düşünülmektedir.

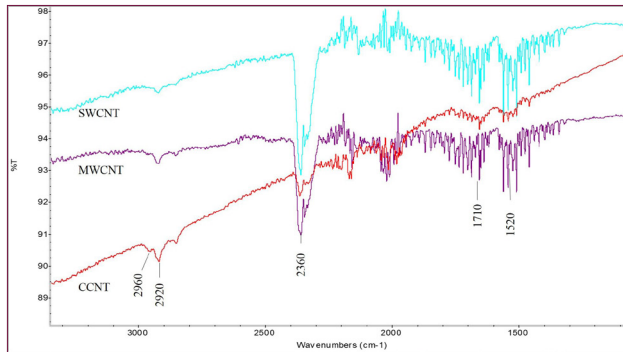
Bununla birlikte, hem SWCNT hem de MWCNT'lerin bitki gelişimsel biyolojisi ve bitki fizyolojisi üzerindeki etkileri tam olarak anlaşılammıştır. Karbon nanotüpler, *Sorghum bicolor* ve *Panicum virgatum* gibi iki önemli enerji bitkisi çimlenmesi ve biyokütlesi üzerinde olumlu etkiler yapmış (17), kabak biyokütlesi MWCNT'lerle muamele edildiğinde azalmış (18), pirinçte ise bitki büyümesi üzerinde toksik etki yaratmıştır (19). Karbon nanotüplerin farklı bitkilerin çimlenmesi üzerinde etkisi kısmen araştırılmış ve gerek olumlu gerekse toksik etkileri belirlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında, hem dünya hem Türkiye ekonomisi açısından önemli bir yere sahip olan arpa bitkisi eksplant kaynağı olarak seçilmiştir. Arpa, hem Türkiye hem de dünyada yetiştirilen önemli bir bitkidir. Arpa üretiminin çoğu, hayvan yemi ve maltlık olarak ve nadiren de insan besini olarak tüketime sunulmaktadır. Bu çalışmada, Türk maltlık arpa çeşidinin (*Hordeum vulgare* L. 'Zeynelağa') çimlenmesi üzerinde 3 farklı karbon nanotüpün [SWCNT, MWCNT, karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüp (CCNT)] etkileri araştırılmıştır.

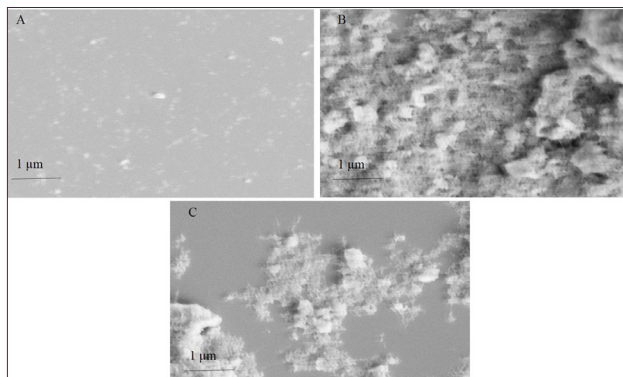
GEREÇ VE YÖNTEM

Bitki Materyali ve Hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan 'Zeynelağa' çeşidine ait arpa tohumları, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden (Ankara) temin edilmiştir. Bu çalışmada, etik komite iznine gerek duyulacak bir materyal ya da deney hayvanı kullanılmamıştır. Bu nedenle, etik komite iznine gerek duyulmamıştır. Tohumların çimlendirilmeden önce, yaklaşık 24 saat çeşme suyu kullanılarak imbibisyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra arpa tohumları, yüzey sterilizasyonu için; %70'lik etil alkolde 1 dk çalkalanıp, steril distile su ile 3 kere 2'şer dk durulandıktan sonra, %2,5'lük ticari sodyum hipoklorit (Merck) çözeltisinde 15 dk inkübe edildikten sonra steril distile su ile en az 3 kere 5'er dk durulanmıştır.



Şekil 1. SWCNT, MWCNT ve CCNT'nin FTIR spektrumlarının karşılaştırılması



Şekil 2. a-c MWCNT (A), SWCNT (B) ve CCNT (C) SEM görüntüleri

Karbon Nanotüplerin Hazırlanması

Denemelerde, ticari karbon nanotüpler; SWCNT (Sigma 704148) ve MWCNT (Sigma 406074) kullanılmıştır. Karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüpler (CCNT), ticari MWCNT'ler kullanılarak aşağıdaki şekilde sentezlenmiştir: 2 g MWCNT, 1 saat 100 mL H₂SO₄:HNO₃ (3:1) içerisinde ultrasonik su banyosunda (WiseClean) soniklenmiştir. Daha sonra, karboksillenme için 75°C'ta, 12 saat 300 rpm'de inkübe edilmiştir. İlgili çözelti, 24°C'ta, 5000 rpm'de 30 dk santrifüj ile çöktürüldükten sonra, pH nötrlenene kadar saf su ile yıkanmış ve gece boyu 55°C'de etüvde kurutulmuştur.

FTIR Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Elde edilen CCNT'de karboksillenmenin gerçekleştiğinin kontrolü, FTIR (Nicolet™ iS™ 50 FT-IR Spectrometer, Thermo Scientific) ile karakterize edilmiştir. Ayrıca, hem SWCNT ve MWCNT'deki titreşim geçişleri de FTIR ile karakterize edilmiştir.

Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizleri

Hem ticari karbon nanotüpler (SWCNT ve MWCNT) hem de sentezlenen CCNT'ye ait SEM görüntüleri alınmıştır. Analiz için alınan örnek karbon disk üzerine yerleştirilmiş ve vakum ortamında Ar (argon) atmosferinde altın tabakası ile kaplanmıştır (Baltec SDC 005 sputter-kaplayıcı). SEM görüntüleri yüksek vakum ve yüksek potansiyel altında Carl Zeiss Evo-40 cihazı kullanılarak alınmıştır. SEM potansiyel artırma voltajı 10kV, I prob 100-50 arası değiştirilerek ayarlanmıştır.

Çimlenme Ortamının Hazırlanması

Tohumların çimlendirilmesi için farklı konsantrasyonlarda karbon nanotüp içeren (50 mg/L veya 100 mg/L) ya da içermeyen (kontrol grubu) ortamlar hazırlandı. Bu amaçla, pH'ı 5.8'e ayarlanan distile su, %0.5 agar ve istenilen oranda karbon nanotüp ile karıştırılarak otoklav öncesinde, ultrasonik su banyosunda hidrofobik yapıdaki karbon nanotüplerin kümelenmesini önlemek için 30 dk sonike edildi ve daha sonra 121°C'ta 20 dk otoklav edildi. Hazırlanan ortamlar otoklav sonrası tekrar 30 dk sonike edildikten sonra, her birinde 50 mL olacak şekilde magenta kaplarına dağıtıldı.

Tohumların Çimlendirilmesi

İmbibisyonu ve yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumlar, çimlendirilmeleri için aseptik şartlar altında, karbon nanotüp içeren ya da içermeyen ortamlara aktarılarak, bitki büyüme kabiniinde 22°C'ta karanlıkta inkübe edilmiştir.

Verilerin Analizi

Her bir uygulama için en az 20 tohum kullanılmış ve 2 tekrar yapılmıştır. Çimlenmenin 3. ve 5. gününde her bir uygulamaya ait, çimlenme yüzdeleri, gövde uzunluğu ve kök sayısı alınmıştır. Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde, tek yönlü ANOVA testi kullanılmış ve ortalamaları karşılaştırmak için anlamlı en az farklılık (LSD) testi (p≤0.05) kullanılmıştır (20).

BULGULAR

Hem ticari karbon nanotüpler hem de laboratuvar koşullarında sentezlenen karboksillenmiş nanotüplere ait FTIR spektroskopisi sonuçları Şekil 1'de sunulmuştur. Bu spektrumlarda 1710

cm^{-1} C=O, 2360 cm^{-1} CO_2 molekülü titreşimlerini, ayrıca 1520 cm^{-1} C=O bağı elastik vibrasyonunu göstermektedir (21). 2920 cm^{-1} ve 2960 cm^{-1} ise CH_3 gruplarının simetrik vibrasyonuna işaret etmektedir. Sonuç olarak, CCNT spektrumundaki 1710 cm^{-1} bandı karboksillenmenin gerçekleştiğine işaret etmektedir.

SWCNT, MWCNT ve CCNT'nin SEM görüntüleri Şekil 2'de sunulmuştur. Bu nano malzemeler oldukça küçük boyutlarda olduklarından görüntü çözünürlükleri oldukça azdır.

Bunun yanı sıra, hidrofobik karakterde olduklarından kümelenmiş ve birbirine yapışık olarak görüntülenmişlerdir. Denemeler süresince, kümelenmenin önlenmesi için çimlenme ortamları hem otoklav öncesi hem sonrası sonike edilerek, kümelenmenin minimuma indirilmesi sağlanmıştır.

Bu karbon nanotüplerin çimlenme üzerindeki etkileri incelendiğinde, kontrol grubunda 3.günün sonunda tohumların yarısından fazlası (%53,3), 5. günde ise %80'i çimlenmeye başlamıştır (Tablo 1). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında SWCNT'nin

Tablo 1. Farklı karbon nanotüp içeren çimlenme ortamlarında, arpa bitkisinin çimlenme yüzdeleri

Karbon nanotüpler	50 mg/L		100 mg/L	
	3. gün	5. gün	3. gün	5. gün
	%		%	
Kontrol*	53,3	80,0	53,3	80,0
SWCNT	50,0	53,3	46,6	46,6
MWCNT	66,6	90,0	46,6	75,0
CNNT	64,1	72,4	30,8	85,2

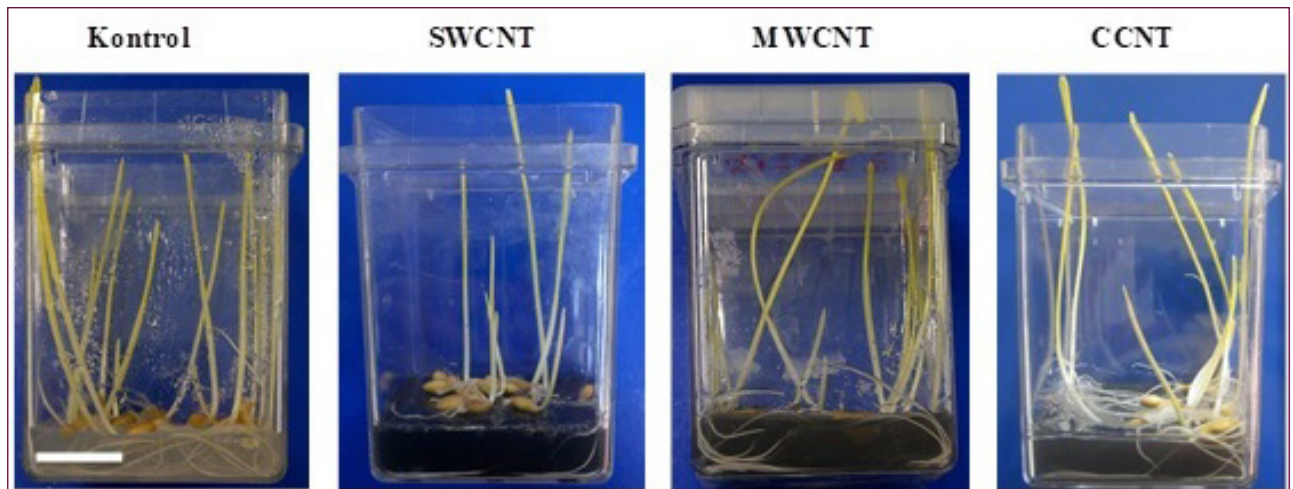
*Kontrol grubu, karbon nanotüp içermeyen ortamda çimlenmeye alınmıştır

çimlenme üzerinde çok düşük de olsa negatif bir etkisi olduğu görülmüştür. Düşük derişimlerde (50 mg/L) kullanıldığında MWCNT'nin arpa çimlenmesi üzerinde olumlu etki gösterdiği ve çimlenmeyi görece arttırdığı görülmüştür (Tablo 1). Bununla birlikte, MWCNT'nin artan konsantrasyonlarının kontrol grubuyla karşılaştırıldığında çimlenmeyi azalttığı belirlenmiştir.

Tablo 2. Farklı karbon nanotüplerin, kök sayısı ve gövde uzunluğu üzerindeki etkisi

	Kök sayısı*		Gövde uzunluğu*(mm)	
	3. gün	5. gün	3. gün	5. gün
Kontrol	4,94±0,95 ^a	5,08±0,19 ^a	29,1±4,29 ^a	82,9±4,64 ^b
50 mg/L SWCNT	5,14±0,21 ^a	5,50±0,37 ^a	33,0±4,31 ^a	99,3±7,97 ^a
100 mg/L SWCNT	5,14±0,27 ^a	5,18±0,46 ^a	26,2±3,47 ^a	73,0±11,9 ^{bc}
Kontrol	4,94±0,95 ^a	5,08±0,19 ^a	29,1±4,29 ^a	82,9±4,64 ^a
50 mg/L MWCNT	5,53±0,31 ^a	5,42±0,25 ^a	23,3±0,88 ^a	85,2±4,85 ^a
100 mg/L MWCNT	4,71±0,38 ^a	5,20±0,25 ^a	10,9±2,75 ^b	83,2±4,33 ^a
Kontrol	4,95±0,26 ^a	4,33±0,24 ^a	21,5±3,40 ^b	71,1±7,24 ^a
50 mg/L CNNT	5,13±0,18 ^a	4,78±0,24 ^a	33,0±3,36 ^a	76,3±8,50 ^a
100 mg/L CNNT	5,00±0,25 ^a	4,84±0,17 ^a	24,3±3,14 ^b	81,8±6,80 ^a

Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler (a, b, c) LSD testine göre kontrol grubu ve nanotüp uygulamaları arasında belirgin bir fark ($p \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir



Şekil 3. Kontrol grubu ve 100 mg/L konsantrasyonda farklı nanotüpler içeren ortamlarda arpa bitkisinin 5.gün sonundaki çimlenmesi (bar: 2,22 cm)

CCNT düşük konsantrasyonda kullanıldığında, 3.günde çimlenmeyi hızlandırmışken, 5. günün sonunda bu oran kontrol grubunu geçememiştir. CCNT'nin yüksek konsantrasyonda kullanıldığında çimlenme üzerinde 3. gün hızlı bir düşüşe neden olurken, 5. günün sonunda bu oran diğer nanotüpler ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında en yüksek seviyeye ulaşmıştır (Tablo 1).

Çimlenme oranları farklı olsa da, diğer çimlenme verileri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında denemeler arasında istatistiksel olarak çok büyük farklılıklar gözlenmemiştir (Tablo 2, Şekil 3). Farklı konsantrasyonlarda SWCNT uygulandığında kök sayısında belirgin bir değişiklik meydana gelmezken, gövde uzunluğu çimlenmenin beşinci gününde 50 mg/L SWCNT varlığında kontrol grubuna görece artmıştır. Ancak SWCNT'nin artan konsantrasyonlarının kontrol grubundan görece daha kısa gövdeler oluşturduğu belirlenmiştir (Tablo 2). MWCNT'nin etkisi incelendiğinde, yine kök sayılarında bir değişiklik gözlenmezken, sadece gövde uzunluğu 100 mg/L MWCNT varlığında çimlenmenin 3.günü biraz düşmüş gibi görünse de, son verinin alındığı 5. günde bu oran istatistiksel olarak kontrol ile aynı uzunluğa ulaşmıştır. Son olarak, karboksillenmiş karbon nanotüp varlığında (CNNT), yine kök sayısında belirgin bir fark görünmezken, 50 mg/L CNNT varlığında çimlenmenin 3. günü biraz daha uzamış gövdeler elde edilse de bu oran yine 5. gün sonunda kontrol ile aynı seviyede kalmıştır (Tablo 3). Elde edilen bu veriler, kullanılan karbon nanotüplerin denenen konsantrasyonlarında arpa çimlenmesi üzerinde herhangi bir toksik etkisi olmadığını göstermektedir.

TARTIŞMA

Nanoteknoloji alanındaki son gelişmeler, tıptan uzaya, elektronik biliminden savunma sanayiine, birçok farklı alandaki uygulamaları ile bilim ve teknolojik platformlarda ilerleme sağlamıştır (22, 23). Son zamanlarda, tasarlanan nanomateryaller ile çeşitli biyolojik sistemler arasındaki etkileşimin anlaşılmasına duyulan ihtiyaç, tarım ve gıda alanlarında nanoteknoloji temelli yaklaşımların kullanımını için önemli bir araştırma alanı geliştirmiştir. Nano boyuttaki materyallerin, küçük hacimleri, yüksek biyokimyasal reaktiviteleri, hücrelere girebilme özellikleri ve organizma içinde hızlı dağılabilmeleri gibi özellikleri, bitkisel ürün üretim teknikleri açısından ilgi çekici bir araç haline getirmektedir (23). Bu bağlamda, nanopartiküllerin biyolojik moleküllerin bitki hücrelerine aktarımında ya da hastalıkların önlenmesinde herbisit uygulamalarında yararlı bulunabileceği gösterilmiştir (16). Tüm bu özelliklerine rağmen, ilgili materyallerin çevreye salınma riskinin bu yararlılardan daha ziyade zarar getireceği endişesi günden güne artmaktadır (10).

Bu nedenle ilgili çalışma kapsamında, artan nanomateryal kullanımına karşı karbon nanotüplerin (SWCNT, MWCNT ve CCNT) arpa çimlenmesi üzerinde olası etkileri araştırılmıştır. Çalışma kapsamında değerlendirilen karbon nanotüplerin fizikokimyasal özelliklerinin, bu yapıların buldukları ortamdaki hareketlerini etkilediği, ortam koşullarına verdikleri cevabı değiştirdiği yapılan çalışmalar ile gözlenmiştir (24). Literatürde karbon

nanotüplerin farklı fonksiyonel kimyasal gruplar ile (karboksilasyon, oksidasyon, amidasyon, polietilen glikol ile modifikasyon, fenil-SO₃H, fenil-(COOH)₂ grupları ile modifikasyon vb.) modifikasyonu bildirilmiştir. Bu eklenen fonksiyonel gruplar karbon nanotüplerin kimyasal özelliklerini değiştirmiş ve çoğu durumda suda çözünürlüklerini arttırmıştır. Karboksillenme modifikasyonu da karbon nanotüplerin suda çözünürlüğünü arttırmanın yanı sıra, farklı moleküller ile birleşmesini kolaylaştırabilmektedir (25). Memeli hücreleri ile yapılan çalışmalarda karboksillenmenin karbon nanotüplerin sitotoksitesini azalttığı, *in vivo* çalışmalar için daha güvenilir hale getirdiği gözlenmiştir (25).

Bununla birlikte, literatürde yapılan çalışmalarda karbon nanomateryallerin tipi, konsantrasyonu, bitki türü ve büyüme koşullarına bağlı olarak hem negatif hem de pozitif yönleri olduğu gösterilmiştir. *Lolium perenne* bitkisine 2000 mg/L MWCNT uygulandığında, yaklaşık %17 oranında kök uzunluğunda artış görülmüştür (26). Buğdayda, suda çözünür karbon nano-dotların (150 mg/L) 10 gün boyunca uygulanması kök büyümesini arttırmıştır (27). Suda çözünür nano-onionların, 10, 20 ve 30 mg/L konsantrasyonlarda nohut bitkisine uygulanması büyümeyi arttırmıştır (28). Tütün hücre kültürlerine karbon-nano hornların 25, 50 ve 100 mg/mL uygulanması, hücrelerin büyümesini %78 oranında arttırmıştır (29). MWCNT'lerin 50, 100 ve 200 mg/L oranında 10-11 gün boyunca arpa, soya fasülyesi ve mısır bitkisindeki etkileri incelendiğinde; arpa ve soyada %50 oranında, mısırdaki ise %90 oranında çimlenme artışı gerçekleşmiştir (9). Arpa bitkisinde elde edilen bu oran, ilgili nanotüpün jelimsi ortam da değil de hava püskürtücü (airbrush) ile uygulanmasından kaynaklanabilir. Bu durumda, ilgili nanotüplerin doğrudan tohum kabuğuna yapıştıkları ve çimlenme üzerinde daha etkin rol oynadıkları düşünülmektedir. Kullanılan yöntemin farklılığın yanı sıra, farklı uygulamalar farklı bitki türleri ve hatta aynı türe ait çeşitlerde de farklılıklar gösterebilmektedir. Karbon nanomateryallerinin bitkiler üzerindeki bu olumlu etkilerinin yanı sıra, aynı zamanda negatif etkilerinin olduğu da kanıtlanmıştır. Giriş kısmında da belirtildiği üzere, 15 gün boyunca 1000 mg/L MWCNT uygulanan kabak bitkilerinin biyokütlesinde %60 oranında azalma meydana gelmiştir (18). Graphen oksit uygulaması (1600 mg/L), *Vicia faba* bitkisinde büyümenin azalması ve antioksidan enzim aktivitesinin düşmesiyle sonuçlanmıştır (30). Tüm bu olumlu ya da olumsuz etkilerinin yanı sıra, çalışmamızda kullanılan karbon nanotüplerin arpa çimlenmesi üzerinde değerlendirilen veriler açısından olumsuz bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır.

SONUÇ

Karbon nanomateryaller, benzersiz optik, elektriksel, mekanik ve termal özellikleri nedeniyle her geçen gün biyoloji ve tıp alanında daha fazla kullanılmaktadır. Bu nedenle, bu materyallerin insan sağlığı ve doğaya etkileri üzerinde ayrıntılı çalışmaların yapılması ve olası toksik etkilerine karşın önlem alınması gerekmektedir. Karbon nanomateryallerin etkileri farklı bitki türleri, çeşitleri ve ilgili nanomateryallerin uygulanmasına bağlı olarak değişmektedir. Bu çalışmada

elde edilen sonuçlar, farklı karbon nanotüplerin ülkemize ait 'Zeynelağa' arpa çeşidinin çimlenmesi üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Elde edilen bu verilere ek olarak, çimlenme üzerinde belirgin bir farklılık olmasa da ilgili materyallerde gen ekspresyonu düzeyinde bir farklılık olup olmadığını araştırılması, bu materyallerin gerçek etkisinin anlaşılması açısından önemlidir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışmada, etik komite iznine gerek duyulacak bir materyal ya da deney hayvanı kullanılmamıştır.

Hasta Onamı: Uygulanabilir değil.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - A.J.H., M.Ç.; Denetleme - A.J.H., M.Ç., H.A.; Gereçler - A.J.H.; M.Ç.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - H.A., M.S., Ş.K.; Analiz ve/veya Yorum - H.A., M.S., Ş.K.; Literatür Taraması - H.A.; Yazan - H.A., Eleştirel İnceleme - A.J.H., M.Ç.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval is not required because of no material or experimental animal that would require permission.

Informed Consent: N/A.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - A.J.H., M.Ç.; Supervision - A.J.H., M.Ç., H.A.; Materials - A.J.H., M.Ç.; Data Collection and/or Processing - H.A., M.S., Ş.K.; Analysis and/or Interpretation - H.A., M.S., Ş.K.; Literature Search - H.A.; Writing - H.A.; Critical Reviews - A.J.H., M.Ç.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR

- Kohli P, Martin CR. Smart nanotubes for biotechnology. *Curr Pharm Biotechnol* 2005; 6: 35-47. [CrossRef]
- Martin CR, Mitchell DT. Nanomaterials in analytical chemistry. *Anal Chem* 1998; 70: 322-7. [CrossRef]
- Martin CR. Nanomaterials - A membrane-based synthetic approach. *Science* 1994; 266: 1961-6. [CrossRef]
- Murthy N, Thng YX, Schuck S, Xu MC, Frechet JMJ. A novel strategy for encapsulation and release of proteins: hydrogels and microgels with acid-labile acetal cross-linkers. *J Am Chem Soc* 2002; 124: 12398-9. [CrossRef]
- Kim SJ, Lewis B, Steiner MS, Bissa UV, Dose C, Frank JA. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for direct labeling of stem cells and in vivo MRI tracking. *Contrast Media Mol Imaging* 2016; 11: 55-64. [CrossRef]
- Cruz-Acuña M, Halman JR, Afonin KA, Dobson J, Rinaldi C. Magnetic nanoparticles loaded with functional RNA nanoparticles. *Nanoscale* 2018; 10: 17761-70. [CrossRef]
- Lee SB, Mitchell DT, Trofin L, Nevanen TK, Söderlund H, Martin CR. Antibody-based bio/nanotube membranes for enantiomeric drug separations. *Science* 2002; 296: 2198-200. [CrossRef]
- Martinelli V, Cellot G, Toma FM, Long CS, Caldwell JH, Zentilin L, et al. Carbon nanotubes promote growth and spontaneous electrical activity in cultured cardiac myocytes. *Nano Lett* 2012; 12: 1831-8. [CrossRef]
- Lahiani MH, Dervishi E, Chen J, Nima Z, Gaume A, Biris AS, et al. Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013; 5: 7965-7973. [CrossRef]
- Mukherjee A, Majumdar S, Servin AD, Pagano L, Dhankher OP, White JC. Carbon Nanomaterials in Agriculture: A Critical Review. *Front Plant Sci* 2016; 7: 172. [CrossRef]
- Wang X, Liu Z. Carbon nanotubes in biology and medicine: An overview. *Chinese Sci Bull* 2012; 57: 167-80. [CrossRef]
- Daniel S, Rao T, Rao K, Rani SU, Naidu GRK, Lee HY, et al. A review of DNA functionalized/grafted carbon nanotubes and their characterization. *Sensor Actuat B-Chem* 2007; 122: 672-82. [CrossRef]
- Welscher K, Liu Z, Daranciang D, Dai H. Selective probing and imaging of cells with single walled carbon nanotubes as near-infrared fluorescent molecules. *Nano Lett* 2008; 8: 586-590. [CrossRef]
- Veetil JV, Ye K. Tailored carbon nanotubes for tissue engineering applications. *Biotechnol Prog* 2009; 25: 709-21. [CrossRef]
- De La Torre-Roche R, Hawthorne J, Deng Y, Xing B, Cai W, Newman LA, et al. Multiwalled carbon nanotubes and C60 fullerenes differentially impact the accumulation of weathered pesticides in four Agricultural plants. *Environ Sci Technol* 2013; 47: 12539-47. [CrossRef]
- Serag MF, Kaji N, Gaillard C, Okamoto Y, Terasaka K, Jabasini M, et al. Trafficking and subcellular localization of multiwalled carbon nanotubes in plant cells. *ACS Nano* 2011; 5: 493-9. [CrossRef]
- Pandey K, Lahiani MH, Hicks VK, Hudson MK, Green MJ, Khodakovskaya M. Effects of carbon-based nanomaterials on seed germination, biomass accumulation and salt stress response of bioenergy crops. *PLoS One* 2018; 13: doi: 10.1371/journal.pone.0202274. [CrossRef]
- Stampoulis D, Sinha SK, White JC. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environ Sci Technol* 2009; 43: 9473-9. [CrossRef]
- Hao Y, Ma C, Zhang Z, Song Y, Weidong Cao W, Jing Guo J et al. Carbon nanomaterials alter plant physiology and soil bacterial community composition in a rice-soil-bacterial ecosystem. *Environ Pollut* 2018; 232: 123-36. [CrossRef]
- Marascuilo LA, McSweeney M. Post-Hoc Multiple Comparisons in sample preparations for test of homogeneity. In: McSweeney M, Marascuilo L A (Eds) *Non-Parametric and Distribution Free Methods the Social Science*, Books/Cole Publication, Belmont CA, 1977. p. 141-7.
- Liu P, Wang X, Li H. Preparation of carboxylated carbon nanotubes/polypyrrole composite hollow microspheres via chemical oxidative interfacial polymerization and their electrochemical performance. *Synthetic Metals* 2013; 181: 72-8. [CrossRef]
- Liu HK, Wang GX, Guo Z, Wang J, Konstantinov K. Nanomaterials for lithium-ion rechargeable batteries. *J Nanosci Nanotechnol* 2006; 6: 1-15. [CrossRef]

23. Khodakovskaya MV, de Silva K, Biris AS, Dervishi E, Villagarcia H. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano* 2012, 6: 2128-35. [\[CrossRef\]](#)
24. Wu Z, Mitra S. Fractionation of carboxylated carbon nanotubes and the corresponding variation in their colloidal behaviour. *Environ Sci Process Impacts* 2014; 16: 2295-300. [\[CrossRef\]](#)
25. Liu Z, Liu Y, Peng D. Carboxylation of multiwalled carbon nanotube attenuated the cytotoxicity by limiting the oxidative stress initiated cell membrane integrity damage, cell cycle arrestment, and death receptor mediated apoptotic pathway. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103: 2770-7. [\[CrossRef\]](#)
26. Lin D, Xing B. Phytotoxicity of nano particles: inhibition of seed germination and root growth. *Environ Pollut* 2007; 150: 243-50. [\[CrossRef\]](#)
27. Tripathi S, Sarkar S. 2014. Influence of water soluble carbon dots on the growth of wheat plant. *Appl Nanosci* 2015; 5: 609-16. [\[CrossRef\]](#)
28. Sonkar SK, Roy M, Babar DG, Sarkar S. Water soluble carbon nano-onions from wood wool as growth promoters for gram plants. *Nanoscale* 2012, 4: 7670-5. [\[CrossRef\]](#)
29. Lahiani MH, Chen J, Irin F, Poretzky AA, Green MJ, Khodakovskaya MV. Interaction of carbon nano horns with plants: uptake and biological effects. *Carbon* 2015; 81: 607-19. [\[CrossRef\]](#)
30. Anjum NA, Singh N, Singh MK, Sayeed I, Duarte AC, Pereira E, et al. Single-bilayer graphene oxide sheet impacts and underlying potential mechanism assessment in germinating faba bean (*Vicia faba* L.). *Sci Total Environ* 2014; 472: 834-41. [\[CrossRef\]](#)