

# ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLÜ İLE ÇİNKO KLORÜR'ÜN *Daphnia magna* (Straus) ÜZERİNE AKUT TOKSİK ETKİLERİ

Şeyda FİKİRDEŞİCİ ERGEN

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 06100, Ankara.  
e-mail: [seydafikirdesici@gmail.com](mailto:seydafikirdesici@gmail.com)

Alınış (Received): 4 Ağustos 2017 Kabul (Accepted): 1 Kasım 2017, Erken Görünüm (Online First): 16 Kasım 2017, Basım (Published): 15 Aralık 2017

**Özet:** Bu çalışmada çinko oksit nanopartikülünün (ZnO NP), çinko klorürün (ZnCl<sub>2</sub>) ve karışımlarının, farklı konsantrasyonlarda (0,75, 1,5, 3, 6 ve 12ppm) *Daphnia magna* (Straus, 1820) üzerine akut toksik etkileri 24., 48. ve 72. saatlerde statik akut toksisite testi kullanılarak araştırılmıştır. Veriler probit analiz metodu kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (SPSS 21.0v). En yüksek toksisite karışımın (ZnO NP+ZnCl<sub>2</sub>) 72. saatinde, en düşük toksisitenin ise ZnCl<sub>2</sub>'nin 24. saatinde olduğu tespit edilmiştir. Akut toksisite sonuçları göz önüne alındığında, *D. magna* üzerine ZnO NP'nin ZnCl<sub>2</sub>'ye göre, karışımlarının ise bu iki kirleticiye göre daha toksik olduğu tespit edilmiştir. Zamana bağlı akut toksisite sonucu değerlendirildiğinde her üç deney grubu (ZnO NP, ZnCl<sub>2</sub> ve ZnO NP+ ZnCl<sub>2</sub>) için zaman arttıkça toksisitenin de arttığı belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** ZnO NP, ZnCl<sub>2</sub>, *Daphnia magna*, korelasyon.

## Acute Toxic Effects of Zinc Oxide Nanoparticle and Zinc Chloride on *Daphnia magna* (Straus)

**Abstract:** The acute toxicities of zinc oxide nanoparticle (ZnO NP), zinc chloride (ZnCl<sub>2</sub>) and their mixtures of different concentrations (0.75, 1.5, 3, 6 and 12ppm) on *Daphnia magna* (Straus, 1820) were investigated at 24, 48 and 72 hours by employing the static acute toxicity test. The data obtained were statistically evaluated by probit analysis method (SPSS 21.0v). The highest toxicity was found at 72 hours of the mixture (ZnO NP+ZnCl<sub>2</sub>) and the lowest toxicity was found at 24 hours of ZnCl<sub>2</sub>. When the overall acute toxicity results were considered, ZnO NP was determined to be more toxic than ZnCl<sub>2</sub> and mixtures were determined to be more toxic than these two pollutants alone. When the results of time-dependent acute toxicity were evaluated, toxicity was found to increase with increasing time for all three experimental groups (ZnO NP, ZnCl<sub>2</sub> and ZnO NP+ZnCl<sub>2</sub>).

**Key words:** ZnO NP, ZnCl<sub>2</sub>, *Daphnia magna*, correlation.

## Giriş

Doğada, sahradan gelen mineral tozlar, orman yangınları ve volkanik patlamalar gibi doğal kaynaklarda bulunan nanopartiküllerin, mühendislik yöntemleri ile de üretimi mümkündür (Baker ve ark. 2014). Son yıllarda nanoteknoloji alanında yaşanan büyük gelişmeler, nanoteknolojik ürünlerin üretiminde ve kullanımında artışa yol açmıştır. Kullanım alanlarının ve uygulamalarının artması, nanopartiküllerin çevre ile olan etkileşiminin de artmasına neden olmuştur. Yüzey-hacim oranının yüksekliği, ara yüzey aktivitesi ve elektronik yapıları gibi farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olan nanopartiküllerin farklı çevresel etkilere neden olacağı düşünülmektedir (Ma ve Wang 2010).

Eser element olsun ya da olmasın biyolojik sistemdeki birikimleri belli bir eşik değerden sonra toksik olan metallerin (Anton ve ark. 2000) ekosistemdeki varlığı ve konsantrasyonu pek çok araştırmacı tarafından araştırılmış olsa da giderek artan nanopartikül ile etkileşimi ve toksik

etkileri günümüzde önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Önemli bir ağır metal olan çinko (Zn), tüm organizmalar için gerekli bir besin kaynağıdır ve enzimatik faaliyetlerde önemli fonksiyonları bulunan bir geçiş metalidir (Palmgren ve ark. 2008). Zn galvanizlemede ve otomotiv sanayinde döküm kalıpları yapımında kullanılan bir metaldir. Çinko klorür metali (ZnCl<sub>2</sub>) lastik sanayisinde aktivatör olarak, pil gövdelerinin yapımında, tekstil sanayisinde ve dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Çinko oksit nanopartikülü (ZnO NP) ise gübrede, boyada, güneş kremlerinde, sensör uygulamalarında, diş macunu, gıdalarda ve gıda ambalaj paketlerinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Baker ve ark. 2014, Shetty ve ark. 2015, Zhang ve ark. 2015, Kuang ve ark. 2016).

Kullanım alanları çok yaygın olan ağır metal ve nanopartiküller doğada karışım halindedir. Dolayısıyla karışım halindeki kirleticilerin ekosistem ve canlı hayatı

üzerine etkilerinin olası olumsuz yönlerinin araştırılması önemli hale gelmiştir. Ekosistemdeki kirleticilerin araştırılmasında önemli bir model organizma olan *Daphnia magna* (Straus) ağır metal ve nanopartikül çalışmaları için de çok önemli bir türdür (Loureiro ve ark. 2011, Shashkova ve Grigor'ev 2013) ve pek çok metal toksisite çalışmalarında yer almıştır (Tan ve Wang 2011, Fikirdeşici ve ark. 2012, Que ve ark. 2013).

Bu çalışmada üretimi artan nanoteknolojik ürünlerin kullanımında sıkça rastladığımız nanopartiküllerden ZnO NP ile yine önemli metallere olan ZnCl<sub>2</sub>'nin laboratuvar ortamında *D. magna* üzerine tek tek ve karışım halindeki akut toksik etkileri araştırılmıştır.

## Materyal ve Metot

### *Daphnia magna* Kültürü

Test organizması *D. magna* laboratuvarında 30L akvaryumlara ISO-6341 (Anonim, 1999) prosedürüne uygun olarak alıştırılmıştır. Millipore Milli-Q ultra saf (Milli-Di, France) su sistemi kullanılarak canlılar için saf su ortamı yaratılmıştır. Akvaryumlar 12 saat karanlık 12 saat aydınlık olacak şekilde ışıklandırılmış, sıcaklık 24±1,3°C'de, çözülmüş oksijen 6ppm'de ve elektriksel iletkenlik ise 250µScm<sup>-1</sup>'de sabit tutulmuştur.

### *Çinko Oksit Nanopartikül Sentezi*

ZnO nanopartiküller yaklaşık 30-40nm boyutunda basit solüsyon faz yaklaşımı ile sentezlenmiştir. Rahman ve ark. (2013)'nin çalışması temel alınmış olup, bazı değişiklikler yapılmıştır. Sentez aşağıda kısaca anlatılmıştır:

Mikro küreler uygun ortalama partikül boyutu ve gözenekliliğe sahip olacak şekilde üretilmiştir. Yaklaşık 0,5-1M çinko asetat ve oksalik asit solüsyonları manyetik karıştırıcıda 250rpm de karıştırılarak ayrı ayrı oda sıcaklığında hazırlanmıştır. Hazırlanan oksalik asit solüsyonu, çinko asetat solüsyonuna damlatma yolu ile ilave edilerek, bu işlem sırasında karıştırmaya 250rpm de devam edilmiştir. Oksalik asit solüsyonu, çinko asetat çözeltisine ilave edildikten sonra karışım bir şişeye alınıp, ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra 70°C ve 12 saat boyunca 120rpm de beyaz renkli bir çözelti elde edilinceye kadar çalkalanmış ve ardından metanol ve damıtık su ile yıkanmıştır. Daha sonra 80°C sıcaklıkta vakum ortamında kurutulmuştur.

### *Toksisite Çalışması*

Biyodenedeyde, toksik madde olarak çinko oksit nanopartikülü (ZnO NP) ve çinkoklorür (ZnCl<sub>2</sub>) metalleri teker teker ve karışımları (v/v) *D. magna* üzerinde çalışılmıştır. Her deney grubu için yaşı 24 saatten küçük 10 adet *D. magna* kullanılmıştır.

Nanoparçacıkların *D. magna* tarafından alınması için iki yol bulunmaktadır. Birinci yol, nanoparçacıkların vücut yüzeyi tarafından emilmesi şeklindedir. Alınma derecesi, nanopartiküller ve vücudun yüzey potansiyelleri tarafından yönetilir. Bununla birlikte, bu yol, toksik etkiye katkıda bulunmayabilir çünkü nanoparçacıklar, düzenli aralıklarla kabuk değişimi yapan *D. magna* tarafından

kolayca atılabilir. Dolayısıyla diğer alım yollarına kıyasla önemsizdir. Diğer yol ise nanoparçacıkların ağızdan yani gastrointestinal yol ile alımıdır (Wang ve ark. 2011). Nanopartikülün suda çözelti halinde bulunması da *D. magna* üzerine toksisiteyi artırıcı bir diğer etkidir. Dolayısıyla deneyde kullanılan nanopartikül *D. magna*'ya suda çözelti halinde verilmiştir.

Tüm deneyler kimyaca inert 100mL'lik beherlerde gerçekleştirilmiştir. Biyodenedeyde 0,75, 1,5, 3, 6 ve 12ppm olmak üzere 5 konsantrasyon ile birlikte kontrol grubu da kurulmuştur. 24, 48 ve 72. saatlerde akut toksisite değerleri (LC<sub>50</sub>) probit analizi ile, ZnCl<sub>2</sub>, ZnO NP ve karışımlarının korelasyon ilişkisi de korelasyon testi ile hesaplanmıştır (SPSS 21.0v (IBM, Portsmouth, UK)).

Karışımındaki metallere birbiri üzerindeki etkilerini anlamada toksik birim (TU<sub>i</sub>) (Dener ve Sinnige 1988) ve ilave indeks (AI) (Marking 1977) hesaplamaları kullanılmıştır.

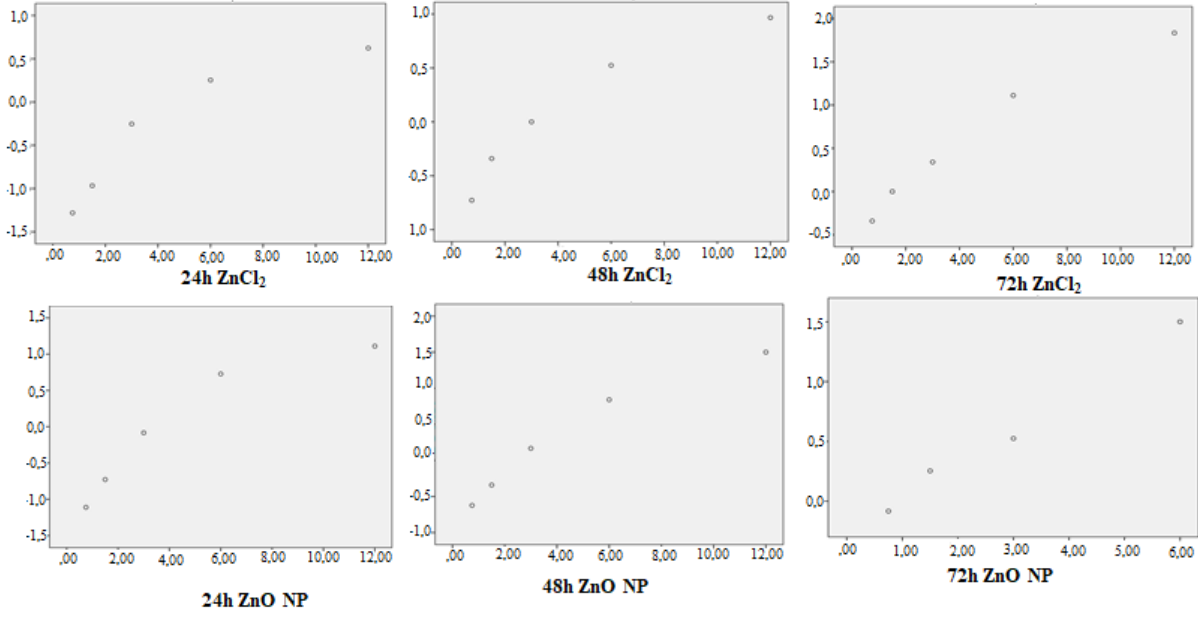
## Bulgular ve Tartışma

Yapılan çalışma sonucunda *D. magna* üzerine en yüksek toksisiteyi ZnCl<sub>2</sub>+ZnO NP karışımının 72. saati, en düşük toksisiteyi ise ZnCl<sub>2</sub>'nin 24. saati göstermiştir. Toksisite sıralaması yapıldığında; C72h> A72h> B72h> C48h> A48h> B48h> C24h> A24h> B24h şeklinde bir sıralama olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1). Heinlaan ve ark. (2008) ZnO NP'nin *D. magna* üzerine 48 saat LC<sub>50</sub> değerini 3,2ppm; Blinova ve ark. (2010) ise 48 saat EC<sub>50</sub> değerini 2,6ppm olarak bulmuşlardır. Bu çalışma sonuçları, mevcut çalışma sonuçları ile paralellik göstermiştir.

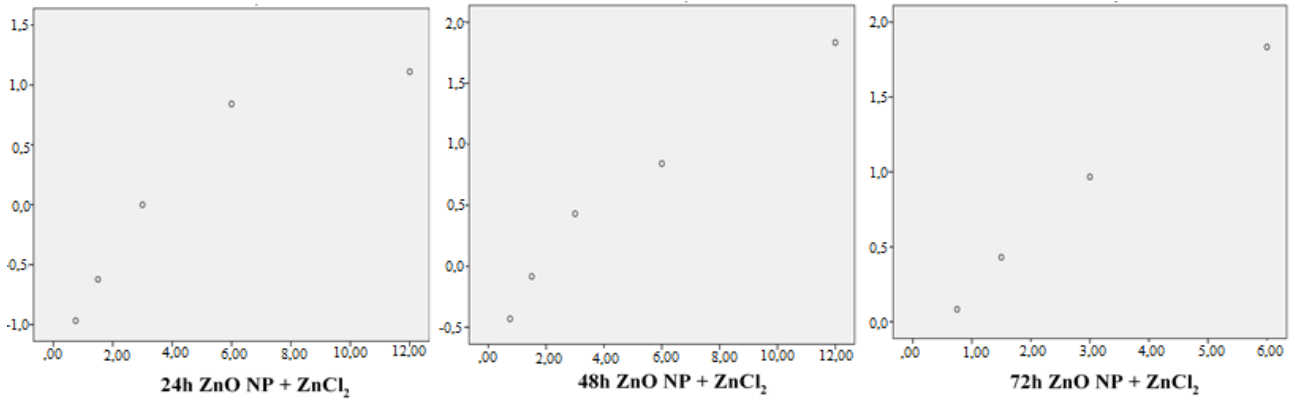
Denedeyde ZnCl<sub>2</sub> ve ZnO NP kullanarak toksisiteye, çözülmüş Zn<sup>+2</sup> iyonu mu yoksa metal oksit nanopartiküllerinin mi sebep olduğu araştırılmıştır. Literatürde bazı çalışmalar ZnO nanopartikülünün oluşturduğu toksik etkinin çözülmüş Zn<sup>+2</sup> iyonundan kaynaklandığını belirtirken, bazı çalışmalar ise metal oksit nanopartiküllerden kaynaklandığını ortaya koymuştur (Mwaanga ve ark. 2014, Bacchetta ve ark. 2016). Bu çalışma ile metal oksit nanopartiküllerinin toksisiteyi artırıcı etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1, Şekil 1 ve 2). Bu sonucu destekler nitelikte ZnO NP gibi metal oksit nanopartiküllerinin sucul canlılar için toksik olduğunu gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (Mwaanga ve ark. 2014, Adam ve ark. 2015, Haulik ve ark. 2015).

**Tablo 1.** ZnCl<sub>2</sub> ve ZnO NP ve karışımlarının *D. magna* üzerine 24, 48 ve 72. saatlerdeki akut toksik etki (LC<sub>50</sub>) değerleri.

	ZnO NP(A)	ZnCl <sub>2</sub> (B)	ZnCl <sub>2</sub> +ZnO NP(C)
24h	4,486ppm (0,169-10,706)	6,460ppm (2,576-19,676)	4,062ppm (-2,189-11,129)
48h	2,924ppm (1,624-4,066)	3,946ppm (2,286-5,525)	1,945ppm (0,380-3,062)
72h	0,933ppm (-0,745-1,810)	1,656ppm (0,035-2,751)	0,345ppm (-1,735-1,215)



Şekil 1. Farklı saatlerde (24, 48 ve 72) ZnCl<sub>2</sub> ve ZnO NP'ye maruz kalan *D. magna* 'nın doz-ölüm eğrisi (probit analizi).



Şekil 2. Farklı saatlerde (24, 48 ve 72) ZnCl<sub>2</sub> ve ZnO NP karışımına maruz kalan *D. magna* 'nın doz-ölüm eğrisi (probit analizi).

Ayrıca karışımdaki metallerin birbiri üzerine etkilerini anlamada toksik birim (TU<sub>i</sub>) (Dener ve Sinnige 1988) ve ilave indeks (AI) (Marking 1977) hesaplamaları kullanılmıştır.

Toksik birim (TU<sub>i</sub>) değeri, karışımdaki bir kirleticinin LC<sub>50</sub> değerinin, o kirleticinin LC<sub>50</sub> değerine bölünmesi ile hesaplanmaktadır (Dener ve Sinnige 1988).

$$TU_i = LC_{50\text{karışım},i} / LC_{50i}$$

TU<sub>i</sub>, karışımdaki i bileşenin toksik birimidir. LC<sub>50karışım,i</sub>, karışımdaki i bileşenin LC<sub>50</sub> değeridir. LC<sub>50i</sub> ise i bileşenin LC<sub>50</sub> değeridir.

$$M = TU_s = \sum TU_i$$

Birbirleri üzerine sinerjistik etki gösteren kirleticilerin toksisite değerleri arasındaki ilişki korelasyon testi ile değerlendirildiğinde, karışımın toksisitesi ile kontaminantların teker teker toksisitesi arasında çok yüksek korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla karışımdaki her kontaminantın birbiri üzerinde sinerjistik

bir etkisi olduğu sonucunu desteklemektedir (p<0,001) (Tablo 3). Wang ve ark. (2011), *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1894) üzerine As(V) ve TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin toksik etkilerini araştırmışlar ve As(V) ve TiO<sub>2</sub> nanopartikülleri arasında benzer şekilde sinerjistik etkinin olduğunu raporlamışlardır.

Tablo 2. Karışımdaki metallerin *D. magna* üzerindeki toksisitesi.

	A	B	TU <sub>s</sub> (M)	TU <sub>i</sub>	AI
LC <sub>50</sub> (C 24h)	0,182	0,26	0,08	0,04	11,5
LC <sub>50</sub> (C 48h)	0,057	0,077	0,04	0,02	24
LC <sub>50</sub> (C 72h)	0,0032	0,006	0,007	0,0035	141,8

Tablo 3. ZnCl<sub>2</sub>, ZnO NP ve karışımlarının korelasyon ilişkisi.

	ZnCl <sub>2</sub>	ZnO NP	ZnCl <sub>2</sub> +ZnO NP
ZnCl <sub>2</sub>	1,000		
ZnO NP	0,992**	1,000	
ZnCl <sub>2</sub> +ZnO NP	0,987**	0,987**	1,000

## Sonuç

Doğal ortamlarda konsantrasyonları hızla artan metal ve nanopartikül gibi kirleticilerin ekosistem ve canlılar için yararları olduğu kadar önemli zararları olabileceğinin bilinirliği günümüzde yapılan çalışmalarla artmıştır. Bu çalışmada ZnO nanopartiküllerinin ZnCl<sub>2</sub>'ye oranla daha toksik olduğu gözlenmiştir.

Doğadaki kirleticilerin karışım halinde bulunması, araştırmacıları kirleticilerin karışım halindeki etkilerini anlamaya yönlendirmiştir. ZnO NP ile ZnCl<sub>2</sub> birbiri üzerine sinerjistik etki göstererek doğada karışım halinde bulunması, teker teker bulunurluklarına oranla, doğal ortam ve canlılar için daha tehlikeli bir hal alabileceği

## Kaynaklar

- Adam, N., Schmitt, C., De Bruyn, L., Knäpen, D. & Blust, R. 2015. Aquatic acute species sensitivity distributions of ZnO and CuO nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 526: 233-242.
- Anonim, Water quality ISO-6341, 1999. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea): Acute toxicity test.
- Anton, A., Serrano, T., Angulo, E., Ferrero, G. & Rallo, A. 2000. The use of two species of crayfish as environmental quality sentinels: the relationship between heavy metal content, cell and tissue biomarkers and physico-chemical characteristics of the environment. *Science of the Total Environment*, 247(2-3): 239-251.
- Azevedo, S.L., Ribeiro, F., Jurkschat, K., Soares, A.M.V.M. & Loureiro, S. 2016. Co-exposure of ZnO nanoparticles and UV radiation to *Daphnia magna* and *Danio rerio*: Combined effects rather than protection. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(2): 458-467.
- Bacchetta, R., Maran, B., Marelli, M., Santo, N. & Tremolada, P. 2016. Role of soluble zinc in ZnO nanoparticle cytotoxicity in *Daphnia magna*: A morphological approach. *Environmental Research*, 148: 376-385.
- Baker, T.J., Tyler, C.R. & Galloway, T.S. 2014. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environmental Pollution*, 186: 257-271.
- Blinova, I., Ivask, A., Heinlaan, M., Mortimer, M. & Kahru, A. 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environmental Pollution*, 158(1): 41-47.
- Dener, J.W. & Sinnige, T.L. 1988. The joint acute toxicity to *Daphnia magna* of industrial organic chemicals at low concentrations. *Aquatic Toxicology*, 12: 33-38.
- Fikirdeşici, S., Altındağ, A. & Özdemir, E. 2012. Investigation of acute toxicity of cadmium-arsenic mixtures to *Daphnia magna* with toxic units approach. *Turkish Journal of Zoology*, 36(4): 543-550.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.C. & Kahru, A. 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71 (7): 1308-1316.
- Hai-zhou, Z., Guang-hua, L., Jun, X. & Shao-ge, J. 2012. Toxicity of Nanoscale CuO and ZnO to *Daphnia magna*. *Chemical Research in Chinese Universities*, 28(2): 209-213.
- Haulik, B., Balla, S., Pálfi, O., Szekeres, L., Juríková, T., Sály, P. & Bakonyi, G. 2015. Comparative ecotoxicity of the nano Ag, TiO<sub>2</sub> and ZnO to aquatic species assemblages. *Applied Ecology and Environmental Research*, 13(2): 325-338.
- Kuang, H., Yang, P., Yang, L., Aguilar, Z.P. & Xu, H. 2016. Size dependent effect of ZnO nanoparticles on endoplasmic reticulum stress signaling pathway in murine liver. *Journal of Hazardous Materials*, 317: 119-126.
- Loureiro, C., Castro, B.B., Pereira, J.L. & Gonçalves, F. 2011. Performance of standard media in toxicological assessments with *Daphnia magna*: Chelators and ionic composition versus metal toxicity. *Ecotoxicology*, 20(1): 139-148.
- Ma, X. & Wang, C. 2010. Fullerene Nanoparticles Affect the Fate and Uptake of Trichloroethylene in Phytoremediation Systems. *Environmental Engineering Science*, 27(11): p. 989-992.
- Marking, L.L. 1977. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. Pp. 99-108. In: Mayer, F.L. & Hamelink, J.L. (eds.) *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials.
- Mwaanga, P., Carraway, E.R., & van den Hurk, P. 2014. The induction of biochemical changes in *Daphnia magna* by CuO and ZnO nanoparticles. *Aquatic Toxicology*, 150: 201-209.
- Palmgren, M.G., Clemens, S., Williams, L.E., Krämer, U., Borg, S., Schjørring, J.K. & Sanders, D. 2008. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends in Plant Science*, 13(9): 464-473.
- Que, R.J., Wang, X.H., Feng, M.B., Li, Y., Liu, H.X., Wang, L.S. & Wang, Z.Y. 2013. The toxicity of cadmium to three aquatic organisms (*Photobacterium phosphoreum*, *Daphnia magna* and *Carassius auratus*) under different pH levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95: 83-90.
- Rahman, Q.I., Ahmad, M., Misra, S.K. & Lohani, M. 2013. Effective photocatalytic degradation of rhodamine B dye by ZnO nanoparticles. *Materials Letters*, 91: 170-174.

21. Shashkova, T.L. & Grigor'ev, Y.S. 2013. Impact of heavy metals on the trophic activity of daphnia depending on feeding conditions and age of crustaceans. *Contemporary Problems of Ecology*, 6(6): 662-666.
22. Shetty, P.K., Venuvanka, V., Jagani, H.V., Chethan, G.H., Ligade, V.S., Musmade, P.B., Nayak, U.Y., Reddy, M.S., Kalthur, G., Udupa, N., Rao, C.M. & Mutalik, S. 2015. Development and evaluation of sunscreen creams containing morin-encapsulated nanoparticles for enhanced UV radiation protection and antioxidant activity. *International Journal of Nanomedicine*, 10: 6477-6491.
23. Spehar, R.L. & Fiandt, J.T. 1986. Acute and chronic effects of water quality criteria- based metal mixtures on three aquatic species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5: 917-931.
24. Sprague, J.B. & Ramsay, B.A. 1965. Lethal levels of mixed copperzinc solution for juvenile salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 22: 425-432.
25. Tan, Q.G. & Wang, W.X. 2011. Acute toxicity of cadmium in *Daphnia magna* under different calcium and pH conditions: Importance of influx rate. *Environmental Science and Technology*, 45(5): 1970-1976.
26. Wang, D., Hu, J., Irons, D.R. & Wang, J. 2011. Synergistic toxic effect of nano-TiO<sub>2</sub> and As(V) on *Ceriodaphnia dubia*. *Science of the Total Environment*, 409: 1351-1356.
27. Zhang, D., Hua, T., Xiao, F., Chen, C., Gersberg, R.M., Liu, Y., Stuckey, D., Ng, W.J. & Tan, S.K. 2015. Phytotoxicity and bioaccumulation of ZnO nanoparticles in *Schoenoplectus tabernaemontani*. *Chemosphere*, 120: 211-219.

