

Araştırma Makalesi

Bakır Oksit Nanopartiküllerinin *Chlorella vulgaris* Üzerindeki Ekotoksik Etkileri

Merve Özkaleli^a, Ayça Erdem^{a}*

^a *Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Antalya*

Öz

Bu çalışmada bakır oksit (CuO) nanopartiküllerinin yeşil alg türü olan *Chlorella vulgaris* üzerindeki ekotoksik etkileri incelenmiştir. CuO nanopartikülleri farklı dispersiyon metodları (karıştırma ve problu sonikasyon) ile farklı konsantrasyonlarda (1, 10, 50, 100 mg/L), farklı su kalite özelliklerine sahip (çok yumuşak - çok sert, düşük - yüksek alkalinite, pH 6,5 - 7,5) sentetik yüzeysel su örnekleri içinde hazırlanmıştır. Etki analizleri kapsamında alg inhibisyonu ve klorofil a içeriğindeki değişim incelenmiştir. Çalışma sonunda konsantrasyondan ve su içeriğinden bağımsız olarak CuO nanopartiküllerinin *C. vulgaris* üzerinde yüksek inhibisyona (%95 - 99) neden olduğu, özellikle sonikasyon yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerin karıştırma yöntemine göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: CuO nanopartikülü, *Chlorella vulgaris*, sentetik yüzeysel su, inhibisyon, klorofil a.

Ecotoxic Effects of Copper Oxide Nanoparticles on *Chlorella vulgaris*

Abstract

In this study, the ecotoxic effects of copper oxide (CuO) nanoparticles on green algae *Chlorella vulgaris* were investigated. CuO nanoparticles were prepared in different dispersion methods (mixing and probe sonication) with different concentrations (1, 10, 50, 100 mg/L), and in synthetic surface water samples with different water qualities (very soft - very hard, low - high alkalinity, pH 6.5 - 7.5). Algal inhibition and chlorophyll a values were analyzed within the effect analysis. The results showed that regardless of concentration and the water constituent, CuO nanoparticles caused high inhibition (95- 99%) on *C. vulgaris*, and especially nanoparticles prepared with sonication method were more effective than those of in mixing method.

Keywords: CuO nanoparticle, *Chlorella vulgaris*, synthetic surface water, inhibition, chlorophyll a.

Giriş

Teknoloji ve malzeme özelliklerinin birleştirilmesiyle ortaya çıkan ve çok hızlı

gelişme gösteren nanoteknoloji ve ürünü olan nanopartiküller (NPler) kullanıma olanak sunduğu ürünleriyle ve umut vaat

* Corresponding author:
e-mail: ayerdem@akdeniz.edu.tr

Received: 03.10.2016

Accepted: 10.02.2017

eden uygulamaları ile geniş bir uygulama alanı bulmuştur. NPLerin şekil, boyut, işlevsel yapı, kendilerine özgü fiziksel ve kimyasal özellikleri bu gelişime büyük katkıda bulunmuştur. NPLer ve özellikle metal oksitlerden üretilen NPLer, kimyasal kompozisyon ve davranış açısından oldukça farklı özellikler (yüzeysel yük, reaktivite, optik karakteristik, yüzey morfolojisi, kristal yapı, hidrofilik/hidrofobik olma durumu, yüzey kimyası) taşıyan çeşitli ve çok sayıda parçacıktan oluşmaktadır [1]. Bu özellikleri sayesinde yüksek aktiviteli katalizörler, süperiletkenler, yüzey aktif maddeler, ilaç taşıyıcılar, biyosidal ürünler gibi birçok teknolojik ve farmakolojik ürünlerin hazırlanmasında yer alan teknolojik parçacıklardır. Fiziksel ve kimyasal davranışlarına bağlı olarak şekil, yüzey alanı, partikül yükü ve kristal dizilişleri modifiye edilebilmekte [2] ve hemen her alanda yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Nanoteknolojik ürünlerin yaygın olarak üretilmesi ve beraberinde kullanılması NP üretimini de hızlandırmıştır. NPLerin yüksek miktarlarda ve çoğu zaman kontrolsüz bir şekilde kullanımı, bu malzemelerden kaynaklanabilecek olası olumsuz etkilerin

Bu çalışmada; farklı dispersiyon (karıştırma ve problu sonikasyon) yöntemleri kullanılarak farklı su kalite özelliklerine sahip (çok yumuşak, yumuşak, orta sert, sert, çok sert, düşük - yüksek alkalinite, pH 6,5-8,5) sahip sentetik yüzeysel su örneklerinde hazırlanmış CuO NPLerinin, yüzeysel su kaynaklarında birincil tüketici olan *Chlorella vulgaris* yeşil alg türü üzerindeki ekotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda farklı NP konsantrasyonlarında (0, 1, 10, 50 ve 100 mg/L) hazırlanmış solüsyonlarının alg türüne olan etkisi alg inhibisyonu ve klorofil a miktarlarının tespit edilmesi ile belirlenmeye çalışılmıştır.

de araştırılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Üretiminden tüketimine tüm ana ve ara proseslerden çevreye yayılan atıklarının artışları da benzer paralellik göstermektedir. Dağılım ortamı olarak sucul ortamlarda etkilerinin var olduğu bilinmekle beraber henüz tam olarak yeterli bilgi düzeyine ulaşılamamıştır. NPLer içinde buldukları ortamın şartlarına bağlı olarak (pH, iyonik güç, zeta potansiyeli vb.) yığın oluşturma eğiliminde bulunmaktadır. Örneğin pH ve iyonik gücü yüksek olan solüsyonlar içerisinde NPLer daha fazla yığın oluşturma eğiliminde olmaktadır [3].

Bakır oksit (CuO) NPLer yarı iletken olup, mono klinik bir yapıya sahiptir [4]. Kristal yapısında boşluklu ve dar yapılar mevcuttur [5]. Yüksek iletkenliklerinden ötürü; gaz sensörleri, katalizör, manyetik faz geçişlerinde ara madde, süper iletkenler ve seramik pigmentlerinde kullanılmaktadır [6, 7]. Ayrıca son zamanlarda koku yapmayan çoraplar başta olmak üzere antimikrobiyal tekstil adı altında, hastane ekipmanları, ahşap koruma ve çürümeyi önleyici boya malzemelerinde katkı maddesi olarak yaygın kullanımları mevcuttur [8].

Materyal ve Metot

Nanopartikül Çözeltilerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Ticari olarak satın alınan CuO NP (Alfa Easer) son konsantrasyonu 0, 1, 10, 50 ve 100 mg/L olacak şekilde ayarlanmıştır. içeriği Tablo 1'de verilen sentetik yüzeysel su (SYS) örnekleri kullanılarak hazırlanmıştır. NP solüsyonları için daha önce 121°C'de 20 dakika süreyle otoklavlanarak steril hale getirilen SYS örnekleri kullanılmıştır. Sterilizasyon işleminden sonra karıştırma (150 rpm, 15 dak) ve problu sonikasyon (15 dak, 100 W) uygulandıktan sonra etki analizleri başlatılmıştır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan sentetik yüzeysel su örneklerinin içeriği [9].

Su Türleri	Safsuya Eklenecek Kimyasal Miktarı (mg/L)				Elde Edilecek Nihai Su Kalitesi		
	NaHCO ₃	CaSO ₄ .H ₂ O	MgSO ₄	KCl	pH	Sertlik*	Alkalinite*
Çok yumuşak	12,0	7,5	7,5	0,5	6,4-6,8	10-13	10-13
Yumuşak	48,0	30,0	30,0	2,0	7,2-7,6	40-48	30-35
Orta sert	96,0	60,0	60,0	4,0	7,4-7,8	80-100	57-64
Sert	192,0	120,0	120,0	8,0	7,6-7,8	160-180	110-120
Çok sert	384,0	240,0	240,0	16,0	8,0-8,4	280-320	225-245

* mg CaCO₃/L

NPlerin fiziksel özelliklerinde; özellikle boyut, boyut dağılımı ve agregasyon durumunda meydana gelebilecek değişiklikler, dinamik ışık saçılımı (DLS) (DynaproNanostar, Wyatt) ve taramalı elektron mikroskopu- enerji dağılım x-ışını spektroskopisi (SEM-EDS) uygulanarak boyut ve kimyasal kompozisyonu tespit edilmiştir. Farklı NP konsantrasyonlarını içeren SYS çözeltilerinden alınan 2 mL örnek, önce 0,45 µm (Whatman) filtre kâğıdından geçirilmiş ve ölçümler yapılmıştır. NPlerin kimyasal özelliklerinde meydana gelen değişiklikler zeta potansiyel (NanoZ90, Malvern) ölçümü ile tespit edilmiştir. Farklı NP konsantrasyonlarını içeren SYS çözeltilerinden alınan 2 mL örneklerin ölçümleri 633 nm dalga boyunda yapılmıştır. Zeta potansiyel ve partikül boyut ölçümleri üç tekrarlı olacak şekilde tamamlanmıştır.

Alg Kültürünün Üretimi

Chlorella vulgaris kültürleri Göttingen Üniversitesi Alg Kültür Koleksiyonundan (SAG 211-11b) temin edilmiş olup, Bristol besiyeri (NaNO₃; 10ml/L, CaCl₂.2H₂O; 10 ml/L, MgSO₄.7H₂O; 10ml/L, K₂HPO₄; 10 ml/L, KH₂PO₄; 10 ml/L, NaCl; 10 ml/L) içerisinde OECD [10]'de verilen yonteme göre hazırlanmıştır. Yaklaşık 10⁴ alg/mL boyanıp 10 dk karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Süre sonunda örnekler

içeren stok kültürden alınan algler, 500 mL'lik erlen içerisinde son hacimleri 100 mL olacak şekilde ayarlanıp sürekli ışık altında (ışık akısı: toplam 6000 lm, ışık rengi: 4300 K) ve 23±2 °C sıcaklıkta günde sürekli havalandırma yapılarak inkübe edilmiştir. Ortalama 4 gün sonunda istenilen popülasyon yoğunluğuna (10⁵ hücre/mL veya 0,5 mg/L kuru ağırlık) ulaşıldığında, alg inhibisyonu ve klorofil a içeriğini tespit etmek üzere etki analizlerine başlanmıştır.

Alg İnhibisyon Analizi

Alglerde meydana gelen inhibisyon canlı hücrelerin sayımına dayanılarak gerçekleştirilmiştir. Başlangıç popülasyonları 10⁵ alg/mL olan *C. vulgaris* alg kültürleri içerikleri ve diğer özellikleri Tablo 1'de verilen değerlere göre ayarlanmış SYS-NP çözeltilerine eklenmiş ve Alg İnhibisyon Testi OECD [10]'de önerildiği şekilde 72 saat süre ile uygulanmıştır. Test ortamı olarak hacmi 100 mL olan steril plastik kaplar kullanılmıştır. NP-SYS çözeltisinden 45 mL, alg kültüründen 5 mL alınarak toplam hacim 50 mL olacak şekilde test düzeneği hazırlanmıştır. Ölü/canlı alg hücrelerinin tespiti için her bir test kabından 24, 48 ve 72 saat süre sonlarında alınan 1 mL Alg-NP örneği, 0.1mL tripan mavisi boyar madde ile hemositometre (Neubauer) kullanılarak ışık mikroskopu altında sayılmıştır. Sayımlar

her bir örnek için üç defa tekrar edilerek, ortalama değerler elde edilmiş ve spesifik ölüm oranları (k') (duyarlılık sabiti) (1) yardımıyla hesaplanmıştır [11, 12].

$$k' = \frac{-\ln(N/N_0)}{C} \quad (1)$$

Burada; N_0 : başlangıç alg popülasyonu (# alg/mL), N : alg popülasyonu (# alg/mL), C : nanopartikül konsantrasyonu (mg/L) olarak tanımlanmaktadır.

Klorofil a

Klorofil a içeriğinin belirlendiği analiz kapsamında; USEPA [13]'de verilen spektrofotometrik klorofil ölçüm metodu uygulanmıştır. Etki analizleri kapsamında dispersiyon yöntemleri uygulanarak hazırlanmış CuO NP ve alg örnekleri 24, 48 ve 72 saat süreyle farklı SYS içinde inkübe edildikten sonra 0,45 µm gözenek çaplı nitroselüloz fiber filtre kâğıdından süzümüştür. Filtre kâğıdı santrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve üzerine 5 mL %90'lık aseton eklenmiştir. Filtre kâğıdı çözünene kadar vortekslenmiş ve sonra 4°C'de 24 saat süreyle buzdolabında, karanlık ortamda bekletilmiştir.

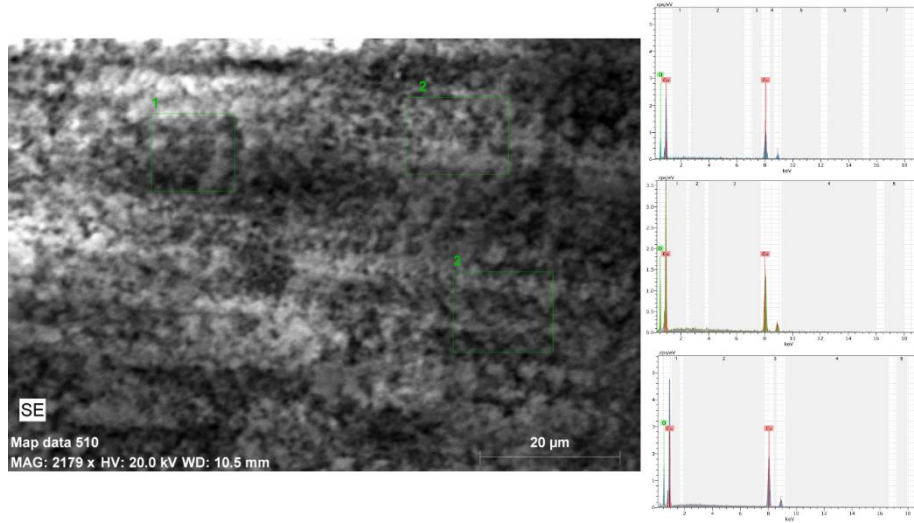
$$\text{Klorofil a } (\mu\text{g/L}) = \frac{11,85 \times (\text{Abs}_{664}) - 1,54 \times (\text{Abs}_{647}) + 0,08 \times (\text{Abs}_{630}) \times V_{\text{aseton}}}{V_{\text{örnek}}} \quad (2)$$

Örnekler karıştırıldıktan sonra 20 dakika süreyle 1000 rpm'de santrifüjlenmiştir. İşlem sonunda elde edilen üst sıvının 750, 664, 647 ve 630 nm'de absorbans okumaları gerçekleştirilmiş ve eşitlik (2) yardımıyla örneklerin klorofil içeriği µg/L olarak tespit edilmiştir.

Sonuçlar

Nanopartikül Karakterizasyonu

NP solüsyonlarına farklı dispersiyon metotları uygulanarak etki analizlerine başlanmıştır. CuO NP boyut aralığı üretici firma (Alfa Aesar) tarafından 30 - 50 nm olarak verilmiş ve kuru örneklerle gerçekleştirilen SEM-EDS görüntüleme çalışması sonunda NP boyutunun ortalama 30 nm civarında olduğu tespit edilmiştir (Görüntüleme çalışması esnasında en yüksek 2179× büyütme (20 µm ölçek, 20 kV yüksek vakum) ulaşılabilmektedir. Ayrıca kimyasal kompozisyon analiz ile CuO NP'nin yaklaşık %68±1,5 Cu ve %29±1,2 O'den oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. CuO nanopartiküllerinin SEM görüntüleme sonucu

Tablo 2'de farklı SYS örnekleri içinde farklı dispersiyon yöntemleri ile hazırlanmış CuO NPLerinin boyut analiz sonuçları verilmiştir. DLS uygulamasında 50 mg/L NP konsantrasyonu kullanılmıştır. DLS ölçümü yapılan cihazın ölçüm hassasiyeti göz önünde bulundurularak düşük konsantrasyon tercih edilmiştir. Ayrıca örnekler içinde meydana gelen büyük boyutlardaki agregasyonu en aza indirmek ve nano boyuttaki partikül boyutunu tespit edebilmek amacıyla ölçüm öncesi örnekler 0,45 µm gözenek çaplı filtre kağıdından filtre edilmiştir. Buna göre en

küçük NP boyutu yumuşak SYS içeriğinde sonikasyon dispersiyon yöntemiyle hazırlanmış örneklerde 50 ± 24 nm olarak ölçülürken, en yüksek NP boyutu çok sert SYS içeriğinde karıştırma yöntemiyle hazırlanmış örneklerde 1206 ± 188 nm olarak tespit edilmiştir.

Söz konusu ölçüm sonucunun SEM ile belirlenen NP boyutundan yaklaşık 2 - 40× kat daha büyük olduğu görülmüştür. Dispersiyon yönteminden bağımsız olarak NPLerin SYS örnekleri içinde hızla agregasyona uğradıkları görülmüştür.

Tablo 2. CuO nanopartiküllerinin boyut analiz sonuçları

Ölçüm Şekli ve Su İçeriği	Nanopartikül Boyutu (nm)	
	Karıştırma Yöntemi	Sonikasyon Yöntemi
DLS, Yumuşak SYS	69 ± 13	50 ± 24
DLS, Orta Sert SYS	481 ± 62	269 ± 10
DLS, Çok Sert SYS	1206 ± 188	730 ± 57

CuO NPLerinin zeta potansiyel değerleri Tablo 3'te verilmiştir. Ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde genel olarak NPLerin yüzey yüklerinin negatif aralıkta olduğu görülmektedir. Buna göre karıştırma yöntemiyle hazırlanmış çok sert SYS içeriğine sahip örneklerdeki NPLerin hızlı agregasyona uğradıkları, yumuşak

SYS içeriğinde bulunan NPLerin ise nispeten başlangıç kararsızlığında oldukları tespit edilmiştir. İyonik gücün ve zeta potansiyelinin NPLerin kümelenmesinde büyük öneme sahip olduğu bilinmektedir [14].

Tablo 3. CuO nanopartiküllerinin farklı su içeriğine sahip örneklerde ölçülen zeta potansiyel (mV) değerleri

Su İçeriği	Nanopartikül Konsantrasyonu (mg/L)	Zeta Potansiyel (mV)			
		Karıştırma Yöntemi		Sonikasyon Yöntemi	
		0	72 s	0	72 s
Yumuşak pH=6,5	10	-17,9	-10,8	-16,0	-13,6
	50	-20,8	-18,3	-11,6	-13,4
Orta Sert pH=7,5	10	-14,6	-15,4	-16,2	-13,5
	50	-17,3	-17,4	-15,4	-15,4
Çok Sert pH=8,2	10	-5,14	-14,1	-10,2	-12,8
	50	-6,79	-8,25	-11,7	-14,1

CuO NPlerinin düşük pH değerlerinde zeta potansiyelinin artan H⁺ iyonları sebebiyle pozitif, alkali özellikteki sularda ise negatif olması beklenmektedir [15]. Elde edilen zeta potansiyeli ve boyut dağılım sonuçları birlikte değerlendirildiğinde çok sert SYS örneğine ait başlangıç pH değerinin alkali olduğu görülmektedir. Ancak pH değerinin 6,5

Alg İnhibisyonu

Farklı su içeriğine sahip su örnekleri içinde karıştırma ve sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış CuO NPlerinin *C. vulgaris* alg türü üzerindeki inhibisyon sonuçları Şekil 2'de verilmiştir. Alglerde meydana gelen inhibisyon değeri, deney süresi sonunda kalan canlı organizma sayısının kontrol organizma sayısına oranı (N/No) olarak hesaplanmıştır. Karıştırma yöntemi ile hazırlanan örnekler için sonuçlar incelendiğinde 24 saatlik deney sonunda yumuşak SYS içeriğine sahip deney düzeneklerinde NP konsantrasyon artışına bağlı olarak NP konsantrasyonundaki artışın alg inhibisyonu ile doğru orantılı olduğu görülmüştür. Buna göre en yüksek inhibisyon değeri 100 mg/L NP konsantrasyonunda çok yumuşak SYS örneğinde 0,24 ve 50 mg/L NP

olduğu yumuşak SYS içeriğine sahip su örneği için negatif zeta potansiyelinin sistem içersinde bulunan alglerde meydana gelen toksisite mekanizmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte çalışma sonucunda ölçülen pH değerinin 72 saat sonunda 7,0-7,5 aralığında olduğu görülmüştür.

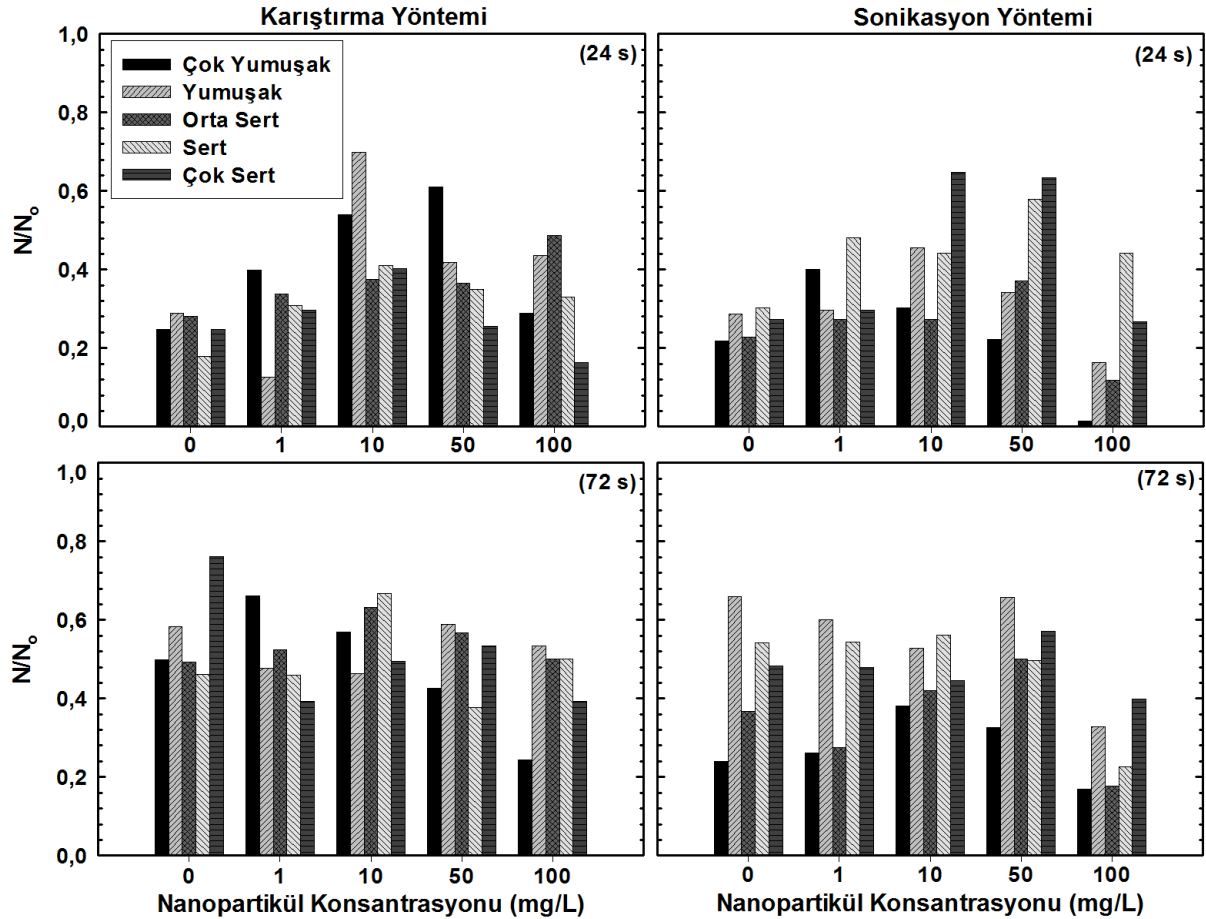
konsantrasyonunda sert SYS örneğinde ise 0,37 olarak hesaplanmıştır. Tüm inhibisyon sonuçları beraber ele alındığında çok yumuşak SYS içeriğine sahip örneklerin alg inhibisyonu üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür.

Probu sonikasyon yöntemi ile hazırlanmış CuO NPlerinin algler üzerindeki inhibisyon etkileri incelendiğinde ise 24 saatlik deney düzeneklerinde inhibisyon değerlerinin herhangi bir trend izlemediği görülmüştür. 72 saatlik deney sonunda ise SYS içeriğinden bağımsız olarak CuO NPlerinin daha yüksek alg inhibisyonuna neden olduğu görülmüştür. Buna göre en yüksek inhibisyon değeri 100 mg/L NP konsantrasyonunda çok yumuşak SYS örneğinde 0,17 ve orta sert SYS örneğinde 0,18 olarak hesaplanmıştır.

Literatürde yer alan diğer ekotoksosite çalışmaları incelendiğinde, canlı ve NP

türleri bakımından farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu çalışmalar arasında sıklıkla TiO₂ [16 - 23], ZnO [24, 25], CeO₂ [26, 27] ve NiO [28] NPLerinin kullanıldığı görülmüştür. Ancak bu çalışmanın konusu olan CuO NPLerinin *C. vulgaris* üzerindeki etkilerine yönelik herhangi bir çalışmaya

rastlanmamıştır. Bu sebepten elde edilen inhibisyon analizi sonuçları diğer metal oksit NPLeri ile gerçekleştirilen çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, mevcut çalışmanın bu alanda gerçekleştirilen çalışmalar arasında bir ilk olma niteliği taşıdığı görülmektedir.



Şekil 2. Sentetik yüzeysel su örnekleri içinde karıştırma ve problu sonikasyon dispersiyon yöntemleri ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi

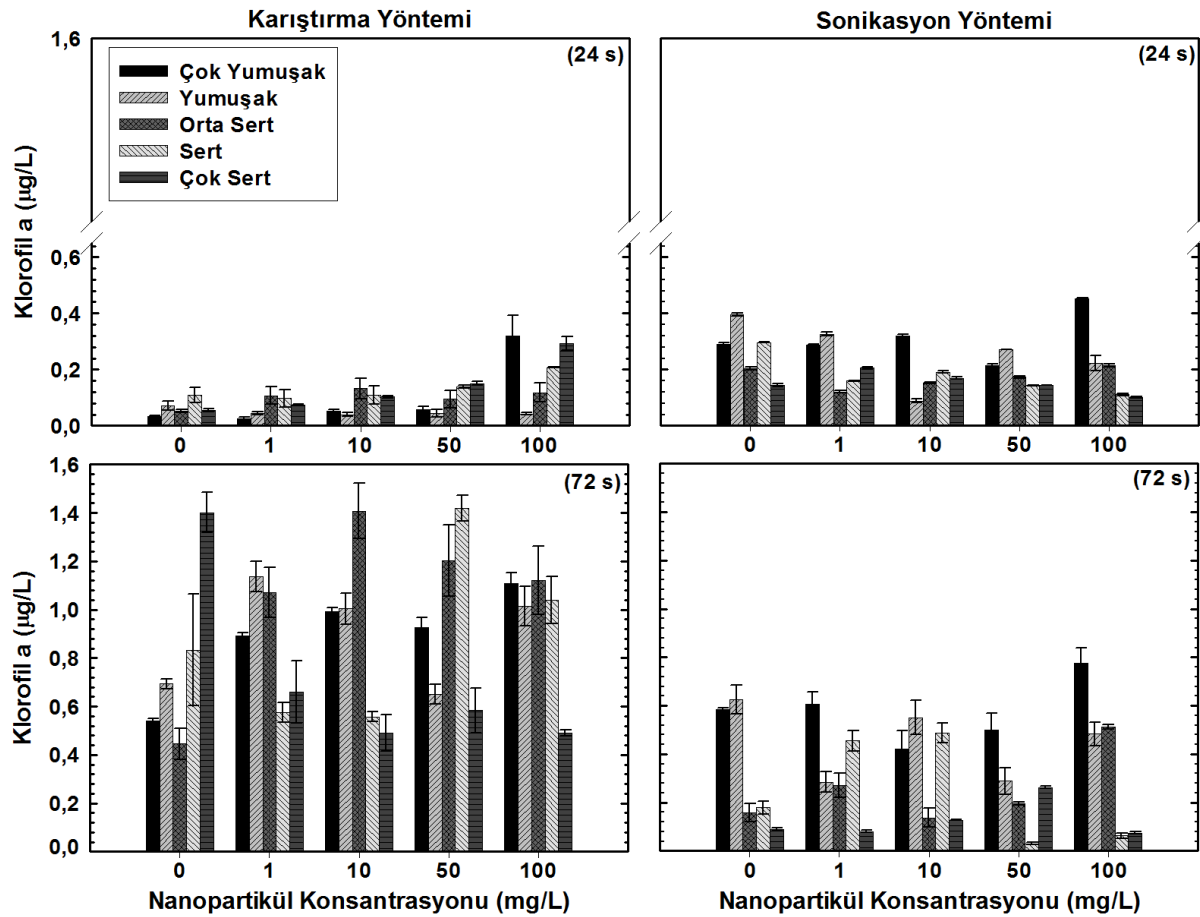
Klorofil a

Şekil 3'te farklı su içeriğine sahip su örnekleri içinde karıştırma ve sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış CuO NPLerinin klorofil a miktarı üzerindeki etkisi görülmektedir. Karıştırma yöntemi ile hazırlanmış deney düzeneklerinden alınan sonuçlar incelendiğinde klorofil a miktarlarının inhibisyon sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Benzer bir

trend *P. subcapitata* alg türü üzerinde TiO₂ NPLerinin etkilerinin izlendiği bir çalışmada da tespit edilmiştir [20]. Klorofil a miktarlarında 2 - 35× kat artış olduğu tespit edilmiştir. Buna göre en yüksek klorofil miktarı ($1,42 \pm 0,11 \mu\text{g/L}$) sert SYS içeriğine sahip, 50 mg/L NP konsantrasyonuna 72 saat süre maruz bırakılmış alg-NP deney düzeneğinden elde edilirken, en düşük klorofil miktarı ise ($0,025 \pm 0,006 \mu\text{g/L}$) çok yumuşak SYS

içeriğine sahip, 1 mg/L NP konsantrasyonuna 24 saat süre maruz bırakılmış örneklerde bulunmuştur. Karıştırma ve problu sonikasyon deney düzeneklerinden 24 saat sonunda elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında Klorofil a miktarlarında 0,4 - 4,7× kat artış olduğu tespit edilmiştir. Problu sonikasyon uygulanması sonucunda CuO NPLerinin başlangıç kümelenme durumlarının en aza indirilmesinden dolayı alglerin 24 saatlik deney süresinden itibaren daha fazla strese

maruz kaldığı düşünülmektedir. Bununla beraber 72 saat sonunda, en düşük klorofil miktarı ($0,09 \pm 0,008 \mu\text{g/L}$) yumuşak SYS içeriğine sahip 10 mg/L NP konsantrasyonuna maruz bırakılmış alg-NP deney düzeneğinden elde edilirken, en yüksek klorofil a miktarı ise ($0,45 \pm 0,001 \mu\text{g/L}$) çok yumuşak SYS içeriğine sahip, 100 mg/L NP konsantrasyonuna 24 saat süre maruz bırakılmış örneklerde bulunmuştur.



Şekil 3. Sentetik yüzeysel su örnekleri içinde karıştırma ve problu sonikasyon dispersiyon yöntemleri ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin Klorofil a miktarına etkisi

Tartışma

Çalışma sonucunda NP-alg etkileşiminin ilk 24 saatlik deney süresinden itibaren CuO NPLerinin C.

vulgaris alg popülasyonunu inhibe etmeye başladığı ve 72. saate kadar bu etkinin devam ettiği ve artış gösterme eğiliminde olduğu belirlenmiştir. NP konsantrasyonundan bağımsız olarak SYS

içeriklerinin inhibisyona etkileri incelendiğinde en yüksek inhibisyonun çok yumuşak SYS içeriğe sahip (pH-6,5) deney gruplarında ortaya çıkmıştır.

Deneysel çalışmalar neticesinde elde edilen bulgular değerlendirildiğinde NP konsantrasyonu arttıkça inhibisyonun arttığı, özellikle düşük NP konsantrasyonunda da inhibisyon etkisinin var olduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra Klorofil a miktarının inhibisyonla paralel olarak değiştiği tespit edilmiştir.

Literatürdeki NP-alg etkileşimlerinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde çeşitli metal oksit türleri ve fotosentetik ve diğer canlılar üzerinde çalışmalar yapıldığı görülmektedir. Ancak CuO NP ve *C. vulgaris* ile ilgili ekotoksik etkinin incelendiği çalışmanın bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu yönüyle çalışma ulusal ve uluslararası literatürde ilk olma niteliği taşımaktadır.

Kaynaklar

[1] Farré, M., J. Sanchís and D. Barceló. 2011. Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the behavior of nanomaterials in the environment. *TrAC Trends in Analyt. Chem.*, 30(3): 517-527.

[2] Brar, S. K., M. Verma, R. Tyagi and R. Surampalli. 2010. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge—Evidence and impacts. *Waste Manag.*, 30(3): 504-520.

[3] Van Hoecke, K., K. A. De Schampelaere, P. Van der Meeren, G. Smaghe and C. R. Janssen. 2011. Aggregation and ecotoxicity of CeO₂ nanoparticles in synthetic and natural waters with variable pH, organic matter concentration and ionic strength. *Environ. Pollut.*, 159(4): 970-976.

[4] Ren, G. G., D. W. Hu, E. W. C. Cheng, M. A. Vargas-Reus, P. Reip and R. P. Allaker. 2009. Characterisation of copper oxide nanoparticles for

antimicrobial applications. *Int. J. Antimicrobial Agents*, 33(6): 587-590.

[5] Xu, J. F., W. Ji, Z. X. Shen, S. H. Tang, X. R. Ye, D. Z. Jia and X. Q. Xin. 1999. Preparation and characterization of CuO nanocrystals. *J. of Solid State Chem.*, 147(2): 516-519.

[6] Zhu, J. W., D. Li, H. Q. Chen, X. J. Yang, L. Lu and X. Wang. 2004. Highly dispersed CuO nanoparticles prepared by a novel quick-precipitation method. *Materials Letters*, 58(26): 3324-3327.

[7] Marino, E., T. Huijser, Y. Creighton and A. van der Heijden. 2007. Synthesis and coating of copper oxide nanoparticles using atmospheric pressure plasmas. *Surface & Coatings Technol.*, 201(22-23): 9205-9208.

[8] Gabbay, J., G. Borkow, J. Mishal, E. Magen, R. Zatcoff and Y. Shemer-Avni. 2006. Copper oxide impregnated textiles with potent biocidal activities. *J. of Industrial Textiles*, 35(4): 323-335.

[9] USEPA (2002). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, EPA-821-R-02-013, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water.

[10] OECD. 2011. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria. *Growth Inhibition Test*.

[11] Yoon, K.-Y., J. H. Byeon, J.-H. Park and J. Hwang. 2007. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Sci. Total Environ.*, 373(2): 572-575.

[12] Erdem, A., D. Metzler, D. Cha and C. P. Huang. 2014. Inhibition of bacteria by photocatalytic nano-TiO₂ particles in the absence of light. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 12(9): 2987-2996.

[13] USEPA (2004). ESS Method 150.1: Chlorophyll. Spectrophotometric, Environmental Sciences Section, Inorganic

Chemistry Unit, Wisconsin State Lab of Hygiene, EPA.

[14] Sousa, V. S. and M. R. Teixeira. 2013. Aggregation kinetics and surface charge of CuO nanoparticles: the influence of pH, ionic strength and humic acids. *Environ. Chem.*, 10(4): 313.

[15] El-Trass, A., H. ElShamy, I. El-Mehasseb and M. El-Kemary. 2012. CuO nanoparticles: Synthesis, characterization, optical properties and interaction with amino acids. *Applied Surface Science*, 258(7): 2997-3001.

[16] Adams, L. K., D. Y. Lyon and P. J. J. Alvarez. 2006. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Research*, 40(19): 3527-3532.

[17] Hund-Rinke, K. and M. Simon. 2006. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles TiO₂ on algae and daphnids. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 13(4): 225-232.

[18] Lovern, S. B. and R. Klaper. 2006. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25(4): 1132-1137.

[19] Navarro, E., A. Baun, R. Behra, N. B. Hartmann, J. Filser, A. J. Miao, A. Quigg, P. H. Santschi and L. Sigg. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17(5): 372-386.

[20] Metzler, D. M., M. Li, A. Erdem and C. P. Huang. 2011. Responses of algae to photocatalytic nano-TiO₂ particles with an emphasis on the effect of particle size. *Chemical Engineering Journal*, 170(2-3): 538-546.

[21] Aruoja, V., H.-C. Dubourguier, K. Kasemets and A. Kahru. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci. Total Environ.*, 407(4): 1461-1468.

[22] Hartmann, N. B., F. Von der Kammer, T. Hofmann, M. Baalousha, S. Ottofuelling and A. Baun. 2010. Algal testing of titanium dioxide nanoparticles-Testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability. *Toxicology*, 269(2-3): 190-197.

[23] Kim, K. T., S. J. Klaine, J. Cho, S. H. Kim and S. D. Kim. 2010. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. *Sci. Total Environ.*, 408(10): 2268-2272.

[24] Franklin, N. M., N. J. Rogers, S. C. Apte, G. E. Batley, G. E. Gadd and P. S. Casey. 2007. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. *Environ. Sci. Technol.*, 41(24): 8484-8490.

[25] Peng, X. H., S. Palma, N. S. Fisher and S. S. Wong. 2011. Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae. *Aquatic Toxicology*, 102(3-4): 186-196.

[26] Quik, J. T. K., I. Lynch, K. Van Hoecke, C. J. H. Miermans, K. A. C. De Schamphelaere, C. R. Janssen, K. A. Dawson, M. A. C. Stuart and D. Van de Meent. 2010. Effect of natural organic matter on cerium dioxide nanoparticles settling in model fresh water. *Chemosphere*, 81(6): 711-715.

[27] Van Hoecke, K., J. T. K. Quik, J. Mankiewicz-Boczek, K. A. C. De Schamphelaere, A. Elsaesser, P. Van der Meeren, C. Barnes, G. McKerr, C. V. Howard, D. Van De Meent, K. Rydzynski, K. A. Dawson, A. Salvati, A. Lesniak, I. Lynch, G. Silversmit, B. De Samber, L. Vincze and C. R. Janssen. 2009. Fate and Effects of CeO₂ Nanoparticles in Aquatic Ecotoxicity Tests. *Environ. Sci. Technol.*, 43(12): 4537-4546.

[28] Baek, Y.-W. and Y.-J. An. 2011. Microbial toxicity of metal oxide

nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Streptococcus aureus*. *Sci. Total Environ.*, 409(8): 1603-1608.