

PAPER DETAILS

TITLE: Nanopartikül Karakterizasyon Yöntemleri ve Ekotoksisite Deneylerindeki Önemi

AUTHORS: Yesim DAGLIOGLU

PAGES: 1-17

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/449584>

Nanopartikül Karakterizasyon Yöntemleri ve Ekotoksiste Deneylerindeki Önemi

Nanoparticle Characterization Methods and Its Importance in Ecotoxicity Experiments

Yeşim DAĞLIOĞLU¹ , Huri ÖZKAN YILMAZ² 

¹Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ordu/Türkiye

²Dr. Ali Menekşe Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Giresun, Türkiye

Öz

Nanoteknoloji önemli bir yenilikçi, bilimsel ve ekonomik büyüme alanıdır. Bununla birlikte, nanopartiküller insan sağlığı ve çevre üzerinde zararlı etkilere sahip olabilir. Şimdiye kadar, nanopartiküllerin toksisitesi üzerine artan sayıda çalışma yapılmasına rağmen hala niceliksel ekotoksiste veri eksikliği bulunmaktadır. Napartiküller en az bir boyutu ≤ 100 nm olup karbon, silikon ve metaller gibi çok farklı temel materyalden oluşabilir. Nanopartikül atomlarının yaklaşık % 40-50'si yüzeyde olmasından dolayı reaktivitesi yüksektir. Buna bağlı olarak da farklı biyolojik etkiler göstermesi beklenmektedir. Ekotoksiste deneylerinde nanopartiküller ile nanopartikül agregatlarının ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmesi gerekir. Çünkü, nanopartiküllerin çevresel konsantrasyonları hem etki derecelerini hem de maruz kalma değerlendirmelerini değiştirmektedir. Çevredeki nanopartiküller ile agregat nanopartiküllerinin yapısı son ürünlerin özellikleri ve ortamdaki davranışları üzerine büyük önem taşımaktadır. Farklı ortamlardaki nanopartikülleri ölçerken, konsantrasyonlarla ilgili veriler sağlamak tek başına yeterli değildir, aynı zamanda nanopartiküllerin boyut dağılımı ve fizikokimyasal özellikleri hakkında da bilgi gereklidir. Tek bir teknik bu bilgilerin hepsini sağlayamaz, bu nedenle farklı analitik teknikler gereklidir. Bu derlemede, nanopartikül toksisitesinin değerlendirilmesinde nanopartikül karakterizasyonun önemi açıklanmıştır. Aynı zamanda, nanopartiküllerin mikroskopik, kromatografik, spektroskopik yöntemler, santrifüjleme ve filtrasyon teknikleri ve diğer teknikler adı altında nanopartikül boyut ve fizikokimyasal özellikleri dikkate alınarak karakterizasyon yöntemleri ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ekotoksiste, Karakterizasyon, Nanopartikül, Nanotoksiste, Nanotoksikoloji

Abstract

Nanotechnology is an important area of innovation, scientific and economic growth. However, nanoparticles may have harmful effects on human health and the environment. So far, despite the increased number of studies on the toxicity of nanoparticles, there is still a lack of quantitative ecotoxicity data. At least one dimension of Nanoparticles is ≤ 100 nm and can consist of very different base materials such as carbon, silicon and metals. The reactivity is high because about 40-50% of the atoms in the nanoparticle are on the surface. Accordingly, different biological effects are expected. Nanoparticles and nanoparticle aggregates should be characterized in detail in ecotoxicity assays. Because the environmental concentrations of nanoparticles change both the efficacy ratings and the exposure assessments. The structure of the surrounding nanoparticles and aggregate nanoparticles is of great importance to the properties of end products and their behavior in the environment. When measuring nanoparticles in different media, it is not enough to provide data on concentrations. It is also necessary to know the size distribution and physicochemical properties of nanoparticles. A single technique can not provide all of this information, so a different analytical technique is required. In this review, the significance of nanoparticle characterization in assessing nanoparticle toxicity is described. At the same time, the characterization of nanoparticles has been discussed in detail, taking into consideration the nanoparticle size and physicochemical properties, such as microscopic, chromatographic, spectroscopic methods, centrifugation and filtration techniques and other techniques.

Keywords: Ecotoxicity, Characterization, Nanoparticles, Nanotoxicity, Nanotoxicology

Sorumlu yazar/Corresponding Author: Yeşim DAĞLIOĞLU, Tel: 05321594062, e-posta: yozkan52@gmail.com

Gönderilme/Submitted: 25.10.2017, **Düzenleme/Revised:** 22.02.2018, **Kabul/Accepted:** 23.03.2018.

I. GİRİŞ

Nanoteknoloji, bilim ve teknolojik uygulamalarının pek çok alanını kapsayan oldukça umut ve heyecan verici yenilikçi, bilimsel ve ekonomik büyüme alanı olan çaprazlama moleküler teknolojisidir [1]. Nanobilim nanometre düzeyinde (0.1-100 nm çapında) materyalleri anlamaya çalışır [2].

Nanoteknoloji, maddenin bu seviyede (nano) sentezlenmesine, değiştirilmesine ve manipüle edilmesine çalışmaktadır. Resmi bir tanımlamasının yapılmamasına rağmen genelde 100 nm'nin altında en az bir boyuta sahip malzemeler olarak kabul edilir [3]. Nanoteknoloji uygulaması, konvansiyonel malzemelerin temel fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değiştirilmesini sağlar, çünkü malzemelerin boyutları nanometreye indirgenmesiyle benzersiz elektrik, optik ve mekanik özelliklere sahip yeni malzemeler oluşur [13]. Bununla birlikte, nanomalzemelerin kalıntıları, insan sağlığı ve çevre üzerinde zararlı etkiye sahip olabilir. Nanopartiküllerin (NP'lerin) farklı matrislerdeki analizi, NP kompozisyonu ve kütle konsantrasyonunun belirlenmesi ile sınırlandırılmamalıdır. Çünkü, NP'lerin potansiyel toksisitesi ve davranışları, partikül sayısı, yükü, boyut ve boyut dağılımı, kimya ve reaktivitesi, yüzey alanı, yapı ve şekli ile agregasyon durumu ve elemental kompozisyonu gibi çok çeşitli faktörlerden etkilenebilir [5-8].

Kısaca bu özellikleri şunlardır;

Agregasyon/toplanma durumu; agregasyon eğilimi gösteren NP'ler işlevselliğini koruyabilir, ancak boyutlarındaki artış, hücreler tarafından alımının azalmasına neden olabilir. *Elemental kompozisyon*; farklı partikül bileşimi, farklı davranış/(toksik) etkiye yol açar. *Kütle konsantrasyonu*; normalde kontaminant konsantrasyonunun artışı toksisite/etki artışına neden olur, bu durum daima NP'ler için geçerli değildir. *Partikül sayısı konsantrasyonu*; NP'ler düşük kütle konsantrasyonlarına sahiptir, ancak toplam partikül sayıları yüksek yüzde göstermektedir. *NP Şekli*; farklı partikül şekilleri (örneğin, küresel, boru şekilli vs.) farklı afiniteler veya erişilebilirliklere sahiptir, örneğin NP'lerin membranlardan hücrelere taşınımı ve bu NP'lerin farklı antibakteriyel davranış sergilemesidir. *Boyut ve boyut dağılımı*; NP'ler boyutlarına göre tanımlanır ve sınıflandırılır, çünkü NP boyutu, taşınma davranışlarını tanımlayan temel özelliklerden birisidir. *Çözünürlük*; çözünür NP'lerin iyonik formları zararlı veya zehirli olabilir. *Türleşme*; farklı türler, farklı davranış, toksisite ve etki gösterebilir (Örneğin, C60'a karşı C70, doğal organik madde veya oksidasyon durumu ile NP kompleksleri). *Yapı*; NP kararlılığını veya davranışını etkileyebilir (örn., TiO₂'nin muhtemel kristal yapıları olarak rutil veya anastaz formları). *Yüzey alanı ve porozite*; yüzey alanının artışı reaktivite ve emme davranışını artırır. *Yüzey yükü*;

yüzey yükünün özellikle dispersiyonlarda NP stabilitesi üzerine etkisi vardır. *Yüzey kimyası*; kaplamalar farklı kimyasal bileşimlerden oluşabilir ve bu NP davranışını veya toksisitesini etkileyebilir (örneğin, CdSe çekirdeği ve ZnS kabuğu bulunan kuantum noktaları).

NP'ler, bulk ve moleküler materyal arasındaki madde-nin ara bir supramoleküler halini temsil eder [4]. Partikül boyutu çok büyük yüzey hacim oranı sağlamasının dışında, NP biyoyumluluk yüzey özellikleri, NP tarafından taşınan yüklere ve kimyasal reaksiyona bağlıdır. Polimerik makromoleküller *in vitro* hücre membranları ile güçlü bir etkileşim gösterirler. NP'lerin biyolojik dokuların yüzey astar tabakaları ile bu etkileşimi NP'lerin yüzey kimyası ve reaktivitesi ile belirlenir [4].

NP'lerin herhangi bir ortamda nasıl davranacağı konusu hala büyük ölçüde bilinmemektedir. Bununla birlikte, boyutları, yüzey yükleri ve kimyasal reaktivitesi kısaca yukarıda bahsedilen özellikleri hakkında bilenlere dayanarak potansiyel tehlikeleri hakkında makul bazı öngörüler yapılabilir. Fakat temel olarak süper molekül varlıklar oldukları için, yüzey özelliklerinden edinilen bilgilere dayanarak öngörülemez yeni özellikleri ortaya çıkabilmesinden dolayı biyolojik etkileşimleri hakkında kolaylıkla öngörü yapılamaz [4, 24-25]. Nanoteknolojinin sürdürülebilir gelişimini sağlamak için çeşitli uygulamalarda kullanılan NP'lerin risk değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır [17, 25]. Bu tür risk değerlendirmeleri, hem etki hem de maruz kalma değerlendirmelerini gerçekleştirmek için uygun analizler ve yöntemler gerektirir [30-32].

Geleneksel olarak, maruz kalma değerlendirmesi hem bir modelleme hem de bir ölçüm yaklaşımı içermesi önerilir, her iki yaklaşımda enstrümantasyon ve analitik teknikler gerektirir [17,29]. Modelleme yoluyla NP'nin çevresel konsantrasyonlarının tahmini, emisyon senaryolarına (örneğin üretim hacimlerinden ve yaşam döngüsü değerlendirmelerinden) ve parçalanma parametrelerine dayanır (örneğin akıbeti ve davranışı gibi). Analitik teknikler, düşük konsantrasyonlu NP'lerin ölçülmesi için yeterince hassastır, zira küçük partiküller normalde toplam kütlede yalnızca küçük bir bölümünü temsil eder.

Analitik teknikler, laboratuvar analizlerinin ortamdan etkilenmeyen çevre koşullarını yansıtmalarını sağlaması için numunelerin bozulmasını en aza indirmelidir [35, 36]. Mikroskopik yaklaşımlar, kromatografi, santrifüjleme ve filtrasyon, spektroskopik ve ilgili diğer teknikler olmak üzere NP konsantrasyonu, özellikleri, tespiti ve karakterizasyonu hakkında bilgi vermek için farklı yaklaşımlar ve çok sayıda analitik teknikler mevcuttur. Bu nedenle, su, toprak, çökelti, kanalizasyon çamuru ve biyolojik örnekler gibi

kompleks çevre matrislerindeki konsantrasyon ve NP karakteristiklerini belirlemek için uygun analitik yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

1.1 Karakterizasyon için Numunelerin Hazırlanması

Kullanılacak tekniğe/yönteme bağlı olarak doğal numuneleri analiz etmek için numune hazırlama ve/veya sindirme işlemlerine sıklıkla ihtiyaç duyulmaktadır. NP'ler çevrelerine tepki olarak yapı ve bileşimini değiştirebilirler. Elde edilen veya ön işleme tabi tutulmuş veya sindirilmiş numuneler partiküllerin yerine karakterize edildiği durumda genellikle sonuçlar farklı olabilir [34]. Analizlerdeki bu artefaktlar numunenin hazırlanmasını minimuma indiren veya gerektirmeyen teknikler kullanarak önlenabilir. Numune hazırlığı önlenemiyorsa, artefaktları izlemek için dikkatli bir örnekleme ve hazırlama yöntemleri gereklidir. NP'lerin doğasında zamanla değişebilir; Örneğin agregasyon artabilir veya azalabilir ve partiküller eriyebilir [34]. Bununla birlikte, kolloidal NP'lerin dispersiyonlarının kararsızlığından dolayı *in situ* analizler tercih edilir. Ancak bu yöntemler nadiren mevcuttur [17, 20]. Diğer bir seçenek örneklemeden analize kadar minimum pertürbasyona neden olan metodolojileri uygulamaktır. NP'lerin

numunelenmesi genellikle standart numune alma protokolleri ile mümkündür ancak kullanma prosedürleri birçok diğer kimyasaldan farklıdır. Yüzey sularındaki kolloid numunelerinin toplanmasında çoğunlukla minimum adsorpsiyon ve kontaminasyonu önlemek için inorganik kolloidler ve metal analizleri için plastikler, özellikle fluoroplastik şişeler ile organik iz elementlerinin analizi için cam şişeler kullanılır [21]. Üretilen NP'ler organik bir kaplamaya veya yüzey aktif cismine sahip bir inorganik çekirdekten oluşabileceğinden geleneksel malzeme seçimlerine dikkat edilmelidir [17]. Ayrıca, nanopartikül yüzey yükü ve spesifik pH'da hem plastik hem cam şişe duvarlarındaki muhtemel yükler göz önüne alınmalıdır.

1.2 Karakterizasyon Yöntemleri

1.2.1 Mikroskopik teknikler

Mikroskopik teknikler optik, elektron ve taramalı prob mikroskobu yöntemlerini içerir. *Taramalı yakın alan optik mikroskopi (SNOM)*; NP'lerin boyutları optik mikroskopi algılama limitinin altında olduğundan, NP agregatlarını görüntülemek için 50 ila 100 nm arasında çözünürlüğe sahip SNOM modifiye görüntüleme tekniği kullanılabilir [9]. *Konfokal mikroskopi/Konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM)*; floresan numuneleri algılayabilmesi ve kalın örnekleri görüntüleyebilmesinden dolayı kolloid numunelerin

karakterize edilmesinde kullanılabilir [8]. NP'lerin görselleştirilmesi/karakterizasyonu için en popüler teknikler elektron ve taramalı prob mikroskoplarıdır. Bu tekniğe bağlı olarak, alt-nanometre aralığındaki çözünürlükler elde edilebilir. *Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM)*, *taramalı elektron mikroskobu (SEM)* ve *geçirimli elektron mikroskopisi (TEM)* kullanılarak NP'ler sadece görselleştirilemez, aynı zamanda agregasyon, dağılma, emilim, boyut, yapı ve şekil durumu gibi özelliklerde gözlemlenebilir [11]. TEM'de, bir görüntü elde etmek için elektronlar bir numune boyunca iletilir (dolayısıyla numunenin çok ince olması gerekir). SEM'de dağınık elektronları görüntülemek için numune arayüzde bulunur. Genel olarak, bir elektron mikroskopunda daha hafif atomların görüntülenmesi, elektronları daha az verimli şekilde saçtığı için daha zordur [13]. *Analitik elektron mikroskobu (AEM)*; analitik (çoğunlukla spektroskopik) cihazlar, genel AEM olarak bilinen ek element bileşimi analizi için elektron mikroskoplarıyla birleştirilebilir. Örneğin, *kayıp elektron enerji spektroskopisi (EELS)* ve *enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDS)*; elemental analizler için kullanılır. Bunlar TEM ile birleştirilirdiğinde numunenin temel bileşimi hakkında ek bilgiler verir [11]. *Seçilmiş alan elektron difraksiyonu (SAED)*; NP'lerin kristal özellikleri hakkında bilgi verir [10]. Bu teknikler güçlü olmakla birlikte bazı dezavantajlara sahiptir. Bunlar numuneleri yıkıcı/bozucu tekniklerdir ve bu nedenle numuneler sadece bir kez analiz edilebilir. Ayrıca, biyolojik numuneler için, TEM grubu olan taramalı transmisyon elektron mikroskobu olan (STEM) kullanılabilir. STEM ile karanlık alan mikroskobu, yüksek kontrast özellikleri olmasından dolayı biyolojik örneklerin lekelenmeden görüntülenmesine olanak tanır. Kırınım ve spektroskopik tekniklerle birlikte STEM'ler

NP'ler için alt nanometre mekansal çözünürlükte görüntüler ile kimyasal veriler de sağlayabilir. *Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)* kullanılarak NP'leri tamamen sıvı halde görüntülemek mümkündür. AFM, taramalı prob mikroskopları (SPM) ailesine aittir [18]. NP görselleştirmesi için AFM'nin ana sınırlaması, uc geometrisinin genellikle tarama partiküllerden daha büyük olmasıdır. Bu durumda taramada partikül topografyasının başlangıcında ve ofsetinde hatalara yol açarak NP'lerin yanal boyutlarının aşırı tahminine neden olur. Bu nedenle, doğru boyut ölçümleri yalnızca partiküllerin yüksekliği üzerinden yapılmalı ve yanal boyutlar çok dikkatle kullanılmalıdır. *Kimyasal kuvvet mikroskopisi (CFM)*; tekniğiyle bireysel atomların doğasını tanımlanabilir [22-23]. NP'lerin nicelleştirilmesinde sadece bu yöntemler kullanılmaz. Yukarıda yazılan yöntemlerle, kompleks biyolojik ve sucul matrikslerde kullanılacak, selektif ve hassas analitik yöntemlerin geliştirilmesine katkıda

bulunabilecek NP'lerin yüzey özelliklerini ve reaktivitesini anlamalarına yardımcı olabilirler.

1.2.2 Kromatografik yöntemler

Numunelerde NP'lerin ayrılması için kromatografiye dayalı veya bununla ilgili teknikler kullanılabilir. Bu teknikler hızlı, hassas ve tahribatsızdır, böylece numuneler daha sonra yapılacak analizlerde kullanılabilir. Bazı kromatografik cihazlarda çözücüler kullanılır ve ayrıca numuneler genellikle orijinal ortamlarında çalıştırılmaz, bu da numunde değişikliğe ve numune çözücü etkileşimine neden olabilir. Boyutlandırma tekniklerine detektör olarak geleneksel analitik cihazların (örneğin ICP-MS, DLS vb.) eklenmesiyle, gıda, su, ve toprakta bulunan farklı NP'lerin sayısallaştırmasının yanı sıra NP'ler karakterize edilebilir veya elemental olarak analizi yapılabilir [8]. NP'leri karakterize etmek için, boyut ayırmada en iyi bilinen teknikler;

Boyut dışlama kromatografisi (SEC); bu en yaygın uygulanan kromatografik yöntem olup voltametrik gibi saptama teknikleriyle birlikte kullanılır.

Alan akış fraksiyonasyonu (FFF); Kompleks doğal numunelerde NP'lerin boyut ayrımı için son derece umut verici bir tekniktir NP'leri yalnızca hidrodinamik kuvvetlere dayanan sabit faz olmadan ayırır [17,120].

Hidrodinamik kromatografi (HDC); farklı ortamlarda geniş partikül boyutu ayırımı aralığı ile çeşitli NP'lerin boyutlandırılmasını sağlar. Bununla birlikte HDC, agrega oluşumunun daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmakta özellikle yararlıdır [121-123].

Kapiler elektroforez (CE) dir. Bu yöntemler oldukça hassas olup numunelerin daha sonraki analizlerde kullanılmasını sağlar [8].

1.2.3 Spektroskopik yöntemler

Nanopartikül analizi ve karakterizasyonu için çok çeşitli spektroskopik yöntemler mevcuttur. Nanopartikül karakterizasyonu için en kullanışlı saçılım teknikleri, SLS ve DLS gibi ışık saçma yöntemleri veya SANS gibi nötron saçılımıdır.

Dinamik ışık saçılımı metodu (DLS); NP boyutlandırılması ve süspansiyonlarda agregasyonunun belirlenmesi için kullanılan en yaygın yöntemdir [14]. Aynı zamanda, DLS hızlı

in situ ve gerçek zamanlı boyutlandırma sağlar [19], fakat, toz parçacıkları gibi müdahaleler ile daha küçük partiküllere kıyasla saçılma yoğunluğunu ve dolayısıyla boyutlandırma sonucunu etkileyecek olan bir dizi olası artefakt

kaynağı olmasından dolayı önemli sınırlamalara sahiptir. Ayrıca, heterojen boyut dağılımlarına sahip partikülleri içeren numunelerden elde edilen verilerin yorumlanması zordur. DLS sadece niceldir ve numunenin içeriği bilinmediği veya saf olmadığında boyut fraksiyonları spesifik bir kompozisyonun partikülleri ile ilgili değildir [26].

Foton korelasyon spektroskopisi (PCS); DLS de olduğu gibi özellikle NP'lerin boyutlandırılması ve süspansiyonlardaki agregasyon durumlarının saptanması için yararlıdır. Lazer tabanlı yöntemler;

Küçük açılı X-ışını saçılımı (SAXS); monodispers (ortamdaki tüm taneciklerin büyüklüğü aynı) ve polidispers (tanecik büyüklükleri birbirinden farklı) sistemleri karakterize edebilir.

Lazerle indüklenen arıza tespiti (LIBD); çok düşük algılama limitine sahip ve kolloidlerin boyut ve konsantrasyon analizi için uygundur.

Raman spektroskopisi; NP'lerin yapısal karakterizasyonu için uygundur [8, 33].

Küçük açılı nötron saçılımı (SANS); katı veya sıvı numunelerde kullanılabilir [8]. X-ışını spektroskopisi, XPS, XRF ve XAS ve XRD tekniklerini kapsar.

X-ışını fotoelektronunu (XPS); NP yüzeylerini ve kaplamaları karakterize etmek için yararlı olabilir.

X-ışını kırınımını (XRD); tahribatsızdır, doğal ve imal edilen malzemelerin kristalografik yapısı veya elemental bileşimi hakkında bilgi verebilir.

X-ışını absorpsiyonu (XAS) ve *emisyon spektroskopisi*; kimya ve malzeme bilimlerinde elemental kompozisyonu ve kimyasal bağları belirlemek için kullanılır.

X-ışını floresan (XRF); bu spektroskopi yöntemi numunelerde tahribat yapmaz. Katı, toz veya sıvı haldeki numunelerde bulunan elementlerin konsantrasyonlarının belirlenmesi ve tanımlamasında kullanılabilir [27].

Kütle spektrometresi; bir iyon kaynağı, bir kütle analizörü ve bir dedektör sisteminden oluşur ve ESI ve MALDI tekniklerini içerir.

Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve *matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI)*; sıvı ve katı biyolojik numuneler ile sıklıkla kullanılan iki iyonizasyon tekniğidir [28].

UV-görünür spektroskopi (UV-vis spektroskopisi); NP'lerin kütle konsantrasyonunu Beer'in yasasına göre ölçmek için basit ve kullanışlı bir analitik tekniktir. Bir numune tarafından emilen ve dağılan ışığı ölçmek için kullanılan tekniktir [45]. NP'ler optik özelliklere sahip olup boyut, şekil, konsantrasyon, aglomerasyon durumu ve nanopartiküllerin yüzeye yakın kırılma indeksine duyarlı olmasından

dolayı UV-vis ile karakterize edilmesi ve incelenmesi için uygundur.

1.2.4 Santrifüjleme ve filtrasyon teknikleri

Bu yöntemler, düşük maliyetli, yüksek hızlı ve yüksek hacimli teknikler olup numunelerin hazırlanması ve boyut fraksiyonlamasında uygun yöntemdir. *Ultra santrifüjleme (UC)*; 1,000,000 g'a kadar hızlanma için çok yüksek eğirme hızlarına sahip bir santrifüj sistemidir. Analitik ve hazırlayıcı UC olmak üzere İki farklı ultra-santrifüj tipi vardır. *Analitik ultra santrifüj (ANUC)*; numune ultraviyole ışık emilimi ve/veya optik refraktif indeks hassas sistemleri kullanılarak bir optik algılama sistemi vasıtasıyla gerçek zamanlı olarak izlenebilir. *Hazırlayıcı ultra santrifüj*; ince tanecikli fraksiyonların peletlenmesi, gradyan ayırma işlemleri ve TEM ve AFM substratlarında sudaki kolloidleri ve NP'lerin agregasyonu için kullanılmıştır [18, 26, 36]. *Çapraz akışlı filtrasyon (CFF) veya tanjant filtrasyon*; numuneleri tekrar sirküle eder ve bu sayede, tıkanıklığı, konsantrasyon polarizasyonunu ve geleneksel sonda filtrelemenin neden olduğu diğer artefaktları azaltır [20].

1.2.5 Diğer teknikler

Partikül sayıcı; bu teknik, bir karbon nanotüp tabanlı coulter counter kullanılarak NP'lerin boyut ve yüzey yükü karakterizasyonunda başarıyla uygulanmıştır [37].

Yoğunlaştırma parçacık sayacı (CPC); alkol ve su gibi çeşitli işletim sıvılarını kullanarak yoğunlaştırma işlemiyle partiküllerin büyütülmesi bireysel partiküllerin sayısı ve konsantrasyonu hakkında bilgi verir [15].

Diferansiyel hareketlilik analizörü (DMA); alt mikrometre aerosol partiküllerinin boyut dağılımını belirlemek için kullanılabilir [38, 39, 40].

Tarama hareketlilik parçacık ölçme cihazı (SMPS); bir DMA ve bir CPC'den oluşur. İlk olarak, partiküller DMA'daki elektriksel hareketlilikleri ile ayrılır, daha sonra, boyut fraksiyonlamaları, bu boyuttaki partikül konsantrasyonunu belirleyen TBM'ye girer.

Brunauer-Emmett-Teller (BET); çok yaygın olan bu yöntemi, katıların ve böylece gaz adsorpsiyonu ile nanopartiküllerin spesifik yüzey alanlarının belirlenmesini sağlar [12].

Elektroforetik hareketlilik ve zeta potansiyeli; elektroforez dağınmak partiküllerin özelliklerini özellikle de zeta potansiyelini ölçmek için kullanılır.

Zeta potansiyeli; bir parçacığın belirli bir ortamda elde ettiği toplam yükün bir ölçümüdür ve bir kolloidal sistemin potansiyel stabilitesinin göstergesidir. Tüm partiküller

büyük bir negatif veya pozitif zeta potansiyele sahipse birbirlerini iter böylece partikül yükü neredeyse nötr olduğunda daha yüksek kararlılığa neden olur. Zeta potansiyeli net yükün bir ölçüsüdür.

1.3 Yüzey Yük Ölçümleri

Kolloidal NP'ler sulu solüsyonlarda yüzey yüklerini artırır. Net yüzey yükü veya yüzey potansiyeli en önemli NP özelliklerinden biridir. NP dispersiyonunun partiküller arası itme ile ne derece elektrostatik olarak stabilize edildiğini açıklar. Sonuç olarak, NP yüzey potansiyelinin akibeti ve davranışları üzerinde yüzey yükünün büyük etkisi olur [16, 17]. Bununla birlikte, yüzey potansiyelini doğrudan ölçmek kolay değildir, ancak elektroforez ile ölçülen partiküllerin elektrostatik çift katmandaki bir hidrodinamik kayma düzlemindeki potansiyeli olan zeta potansiyeli ölçen basit bir yöntem bulunmaktadır. Ölçülen elektroforetik hareketlilik Smoluchowski teorileri ile Z potansiyeline dönüştürülebilir. Sıfır yük noktası (SYN) negatif ve pozitif yüklerin dengelenmediği pH'dır, bu nedenle NP'lerin üzerinde net bir yük yoktur. SYN'de, genellikle çekici van der Waals kuvvetlerinin (bağlarının) harekete geçebilmesi için partiküllerin yakın temas etmesi sağlandığından dolayı maksimum agregasyon gerçekleşir.

1.4 Kütle Yoğunluğunun Ölçümü

Kütle, NP'lerin geleneksel ve en sık ölçülen konsantrasyon metriğidir. NP numunelerinin toplam kütle konsantrasyonlarını ölçmek için günümüzde çeşitli analitik teknikler ve metodolojiler mevcuttur. En yaygın olanları ICP-MS, AAS, UV-vis spektroskopisi ve kuvarz kristal mikro dengesidir. *Atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS)*; potansiyel olarak doğal organik madde (DOM) veya ağır yüzey aktif madde kapsama alanındaki kütle konsantrasyonlarını belirlemek için kullanışlı analitik yöntemdir [46]. AAS, çok çeşitli metal konsantrasyonlarının tespitinde güvenilirlik açısından iyi bilinir. *İndüktif plazma ile birleştirilmiş kütle spektrometresi (ICP-MS)*; karbon olmayan NP'lerin kütle konsantrasyonunu değerlendirmek için önde gelen bir analitik tekniktir, çünkü diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında hassas bir saptama limiti sağlar (0.1-0.05 µg/L), izotopik ölçüm için büyük doğrusal bir aralık ve potansiyele sahiptir [11, 49]. Tipik olarak, ICP-MS için NP numuneleri, ölçümden önce çoklu asit ile muamele edilerek hazırlanır. Organik maddelerden NP analizi yapılacaksa yaş yakma (kül etme) metodu ile numuneler hazırlanır. UV-vis spektroskopisi laboratuvar temelli çalışmalar için basit ortamda agregasyonsuz NP numunelerinin

yaklaşık toplam kütle konsantrasyonu ölçümü için uygundur [11]. Sulu fazda fulleren NP gibi veya yüksek iyonik mukavemetli ortamda yüklü stabilize NP'ler gibi agregat numuneleri için UV-vis verileri dikkatlice analiz edilmelidir. Çünkü NP'lerin spektroskopik özellikleri boyutları, yüzey özellikleri ve agregasyon durumuna göre önemli ölçüde değişiklik gösterir [11, 48]. *Kuvars kristal mikro balansı (KKMB)*; piezoelektrik özelliği etki yoluyla NP kütlesini algılamakta başarıyla kullanılabilir. KKMB, NP'lerin boyutlarından veya yüzeylerinden etkilenmeden nanokristallerin kütle konsantrasyonunu ölçmek için doğrudan ve hassas bir tekniktir [47].

Çevresel süreçleri değerlendirmek ve toksikolojideki doz-tepki ilişkilerini yorumlamak için farklı NP konsantrasyon ölçümlerinin önemini Palchoudhury 2015'de konsantrasyon metriğinde özetlemiştir. Buna göre; Kütle konsantrasyonu: birimi $\mu\text{g/L}$ dir. Daha büyük (yüksek kütle) NP'lerin toksisitesini analiz eden nano (toksikoloji) ile ilgilidir, örneğin, sedimentasyon. Yüzey alanı konsantrasyonu: birimi $\text{m}^2 \text{cm}^{-3}$ dir. Enflamasyon gibi küçük NP ile ilgili toksisite etkilerini daha iyi gösterir. Sayı konsantrasyonu: partiküller L^{-1} dir. Nanotoksikolojideki önemi küçük NP fraksiyonu ile alakalıdır, örneğin, agregasyon/ayırıştırma.

1.5 Nanopartikül Özelliklerine Göre Potansiyel Ölçümlerde Kullanılan Analitik Yöntemler

Agregasyon: Mikroskopik teknik; STEM, TEM, SEM, AFM, STM, santrifüj ve filtrasyon teknikler; ANUC, spektroskopik yöntemler; XRD, SANS, diğer teknikler; zeta potansiyeli.

Kütle konsantrasyonu ölçümü: Mikroskopik teknik; AEM, CFM, diğer teknik; gravimetri, termal analiz.

Kimyasal kompozisyonu: Mikroskopik teknik; AEM, CFM, spektroskopik yöntemler; NMR, XPS, Auger, AES, AAS, MS, XRD, EBSD.

Partikül sayısı konsantrasyonları: Diğer teknik; partikül sayacı, CPC

Şekil: Mikroskopik teknik; STEM, TEM, SEM, AFM, STM, Kromatografik teknikler; FIFFF-SLS, SedFFF-DLS, santrifüj ve filtrasyon teknikleri; UC

Boyut: Mikroskopik teknik; STEM, TEM, SEM, AFM, STM, diğer teknikler; DMA

Boyut dağılımı: Mikroskopik teknik; STEM, TEM, SEM, AFM, STM, Kromatografik teknikler; FFF, HDC, SEC, santrifüj ve filtrasyon teknikler; CFF, UC, CFUF, spektroskopik yöntemler; SPMS, SAXS, diğer teknikler; UCPC, SMPS

Çözülme: Diğer teknikler; Voltametri, titrasyon gibi ince filmlerde difüzyon gradyanlar

Türleşme yapısı: Mikroskopik teknik; STEM, TEM, SEM, AFM, STM, diğer teknikler; BET Yüzey alanı (porozite)

Yüzey yükü: Kromatografik teknikler; CE, diğer teknikler; Zeta potansiyel

Yüzey kimyası: Mikroskopik teknik; AEM, CFM, spektroskopik yöntemler; XPS, Auger, SERS

1.6. Nanopartikül Karakterizasyonunun Ekotoksisite Çalışmalarındaki Yeri

Nanopartiküllerin, toksik etki mekanizmaları veya nedenlerini doğru şekilde saptamak için nanopartikül özelliklerini hem biyolojik ortamın dışında hem de biyolojik çevrede iyi anlamak gerekir. Araştırmacılar fizyolojik ortamın dışındaki NP'lerin boyut, şekil ve yüzey özelliklerini incelemek için

Tablo 1: Nanopartikül boyutlandırma yöntemleri ve nanopartikül ölçümleri için boyut aralıkları

	Boyut		Analizler
NP noyutu	0.001 μm (1 nm)	0.01 μm (10 nm)	FFF, TEM, SEM, AFM, UC, HDC, CE, santrifüj, SEC, LIBD, X-ışını, SANS
	0.01 μm (10 nm)	0.1 μm (100 nm)	SedFFF, DLS, TEM, SEM, AFM, CLSM, SNOM, membran filtrasyon, HDC, CE, santrifüj, SEC, LIBD, X-ışını, SANS
Partikül, bulk materyal ve agregatların boyutu	0.1 μm (100 nm)	1 μm (1000 nm)	SedFFF, DLS, TEM, SEM, AFM, CLSM, SNOM, membran filtrasyon, HDC, CE, santrifüj, LIBD, X-ışını, SANS.
	1 μm (1000 nm)	10 μm (10000 nm)	lazer kırınımı, CLSM, SNOM, membran filtrasyon, HDC, LIBD, X-ışını emilimi
	10 μm (10000 nm)	100 μm (100000 nm)	lazer kırınımı, X-ışını emilimi
	100 μm (100.000 nm)	1 mm (1000000 nm)	lazer kırınımı, X-ışını emilimi

* Lead ve Wilkinson (2006) ve Gimbert et al. (2007) tarafından uyarlanmıştır.

yukarıda da açıklandığı gibi birçok araç ve yöneme sahiptir. Ekotoksikite çalışmalarında, NP'lerin biyolojik aktivitesini etkileyen/değiştiren temel parametreler büyük oranda bilinmediğinden nanopartikül karakterizasyonu oldukça önemli hale gelmiştir. Bu sebeple ekotoksikite deneylerinde nanopartikül karakterizasyonu açık ve kapsamlı şekilde yapılmalıdır. Çünkü, toksikite için kritik olduğu tespit edilen özellikler için nitelendirilmemiş nanopartikül ile yapılan çalışmaların ekotoksikiteye katkısı az olacaktır. Bununla birlikte, bu alanda çalışan araştırmacılar tarafından genellikle kabul edilen bir takım temel özellikler bulunmaktadır. Bunlar nanotoksikite çalışmalarında kullanılan nanopartiküller için ölçülmesi gereken minimum özelliklerin temelini oluşturmaktadır. Bunlar, boyut ve şekil, dispersiyon hali, fiziksel ve kimyasal özellikler, yüzey alanı ve yüzey kimyasıdır. Genelde toksiste çalışmalarında bu özellikler dikkate alınarak karakterizasyon yapılmıştır.

Ekotoksikite deneylerinde nanopartikül karakterizasyonu ilk yıllarda su ortamında (deiyonize su, distile su, nano saf su) gerçekleştirirken son yıllarda genellikle karakterizasyon için deney ortamları tercih edilmiştir. Bazı ekotoksikite çalışmalarda ise farklı deney ortamlarında nanopartikül karakterizasyonunun farklı sonuçlar sergilediğini göstermek için araştırmacılar aynı karakterizasyon yöntemlerini hem su hemde deney ortamlarında ayrı ayrı gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca, yine aşağıdaki tabloda görüldüğü gibi nanopartikül toksisitesinin değerlendirildiğı ekotoksikite çalışmalarının ilk yıllarında yüksek yapılı organizmalar yerine daha çok fungus, maya, vektör ve bakteri gibi organizmalar ile hücre, hücre hattı gibi *in vivo* çalışmalar terih edilmiştir. Aşağıdaki tabloda ekotoksikite deneylerinde kullanılan nanopartikül karakterizasyon yöntemleri ve karakterize edilen deney ortamları kronolojik olarak verilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Nanopartikül karakterizasyon yöntemlerinin değerlendirildiğı bazı ekotoksikite çalışmalar

Nanopartikül	İndikatör organizma	Karakterizasyon yöntemleri	Karakterize edilen ortam	Araştırmaçı ve yılı
Ag NP	Maya suşu MKY3	TEM, XRD, XPS, UV-Vis ve WAXS	Distile su	Kowshik ve ark., 2002 [50]
Kitosan-DNA NP	Mezenkimal kök hücreler İnsan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293) İnsan osteosarkom hücreleri (MG63)	TEM, AFM, fFluorescamine ve PicoGreen analizleri	-	Corsi ve ark., 2003 [51]
Au NP	<i>Thermomonospora sp.</i> (aktinomiset)	TEM	-	Ahmad ve ark., 2003 [52]
Kitosan-Florescein NP	Tavşan kornea ve konjunktival epitel	TEM, PCS* ve LDA*	Distile su	De Campos ve ark., 2004 [53]
Ag, Al, MoO ₃ , MnO ₂ , Fe ₃ O ₄ , TiO ₂ , CdO,	Sıçan karaciğer hücreleri	-	-	Hussain ve ark., 2005 [54]
TiO ₂ NP	<i>Desmodesmus subspicatus</i> (alg) <i>Daphnia magna</i> (su piresi)	-	-	Hund-Rinke ve Simon 2006 [55]
Fulleren, C60	<i>Pimephales promelas</i> (balık) <i>Daphnia magna</i> (alg)	-	-	Zhu ve ark., 2006 [56]
TiO ₂ , ZnO, Fe ₃ O ₄ , Al ₂ O ₃ , CrO ₃	Fare neuro-2A hücreleri	TEM	Deiyonize su	Jeng ve Swanson 2006 [57]
ZnO, Bulk ZnO, ZnCl ₂	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (alg)	DLS, TEM, Dengeleme diyalizi	Saf su	Franklin ve ark., 2007 [58]
Ag NP	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (alg)	DLS, Zeta potansiyeli ve TEM	Deney ortamı	Navarro ve ark., 2008 [59]
Cu NP	<i>Phaseolus radiatus</i> (fasulye) <i>Triticum aestivum</i> (buğday)	TEM	-	Lee ve ark., 2008 [60]
Cu, ZnO, TiO ₂ NP	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (alg)	-	-	Aruoja, ve ark., 2009 [61]
CeO ₂ NP	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (alg) <i>Daphnia magna</i> (su piresi) <i>Thamnocephalus platyurus</i> (kabuklu) <i>Danio rerio</i> (balık)	NİA*, Zeta potansiyeli ve XANES*	Deney ortamları ve deiyonize su	Hoecke ve ar., 2009 [62]
Ag NP	<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematod)	TEM, DLS ve karanlık alan mikroskopu	Deney ortamı	Roh ve ark., 2009 [63]

CeO ₂ , SiO ₂ , TiO ₂ NP'leri	<i>Chironomus riparius</i> <i>Daphnia magna</i>	TEM ve BET*	Deney ortamı	Lee ve ark., 2009 [64]
ZnO, CuO, TiO ₂	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	Kasemets ve ark., 2009 [65]
ZnO, CeO ₂	<i>Glycine max</i> (soya fasulyesi)	XRD, ICP-OES, XAS	CeO ₂ NP için saf HNO ₃ + H ₂ O ₂ (1:4), ZnO NP için Saf HNO ₃	López-Moreno ve ark., 2010 [66]
Au NP	<i>Oryzias latipes</i> (balık)	TEM, DLS ve ICP-MS	Su ortamı	Zhu ve ark., 2010 [67]
<i>Eclipta prostrata</i> yaprak özütü ile gümüş nanopartiküllerin sentezi	<i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Anopheles subpictus</i> (filariasis ve sıtma vektörleri)	XRD, FTIR ve SEM	Deney ortamı	Rajakumar ve Rahuman 2011[68]
<i>Nelumbo nucifera</i> yaprak özütü ile Ag NP'lerin sentezi	<i>Anopheles subpictus</i> <i>Culex quinquefasciatus</i>	XRD, FTIR, SEM, UV – Vis	Deney ortamı	Santhoshkumar ve ark., 2011 [69]
<i>Mimosa pudica</i> yaprak özütü ile Ag NP'lerin sentezi	<i>Anopheles subpictus</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	XRD, FTIR, SEM ve UV-Vis	Deney ortamı	Marimuthu ve ark., 2011 [70]
Silika NP	Makrofaj (J774) ve fibroblast (3T3) hücre hattı	TEM, DLS	Deney ortamı	Rabolli ve ark., 2011 [71]
ZnO NP	<i>Lymnaea luteola</i> (Tatlı salyangozu)	UV-Vis, XRD, TEM ve DLS	Saf su ortamı	Ali ve ark., 2012 [72]
TiO ₂ NP	<i>Chlorella vulgaris</i> (alg) <i>Daphnia magna</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (diatom) <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Linum usitatissimum</i> (bitki)	Zeta potansiyeli, TEM ve XRD	Deney ortamı	Clément ve ark., 2013 [73]
Ag NP	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> <i>Daphnia magna</i> Sıçan fibroblast hücre hattı Balb/3T3	EDX, TEM, SEM ve Zeta potansiyeli ve UV-Vis	Deney ortamı ve ultra saf su	Ivask ve ark., 2014 [74]
Ag NP	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , <i>Daphnia magna</i> , <i>Danio rerio</i>	DLS, TEM ve EDX	Deney ortamı	Ribeiro ve ark., 2014 [75]
Bor NP	<i>Apis mellifera</i> ,	-	-	Dağlıoğlu ve ark., 2015 [76]
Silika NP'leri	A549, HepG2 epitel hücreleri, NIH/3T3 fibroblast hücreleri	TEM, SEM, DLS ve BET	Deney ortamı ve deiyonize su	Kim et al., 2015 [77]
PT/PVF ⁺ NP'leri	<i>Artemia salina</i> (Zooplankton)	-	-	Dağlıoğlu ve Çelebi 2015 [78]
TiO ₂ , ZnO-TiO ₂ and Ag-TiO ₂	<i>Apis mellifera</i> (Arı)	SEM	-	Özkan ve ark., 2015 [79]
Cu ve ZnO	<i>Daphnia magna</i>	TEM, ICP-OES ve DLS,	Deney ortamı	Xiao ve ark., 2015 [80]
ZnO NP	<i>Chlorella vulgaris</i> (Alg)	EDX, XRD, EDAX, FE-SEM, FTIR, ve KMA	Deney ortamı	Suman ve ar., 2015 [81]
Ag, ZnO, TiO ₂ NP	<i>Daphnia magna</i>	Zeta potansiyeli ve SEM	Deney ortamı, ultra safsu	Cupi ve ark., 2015 [82]
Pd/PVF ⁺ NP	<i>Apis mellifera</i>	-	-	Dağlıoğlu ve ark., 2015 [83]
Bor NP	<i>Desmodemus multivariabilis</i> (Alg)	-	-	Dağlıoğlu ve Öztürk 2016 [84]
ZnO-TiO ₂	<i>Artemia salina</i>	SEM ve DLS	Distile su	Dağlıoğlu ve ark., 2016 [85]
<i>Centroceras clavulatum</i> 'dan sentezlenmiş Ag NP	<i>Aedes aegypti</i> (sivrisinek)	UV-Vis, FTIR, XRD, SEM, EDX ve zeta potansiyeli	Deney ortamı	Murugan ve ark., 2016 [86]

TiO ₂ , AgTiO ₂ NP	<i>Artemia salina</i>	SEM ve DLS	Distile su	Özkan ve ark., 2016 [87]
PVA-AgNP, cit-Ag NP	İnsan hepatoblastoma (HepG2) hücreleri	TEM, ICPMS ve Zeta potansiyeli,	Deney ortamı	Vrček ve ark., 2016 [88]
Si NP'leri	<i>Zea mays</i> (Mısır)	EDX, XRD ve SEM,	Distile su	Tripathi ve ark., 2016 [89]
(ZnO-TiO ₂) _{NCM} NP'leri	<i>Desmodemus multivariabilis</i> (Alg)	TEM ve DLS	Distile su	Dağlıoğlu ve Öztürk 2017 [90]
PT/PVF ⁺ NP'leri	<i>Apis mellifera</i> (arı)			Dağlıoğlu ve ark., 2016 [91]
Pd/PVF ⁺ NP'leri	<i>Artemia salina</i> (Zooplankton)	-	-	Dağlıoğlu ve ark., 2016 [92]
TiO ₂	<i>Lemna minor</i> (sucul bitki)	-	-	Dağlıoğlu ve Türk 2017 [93]
Bor NP'leri	<i>Myriophyllum spicatum</i> (sucul bitki)	-	-	Dağlıoğlu ve Türk 2017 [94]

*Geniş açılı X-ışını kırınımı (WAXS), Nanopartikül izleme analizi (NIA), X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), Yüzey karakterizasyonu (BET), Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM), X-ışını spektroskopisi (EDX), Lazer doppler anemometri (LDA), X-ışını emilimi yakın kenar yapısı (XANES), Konfokal mikroskop analizi (KMA).

II. TARTIŞMA

Temel olarak nanopartiküllerin (NP'lerin) ekotoksitesitesini belirlemek mümkündür. NP'ler spesifik NP'lerin özelliklerine bağlı olarak çeşitli ekotoksikolojik etkiler gösterebilir. Deney ortamlarında NP'lerin hazırlanması, doz/konsantrasyonlarının belirlenmesi ve uygulanması ortamdaki nanopartiküle maruz kalmanın potansiyel zararlı etkilerinin araştırılmasında önemli faktörler arasındadır. Buna ilaveten, NP'lerin çeşitli fizikokimyasal özelliklerinden biri olan agregasyon eğilimi ise, kimyasal çevreye bağlı olarak toksisiteyi etkileyen önemli bir faktördür. Bu eğilimlerinden dolayı, NP'lerin ekotoksitesite çalışmalarında kullanılan deney ortamlardaki agregasyon durumları diğer özelliklere nazaran daha önemli hale gelmiştir. Tam ve doğru nanopartikül karakterizasyonunun, biyolojik sistemlerde NP'lerin potansiyel toksitesitesini değerlendirmenin önemli bir parçası olduğu görüşü genel kabul görmüştür [2, 94].

Nanopartiküllerin doğru karakterizasyonu, sonuçların tekrarlanabilir olmasını ve ayrıca biyolojik etkilerini belirleyen NP'lerin özelliklerini anlamının temelini sağlamak için önemlidir. Bununla birlikte, nanopartikül karakterizasyon yöntemlerinde araştırmacılar tarafından genellikle kabul edilen bir takım temel özellikler bulunmaktadır [95-97]. Bunlar nanotoksitesite çalışmalarında kullanılan NP'ler için ölçülmesi gereken minimum özelliklerin temelini oluşturmaktadır [98]. Genellikle ekotoksitesite deneylerinde nanopartikül özelliklerini ve bunların biyolojik sistemler ile etkileşimlerini ölçmede belli başlı nanopartikül karakterizasyon teknikleri/yöntemleri kullanılmıştır. NP'lerin fiziko-kimyasal özellikleriyle ekotoksitesite arasındaki ilişkiyi araştırmak için genellikle NP'lerin birincil karakterizasyon yöntemleri arasında yüzey alanı ve yüzey alanı hakkında bilgi veren Branauer, Emmett ve Teller (BET) ve geçirirli elektron

mikroskopisi (TEM) dir. Nanopartiküller için yüzey alanı, genelde BET yöntemi kullanılarak ölçülür. BET, yüzey alanı gözeneksiz küresel bir modele dayanan tahmini bir ortalama boyut sağlar. 100 nm ve altında partikül sistemlerine uygulanabilen agregat boyutlandırma tekniklerinden birisidir. Genelde nominal boyut aralığı 5 nm'den birkaç mikrona kadar olan partiküller analiz edilebilir. Çoğu sistem için basit ve uygulanabilir. Dezavantajı ise partikül boyutu, gözeneksiz monodispers (tek dağılımlı) küresel bir modele dayalı olarak tahmini bir ortalama boyut vermesidir [98-99]. Elektron mikroskopisi (TEM), nominal boyut aralığı 0.3 nm'den birkaç mikrona kadar olan nanopartiküllerde iyi çözünürlük ve görüntüleme sağlar. Yüksek çözünürlüklü mikroskopi, numune hazırlamanın veya özel analiz koşullarının neden olduğu artefaktlara sebep olur. Örneğin, TEM, elektron demetinin numuneye nüfuz edebilmesi için yüksek vakum ve ince numune kesitleri veya sınırlı çaplı partiküller gerektirir. TEM, NP'lerin morfolojik şekli ve boyutu hakkında bilgi sağlar ve neredeyse ekotoksitesite deneylerinin tamamında NP'lerin morfoloji ve boyutlarını göstermek için rutin şekilde uygulanır. Örneğin, Lee ve ark., deney ortamında test edilen NP'lerin TEM görüntüleri ile boyut farkını göstermiştir. Aynı zamanda BET yüzey alanları daha küçük boyutlu CeO₂ ve TiO₂ NP'lerinin daha büyük yüzey alanlarına sahip olduğunu göstermiştir [64].

Nanopartiküllerin yaygın olarak, kristal yapısı X-ışını kırınımı (XRD) kullanılarak araştırılır [100]. Nano materyalin bileşimi/kompozisyonu ise, tipik olarak, enerji dağıtıcı X-ışını (EDX) spektroskopisi ve/veya X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) kullanılarak araştırılır [100-101]. XPS, daha yüzey hassas bir tekniktir ve materyaldeki elementlerin oksidasyon durumu hakkında bilgi sağlayabilir. EDX ve XPS'in tipik olarak >% 0.1 aralıktaki yabancı

madde seviyelerine karşı oldukça hassastır [100]. Kowshik ve ark., 2-5 nm boyut aralığındaki Ag NP'lerini gümüşe toleranslı maya türü MKY3 tarafından ekstraselüler olarak sentezlemişlerdir. TEM, XRD ve XPS analizleri sonucu metalik (elemental) Ag NP'lerinin oluştuğunu doğrulamıştır. Ek olarak, NP'lerin partikül boyutunun yanı sıra nanopartikül yapısını belirlemek için geniş açılı x-ışını kırınımı (WAXS) analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada XPS'nin, nanopartikülün kimyasal bileşiminin tahmin edilebilmesi için güçlü ve doğru bir teknik olmasından dolayı kullanılmış ve numunede C, O, N ve P ile birlikte Ag'nin bulunduğu görülmüştür. C, N, O ve P'nin varlığı muhtemelen numunedeki kontaminant proteinlerin ve diğer biyopolimerlerin varlığına bağlı olduğunu kaydetmişlerdir. Bununla birlikte, numunede Ag₂O veya Ag₂S görülmemiş ve bu sonuçlar aynı zamanda WAXS ve TEM analizinden elde edilmiştir. Mevcut araştırmalar, yüksek saflıkta Ag NP'lerinin mikrobik yolla sentezlendiğini göstermiştir. Bununla birlikte, XRD analizinde büyük partiküllerin geniş dağılımı ve baskınlığı nedeniyle daha küçük partiküllerin yapısal ayrıntıları hakkında sonuç alınamamıştır [50]. Bunu haricinde nanopartikül bileşiminin daha kesin analizleri için, NP'ler asitle digeste edildikten sonra atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS), indüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektroskopisi (ICP-OES), daha düşük konsantrasyonda (tipik olarak ppm seviyesinde) saf olmayanları tespit edebilen endüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) kullanılabilir [102-103]. Ayrıca, ICP-MS, nanopartikül alımını incelemek için nanopartiküle maruz bırakılan organizmaların veya doku örneklerinin analizine ve ayrıca NP'lerden metal iyonu salınımının miktar analiz için de uygulanabilir [102,104]. Lopez-Moreno ve ark., dokulardaki metal konsantrasyonu ve oksidasyon durumu ile ilgili verileri sırasıyla ICP-OES ve X-ışını absorpsiyon spektroskopisi (XAS) kullanılarak elde etmişlerdir. XAS verileri CeO₂ NP'lerindeki Ce'nin oksidasyon durumuna sahip olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, bu çalışmada, XAS analizi soya fasulyesi fidelerindeki CeO₂ NP'lerinde herhangi bir değişiklik olmadığını göstermiştir. Yine bu çalışmada ICP analizleri, ZnO NP'leri için % 100.0±3.0 ve CeO₂ NP'leri için % 98.0±0.2 saflıkta olduğunu göstermiştir. Çinko için sertifikalı referans materyalin ICP-OES verileri bu çalışmanın sonuçlarını % 99 doğrulamıştır. Ayrıca, soya fidelerinin Zn ve Ce alımlarında oldukça farklı olduğu kaydedilmiştir [66].

Ekotoksikite çalışmalarında zeta potansiyel ölçümü, NP'lerin ve bakteri hücrelerinin (genellikle negatif yüklü yüzeye sahip olduğu) ve düşük çözünürlüklü NP'lerdeki toksikite öncüsünün arasındaki etkileşim gücünün önemli bir öngörücüsü olarak tespit edilmiştir [105-106]. Bununla birlikte, literatürde zeta potansiyelleri her zaman

bildirilmemiştir. Zeta potansiyelleri, pH'ın, çözeltinin iyonik mukavemetinin ve yüzey kaplamaların varlığından etkilenir [105]. Ayrıca, çelişkili sonuçlarda bildirilmiştir, örneğin, partikül alımı ve protein adsorpsiyonu partikül yüküyle (negatif yüklü partiküllerin tercihi alınması) ilişkili olduğu bulunmuştur [104]. Bununla birlikte, negatif zeta potansiyelleri, negatif yüklü bakteri hücre duvarı ile daha zayıf bir etkileşime sahipken, P25 titanyum gibi toksikliği bilinen nanopartikül için de rapor edilmiştir [107-108]. Bu nedenle, zeta potansiyeli ve nanopartikül-hücre etkileşimi arasındaki ilişki tam olarak açık değildir [105]. NP'lerin zeta potansiyelleri tipik olarak elektroforez veya elektroakustik yöntemlerle ölçülür. Literatürdeki çalışmaların çoğu, ışık saçılım elektroforezi ölçümünü benimsemiştir çünkü ticari tam otomatik aletler piyasada yaygın olarak bulunmaktadır [103,108]. Zeta potansiyeli, numunenin konsantrasyonu, pH, ölçüm sıcaklığı ve dispersiyon ortamı bileşiminden önemli ölçüde etkilenir [103,109-113].

Ekotoksikite deneylerinde UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi, belirli bir ışık dalga boyuyla aydınlatmanın fotokatalitik reaksiyonlara bağlı olarak ilave toksik etki oluşturup oluşturmayacağını incelemek için yararlı olan, nanopartikülün bant açısını belirlemek için kullanılabilir [100-101]. Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR), adsorbatların nanomateriyal yüzey üzerindeki varlığını karakterize etmek için kullanılabilir [114]. Adsorbatlar, ortamdaki numuneler için ortak olan suyun yanı sıra kasıtlı olarak katılan yüzey düzeltici/kaplayıcı ajanlar yada nano materiyal sentezi sırasında istenmeden verilmiş olan adsorbat/ reaksiyona girmemiş reaktifler içerebilir [103,114]. Marimuthu ve ark., çalışmalarında *Mimosa pudica* yapraklar özütü ile Ag NP solüsyonunun sentezi ve çözeltielerde Ag⁺ iyonlarının biyolojik olarak indirgenmesi, UV-vis spektrumlarının ölçülmesi ile izlemişlerdir. Ag NP'lerinin sentezi öncesinde ve sonrasında alınan yaprak özütlerinin FTIR spektrumu analiz edilmiş ve Ag NP'lerinin oluşması için olası fonksiyonel gruplar tartışılmıştır. *M. pudica* yaprak özütü tarafından üretilen Ag NP'leri daha belirgin ve dağınık dağılmış ve FTIR spektrumları belirgin pikler sergilemiştir [70].

NP'lerin agregasyon durumu, toksik aktivitelerinin deneysel olarak değerlendirilmesi için ekotoksikite çalışmalarında önemli bir zorunluluk olmuştur. Bu konu nanotoksikolojide yoğun tartışmalara neden olmuş ve bunu için İki farklı yaklaşım düşünülmüştür. İlki, elementer/birincil dağılımlı NP'lerin kendi özelliklerinin toksikolojik etkilerini araştırmak üzere incelemek, ikincisi ise risk değerlendirilmesi amaçları için önemli olduğundan organizmaların maruz kaldığı NP'lerin agregat ve/veya agregasyon durumlarının öncelikli olarak incelemektir [71]. Ekotoksikite çalışmalarında, deneysel koşullarda (deney ortamlarında) NP'lerin gerçek

agregasyon durumunun değerlendirilmesi bu sebeplerle gerekir ve bunun için dinamik ışık saçılması (DLS) gibi teknikler önerilir [115]. DLS, nominal boyutu 4 nm–6 µm arasında olan partiküller için uygulanabilir. Bu yöntemin avantajı zeta potansiyeli için de kullanılabilir olmasıdır. Dezavantajı ise boyut dağılımı genişledikçe daha az güvenilir olmasıdır [116-117]. Ayrıca, dispersiyonu arttıran fakat NP özelliklerini de değiştiren ajanlar (deterjanlar, proteinler, serum vs.) ve/veya prosedürlerin (örneğin sonikasyon) kullanılması, toksisite üzerine agregasyonun etkisinin kesin sonucuna varılmasını engellemektedir [71,115, 118-119].

Nanopartikül agregasyonunun toksisite üzerine etkisinin detaylı değerlendirildiği bir çalışmada dispersiyon ajanları olmaksızın kararlı monodispers ve agregat silikon tabanlı nanopartiküllerin (SNP) sitotoksik aktivitesi karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, çalışmada SNP'nin dikkatle kontrol edilen agregatları indüklenmiş ve iki tip hücre hattı, SNP'nin monodispers veya agregatlarca zenginleştirilmiş süspansiyonlarına maruz bırakılmıştır. DLS ile NP'lerin ortalama hidrodinamik çapının agregasyonu takiben 25 nm'den 183 nm'ye yükseldiği görülmüştür [71].

Tablo 2'de görüldüğü gibi 2007 yılına kadar yapılan birçok ekotoksikolojik çalışmalarda NP'lerin karakterizasyonu genel olarak eksik yada yapılmamıştır. Bu tarihten sonraki yapılan çalışmalarda nispeten artan sayıda karakterizasyon yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Öncelikli olarak karakterizasyon yöntemlerinde TEM sonra DLS daha sonrada XRD kullanılmaya başlanmıştır. Günümüze gelindiğinde ise ekotoksikite deneylerinde kullanılan karakterizasyon yöntemlerinin sayısı ve çeşitliliği artmıştır. Örneğin UV-vis, FTIR, ICP-OES, DLS ve EDX gibi karakterizasyon yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca, NP'lerin agregasyon kabiliyeti göz önüne alındığında, tek başına nominal (birincil/gerçek) partikül boyutunu sağlayan çalışmalar spesifik nanopartikül riskleri için yetersiz kalması muhtemeldir. Çünkü belli bir sistemde NP'lerin agregasyon derecesi NP'lerin hücrelere alımını büyük ölçüde etkiler. Nanopartiküllerin ekotoksikitesi üzerine yapılan güvenilir araştırmalar NP'lerin uygun bir şekilde karakterizasyon değerlendirmelerini ve sulu (deney) ortamları hakkında temel fizikokimyasal bilgileri sağlar. Çünkü, sulu sistemlerde çözelti pH'sı ve adsorbe moleküllerin ve iyonların varlığı, yüzey yüklerini değiştirir ve NP'lerin agregasyon davranışlarını kuvvetlice etkiler. De Campos ve ark., çalışmalarında o yıllarda yapılan ekotoksikite deneylerinden farklı olarak nanopartikül karakterizasyonunda XPS ve lazer Doppler anemometre kullanılmıştır. Ayrıca, bu çalışma o yıllarda yapılan ekotoksikite deneyleriyle kıyaslandığında nadiren nanopartikül karakterizasyonun yapıldığı çalışmalardandır [53]. Corsi ve ark., optimum sentez koşullarını belirlemek için kitosan ve DNA

arasındaki bağlanma derecesinin değerlendirilmesi için polimer üzerindeki serbest amino gruplarını ve süpernatandaki bağlanmamış DNA'yı ölçen tamamlayıcı teknikler olarak fluorescamine ve PicoGreen analizlerini kullanmışlardır [51]. Hoecke ve ark., yaptıkları çalışmalarında nanopartikül karakterizasyonunun ekotoksikite deneylerindeki önemi açıklayan ender çalışmalardan bir tanesidir. Buna göre, nanopartikül boyutu dağılımlarını nanopartikül izleme analizi (NIA) kullanılarak elde etmişlerdir. İlk olarak CeO₂ NP dağılımları pH 4'te seyreltilmesiyle incelenmiş ve NP'lerin küçük agregaları (14, 20 ve 29 nm) içerdiği ve ortalama boyutunun yaklaşık 100 nm olduğu görülmüştür. Bu agregatlar şaşırtıcı değildir, çünkü NP'ler sentez sırasında kurutulmuş ve digeste ile yeniden süspansiyon edilmiştir. NP'ler kurutulurken agregasyon oluşturmaları kaçınılmazdır ve digeste gibi mekanik işlemler nanopartikül agregalarını bir arada tutan kuvvetleri aşamaz. Ayrıca, numune hazırlama, ekotoksikolojik değerlendirme için önemlidir. Çünkü bu işlem, NP'lerin endüstriyel uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Çeşitli test ortamlarında seyreltikten ve pH 7.4'e ayarlanmasını takiben süspansiyonlar bir saat içinde bulanıklaşmış ve nanopartikül agregaları yaklaşık 400 nm çapa ulaşmıştır. Dolayısıyla, organizmalar ekotoksikite deneylerinde agregat haldeki CeO₂ NP'ne maruz kalırlar. Ayrıca, çalışmalarında, farklı deney ortamlarında analiz edilen nanopartikül boyut dağılımlarının çakıştığını kaydetmişlerdir. 14, 20 ve 29 nm CeO₂ NP agregalarının zeta potansiyelini, OECD alg ortamında ve M4 *Daphnia* ortamında incelemişlerdir. Buna göre NP'ler pH 7.4'te deney ortamında negatif yüzey yükü taşıırken, 10 mM KCl çözeltisinde yüzey yükü pH 7.4'te pozitif olduğunu kaydetmişlerdir. Yüzey yükünün değişimi, öncelikli olarak CeO₂ NP'lerin fosfat iyonlarını adsorbe etme eğilimi ile ve İkinci olarak NP'lerin düşük iyonik ortamda daha yüksek yük taşımalarıyla açıklanmışlardır. İstatistiksel analiz sonucunda, OECD ve M4 ortamında dağılmış NP'ler arasındaki zeta potansiyel farkları her CeO₂ NP boyutu için anlamlı olduğunu kaydetmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar aynı NP'leri kullanırken bile ortam bileşimindeki değişiklikler nedeniyle nanopartikül özelliklerinde farklılıkların ortaya çıkabileceğini açıkça ortaya koymuşlardır [62].

Navarro ve ark., Ag NP'nin orijinal partikül süspansiyonunda (deneysel koşullarda) partikül boyutu ölçümlerinde (DLS) partikül boyutunun 10 nm'den 200 nm'ye kadar değişmekte olduğunu ve ortalama partikül çapının ise 40 nm olduğunu kaydetmiştir. Bununla birlikte, hacim bakımından, Ag NP'nin % 98'i 25 ±13 nm dir. TEM analizi bu sonuçları teyit etmiş ve ayrıca 10 nm'den küçük partiküller olduğu görülmüştür. Bu farklılıkların sebebinin ise, DLS ölçümlerinin daha büyük partiküllere yönelik eğilimi

ile açıklamışlardır. Ayrıca deneysel koşullar altında (MOPS) Ag NP'lerinin agregasyon oluşturmadığını kaydetmişlerdir [59]. Lee ve ark., çalışmalarında NP'lerin deney ortamındaki karakterizasyonunun ekotoksikite üzerindeki etkilerini açıklamaya çalışmışlardır. Çünkü, nanotoksikite ile bağlantılı olarak, sıklıkla boyutun küçülmesi toksisitenin daha güçlü olması şeklinde beklenir. Buna göre, BET yüzey alanları sonuçları, SiO₂ NP'leri hariç daha küçük boyutlu CeO₂ ve TiO₂ NP'lerinin daha büyük yüzey alanına sahip olduğunu göstermiştir. SiO₂ NP'lerinde böyle bir eğilim gözlenmemesinin muhtemel sebebi çok küçük boyut farklılıklarından (7 ve 10 nm) ve farklı fiziksel özelliklerinden (füme ve gözenekli tipten) dolayı olabilir [64].

III. SONUÇ

Nanoteknoloji, ekonomik büyüme alanı olan medikal ve üretim teknolojilerindeki muazzam gelişmeleri ile çevresel iyileştirmeleri vaad etmektedir. Hem nanoteknoloji endüstrileri hem de hükümetler bu yeni teknolojinin bir sonucu olarak insan sağlığı ve çevresel bozulmalar için öngörülen risklerin olasılığı üzerine ciddi önlemler almaktadır [1, 4, 41-43]. NP'lerin imalatının ve kullanımının dinamik bir şekilde büyümesine rağmen, eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak çevresel matrislerde nicelendirmeleri için çok az analitik yöntem bulunmaktadır. NP'lerin koloidal fazlar ve agregasyon oluşturma eğilimi farklı emme ve emilme özellikleri ile şekil ve boyut çeşitliliği

NP'lerin nicelleştirilmesini (miktar, sayısallaştırma) zorlaştırır [13, 19]. Ayrıca, mevcut bilimle, NP'ler ile doğal veya başka kaynaklardan gelen partiküllerin ayırt edilmesi çok zordur [34]. Doğal olarak ortaya çıkan partiküller ile NP'lerin ayırt edilmesinin yolu bulunmalıdır. Bu sayede NP'lerin tüketici ürünleri ve çevresel konsantrasyonlarının belirlenmesini sağlayacaktır. Bu nedenle, NP'ler için seçici tespit yöntemleri geliştirilmelidir. Tieda 2012'de bu sorunun çözümünün NP etiketlemesi olabileceğini belirtmiştir. Bu etiketleme, örneğin karbon temelli NP'ler için floresan ve radyoaktif etiketlemeden, metal tabanlı nanopartiküllerin izotop zenginleştirmesine veya tükenmesine kadar değişen etiketleme önerileridir. Ayrıca, deneysel bir çalışmadan sonra, özel partikül kaplamaları, nanotüpler veya fullerenlerde nadir elementlerin tutulması bu belirgin kimyasal özelliklerin saptanmasını sağlamak için kullanılabilir [15]. Farklı ortamlardaki NP'leri ölçerken, konsantrasyonlarla ilgili veriler sağlamak tek başına yeterli değildir, aynı zamanda NP'lerin boyut dağılımı ve özellikleri hakkında da bilgi gereklidir. Tek bir teknik tüm bu bilgileri sağlayamaz, bu nedenle bir dizi analitik teknik uygulaması gereklidir. Dahası, NP'lerin analizi için bir dizi yöntem uygulanabilirken,

mevcut yöntemler tüm veri gereksinimlerini karşılayamamaktadır [8]. Yukarıda da bahsedildiği gibi, NP'lerin karakterizasyonu için teorik olarak birçok analitik teknik/yöntem uygundur. Metroloji ve analitik kimyadan elde edilen sonuçların izlenebilirliğini sağlamak esastır. Niceleme için kullanılan kalibrasyon standartları genellikle birincil ulusal veya uluslararası standartlara göre izlenebilir. Bununla birlikte, NP için bu standartların geçerliliği diğer standartların çoğundan daha kısa bir ömre sahiptir ve çalışma koşullarına daha duyarlıdır. NP standartları veya referans malzemeleri hem süspansiyonlar hem de tozlar olarak mevcuttur. Süspansiyon içindeki NP standartları genellikle son kullanma tarihleri ve depolama talimatları ile etiketlenir. Bazen standartın bütünlüğünü korumak için standartın daha da seyreltilmesine ilişkin talimatlar da mevcuttur. Toz nanopartikül standartlarının kullanımı NP süspansiyonu için standart bir prosedür içermez. Her bir laboratuvar NP dispersiyonu yapıldığında üretici tarafından belirtilen orijinal metriğin belirsizliği artar. Nitekim, NP için yapılan bir çok metrik (boyut, şekil, vs.) dispersiyonun hangi ortamda (pH, iyonik kuvvet ve bileşim ve organik madde varlığı) yapıldığına kuvvetle bağlıdır. Bu metrik belirsizliği en aza indirmenin birkaç yolu vardır. Bunlardan biri, laboratuvarlar arası karşılaştırma yapmaktır. Örneğin, kör numuneler analiz için birçok laboratuvara gönderilir ve böylece elde edilen sonuçların karşılaştırılması bu sonuçların doğruluğunu ve hassasiyetini gösterir. Fakat, laboratuvarlar arası karşılaştırmalar, sertifikalı akreditasyonun sağlanması için klasik analitik kimyada olduğu gibi nano-metrolojide henüz yaygın değildir. Diğerleri ise, maruziyet/etki deneylerinin karakterizasyonundaki başarılı/uygun laboratuvar uygulamaları, minimal örnek perturbasyonu ve dispersiyon aglomerasyon durumunun belirlenmesini içermelidir [17, 44].

TEŞEKKÜR

Değerli babamız MURAT ÖZKAN'a eğitimimize gösterdiği emeklerinden dolayı teşekkür ederim. Nur içinde uyu, mekânın cennet olsun babacığım.

KAYNAKÇA

- [1] Moore, M.N. (2006). Do Nanoparticles Present Ecotoxicological Risks for the Health of the Aquatic Environment?. *Environmental International*. 32:967–976.
- [2] Royal Society And The Royal Academy Of Engineering, 2004.
- [3] Borm, P.J.A., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J. (2006). The Potential Risks of Nanomaterials: A Review Carried Out for ECETOC. *Particle Fibre Toxicol* 3.

- [4] Peter, H., Bruske-Hohlfeld, I., Salata, O. (2004). Nanoparticles – Known and Unknown Health Risks. *Journal of Nanobiotechnology*. 2 (1):12.
- [5] Pal, S., Tak, Y.K., 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*. *Appli Environ Microbiol*. 73:1712–1720.
- [6] Madden, A.S., Hochella, J. (2005). A Test of Geochemical Reaktivty As a Function of Mineral Size: Manganese Oxidation by Hematite Nanoparticles Promoted. *Geochim Cosmochim Acta*. 69:389–398.
- [7] Chau, C-F., Wu, S-H., Yen, G-C. (2007). The Development of Regulations for Food Nanotechnology Trends in Food. *Science & Technology*. 18.5: 269-280.
- [8] Tiede, K., Boxall, A.B.A., Tear, S.P., Lewis, J., David, H., Hasselov, M. (2008). Detection and Characterization of Engineered Nanoparticles in Food and the Environment. *Food Additives And Contaminants*. 25(7), 795-821.
- [9] Maynard AD. (2000). Overview of Methods for Analysing Single Ultrafine Particles *Philosophical Transactions of the Royal Society of London a: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 358.1775: 2593-2610.
- [10] Mavrocordatos, D., Pronk, W., Boller, M. (2004). Analysis of Environmental Particles by Atomic Force Microscopy, Scanning and Transmission Electron Microscopy. *Water Science and Technology*. 50.12: 9-18.
- [11] Palchoudhury, S., Baalousha, M., Lead, J. (2015). Methods for Measuring Concentration (Mass, Surface Area And Number) of Nanoparticles. DOI: 10.1016/B978-0-08-099948-7.00005-1.
- [12] Brunauer, S., Emmet, P.H., Teller, E. (1938). Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J Am Chem Soc*. 60:309–319.
- [13] Farre, M., Gajda-Schranz, K., Kantiani, L., Barceló, D. (2009). Ecotoxicity and Analysis of Nanomaterials in the Aquatic Environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393.1: 81-95.
- [14] Ledin, A., Karlsson, S., Düker, A., Allard, B. (1994). Measurements In Situ Of Concentration and Size Distribution of Colloidal Matter in Deep Groundwaters by Photon Correlation Spectroscopy *Water Research* 28.7: 1539-1545.
- [15] Tiede, K., Boxall, B.A.A., Tear, P.S., Lewis, J. (2008). David H., Hasselov M., Detection and Characterization of Engineered Nanoparticles in Food and The Environment. *Food Additives and Contaminants*. 25,7: 795-821.
- [16] Guzman, K.A.D., Finnegan, M.P., Banfield, J.F. (2006). Influence of Surface Potential on Aggregation and Transport of Titania Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* 40.24: 7688-7693.
- [17] Hasselov, M., Readman, J.W., Ranville, J.F., Tiede, K. (2008). Nanoparticle Analysis and Characterization Methodologies in Environmental Risk Assessment of Engineered Nanoparticles. *Ecotoxicology*. 17.5: 344-361.
- [18] Balnois, E., Papastavrou, G., Wilkinson, K.J. (2007). Force Microscopy and Force Measurements of Environmental Colloids. in: Wilkinson KJ, Lead JR (Eds) *Environmental Colloids and Particles: Behaviour, Structure and Characterization*. IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems. John Wiley and Sons, Chichester. Pp 405–468.
- [19] Ledin, A., Karlsson, S., Duker, A., Allard, B. (1994). Measurements in Situ of Concentration and Size Distribution of Colloidal Matter in Deep Groundwaters by Photon-Correlation Spectroscopy. *Water Res*. 28:1539–1545.
- [20] Lead, J.R., Wilkinson, K.J. (2006). Aquatic Colloids And Nanoparticles: Current Knowledge And Future Trends. *Environ Chem*. 3:159–1.
- [21] Hall, G.E.M. (1998). Relative Contamination Levels Observed In Different Types Of Bottles Used To Collect Water Samples. *Explorer*. 101:1–7.
- [22] Sugimoto, Y., Pou, P., Abe, M., Jelinek, P., Perez, R., Morita, S. (2007). Chemical Identification Of Individual Surface Atoms By Atomic Force Microscopy. *Nature*. 446.7131: 64-67.
- [23] Trevethan, T., Shluger, A.L. (2007). Building Blocks For Molecular Devices: Organic Molecules on the MgO (001) Surface the *Journal of Physical Chemistry C* 111.42: 15375-15381.
- [24] Warheit, D.B., Laurence, B.R., Reed, K.L., Roach, D.H., Reynolds, G.A., Webb, T.R. (2004). Comparative Pulmonary Toxicity Assessment Of Single-Wall Carbon Nanotubes In Rats. *Toxicological Sciences*. 77, 117–125.
- [25] Colvin, V.L. (2003). The Potential Environmental Impact Of Engineered Nanomaterials *Nature Biotechnology* 21.10: 1166-1170.
- [26] Bootz, A., Vogel, V. (2004). Comparison Of Scanning Electron Microscopy, Dynamic Light Scattering And Analytical Ultracentrifugation For The Sizing Of Poly(Butyl Cyanoacrylate) Nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. 57(2):369–375.
- [27] Nurmi, J.T., Tratnyek, P.G., Sarathy, V., Baer, D.R., Amnette, J.E., Pecher, K., Wang, C.M., Linehan, J.C., Matson, D.W., Penn, R.L. (2005). Characterization and Properties of Metallic Iron Nanoparticles: Spectroscopy, Electrochemistry, and Kinetics. *Environ Sci Technol*. 39:1221–1230.
- [28] Ho, C.S., Lam, C.W.K., Chan, M.H.M., Et Al. (2003). Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clinical Biochemistry Review*, Vol. 24, Pp. 3–12.
- [29] Holt, M.S., Fox, K., Griebach, E., Johnsen, S., Kinnunen, J., Lecloux, A., Murray-Smith, R., Peterson, D.R., Schroder, R., Silvani, M., Ten Berge, W.F.J., Toy, R.J., Feijtel, T.C.M. (2000). Monitoring, Modelling And Environmental Exposure Assessment of Industrial Chemicals In The Aquatic Environment. *Chemosphere*. 41:1799–1.

- [30] Crane, M., Handy, R.D. (2007). An Assessment of Regulatory Testing Strategies and Methods for Characterizing The Ecotoxicological Hazards of Nanomaterials, Report For Defra, London, UK. Available At: 2007, [Http://Randd.Defra.Gov.Uk/Document.aspx?Documentid=2270](http://Randd.Defra.Gov.Uk/Document.aspx?Documentid=2270).
- [31] E.P.A. (2007). Nanotechnology White Paper, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. [Http://Es.Epa.Gov/Ncer/Nano/Publications/Whitepaper12022005.Pdf](http://Es.Epa.Gov/Ncer/Nano/Publications/Whitepaper12022005.Pdf).
- [32] SCENIHR. (2005). Opinion On The Appropriateness of Existing Methodologies to Assess The Potential Risks Associated With Engineered and Adventitious Products of Nanotechnology. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, European Commission. [Http://Ec.Europa.Eu/Health/Ph_Risk/Committees/04_Scenihr/Docs/Scenihr_O_003b.Pdf](http://Ec.Europa.Eu/Health/Ph_Risk/Committees/04_Scenihr/Docs/Scenihr_O_003b.Pdf).
- [33] Kim, J.I., Walther, C. (2007). Laser Induced Breakdown Detection (LIBD). In: Wilkinson KJ, Lead JR (Eds) Environmental Colloids and Particles: Behaviour, Structure And Characterization. IUPAC Series on Analytical And Physical Chemistry Of Environmental Systems. John Wiley and Sons, Chichester. Pp 555–612.
- [34] Burleson, D.J., Driessen, M.D., Penn, R.L. (2004). On The Characterization of Environmental Nanoparticles. *J Environ Sci Health A*. 39:2707–2753.
- [35] Gimbert, L.J., Worsfold, P.J., Haygarth, P.M. (2007). Processes Affecting Transfer Of Sediment and Colloids, With Associated Phosphorus, From Intensively Farmed Grasslands: Colloid and Sediment Characterization Methods. *Hydrol Processes*. 21:275–279.
- [36] Mavrocordatos, D., Perret, D., Leppard, G.G. (2007). Strategies And Advances in the Characterization of Environmental Colloids by Electron Microscopy. in: Wilkinson KJ, Lead JR, Editors. Environmental Colloids And Particles: Behaviour, Structure and Characterization. Chichester: Wiley. Pp. 345–404.
- [37] Ito, T., Sun, L., Henriquez, R.R., Crooks, R.M. (2004). A Carbon Nanotube-Based Coulter Nanoparticle Counter. *Accounts of Chemical Research*. 37.12: 937-945.
- [38] McMurry, P.H., Litchy, M., Huang, P.F., Cai, X.P., Turpin, B.J., Dick, W.D., Hanson, A. (1996). Elemental Composition And Morphology Of Individual Particles Separated By Size And Hygroscopicity With The TDMA. *Atmos Environ*. 30:101–108.
- [39] Weber, A.P., Baltensperger, U., Gaggeler, H.W., Schmid-tott, A. (1996). In Situ Characterization and Structure Modification of Agglomerated Aerosol Particles. *J Aerosol Sci*. 27:915–929.
- [40] Okada, Y., Yabumoto, J., Takeuchi, K. (2002). Aerosol Spectrometer For Size and Composition Analysis of Nanoparticles. *J Aerosol Sci*. 33:961–965.
- [41] Colvin, V.L. (2003). The Potential Environmental Impact of Engineered Nanomaterials. *Nat Biotechnol*. 21:1166–70.
- [42] Howard, C.V. (2004). Small Particles — Big Problems. *Int Lab News*. 34(2):28–9.
- [43] Perkel, J.M. (2004). Nanoscience Is Out of the Bottle. *The Scientist*. 17(15):20–3.
- [44] Aitken, R.J., Hankin, S.M., Tran, C.L., Donaldson, K., Stone, V., Cumpson, P., Jhonstone, J., Chaudhry, Q., Cash, S. (2007). REFNANO: Reference Materials for Engineered Nanoparticle Toxicology And Metrology Final Report on Project CB01099. London: IOM.
- [45] Tejamaya, M., Roemer, I., Merrifield, R.C., Lead, J.R. (2012). Stability Of Citrate, PVP, And PEG Coated Silver Nanoparticles In Ecotoxicology Media. *Environ Sci Technol*. 46:7011-7017.
- [46] Hartmann, G., Schuster, M. (2013). Species Selective Preconcentration And Quantification Of Gold Nanoparticles Using Cloud Point Extraction And Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Anal Chim Acta*. 761:27-33.
- [47] Reipa, V., Purdum, G., Choi, J. (2010). Measurement of Nanoparticle Concentration Using Quartz Crystal Microgravimetry. *J Phys Chem B*. 114:16112-16117.
- [48] Baalousha, M., Nur, Y., Roemer, I., Tejamaya, M., Lead, J.R. (2013). Effect Of Monovalent And Divalent Cations, Anions And Fulvic Acid on Aggregation of Citrate-Coated Silver Nanoparticles. *Sci Total Environ*. 454:119-131.
- [49] Mitrano, D., Ranville, J., Neubauer, K., Thomas, R. (2012). Field-Flow Fractionation Coupled With ICP-MS For The Analysis of Engineered Nanoparticles in Environmental Samples. *Spectroscopy*. 27:36-44.
- [50] Kowshik, M., Ashtaputre, S., Kharrazi, S., Vogel, W., Urban, J., Kulkarni, S.K., Paknikar, K. M. (2002). Extracellular Synthesis Of Silver Nanoparticles By A Silver-Tolerant Yeast Strain MKY3. *Nanotechnology*, 14(1), 95.
- [51] Corsi, K., Chellat, F., Yahia, L.H., Fernandes, J. C. (2003). Mesenchymal Stem Cells, MG63 And HEK293 Transfection Using Chitosan-DNA Nanoparticles. *Biomaterials*, 24(7), 1255-1264.
- [52] Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M.I., Kumar, R., Sastry, M. (2003). Extracellular Biosynthesis of Monodisperse Gold Nanoparticles By A Novel Extremophilic Actinomycete, *Thermomonospora Sp*. *Langmuir*, 19(8), 3550-3553.
- [53] De Campos, A.M., Diebold, Y., Carvalho, E.L., Sánchez, A., Alonso, M.J. (2004). Chitosan Nanoparticles As New Ocular Drug Delivery Systems: *in vitro* Stability, *in vivo* Fate, and Cellular Toxicity. *Pharmaceutical Research*, 21(5), 803-810.
- [54] Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T., Schlager, J.J. (2005). *In Vitro* Toxicity of Nanoparticles in BRL 3A Rat Liver Cells. *Toxicology In Vitro*, 19(7), 975-983.
- [55] Hund-Rinke, K., Simon, M. Ecotoxic Effect of Photocatalytic Active Nanoparticles TiO_2 on Algae and Daphnids. *Environ. Sci. Pollution Res*. 2006, 13, 225–232.
- [56] Zhu, S., Oberdörster, E., Haasch, M.L. (2006). Toxicity Of An Engineered Nanoparticle (Fullerene, C60) in Two Aquatic

- Species, *Daphnia* and *Fathead Minnow*. Marine Environmental Research, 62, S5-S9.
- [57] Jeng, H.A., Swanson, J. (2006). Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles in Mammalian Cells. Journal of Environmental Science And Health Part A, 41(12), 2699-2711.
- [58] Franklin, N.M., Rogers, N.J., Apte, S.C., Batley, G.E., Gadd, G.E., Casey, P.S. (2007). Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, And ZnCl₂ To A Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella Subcapitata*): The Importance of Particle Solubility. Environmental Science & Technology, 41(24), 8484-8490
- [59] Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Laura, S., Behra, R. (2008). Toxicity Of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas Reinhardtii*. Environmental Science & Technology, 42(23), 8959-8964.
- [60] Lee, W.M., An, Y.J., Yoon, H., Kweon, H.S. (2008). Toxicity and Bioavailability Of Copper Nanoparticles to the Terrestrial Plants Mung Bean (*Phaseolus Radiatus*) And Wheat (*Triticum Aestivum*): Plant Agar Test For Water-Insoluble Nanoparticles. Environmental Toxicology and Chemistry, 27(9), 1915-1921.
- [61] Aruoja, V., Dubourguier, H.C., Kasemets, K., Kahru, A. (2009). Toxicity of Nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to Microalgae *Pseudokirchneriella Subcapitata*. Science of the Total Environment, 407(4), 1461-1468.
- [62] Hoecke, K.V., Quik, J.T., Mankiewicz-Boczek, J., Schampheleere, K.A.D., Elsasser, A., Meeren, P.V.D., ... & Rzydyński, K. (2009). Fate And Effects Of CeO₂ Nanoparticles In Aquatic Ecotoxicity Tests. Environmental Science & Technology, 43(12), 4537-4546.
- [63] Roh, J.Y., Sim, S.J., Yi, J., Park, K., Chung, K.H., Ryu, D.Y., Choi, J. (2009). Ecotoxicity of Silver Nanoparticles on The Soil Nematode *Caenorhabditis Elegans* Using Functional Ecotoxicogenomics. Environmental Science & Technology, 43(10), 3933-3940.
- [64] Lee, S.W., Kim, S.M., Choi, J. (2009). Genotoxicity and Ecotoxicity Assays Using the Freshwater Crustacean *Daphnia Magna* and The Larva of The Aquatic Midge *Chironomus Riparius* to Screen The Ecological Risks of Nanoparticle Exposure. Environmental Toxicology and Pharmacology, 28(1), 86-91.
- [65] Kasemets, K., Ivask, A., Dubourguier, H.C., Kahru, A. (2009). Toxicity of Nanoparticles Of ZnO, CuO And TiO₂ to Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. Toxicology in vitro, 23(6), 1116-1122.
- [66] López-Moreno, M.L., De La Rosa, G., Hernández-Viezas, J.Á., Castillo-Michel, H., Botez, C.E., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J. L. (2010). Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CeO₂ Nanoparticles on Soybean (*Glycine Max*) Plants. Environmental Science & Technology, 44(19), 7315-7320.
- [67] Zhu, Z.J., Carboni, R., Quercio, M.J., Yan, B., Miranda, O.R., Anderton, D.L., Arcaro, F.K., Rotella, M.V., Vachet, R.W. (2010). Surface Properties Dictate Uptake, Distribution, Excretion, and Toxicity of Nanoparticles in Fish. Small, 6(20), 2261-2265.
- [68] Rajakumar, G., Rahuman, A.A. (2011). Larvicidal Activity of Synthesized Silver Nanoparticles Using Eclipta Prostrata Leaf Extract Against Filariasis and Malaria Vectors. Acta Tropica, 118(3), 196-203.
- [69] Santhoshkumar, T., Rahuman, A.A., Rajakumar, G., Marimuthu, S., Bagavan, A., Jayaseelan, C., ... & Kamaraj, C. (2011). Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Nelumbo Nucifera* Leaf Extract And Its Larvicidal Activity Against Malaria and Filariasis Vectors. Parasitology Research, 108(3), 693-702.
- [70] Marimuthu, S., Rahuman, A.A., Rajakumar, G., Santhoshkumar, T., Kirithi, A.V., Jayaseelan, C., Bagavan, A., Zahir, A.A., Elango, G., Kamaraj, C. (2011). Evaluation of Green Synthesized Silver Nanoparticles Against Parasites. Parasitology Research, 108(6), 1541-1549.
- [71] Rabolli, V., Thomassen, L.C., Uwambayinema, F., Martens, J.A., Lison, D. (2011). The Cytotoxic Activity of Amorphous Silica Nanoparticles is Mainly Influenced by Surface Area and Not by Aggregation. Toxicology Letters, 206(2), 197-203.
- [72] Ali, D., Alarifi, S., Kumar, S., Ahamed, M., & Siddiqui, M. A. (2012). Oxidative Stress And Genotoxic Effect of Zinc Oxide Nanoparticles in Freshwater Snail *Lymnaea Luteola* L. Aquatic Toxicology, 124, 83-90.
- [73] Clément, L., Hurel, C., Marmier, N. (2013). Toxicity of TiO₂ Nanoparticles to Cladocerans, Algae, Rotifers and Plants—Effects of Size and Crystalline Structure. Chemosphere, 90(3), 1083-1090.
- [74] Ivask, A., Kurvet, I., Kasemets, K., Blinova, I., Aruoja, V., Suppi, S., Vija, H., Kärkinen, A., Titma, T., Heinlaan, M., Visnapuu, M., Koller, D., Kisand, V., Kahru, A. (2014). Size-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria, Yeast, Algae, Crustaceans and Mammalian Cells *in vitro*. Plos One, 9(7), E102108.
- [75] Ribeiro, F., Gallego-Urrea, J.A., Jurkschat, K., Crossley, A., Hassellöv, M., Taylor, C., Soares, M.V.M.A., Loureiro, S. (2014). Silver Nanoparticles and Silver Nitrate Induce High Toxicity to *Pseudokirchneriella Subcapitata*, *Daphnia Magna* And *Danio Rerio*. Science of The Total Environment, 466, 232-241.
- [76] Dağlıoğlu, Y., Kabakçı, D., Akdeniz, G. (2015). Toxicity Of Nano And Non-Nano Boron Particles on *Apis Mellifera* (Honey Bee). Research Journal of Chemical and Environmental Sciences. 3(3).
- [77] Kim, I.Y., Joachim, E., Choi, H., Kim, K. (2015). Toxicity of Silica Nanoparticles Depends on Size, Dose, and Cell Type. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 11(6), 1407-1416.
- [78] Dağlıoğlu, Y., Çelebi, M.S. (2015). The Evaluation of the Acute Toxic Effects of Polyvinylferrocene Supported

- Platinum Nanoparticles on *Artemia Salina* (Brine Shrimp). Biological Diversity and Conservation, ISSN, 1308-8084.
- [79] Özkan, Y., Irendi, İ., Akdeniz, G., Kabakçı, D., Sökmen, M. (2015). Evaluation Of The Comparative Acute Toxic Effects Of TiO_2 , TiO_2 , Ag- TiO_2 and Zn- TiO_2 Composite Nanoparticles on Honey Bee (*Apis Mellifera*). Journal of International Environmental Application and Science, 10(1), 26.
- [80] Xiao, Y., Vijver, M.G., Chen, G., Peijnenburg, W J. (2015). Toxicity and Accumulation of Cu and Zn Nanoparticles in *Daphnia Magna*. Environmental Science & Technology, 49(7), 4657-4664.
- [81] Suman, T.Y., Rajasree, S.R., Kirubakaran, R. (2015). Evaluation of Zinc Oxide Nanoparticles Toxicity on Marine Algae *Chlorella Vulgaris* Through Flow Cytometric, Cytotoxicity and Oxidative Stress Analysis. Ecotoxicology and Environmental Safety, 113, 23-30.
- [82] Cupi, D., Hartmann, N. B., Baun, A. (2015). The Influence of Natural Organic Matter and Aging on Suspension Stability in Guideline Toxicity Testing of Silver, Zinc Oxide, and Titanium Dioxide Nanoparticles With *Daphnia Magna*. Environmental Toxicology and Chemistry, 34(3), 497-506.
- [83] Dağlıoğlu, Y., Önal, Ş., Çelebi, S.M., Kabakçı, D., Akdeniz, G. (2015). The Evaluation of Toxic Effects of Poly(Vinylferrocene)-Supported Palladium NPs (Pd/PVF⁺) on *Apis Mellifera* (Honey Bee). International Journal of Development Research. 5(6), 4577-4583.
- [84] Dağlıoğlu, Y., Öztürk, B.Y. (2016). The Assessment of Biological Accumulation on Exposure In Boron Particles of *Desmodesmus Multivariabilis*. Biological Diversity and Conservation, 9(3), 204-209.
- [85] Dağlıoğlu, Y., Altınok, İ., İlhan, H., Sökmen, M. (2016). Determination of the Acute Toxic Effect of Zn- TiO_2 Nanoparticles in Brine Shrimp (*Artemia Salina*). Acta Biologica Turcica, 29(1), 6-13.
- [86] Murugan, K., Aruna, P., Panneerselvam, C., Madhiyazhagan, P., Paulpandi, M., Subramaniam, Rajaganesh R, Wei H, Alsahhi MS, Devanesan S, Nicoletti M, Syuhei B, Canale A, Benelli G. J. (2016). Fighting Arboviral Diseases: Low Toxicity on Mammalian Cells, Dengue Growth Inhibition (*In Vitro*), and Mosquitocidal Activity Of *Centrocercus Clavulatum*-Synthesized Silver Nanoparticles. Parasitology Research, 115(2), 651-662.
- [87] Ozkan, Y., Altınok, I., İlhan, H., & Sökmen, M. (2016). Determination Of TiO_2 And Ag TiO_2 Nanoparticles In *Artemia Salina*: Toxicity, Morphological Changes, Uptake and Depuration. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 96(1), 36-42.
- [88] Vrček, I.V., Žuntar, I., Petlevski, R., Pavičić, I., Dutour Sikirić, M., Čurlin, M., Goessler, W. (2016). Comparison of *in vitro* Toxicity of Silver Ions and Silver Nanoparticles on Human Hepatoma Cells. Environmental Toxicology, 31(6), 679-692.
- [89] Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, V.P., Prasad, S.M., Chauhan, D.K., Dubey, N.K. (2016). Silicon Nanoparticles More Efficiently Alleviate Arsenate Toxicity Than Silicon In Maize Cultivar and Hybrid Differing In Arsenate Tolerance. Frontiers In Environmental Science, 4, 46.
- [90] Dağlıoğlu, Y., Yılmaz Öztürk, B. (2017). Effect of Concentration and Exposure Time of ZnO- TiO_2 Nanocomposite On Photosynthetic Pigment Contents, ROS Production Ability, and Bioaccumulation of Freshwater Algae (*Desmodesmus Multivariabilis*). Caryologia, 1-11.
- [91] Dağlıoğlu, Y., Kabakçı, D., Akdeniz, G., Çelebi, M.S. (2016). Determining The Acute Toxic Effects of Poly (Vinylferrocene) Supported Platinum Nanoparticle (Pt/PVF⁺ Nps) on *Apis Mellifera*. Mugla Journal of Science And Technology, 2(2), 1-8.
- [92] Dağlıoğlu, Y., Çelebi, S.M., Önal, Ş. (2016). Determination of Acute Toxic Effects of Poly (Vinylferrocene) Supported Palladium Nanoparticle (Pd/PVF⁺) on *Artemia Salina*. Pakistan Journal of Zoology Vol. 48(1), 187-193.
- [93] Dağlıoğlu, Y., Türkş, S., TiO_2 Nanopartikül Uygulamasının Su Mercimeğinin (*Lemna Minor* L.) Fotosentetik Pigment İçeriği Üzerine Etkisi. Acta Biologica Turcica, 30(4), 108-115.
- [94] Dağlıoğlu, Y., Türkş, S. (2017). *Myriophyllum Spicatum*'un Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi, Lipid Peroksidasyonu ve Hidrojen Peroksit Üzerine Nano ve Mikro Bor Partiküllerinin Etkisi. BEÜ Fen Bilimleri Dergisi, 6(2), 62-70.
- [95] Bucher, J., Masten S., Moudgil B., Powers K., Roberts S., Walker N. (2004), Developing Experimental Approaches for The Evaluation of Toxicological Interactions of Nanoscale Materials. Final Workshop Report 3-4 November, 1-37; University of Florida, Gainesville, FL. Wwww. Nanotoxicology. Ufl.Edu.
- [96] Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J. (2005a). Nanotoxicology: an Emerging Discipline Evolving From Studies of Ultrafine Particles. Environ. Health Perspect. 113, 823-839.
- [97] Oberdorster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Et Al. (2005b). Principles for Characterizing the Potential Human Health Effects from Exposure to Nanomaterials: Elements of a Screening Strategy. Particle Fibre Toxicol. (Doi:10.1186/1743-8977-2-82:8)
- [98] Powers, K.W., Brown, S.C., Krishna, V.B., Wasdo, S.C., Moudgil, B.M., Roberts, S.M. (2006). Research Strategies For Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation. Toxicological Sciences, 90(2), 296-303.
- [99] Lowell, S., Shields, J.E., Thomas, M.A., Thommes, M. (2004). Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density, Particle Technology Series, Springer, New York.

- [100] Yu, J.C., Ho, W., Yu, J., Yip, H., Wong, P.K., Zhao, J. (2005). Efficient Visible-Light-Induced Photocatalytic Disinfection On Sulfur-Doped Nanocrystalline Titania. *Environmental Science & Technology*, 39(4), 1175-1179.
- [101] Tseng, Y.H., Sun, D.S., Wu, W.S., Chan, H., Syue, M.S., Ho, H.C., Chang, H.H. (2013). Antibacterial Performance Of Nanoscaled Visible-Light Responsive Platinum-Containing Titania Photocatalyst In Vitro And *In Vivo*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3787-3795.
- [102] Dhawan, A., & Sharma, V. (2010). Toxicity Assessment Of Nanomaterials: Methods And Challenges. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 398(2), 589-605.
- [103] Djurišić, A.B., Leung, Y.H., Ng, A., Xu, X.Y., Lee, P.K., Degger, N. (2015). Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles: Mechanisms, Characterization, and Avoiding Experimental Artefacts. *Small*, 11(1), 26-44.
- [104] Patil, S., Sandberg, A., Heckert, E., Self, W., Seal, S. (2007). Protein Adsorption and Cellular Uptake of Cerium Oxide Nanoparticles As a Function of Zeta Potential. *Biomaterials*, 28(31), 4600-4607.
- [105] Neal, A.L. (2008). What Can Be Inferred from Bacterium–Nanoparticle Interactions About the Potential Consequences of Environmental Exposure to Nanoparticles?. *Ecotoxicology*, 17(5), 362.
- [106] Cho, W.S., Duffin, R., Thielbeer, F., Bradley, M., Megson, I.L., Macnee, W., Poland, C.A., Tran, L.C., Donaldson, K. (2012). Zeta Potential And Solubility to Toxic Ions as Mechanisms of Lung Inflammation Caused by Metal/Metal Oxide Nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 126(2), 469-477..
- [107] Long, T.C., Saleh, N., Tilton, R.D., Lowry, G.V., Veronesi, B. (2006). Titanium Dioxide (P25) Produces Reactive Oxygen Species in Immortalized Brain Microglia (BV2): Implications for Nanoparticle Neurotoxicity. *Environmental Science & Technology*, 40(14), 4346-4352..
- [108] Kosmulski, M. (2009). Ph-Dependent Surface Charging and Points Of Zero Charge. IV. Update and New Approach. *Journal of Colloid and Interface Science*, 337(2), 439-448.
- [109] Clogston, J.D., Patri, A.K. (2011). Zeta Potential Measurement. In *Characterization Of Nanoparticles Intended For Drug Delivery* (Pp. 63-70). Humana Press.
- [110] Berg, J.M., Romoser, A., Banerjee, N., Zebda, R., Sayes, C.M. (2009). The Relationship Between Ph and Zeta Potential of ~ 30 Nm Metal Oxide Nanoparticle Suspensions Relevant To *in vitro* Toxicological Evaluations. *Nanotoxicology*, 3(4), 276-283.
- [111] Tantra, R., Schulze, P., Quincey, P. (2010). Effect of Nanoparticle Concentration on Zeta-Potential Measurement Results and Reproducibility. *Particuology*, 8(3), 279-285.
- [112] Kosmulski, M. (2003). A Literature Survey of The Differences Between the Reported Isoelectric Points and Their Discussion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 222(1-3), 113-118.
- [113] Kosmulski, M. (2002). The Ph-Dependent Surface Charging and The Points of Zero Charge. *Journal of Colloid and Interface Science*, 253(1), 77-87.
- [114] Premanathan, M., Karthikeyan, K., Jeyasubramanian, K., & Manivannan, G. (2011). Selective Toxicity of ZnO Nanoparticles Toward Gram-Positive Bacteria and Cancer Cells by Apoptosis Through Lipid Peroxidation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(2), 184-192.
- [115] Murdock, R.C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A.M., Schlager, J.J., Hussain, S.M., 2008. Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to *in vitro* Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. *Toxicol. Sci.* 101, 239–253.
- [116] Bootz, A., Vogel, V., Schubert, D., Kreuter, J. (2004). Comparison of Scanning Electron Microscopy, Dynamic Light Scattering and Analytical Ultracentrifugation for the Sizing of Poly (Butyl Cyanoacrylate) Nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(2), 369-375.
- [117] Jillavenkatesa, A., Kelly, J.F. (2002). Nanopowder Characterization: Challenges and Future Directions. *J. Nanopart. Res.* 4, 463–468.
- [118] Drescher, D., Orts-Gil, G., Laube, G., Natte, K., Veh, R.W., Osterle, W., Kneipp, J., 2011. Toxicity of Amorphous Silica Nanoparticles on Eukaryotic Cell Model is Determined by Particle Agglomeration and Serum Protein Adsorption Effects. *Anal. Bioanal. Chem.* (Online).
- [119] Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S.M., Schlager, J.J., Hong, Y., 2008. DNA Damage Response to Different Surface Chemistry of Silver Nanoparticles in Mammalian Cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233, 404– 410
- [120] Schimpf M, Caldwell K, Giddings JC. 2000. *Field-Flow Fractionation Handbook*. New York: Wiley.
- [121] Williams A, Varela E, Meehan E, Tribe K. 2002. Characterisation of Nanoparticulate Systems by Hydrodynamic Chromatography. *Int J Pharm.* 242:295–299.
- [122] Chmela E, Tijssen R, Blom M, Gardeniers HJGE, Van Den Berg A. 2002. A Chip System For Size Separation of Macromolecules and Particles by Hydrodynamic Chromatography. *Anal Chem.* 74:3470–3475.
- [123] Blom MT, Chmela E, Oosterbroek RE, Tijssen R, Van Den Berg A. 2003. On-Chip Hydrodynamic Chromatography Separation and Detection of Nanoparticles and Biomolecules. *Anal Chem.* 75:6761–6768.