



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



FARKLI BÜYÜKLÜKTEKİ BAKIR OKSİT
NANOPARTİKÜLLERİNİN *Cucumis sativus* VE
TOPRAK ENZİMLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yavuz İŞILDAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Şubat-2022
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından 201315002 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Yavuz IŞILDAK

Tarih:10.02.2022

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI BÜYÜKLÜKTEKİ BAKIR OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN *Cucumis sativus* VE TOPRAK ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Yavuz İŞILDAK

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM

2022, 60 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM
Prof. Dr. Erdal KOCABAŞ
Doç. Dr. Gökhan ZENGİN

Son yıllarda, mühendislik ürünü nanomalzemeler hem üretim hacmi hem de uygulama çeşitliliği açısından artmıştır. Bakır esaslı nanopartiküller, zirai kimyasallar olarak kullanılmaya başlanmış, agro-ekosisteme girmiş ve toprak-bitki sistemlerini etkilemişlerdir. Bakır eksikliği bitkilerin hastalık direncini azaltmakta ve mahsul verimini düşürmektedir. Temel bir element olmasına rağmen, toprak ortamındaki aşırı bakır miktarı bitki ve toprak organizmaları için toksik hale gelebilmektedir. Bu çalışmada, sakı denemelerinde toprak örneklerine uygulanan farklı büyüklükteki bakır oksit (CuO) nanopartiküllerin (NP) *Cucumis sativus*'un gelişimine ve toprak enzimi aktivitesi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

30, 50 ve 100 nm olarak temin edilen CuO NP'lerin karakterizasyonları XRD ve FESEM ile gerçekleştirildi. Konya tarım toprağından alınan örneklerle CuO NP ve Cu⁺² iki farklı konsantrasyonda uygulandı. Uygulanan örneklerin *Cucumis sativus* bitkisine etkisi, bitki kök-gövde yaş ve kuru ağırlık ölçümleri ile analiz edildi. Ayrıca bitkide uygulama sonrası meydana gelen TAS ve TOS değerleri incelendi. Uygulama sonrası toprak örneklerinde meydana gelen toprak enzimleri ve solunum değişimleri değerlendirildi. Bunlara ilaveten, bitki yaprak ve gövdesinde biriken bakır miktarı ölçüldü.

CuO NP'lerin karakterizasyonu ile nanopartiküllerin farklı boyutlara sahip olduğu ortaya çıkarıldı. Nanopartiküller ile Cu⁺² karşılaştırıldığında, nanopartiküllerin daha az bitki büyüme inhibisyonuna yol açtığı belirlendi. Çalışma sonucunda, özellikle düşük boyuta sahip nanopartiküllerin daha yüksek oranda bitki yaş ve kuru ağırlığında düşüşe neden olduğu belirlendi. Ayrıca, tüm örneklerde TAS ve TOS değerlerinin kontrol gurubuna göre arttığı belirlendi. En yüksek TAS ve TOS değerleri 400 mg kg⁻¹ uygulamada 30 nm boyuta sahip CuO NP'lerde görüldü. Dehidrogenaz ve alkalen fosfataz enzimi aktivitelerinde ise bakır oksit nanopartiküllerin boyut bağımlı etkilerinin her iki enzim için farklı sonuçlar ortaya çıkardığı bulundu. Bu çalışmada, Cu⁺² uygulamasının CuO NP'lere göre toprak solunumunu oldukça düşürdüğü sonucu elde edildi. Ayrıca, bitkinin yaprak ve kök kısımlarında Cu⁺²'nin CuO NP'lere oranla daha fazla biriktiği ve 30 nm boyuta sahip CuO NP'lerin diğer nano uygulamalarına oranla daha fazla bulunduğu belirlendi.

Sonuç olarak, CuO NP'lerin boyut bağımlı etkisinin toprak özelliklerinde ve bitki gelişiminde farklı davrandığı ortaya çıkarıldı. Bu çalışma, bakır oksit nanopartiküllerin tarım alanında kullanımlarında daha belirleyici ve kapsamlı stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Alkalen fosfataz, Bakır oksit nanopartiküller, *Cucumis sativus*, Dehidrogenaz, TAS, TOS

ABSTRACT

MS

EVALUATION OF THE EFFECTS OF DIFFERENT SIZES OF COPPER OXIDE NANOPARTICLES ON *Cucumis sativus* AND SOIL ENZYMES

Yavuz IŞILDAK

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa YÖNTEM

2022, 60 Pages

Jury

Assoc. Prof. Dr. Mustafa YÖNTEM
Prof. Dr. Erdal KOCABAŞ
Assoc. Prof. Dr. Gökhan ZENGİN

In recent years, the production of engineered nanomaterials has increased both in terms of production volume and variety of applications. Copper-based nanoparticles were first used as agrochemicals, entering the agroecosystems, and affecting soil-plant systems. Copper deficiency reduces the disease resistance of plants and decreases crop yield. Although an essential element, excess copper in the soil environment can become toxic to exposed plants and soil organisms. The aim of this study was to evaluate the effects of different sizes of copper oxide (CuO) nanoparticles (NPs) applied to soil samples in pot experiments on the growth and soil enzyme activity of *Cucumis sativus*.

Characterizations of the CuO NPs delivered at 30, 50, and 100 nm were performed by XRD and FESEM. CuO NP and Cu⁺² was applied at two different concentrations to the samples taken from Konya agricultural soil. The effect of the applied samples on the *Cucumis sativus* plant was analyzed by plant root and stem fresh and dry weight measurements. In addition, TAS and TOS values were examined according to the applications in the plant. Soil enzymes and respiration changes in soil samples after application were evaluated. The amount of copper deposited in plant leaves and stems was also measured.

Characterization of CuO NPs showed that nanoparticles have different sizes. Comparing nanoparticles and Cu⁺², it was found that nanoparticles were less inhibitory to plant growth. As a result of the study, it was found that particularly small nanoparticles caused a greater decrease in plant fresh and dry weight. It was also noted that TAS and TOS increased for all samples compared to the control group. The highest TAS and TOS values were observed with 30 nm CuO NPs at 400 mg kg⁻¹ application. It was found that the size-dependent effects of copper oxide nanoparticles on the enzyme activities of dehydrogenase and alkaline phosphatase showed different results for both enzymes. In this study, it was concluded that the application of Cu⁺² significantly reduced soil respiration compared to CuO NPs. Additionally, it was found that Cu⁺² accumulated more than CuO NPs in the leaf and root parts of the plant, and CuO NPs with a size of 30 nm were found more frequently than in other nano applications.

In summary, the size-dependent effect of CuO NPs on soil properties and plant growth behaved differently. This study will contribute to the development of more definitive and comprehensive strategies for using copper oxide nanoparticles in agriculture.

Keywords: Alkaline phosphatase, Copper oxide nanoparticles, *Cucumis sativus*, Dehydrogenase, TAS, TOS

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez süreci boyunca bendenengin bilgi ve deneyimini esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunuyorum. Tez çalışmamı gerçekleştirmemi mümkün kılan Fen Fakültesi Dekanlığına, Biyoteknoloji bölümü değerli öğretim üyeleri ve asistanlarına, Gerektiğinde yardımlarını esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. EmrahTORLAK, Doç. Dr. Ali Tefvik UNCU ve Arş. Gör. Behiç Selman ERDOĞDU'ya, Biyoteknoloji bölümü yüksek lisans öğrencisi Büşra ESİRGENLER'e, ayrıca yaşadığım her türlü zorluğa karşı benden desteğini esirgemeyen sevgili aileme, her konuda benden desteğini esirgemeyen çalışkanlığını, özgüvenini ve disiplinini örnek aldığım sevgili eşim Seda BAYRAKTAR İŞILDAK'a ve kalpten desteğini şimdiden hissettiğim sevgili kızım Nil Arven İŞILDAK'a tüm içtenliğimle teşekkürü bir borç bilirim.

Yavuz İŞILDAK
KONYA-2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
GRAFİK DİZİNİ.....	x
TABLO DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Nanoteknoloji.....	2
1.2. Nanoteknolojinin Tarihsel Gelişimi	3
1.3. Nanoteknolojide Sentez Yaklaşımları ve Uygulama Alanları	4
1.3.1. Yukarıdan aşağıya doğru yaklaşım	5
1.3.2. Aşağıdan Yukarıya Yöntemler	7
1.4. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları	12
1.5. Bakır Oksit Nanopartiküller (CuO NP'ler)	12
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1. Nanopartiküllerin Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu	17
3.2. Toprak Örneklerinin Alınması ve Toprak Analizleri	17
3.2.1. Toprak örneklerinde yapılan analizler.....	17
3.3. Denemenin kurulması.....	20
3.4. Bitki Hasadı ve Analizleri	20
3.4.1. Bitki Büyüme Parametrelerinin Belirlenmesi.....	20
3.4.2. Bitki Örneklerinde TAS, TOS ve OSI Testleri.....	20
3.5. Hasat Sonrası Toprak ve Bitkide Bakır (Cu ²⁺) İçeriklerinin Belirlenmesi.....	21
3.6. İstatiksel Analizler	21
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	22
4.1. CuO-NP'lerin Karakterizasyonu	22
4.2. Denemede Kullanılan Toprağın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	24
4.3. Denemenin Kurulması ve Bitkilerin Hasadının Yapılması	24
4.3.1. Bitkilerde Fizyolojik Parametreler.....	26

4.3.2. Bitkilerde TAS-TOS ve OSI değerleri	28
4.4. Hasat Öncesi ve Sonrası Topraklardaki Dehidrogenaz -Alkalen Fosfataz Enzim Aktiviteleri ve Toprak Solunumlarının Belirlenmesi	29
4.5. Toprak ve Bitki Dokularında Cu ⁺² Birikimi	33
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	36
5.1. Sonuçlar	36
5.2. Öneriler	37
6. KAYNAKLAR.....	39
ÖZGEÇMİŞ.....	50



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Mikro ve nano boyutu gösteren uzunluk ölçeği	3
Şekil 1.2. Yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya sentez yöntemine genel bakış.....	4
Şekil 4.1. CuO nanopartiküllerin XRD analizleri.....	22
Şekil 4.2. 30 nm boyutlu CuO nanopartiküllerin FE-SEM görüntüleri	23
Şekil 4.3. 50 nm boyutlu CuO nanopartiküllerin FESEM görüntüleri	23
Şekil 4.4. 100 nm boyutlu CuO nanopartiküllerin FESEM görüntüleri	23
Şekil 4.5. Uygulama sonrası bitkilerin 15 ve 20. gün görünüşleri	25



GRAFİK DİZİNİ

Grafik 4.1. Bitki gövde yaş ve kuru ağırlıkları	26
Grafik 4.2. Bitki kök yaş ve kuru ağırlıkları.....	26
Grafik 4.3. Bitki (Gövde) ve kök boyları	27
Grafik 4.4. Hasat öncesi ve sonrası dehidrogenaz aktivitesinin değişimi	29
Grafik 4.5. Hasat öncesi ve sonrası akalen fosfataz aktivitesinin değişimi.....	31
Grafik 4.6. Hasat öncesi ve sonrası toprak solunumu	32
Grafik 4.7. Hasat sonrası topraktaki bakır miktarı.....	33
Grafik 4.8. Hasat sonrası bitki yapraklarındaki bakır birikimi.....	34
Grafik 4.9. Hasat sonrası bitki köklerindeki bakır birikim değerleri	34



TABLO DİZİNİ

Tablo 1.1 Nanoparçacık hazırlamanın yukarıdan aşağıya yöntemleri ve aşağıdan yukarıya yöntemleri.....	5
Tablo 4.1. Çalışma alanından alınan toprak örneklerinde yapılan bazı fiziksel analizler ve sonuçları.....	24
Tablo 4.2. Çalışma alanından alınan toprak örneklerinde yapılan bazı kimyasal analizler ve sonuçları.....	24
Tablo 4.3. Bitkilerde TAS-TOS ve OSI değerleri ve standart sapmaları	28



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

nm	nanometre
ppm	milyonda bir kısım
µg	mikro gram
mL	mili Litre
mg	mili gram
kg	kilo gram
cm	santimetre
kV	kilo volt
mA	mili amper
mm	milimetre
J	joule
kPa	kilo paskal
g	gram
M	molar
°C	santigrat
h	saat
N	normalite
mmol	milimolar
v/v	hacim/hacim
µS	mikro simens
sa	saat
cm ³	santimetreküp

Kısaltmalar

MNP	metal nano partikül
Pb	hacim ağırlığı
Pk	tane yoğunluğu
P	porozite
TK	tarla kapasitesi
SN	solma noktası
FS	faydalı su
AS	agregat stabilitesi
YP	yarayışlı fosfor
TN	toplam azot
EC	elektriki iletkenlik
OM	organik madde
TAS	toplam antioksidan statüsü
TOS	toplam oksidan statüsü
OSI	oksidatif stres indeksi
ICP-OES	indüktif eşleşmeli plazma-optik emisyon spektrometresi
FESEM	alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu
XRD	X-ışını kırınımı
DHA	dehidrogenaz enzim aktivitesi
ALP	alkalen fosfataz enzim aktivitesi
SiCL	siltli killi tın

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji terimi ilk kez 1974 yılında Norio Taniguchi tarafından kullanılmıştır. "Nanoteknoloji" kelimesi, "cüce" anlamına gelen Yunanca "nanos" kelimesinden türemiştir. Sözcük olarak daha eskilere dayanan fakat bilimsel bir terim olarak 20. yüzyılın ortalarında anılmaya başlanan nanoteknoloji, günümüzde özellikle yaşam bilimlerinde kendine pek çok uygulama alanı bulmuştur (Narayanan ve Sakthivel, 2010). Nanoparçacıklar tıp, bilgi teknolojileri, enerji üretimi ve depolanması, yeni malzemelerin üretilmesi ve çevresel uygulamalar gibi farklı alanlarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Gebre ve Sendeku, 2019). Nanoteknoloji, bilim ve teknoloji alanının nano seviyelere inmesiyle özellikle son on yılda hızlı bir büyüme göstermiştir (Das ve ark., 2014; Rao ve ark., 2016).

Demir, bakır, gümüş, altın, palladyum, çinko, titanyum gibi metal tuzlarından sentezlenen metal nanopartiküllerin (MNP) her biri farklı bir kullanım alanında başarılı sonuçlar vermektedir. Nano boyutlarda sentezlendiğinde nanopartiküller ve nanomalzemeler yüzey alanı, termal, elektronik, optik, iletkenlik özellikleri gibi fizikokimyasal özellikleri makro ve mikro boyutlarına göre oldukça değişkenlik göstermektedirler ve sensörler, biyoteknoloji, gübre, biyomedikal, uzay teknolojileri, tarım, kozmetik sanayii, tıp, gıda ve çevre gibi alanlarda geniş bir uygulama alanına sahiptirler (Saifuddin ve ark., 2009; Singh ve ark., 2016). Metal bazlı nanopartiküllerin, normal boyutlardaki malzemelere (yığın) göre daha potansiyel toksisiteye sahip oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Farinha ve ark., 2021). Bu nedenle nanoteknolojide kullanılan malzemeler insan, hayvan ve çevre sağlığı için risk oluşturmaktadır ve bu risklerin potansiyel etkileri yapılan çalışmalar ile değerlendirmesi gerekmektedir (Handy ve ark., 2008). MNP'lerin birçok alanda kullanımı, çevreye taşınmalarına neden olmakta ve bu durum sonucunda nanopartiküllerin ekosistem üzerindeki etkileri büyük bir endişeye yol açmaktadır (Ghodake ve ark., 2011). Bitkiler tarafından alınan MNP'ler, gıdaları kontamine etmelerinden dolayı insan sağlığı için potansiyel risk taşımaktadır. Bu nedenle, çevresel sistemlerdeki MNP'lerin davranışı ile birlikte bitkiler ve MNP'ler arasındaki etkileşimleri anlamak önem taşımaktadır (Holbrook ve ark., 2008; Judy ve ark., 2011).

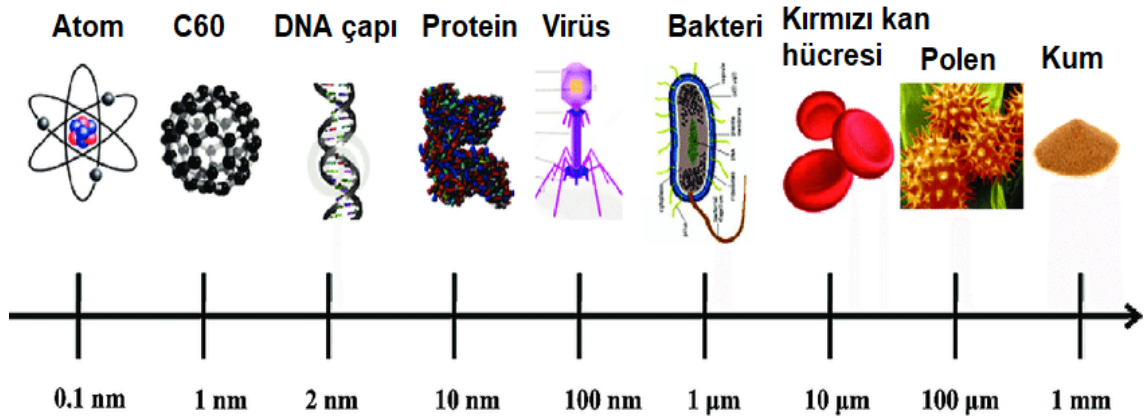
Farklı metal oksit NP'ler arasında, bakır oksit nanopartikülleri (CuO NP) elektronik, hava ve sıvı filtrasyonu, seramik, ahşap koruma, tekstil, biyoaktif kaplamalar, cilt ürünleri ve filmler gibi çok çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır (White ve ark.,

2006). Bütün bu kullanım alanlarına ek olarak Cu elementi bitki gelişiminde önem arz etmektedir. Bu bağlamda makro elementlere kıyasla daha etkin rol oynayan nanopartiküllerin bitki gelişimindeki etkinliklerinin de belirlenmesi gerekmektedir. Gerçekleştirilen çalışmada, farklı nanopartikül boyutuna sahip metal bakır oksit nanopartiküllerin *Cucumis sativus* bitkisinin gelişimine, bitki TAS ve TOS değerlerine etkisine, toprak solunumuna ve toprak enzim aktivitelerine olan etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, çeşitli sentez yöntemleri ile 1-100 nm arasında değişen nano boyutta parçacıkların üretilmesi ve bunların kullanılma potansiyelinin ortaya çıkarılması ile ilgilenen bir bilimdir (Shah ve ark., 2015). Nanopartiküllerin moleküler biyoloji, fizik, organik ve inorganik kimya, tıp ve malzeme bilimi gibi farklı alanlarda kullanımı günümüzde artış göstermiştir (Salata, 2004; Keller ve Lazareva, 2014). Parçacık boyutundan nano boyuta azalma, daha büyük hacimli malzemelerde görülmeyen parçacık boyutu ve morfolojisi kaynaklı farklı ve gelişmiş özelliklerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır (Yadav ve ark., 2014). 'Nanoparçacık' terimi, 'cüce veya küçük' anlamına gelen Yunanca 'nano' kelimesinden türetilmiştir ve ön ek olarak kullanıldığında 10^{-9} m ye karşılık gelen boyutu belirtmektedir (Narayanan ve Sakthivel, 2010). Nanoparçacıkların yüzey/hacim oranı, büyük parçacık veya atom ile karşılaştırıldığında %35–45 kat daha yüksektir. Nanopartiküller de ortaya çıkan spesifik yüzey alanı nanopartikülleri önemli kılan temel faktörlerden bir tanesidir. Ayrıca, nano boyuta bağlı olan güçlü yüzey reaktivitesi gibi farklı içsel özellikler de nanopartikülleri üstün kılan faktörler arasında gösterilmektedir (Hoet ve ark., 2004). Genel olarak, nanopartiküller sahip oldukları benzersiz özellikleri sayesinde enerji, ilaç ve beslenme gibi çeşitli alanlarda uygulanmaktadırlar ve bundan dolayı son yıllarda ilgi görmektedirler (Singh ve ark., 2015).

Nanometrenin boyutsal olarak daha iyi anlaşılabilmesi için farklı büyüklüklerdeki yapılar Şekil 1.1'deki boyut skalasında gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Mikro ve nano boyutu gösteren uzunluk ölçeği (İsmail ve ark., 2016).

Şekil 1.1.'de yer alan boyutsal malzeme büyüklüklerini yazılı olarak ifade etmek gerekirse; kırmızı kan hücresinin boyutu yaklaşık olarak 10.000 nm ve DNA'nın çapının ise 2 nm bir boyuta sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca, lökosit hücresinin 10.000 nm, bakteri hücresinin 1.000-10.000 nm, virüslerin 75-100 nm ve proteinlerin 5-10 nm, DNA'nın ise yaklaşık 2 nm boyutuna sahip olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu ölçek nanopartiküllerin boyutunu anlamamıza yardımcı olmaktadır (Prasanna ve Hossain, 2007).

1.2. Nanoteknolojinin Tarihsel Gelişimi

Nano çağının başlangıcından çok önce, insanlar çeşitli nano boyutlu nesnelerle ve ilgili nano düzeydeki süreçlerle karşılaşmışlardır ve bunları günlük hayatlarında kullanmışlardır (Wilson ve ark., 2002). Bununla birlikte, doğal olarak kendiliğinden gelişen nanoteknoloji esaslı bu nesnelerin ve süreçlerin anlaşılamadığı bir dönem yaşanmıştır. Birçok durumda, eski nano esaslı üretimde nanoteknolojik malzemeler ve onlardan türetilen ürünler benzersiz özellikleri ile nesilden nesile aktarılmıştır. Binlerce yıl önce insanların doğal kumaşları kullandıkları bilinmektedir. Bu kumaşlar 1-20 nanometre boyutlarında gelişmiş bir gözenek ağına sahip tipik nano gözenekli malzemelerden oluşmuştur (Tolochko, 2009).

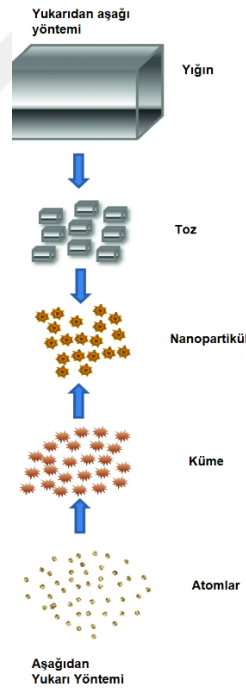
Her ne kadar nanoteknoloji sözcüğünün literatürde teknik bir terim olarak yer alması 1970'li yılları bulmuş olsa da, 9. ve 17. yüzyıllar arasında Orta Çağ Avrupası'ndaki katedrallerin ve günümüzde hala renk canlılığını korumakta olan mozaiklerinin yapımında metalik nanopartiküllerin kullanıldığı bilinmektedir. İngiliz müzesi, mirasının bir parçası olarak Licurg'un kasesine sahiptir. Üzerinde Edons kralı Licurg'un tasvir edildiği bu kâse olağandışı optik özelliklere sahip olup, ışık kaynağının

konumunun (iç veya dış) değişmesiyle renk değiştirmektedir. Doğal ışıktaki kâse yeşil, içeriden aydınlatıldığında ise kırmızıya dönmektedir (Leonhardt, 2007).

1990'lı yıllarda, nanoteknoloji üzerine şirketler kurulmaya başlanmıştır. 1985'de fulleren molekülünün yapısı aydınlatılmıştır. 2000 yılında nanoteknoloji uygulamalarını ticarileştirmek amacıyla Ulusal Nanoteknoloji girişimleri başlatılmıştır. 2005'te Amerikan Kimya Konseyi'nde Nanoteknoloji paneli ilk defa düzenlenmiştir. 2008'de Amerikan Hükümeti tarafından nanoteknolojik araştırmalar için 5 milyar Amerikan doları, diğer ülkeler tarafından ise 10 milyar Amerikan doları harcama yapılmıştır (Roco, 2011).

1.3. Nanoteknolojide Sentez Yaklaşımları ve Uygulama Alanları

Günümüzde araştırmacılar, metal nanoparçacıkların göze çarpan özelliklerinden dolayı nanoyapıların ve nanomalzemelerin sentezine odaklanmaktadır. Nanoparçacıkların sentezinde başlangıç materyaline bağlı olarak aşağıdan yukarıya yöntemler ve yukarıdan aşağıya yöntemler olmak üzere iki ana yöntem bulunmaktadır (Şekil 1.2. ve Tablo 1.1.).



Şekil 1.2. Yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya sentez yöntemine genel bakış (Kumar ve ark., 2019)

İki yöntem arasındaki temel fark, nanoparçacık hazırlanırken kullanılan başlangıç materyalidir. Yukarıdan aşağıya yöntemlerde, dökme malzeme başlangıç malzemesi olarak kullanılarak farklı fiziksel, kimyasal ve mekanik işlemlerle parçacık boyutu

nanoparçacıklara indirgenirken, aşağıdan yukarı yöntemlerde atomlar veya moleküller başlangıç malzemesi olarak kullanılmaktadır (Rajput, 2015).

Tablo 1.1 Nanoparçacık hazırlamanın yukarıdan aşağıya yöntemleri ve aşağıdan yukarıya yöntemleri (Verma ve ark., 2009).

	Yukarıdan aşağıya yöntemler		Aşağıdan yukarıya yöntemler	
	Yöntemler	Örnekler	Yöntemler	Örnekler
1	Mekanik Öğütme	Bilyalı Öğütme Mekanokimyasal yöntem	Katı hal yöntemleri	Fiziksel buhar biriktirme Kimyasal buhar biriktirme
2	Lazer ablasyon		Sıvı hal sentez yöntemleri	Sol jel yöntemleri Kimyasal indirgeme Hidrotermal yöntem Solvotermal yöntem
3	Püskürtme		Gaz fazı yöntemleri	Sprey piroliz Lazer ablasyon Alevle piroliz
4			Biyolojik yöntemler	Bakteri Mantar Maya Yosun Bitki özü
5			Diğer metodlar	Elektrodepozisyon işlemi Mikroalga tekniği Süper kritik akışkan çökeltme işlemi Ultra ses tekniği

1.3.1. Yukarıdan aşağıya doğru yaklaşım

Yukarıdan aşağıya yöntem, bir yığın malzemenin nanometrik ölçekli parçacıklara indirgenmesidir. Mekanik öğütme, nanolitografi, lazer ablasyon, püskürtme ve termal ayırıştırma en yaygın kullanılan nanoparçacık sentez yöntemlerinden bazılarıdır. Yukarıdan aşağıya yöntemlerin uygulanması kolay olmasına rağmen, çok küçük boyutlu parçacıkların hazırlanması için uygun bir yöntem değildir. Bu yöntemle ilgili en büyük problem, nanopartiküllerin yüzey kimyası ve fizikokimyasal özelliklerindeki değişimdir (Nadagouda ve ark., 2011).

1.3.1.1. Mekanik Öğütme

Yukarıdan aşağıya yöntemler arasında mekanik öğütme, çeşitli nanoparçacıkları üretmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Mekanik öğütmenin çalışma prensibi, yüksek enerjili bilyalı öğütme ile parçacık boyutunun küçültülmesidir. 1970 yılında John Benjamin, bu parçacık boyutunu küçültme yöntemini geliştirdi. Toz karışımına indüklenen mekanik enerjiye bağlı olarak düşük enerjili ve yüksek enerjili öğütme olarak sınıflandırılmaktadır. Nano boyutlu parçacıklar genellikle yüksek enerjili bilyalı öğütme işlemi kullanılarak üretilmektedir. Bu yöntem, intermetalik nanoparçacıkların sentezi için yaygın olarak tercih edilmektedir (Yadav ve ark., 2012).

Yöntemin avantajı ise, uygun maliyetli bir şekilde suda az çözünür olan ilaç bileşenlerinin gelişmiş çözünürlüğü gibi üstün fiziksel özelliklere sahip yüksek saflıkta nanopartiküllerin büyük ölçekli üretimi için elverişli olmasıdır (Ullah ve ark., 2014) (Thamizharasan ve Saravanan, 2017). Yöntemin dezavantajları ise, yüksek enerji gerektirmesi, kapsamlı uzun öğütme süresinin gerekli olması ve kullanılan çelik bilyeler nedeniyle tozun kirlenmesi olarak sıralanmaktadır (Tavakoli ve ark., 2007).

Diğer bir mekanik öğütme yöntemi olan mekanokimyasal sentez yöntemi, reaktan karışımının tekrarlanan deformasyonu, kaynaklanması ve kırılmasına dayanmaktadır. Öğütme işlemi sırasında nano boyutlu parçacıkların ara yüzeyinde farklı kimyasal modifikasyonlar oluşmaktadır. Genel olarak, reaksiyon fazlarını ürün fazından ayırmak gibi çeşitli amaçlar için kimyasal reaksiyonlardan önce yüksek sıcaklık gereklidir. Nanopartiküller, herhangi bir harici ısıtma kullanılmadan düşük sıcaklıklarda bir bilyalı değirmen kullanılarak elde edilebilmektedir (Tsuzuki ve McCormick, 2004). Bu yöntemin avantajları arasında nanoparçacık hazırlamanın basit ve verimli olması yer almaktadır (Tavakoli ve ark., 2007). Diğer yandan, bu yöntemde oluşan mikro yapılar (nanoyapılar/nanopartiküller) öğütme koşullarına karşı oldukça hassas olup öğütme ortamından ve atmosferden istenmeyen kirliliklerden etkilenebilmektedir. Daha küçük partiküllerin (20 nm'den küçük) hazırlanması için uzun süreli öğütme gerekmektedir (Tavakoli ve ark., 2007).

1.3.1.2. Lazer Ablasyon

Lazer ablasyon yönteminde partikül boyutunu nano seviyeye indirmek için lazer ışınlaması kullanılmaktadır. Katı hedef materyal, ince bir tabakanın altına yerleştirilmekte ve ardından darbeli lazer ışımasına maruz bırakılmaktadır. Lazer darbesinin süresi, dalga boyu, ablasyon süresi, lazer akıcılığı ve yüzey aktif madde içeren veya içermeyen etkili çevreleyen sıvı ortam gibi çeşitli parametreler, ablasyon verimini

ve oluşan metal parçacığın karakteristiğini etkilemektedir (Al-Warthan ve ark., 2010). Bu yöntemin süspansiyon şeklinde büyük miktarda küçük partiküllerin (nano-boyut) oluşumu için nispeten basit ve etkili bir teknik olması, bu yöntemde nanopartikül özelliklerinin değiştirilebilir olması ve nanopartikül oluşumunun sıvı ortama yüzey aktif madde eklenmeden mümkün olması avantaj oluşturmaktadır (Simakin ve ark., 2004). Bu yöntemde uzun süreli lazer ablasyonu kolloidal çözeltide lazer yolunu bloke eden yüksek miktarda nanopartikül oluşumuna ve ayrıca lazer enerjisinin hedef yüzey yerine halihazırda oluşturulmuş nanopartiküller tarafından emilmesine neden olmaktadır. Bu durum da ablasyon oranında azalmaya yol açmaktadır (Ghorbani, 2014).

1.3.1.3. İyon Püskürtme

İyon püskürtme yöntemi, inert gaz iyonları demeti ile püskürtme yoluyla bir katının buharlaştırılmasını içermektedir (Swihart, 2003). Bu yöntemde, püskürtülmüş malzemenin bileşimi değişmemektedir ve hedef malzemenin bileşimi ile aynı kalmaktadır (Kruis ve ark., 1998). Buharlaştırma ve lazer ablasyon gibi diğer yöntemlere göre refrakter metaller ve intermetalik bileşikler için tercih edilen bir yöntemdir. Ayrıca, bu yöntemde kimyasal yöntemlerle oluşturulanlardan daha az safsızlık üretilmektedir. Alaşım nanoparçacıkları, diğer kimyasal indirgeme yöntemlerine göre bileşim üzerinde daha kolay kontrol ile üretilebilmektedir (Nie ve ark., 2009). Bu yöntem, çözeltide elde edilemeyen geniş boyutlara ve bileşimlere sahip iyonik nanoparçacıkları sentezlemek için çok yönlü bir tekniktir (Johnson ve ark., 2016).

1.3.2. Aşağıdan Yukarıya Yöntemler

Aşağıdan yukarıya yaklaşımı yöntemi, atomların, moleküllerin veya küçük parçacıkların birleştirilmesi gibi daha küçük moleküllerden nanoparçacıkların oluşturulmasına dayanmaktadır (Mukherjee ve ark., 2001).

1.3.2.1. Katı Hal Yöntemleri

Katı hal yöntemlerinden birisi olan fiziksel biriktirme yönteminde, malzeme ya ince bir film ya da nanoparçacıklar olarak bir yüzey üzerine biriktirilmektedir. Bu yöntem, karbon nanotüpler üzerinde metal nanoparçacık ve ince film biriktirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Pandey ve ark., 2011). Bu yöntem, ince metal filmlerin oluşturulmasında basit bir yöntem olarak avantaj sağlamaktadır. Özellikle bu yöntemde düşük hacimli malzeme üretiminin olması bu yöntemi ekonomik kılmamaktadır (Willems, 2005).

Kimyasal buhar biriktirme yöntemi ise, ilk kez 19. yüzyılın sonlarında rapor edilmiş, patenti alınmış ve elektrik lambasında filamentler olarak karbon fiberin ve renk

pigmenti için karbon tozunun hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu biriktirme yönteminde, film oluşumu için taşıyıcı gaz halindeki molekülün kimyasal reaksiyonu yoluyla bir yüzey üzerinde ince bir hedef malzeme filmi biriktirilmektedir (Pedersen ve Elliott, 2014).

Plazma ile güçlendirilmiş kimyasal buhar biriktirme yönteminde ise, plazma boşluk odasında üretilmekte ve reaksiyona giren gazların kimyasal reaksiyonları ile substrat yüzeyinde ince film olarak biriktirilmektedir. Göreceli olarak düşük sıcaklıkta çalışabildiği için büyük ölçekli endüstriyel uygulamalar ve grafen nanoyapı üretimi ile nanotüpler için avantaj oluşturmaktadır (Bhuyan ve ark., 2016). Aynı zamanda bu yöntemde nanoyapıların yüzey morfolojisi ve kristal yapısı gibi parçacık özelliklerinin kontrol edilebilir olması önemli bir avantaj oluşturmaktadır (Reina ve ark., 2009). Bu yöntemin üretim ölçeğini büyütme kolay olmakta ve kontrollü yüzey morfolojisine sahip nanopartiküller bu yöntemle üretilebilmektedir. Toksik, aşındırıcı ve patlayıcı öncü gazlar nedeniyle kimyasal tehlike olasılığının yöntemde bulunması ve bu yöntemde çok bileşenli malzeme biriktirmenin zor olması yöntemin zayıf yönlerini oluşturmaktadır (Zhang ve ark., 2010).

1.3.2.2. Sıvı Hal Sentez Yöntemleri

Nanopartikül sentezinde kullanılan sol jel yöntemi; a) önceden oluşturulmuş kolloid metalin (oksit) matris oluşturan türleri içeren bir sol ile karıştırılması ve ardından jel oluşumu, b) önceden hidrolize edilmiş bir silika sol içinde metal ve metal oksit veya nanoparçacıkların doğrudan karıştırılması ve c) hidrolizden önce metalin silikonla kompleksleşmesi ve metalin indirgenmesi prensibine dayanmaktadır (Cushing ve ark., 2004). Bu yöntemde, sürekli sıvı fazda (jel) bir ağ oluşturmak için kolloidal süspansiyon (sol) ve jelatin kullanılarak bir ağ oluşumu gerçekleştirilir. Metal alkoksitlerin ve aloksisilanların iyonları, kolloidlerin sentezi için bir öncü olarak kullanılmaktadır. Uygulama yönünde yöntemin basit olması ve ayrıca bu yöntemde partikül boyutu ve morfolojisinin reaksiyon parametrelerinin sistematik olarak izlenmesiyle kontrol edilebilir olması yöntemin üstün özellikleri arasında sayılmaktadır (Hasnidawani ve ark., 2016).

Kimyasal indirgeme yönteminde ise iyonik tuz, farklı indirgeme ajanları kullanılarak yüzey aktif madde varlığında uygun bir ortamda indirgenmektedir (Guzmán ve ark., 2009). Metal nanoparçacıkları hazırlamak için sulu çözeltide sodyum borohidrit gibi indirgeyici ajan kullanılmaktadır. Oluşan metal nanopartiküller, trisodyum sitrat

(TSC) veya sodyum lauril sülfat (SLS) kullanılarak kapatılmaktadır. Gümüş nanoparçacıkların sentezi için de kullanılan bir yöntemdir (Landage ve ark., 2014). Metal nanoparçacıkların hazırlanması için kullanılan en basit yöntem olması yöntemin avantajları arasında gösterilmektedir (Guzmán ve ark., 2009). Toksisiteye sebep olması, ekonomik olmaması, zayıf indirgeme yeteneği ve safsızlıklar gibi indirgeyici ajanlarla ilişkili çeşitli sınırlamalara sahip olması yöntemin dezavantajları arasında yer almaktadır. İndirgeyici madde olarak potasyum borohidrat kullanılarak bakır nanoparçacıkların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Zhang ve ark., 2010).

Sıvı hal sentez yöntemlerinden biri olan hidrotermal yöntem, sulu çözelti buharlarının katı malzeme ile yüksek basınç ve sıcaklıkta reaksiyona girmesine dayanmakta olup küçük parçacıkların birikmesine yol açmaktadır. Bu yöntemde polimerik hidroksit formunda katyon çökelmektedir ve ayrıca bu hidroksitler dehidre olup metal oksit kristal yapısının oluşumunu hızlandırmaktadır. Yöntemde istenilen boyut ve şekilde nanoparçacık sentezlenebilmesi, iyi kristalize edilmiş tozlar oluşturulabilmesi ve yüksek kristallığe sahip nanokristal üretiminin yapılması yöntemin avantajlarını oluşturmaktadır (Tavakoli ve ark., 2007). Diğer yandan, üretim süreçlerinin kontrolünün zor ve tekrarlanabilirliğinin sınırlandırılmış olması yöntemin zayıf yönleri olarak sıralanmaktadır. Nanoparçacık formunda veya hatta tek kristal halinde tozların hazırlanması için uygun bir yöntem olarak değerlendirilmektedir (Tavakoli ve ark., 2007).

Solvothermal yöntem ise, çözücü olarak su, metanol ve etanol gibi kimyasalların varlığında nanofazın hazırlanması için kullanılmaktadır. Reaksiyon, çözücünün (su ve alkol) kaynama noktası sıcaklıklarının üzerinde ısınmasına izin veren basınçlı kap içinde gerçekleştirilmektedir. Kristalleşme kinetiği (kristal oluşumu), mikrodalga destekli reaksiyonlar (mikrodalga solvothermal) kullanılarak arttırılabilmektedir (Komarneni, 2003). Yüksek kaliteli kristalize monodispers nanokristallerin hazırlanmasında bu yöntem tercih edilmektedir (Yang ve ark., 2007). Uygulama alanları arasında gümüş nanoparçacıkların sentezi, mikrodalga destekli koşul altında indirgeyici madde olarak polietilen glikol veya metanol kullanılarak çeşitli nanoyapılarının hızlı sentezi, nitritlerin, metal oksitlerin ve yeni yarı iletken malzemelerin yüksek kaliteli kristalize monodispers nanokristallerinin hazırlanması yer almaktadır (Komarneni, 2003; Yang ve ark., 2007).

1.3.2.3. Gaz Fazı Yöntemleri

Piroliz, endüstrilerde büyük ölçekli nanoparçacık üretimi için en yaygın olarak kullanılan prosestir. Bir öncünün alevle yakılmasını içermektedir. Ön-madde, yandığı

küçük bir delikten fırına yüksek basınçta beslenen sıvı veya buhardır (Kammler ve ark., 2001). Yanma veya yan ürün gazları daha sonra nanoparçacıkları geri kazanmak için havayla sınıflandırmaktadır. Bazı fırınlar, kolay buharlaşma sağlamada yüksek sıcaklık üretmek için alev yerine lazer ve plazma kullanır (D'Amato ve ark., 2013). Pirolizin avantajları basit, verimli, uygun maliyetli ve yüksek verimli sürekli prosestir. Uygulama alanları ise, nano-metal oksit ve karışık metal oksit sentezidir (Ghaffarian ve ark., 2011).

1.3.2.4. Biyolojik Yöntem/Yeşil Sentez Yöntemi

Yeşil sentez yöntemleri kullanılarak nanoparçacıkların hazırlanması, nanoteknoloji de ön plana çıkmaya başlamıştır. Bu teknikler, geleneksel yöntemlerin reaksiyon komplikasyonları, yüksek maliyet ve güvenlik sorunu gibi problemlerinin üstesinden gelmek için ortaya çıkmıştır. Yeşil kimya yaklaşımları, sentez süreçlerine yeni teknikler ile birlikte sağlık ve çevreye yönelik tehdidi azaltmak yeni stratejiler sunmuştur (Bhosale ve ark., 2014).

Nanoparçacık hazırlamada biyolojik yöntemlerde mikroorganizmalar, bitkiler ve bunların bileşenleri kullanılmaktadır. Bu tekniklerin maliyet olarak daha uygun olması, çevre dostu yöntemler olması ve büyük ölçekli üretim için kolayca büyütülmesi nedeniyle diğer fiziksel ve kimyasal yöntemlere göre birçok avantajı barındırmaktadır. Ayrıca yeşil sentez, yüksek basınç, enerji, sıcaklık ve toksik kimyasalların kullanımını içermemektedir (Karnani ve Chowdhary, 2013).

Nanopartiküllerin sentezi için mikroorganizma gibi doğal olarak oluşan kaynakların uygun şekilde uygulanmasına olan ilgi, dünya çapında sürekli olarak artmaktadır. Bakterilerin, hızlı çoğalma ve yetiştirme kolaylığı gibi sunduğu avantajlar nedeniyle metalik nanoparçacık sentezinde kullanımı dikkat çekmiştir (Pantidos ve Horsfall, 2014). Ayrıca, mantarlar tarafından salgılanan enzim ve proteinler, metal tuzundan metal nanoparçacık sentezi için kullanılabilen indirgeyici ajan olarak işlev görmektedirler. Ag gibi metaller, elektrostatik etkileşim nedeniyle sitoplazmik membrana bağlanma ve indirgenme yeteneğine sahiptir, bu da gümüş çekirdeklerini oluşturmada ve sonunda gümüş çekirdekleri nanopartiküllerin birikmesine yol açmaktadır (Mukherjee ve ark., 2001; Ahmad ve ark., 2003). Son zamanlarda bitki aracılı nanoparçacık sentezi dünya çapında geniş ilgi görmektedir (Prathna ve ark., 2011). Altın, gümüş, bakır ve çinko gibi çeşitli metalik nanoparçacıkların hazırlanması için bitki ekstraktları yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Nanopartikül sentezi, biyolojik özütten biyolojik indirgeyici ajanın saflaştırılmasını ve kontrollü bir şekilde ilgili metal öncü çözeltisinin sulu çözeltisi ile karıştırılmasını içermektedir. Nano boyutlu parçacıklar üretmek için oda sıcaklığında

birkaç spontane reaksiyon meydana gelmektedir. Bazen sentez sürecini hızlandırmak için karıştırma ve ısıtma yeterli olmaktadır. Bitki özütlerinin genellikle kolay bulunabilmesi, toplu üretime uygun olması ve oluşan yan ürünler ile atık ürünlerin çevre dostu olması gibi unsurlar bu yöntemin nanopartikül sentezinde tercih edilmesini sağlayan önemli faktörlerdir (Pantidos ve Horsfall, 2014).

1.3.2.5. Nanoparçacık Sentezinin Diğer Yöntemleri

Nanomalzemelerin üretimi için ayrıca elektrodpozisyon sentezi gibi yöntemler kullanılmaktadır (Dikusar ve ark., 2009). Gözenekli alümina membranların üretimi için iyon aşındırma tekniği kullanılmaktadır (Furneaux ve ark., 1989). Ek olarak, gözenekli yarı iletken yapıların üretimi için, elektrokimyasal anot çözme işlemleri gibi bir elektrokimyasal biriktirme yöntemi tercih edilmektedir (Dikusar ve ark., 2009).

Metal nanoparçacıklar, metal tuzları içeren ortamlar kullanılarak elektrokimyasal biriktirme ile hazırlanmaktadır. Metal tuzu içeren elektrolitik banyoda uygun süre boyunca hafif voltaj uygulanmaktadır (Islam ve Islam, 2013). Yöntem avantajları, basit, hızlı ve ucuz bir yöntem olması, kontrollü boyut ile morfolojide nanopartiküller üreten benzersiz yöntem olması ve nanoparçacıkların doğrudan alt tabakaya bağlanmasıdır (Mohanty, 2011).

Günümüzde mikrodalga teknikleri, nanoparçacıkların hazırlanması için termal ısıtmaya göre daha fazla önerilmektedir. Son zamanlarda bu teknik, gümüş nitrat çözeltisinin indirgeyici ajan ve stabilizatör olarak görev yapan karboksimetil kitosan ile gümüş nanopartiküllerin hazırlanması için başarıyla uygulanmıştır (Wang ve ark., 2010). Nanoparçacık hazırlama için son derece etkili teknoloji olması, basit, hızlı hacimsel ısıtma ile reaksiyon hızında çarpıcı artış gözlemlenmesi ve işlem boyunca homojen ısıtma uygulanabilmesi bu yöntemin avantajları olarak sıralanabilir. Mikrodalga fırının homojen ısıtması nedeniyle daha kısa kristalleşme süresi ve homojen çekirdeklenme gözlemlenmesi dezavantaj olarak kabul edilmektedir (Ali ve ark., 2016). Kimya ve malzeme biliminin çeşitli alanlarında uygulama alanı bulan çeşitli metal nanopartikülleri hazırlamada bitki ekstraktlarının yaygın olarak kullanımı söz konusudur (Singh ve Rawat, 2016).

Süper kritik akışkanlar (SKA'ler), malzeme ve kimya biliminin çeşitli alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. SKA'ların ayırt edici özelliği, fizikokimyasal özelliklerinin, basınç veya sıcaklığın basitçe değiştirilmesiyle gaz ve sıvı haller arasında değiştirilebilmesidir. Bu durum yoğunluk, viskozite, yayılma veya yüzey gerilimi gibi reaksiyon ortamını değiştirme fırsatı sağlamaktadır (Ye ve Wai, 2003; Aymonier ve ark., 2006). SKA'ların hızlı genleşme yeteneği, nanopartiküller gibi ince tozların sentezi için

seçici olarak kullanılan temel bir özelliktir (Ye ve Wai, 2003). Düşük maliyetli ve kolay bir yöntem olması en büyük avantajını oluşturmaktadır (Sankula ve ark., 2014).

1.4. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları

Nanoteknoloji temelli malzeme hazırlama prensiplerine göre üretilen yüksek dayanıklılık ve iletkenlik gibi özelliklerinden dolayı tercih edilen nanomalzemeler günümüzde günlük hayatımızın birçok alanında uygulama alanı bulmaktadır. Metal nanopartiküllerin sıklıkla kullanıldığı sektörlerden birisi de tarım sektörüdür. Tarım alanında mühendislik ürünü metal nanopartiküllerin (MNP'ler) kullanımı, nihai olarak mahsul bitkilerinin büyümesini ve üretkenliğini destekleyen kontrollü besin salınımı yoluyla toprak kalitesini iyileştirebilmektedir. Bu gelişmeler ile birlikte, bilim insanları tarımsal faaliyetlerdeki ve gelecekteki potansiyel tehlikeleri bertaraf etmek amacıyla yeni teknikler geliştirmeye çaba sarf etmektedir. Günümüzde, yeşil mühendislik nanopartikülleri makro ve mikro besinlerin toprağa kontrollü salınımı için nanogübre olarak kabul edilip potansiyel besin kaynakları olarak kullanılmaktadır ve böylelikle besinler boşa harcamadan bitki büyümesini ve gelişimini teşvik edecek forma dönüştürülmektedir. Toprak altı sebzeler, topraktaki nanopartiküllerle doğrudan temas halinde olmaktadır (Ebbs ve ark., 2016a; Ebbs ve ark., 2016b).

Günümüzde nanoteknoloji, tarımsal ürün verimliliğini önemli ölçüde artırmada potansiyel bir çözüm olarak görülmektedir. Bu doğrultuda nano-enkapsülasyon gübreler ve nanopartiküllerin uygulanması ile gübreler israf olmadan sürdürülebilir bir şekilde kontrollü salınabilmektedir. Gerçekleştirilen çalışmalar, nano-enkapsülasyon gübrelerin fide büyümesi, gelişimi, biyokütle ve tohum verimi üzerinde önemli faydalı etki sağlayabileceğini göstermektedir. Tarım ürünlerinin değerini artırmak için ve çevre sorunlarını azaltmak için potansiyel bir çözüm olan nano-enkapsülasyon gübre uygulamalarının başarısı, nanopartikül yüzeylerindeki reaktif alanlardaki yoğunluğun yüksek olmasından kaynaklanmaktadır.

1.5. Bakır Oksit Nanopartiküller (CuO NP'ler)

Bakır nanopartiküller (CuNP'ler) yüksek iletkenlikleri, çevre dostu olmaları, kolay bulunabilir olmaları ve toksik olmamaları nedeniyle teknolojik açıdan önemli olmaktadır. En önemli metal oksit NP'lerinden biri olan CuO NP'ler, sensörlerde, katalizörlerde, yüzey aktif maddelerde ve antimikrobiyallerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Cioffi ve ark., 2005; Saison ve ark., 2010).

Bakır bazlı gübreler, bitki koruma formülasyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakır aynı zamanda birçok protein ve enzime dahil olan temel bir mikro

besindir ve bitkilerin beslenmesinin yanı sıra sağlığında da önemli bir role sahiptir. Bakır nanoparçacıkların biyolojik nano-gübreler ve biyo-katılar olarak tarım alanlarına uygulanması, bitkilerin bu nanopartiküllere maruz kalmasının olası bir yolunu göstermektedir (Rawat ve ark., 2018). Bakır, bitkiler ve hayvanlar için hayati bir mikro besin olmakla birlikte çeşitli önemli fizyolojik ve biyolojik işlevler için oldukça gereklidir (Javed ve ark., 2017; Vishveshvar ve ark., 2018). Çevresel, ticari ve tıbbi alanlarda çok çeşitli nanoparçacık (NP) kullanımları göz önüne alındığında, nanopartikül üretimi en yüksek endüstriyel ölçeğe ulaşmıştır (Anjum ve ark., 2016; Rippner ve ark., 2018). Çeşitli kullanım amaçları ile farklı çevresel alanlara girme potansiyelleri nedeniyle, CuO NP'ler biyotoksisite çalışmalarında ana odak noktası olmuştur (Rajput ve ark., 2018).

Atmosfere salınan CuO-NP'lerin seviyeleri hakkında kesin bir veri olmamasına rağmen, bitki yapraklarında alışılmadık derecede yüksek CuO NP konsantrasyonlarına rastlandığı belirlenmiştir (Hong ve ark., 2015a). Gerçekleştirilen çalışmalarda, bitkiler daha yüksek konsantrasyonlarda CuO NP'lere maruz kaldıklarında, fide yapraklarındaki terleme hızında ve net fotosentez hızında bir azalma gözlemlenmiş, bu durum fitotoksik semptomlara maruz kaldıklarını göstermiştir (Du ve ark., 2016). Metal NP'lerin ana toksisite mekanizmaları, hücrel oksidatif stres ve metabolik işlev bozukluğu olmaktadır (Chang ve ark., 2012; Perreault ve ark., 2014).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Nano ürün pazarının büyümesi, topraklar da dahil olmak üzere çevresel alanlarda tasarlanmış nanoparçacıkların (NP'ler) varlığında artış ile sonuçlanmaktadır. Metal oksit nanopartiküllerin (MNP'ler) yaygın olarak kullanılması, bunların toprağa salınımını kaçınılmaz olarak artırmakla birlikte çevresel etkileri ve ekolojik riskleri hakkında endişeleri de beraberinde getirmektedir (Xu ve ark., 2015). NP'lerin toprakta varlığına ilişkin en önemli adım, NP'lerin toprak mikrobiyal topluluğu üzerindeki etkisinin değerlendirilmesidir (Joško ve ark., 2019). Uygulamalardan önce NP'lerin ekolojik potansiyel tehditlerinin anlaşılması gerekmektedir. Bitkiler ve NP'ler arasındaki etkileşim, risk değerlendirmesinin önemli bir yönünü oluşturmaktadır. Kirlenmiş bir ortamda yetişen bitkiler, besin zinciri yoluyla insan sağlığına önemli ölçüde tehdit oluşturabilmektedir (Rajput ve ark., 2020).

Ayrıca, CuO NP'lerinin uygulanmalarının bitkilerin yetiştirilmesi, bitkilerin korunması, haşere kontrolü ve bozulmuş toprakların geri kazanılması umut verici olabileceği yapılan bazı çalışmalar ile gösterilmiştir. Ancak uygulanan nanopartikül boyut ve konsantrasyona bağlı olarak bakır fitotoksik etkilere neden olabilmektedir. Bu bağlamda CuO nanopartikülleri ile alakalı yapılan bazı çalışmalara bu bölümde yer verilmiştir.

Moon ve ark., (2014), bakır oksit (CuO) ve CuO NP'leri ile muamele edilmiş salatalık tohumları (*Cucumis sativus*) üzerinde akut fitotoksisite testi, tohum çimlenmesi ve kök uzaması testleri yapmıştır. Kök çimlenmesinin inhibisyon oranını test etmek için 200 ve 600 ppm olmak üzere iki CuO ve CuO NP konsantrasyonu kullanılmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, CuO'nun her iki konsantrasyonu da tohum çimlenmesini zayıf bir şekilde inhibe ettiği, CuO NP'leri çimlenmeyi önemli ölçüde engellediği ve 600 ppm'de %23,3'lük düşük bir çimlenme oranı gösterdiği tespit edilmişlerdir. Kök uzama testlerinde ise, CuO NP'lerinin CuO'dan çok daha güçlü bir inhibitör olduğunu gözlemlemişlerdir (Moon ve ark., 2014).

Yusefi-Tanha ve ark., (2020) yaptıkları bir çalışmada, 3 farklı boyutta sentezlenen (25, 50, 250 nm) bakır oksit nanopartiküllerinin (CuO NP'ler) toprakta soya fasülyesi tohum verimliliğine etkisini incelemişlerdir. CuO NP'lerin uygulamalarının farklı nanopartikül boyutuna ve konsantrasyonuna bağlı olarak soya fasülyesi tohumlarında inhibisyonu yansıttığı belirlemişlerdir. CuO NP-25'in tüm konsantrasyonlarında meydana

gelen inhibisyonun, test edilen diğer iki Cu ONP boyutundan ve Cu^{2+} iyonundan önemli ölçüde daha yüksek olduğu ilgili çalışmada belirlenmiştir (Yusefi-Tanha ve ark., 2020).

Shi ve ark., (2018) tarafından yapılan çalışmada ise, CuO NP'lerinin dönüşümünü ve bunların toprak özellikleri ve bileşenleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek için farklı özelliklere sahip iki çeltik toprağı CuO NP'lere maruz bırakılmıştır. Her iki topraktaki mikrobiyal biyokütlenin, CuO NP'leri tarafından ciddi şekilde inhibe edildiğini bulmuşlardır (Shi ve ark., 2018).

Rippner ve ark., (2021) ise alüvyal bir toprağı CuO NP eklenmesinin toprak mikrobiyal biyokütlesi ve solunumu üzerindeki etkilerini ölçmüşlerdir. Yapılan uygulamalar sonrasında 16 nm CuO NP, 42 nm CuO NP ve nanoparçacık boyutundan daha büyük CuO ilavesini takiben, topraklardaki Cu mevcudiyetinin $\text{CuCl}_2 > 16\text{nm CuO NP} > 42\text{nm CuO NP} > \text{CuO}$ sırasına göre tüm topraklarda hemen artış gösterdiği belirlenmiştir (Rippner ve ark., 2021).

Pelegriño ve ark., (2020) biyosentezlenen CuO NP'lerinin (yeşil çay ekstresi kullanılarak) 0,2 ile 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ arasında değişen konsantrasyonlarına maruz bırakılan marulda (*Lactuca sativa* L.) nanopartiküllerin fide büyümesi üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Toksisite biyoanalizlerine göre, düşük konsantrasyonlarda (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e kadar) yapılan CuO NP uygulamalarının tohum çimlenmesini etkilemediği, daha yüksek konsantrasyonlarda (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'den yüksek) yapılan CuO NP uygulamalarının ise tohum çimlenmesi ve kök büyümesinde sırasıyla %35 ila 75 arasında değişen oranlarda inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. CuO NP konsantrasyonunun artmasıyla köklerdeki nitrit ve S-nitrozotiyol seviyeleri artarken, süperoksit dismutaz ve toplam antioksidan aktivitelerinin azaldığı ilgili çalışmada gözlenmiştir (Pelegriño ve ark., 2020).

Kim ve ark., (2013) CuO ve çinko oksit (ZnO) NP'ler belirli doz ve uygulama şekli ile toprağı uygulamışlardır. Nanopartiküller ile muamele edilmiş topraklarda *Cucumis sativus* ve *Zea mays* bitkileri yetiştirilmiş ve ardından yapılan uygulamaların biyobirikim üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda toprak enzim aktivitesinin ve bitki biyokütlesinin, CuO NP'leri tarafından büyük ölçüde inhibe edildiği tespit edilmiştir. Bu bulgulara ek olarak, bitkilerin metal NP alım miktarlarının bitki türlerine bağlı olduğu da bu çalışmada gösterilmiştir. *C. sativus* ve *Z. mays* bitkileri arasında karşılaştırma yapıldığında ise, *C. sativus* tarafından yapılan Cu ve Zn birikiminin belirgin şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, metal oksit NP'lerinin toprak bakterilerini ve bitkileri olumsuz etkileyebileceği sonucuna ilgili çalışma ile ulaşılmıştır (Kim ve ark., 2013).

Qu ve ark., (2022) yaptıkları bir çalışmada, *Salix* büyütülen sulak bir alanda CuO nanoparçacıklarının (NP'ler; 0, 100 ve 500 mg/kg'daki eşdeğer Cu miktarı) bitki, toprak enzim aktivitesi ve mikrobiyal topluluk üzerindeki etkilerini araştırmak için bir deneme kurmuşlardır. Deneme sonuçları, 500 mg kg⁻¹'da CuO NP'lerinin ve iyonik Cu uygulamalarının bitki büyümesini engellediği, 100 mg kg⁻¹'da CuO NP'lerinin kolaylaştırıcı bir rol oynadığını göstermiştir. CuO NP'lerin peroksidaz ve polifenol oksidaz aktivitelerini önemli ölçüde azalttığı, iyonik Cu uygulamalarının ise peroksidaz aktivitesini arttırdığı ilgili çalışmada belirlenmiştir. Tüm Cu uygulamalarında bakteriyel topluluğun zenginliğinin ve çeşitliliğinin önemli ölçüde azaldığını belirlemişlerdir (Qu ve ark., 2022).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Nanopartiküllerin Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan CuO nanopartikülleri NANOGRAPHİ firması tarafından ticari olarak tedarik edilmiştir. Alınan bakır oksit (CuO) nanopartiküllerin firma tarafından %99,99 saflıkta olduğu ve ortalama 30, 50 ve 100 nm boyutlarına sahip olduğu bildirildi. Satın alınan CuO nanopartiküllerin faz ve kristal yapılarının belirlenmesi, Cu-K α radyasyonu (1,5405Å) kullanan bir X-ışını diffraktometresi ile 20-80 derece aralığında ve 0.02 adım boyutunda X-ışını kırınım (XRD) sisteminde (PANalytical Empyrean) gerçekleştirildi. XRD ölçümlerinde 45 kV ve 40 mA akımda kullanılan powder diffraktometre kullanıldı. Elde edilen piklerle gümüş nanopartiküllerin kristallilik derecesi belirlendi. Örneklerin şekilsel karakterizasyonu alan etkili taramalı elektron mikroskobu (FESEM, ZEISS GeminiSEM 500) ile 200 kX büyütmelemlerde yapıldı. Bir miktar nanopartikül örneği karbon şerit üzerine kaplandı ve ardından altın ile tekrar kaplanarak analiz edildi.

3.2. Toprak Örneklerinin Alınması ve Toprak Analizleri

Sarıcalar bölgesinden 0-20 cm derinlikten alınan bozulmuş örnekler toprakçı küreği yardımıyla, V şeklinde çukurlar açılarak alındı. Her bir noktadan alınan toprak örnekleri büyük bir kovada karıştırılarak içerisinde toprak analizleri için 1'er kg olacak şekilde 2 adet numune alındı. Bu numunelerden bir kısmı toprağın bazı kimyasal ve fiziksel özelliklerini belirlemek için laboratuvara götürüldü. Kurutulan bu toprak örneği 2 mm'lik elekten geçirilerek belirlenen analizler yapıldı. Diğer bir kısım toprak numunesi ise soğutucuda saklanarak biyolojik analizlerde kullanılmak için depolandı. Geriye kalan topraklar saksı denemelerinde kullanılmak üzere laboratuvara götürülerek hava kuru hale getirildi.

3.2.1. Toprak örneklerinde yapılan analizler

3.2.1.1. Fiziksel analiz metotları

Bouyoucos hidrometre yöntemine göre toprak örneğinin tekstür tayini yapıldı (Gee ve ark., 1986). Hacim ağırlığı (Pb) tayininde, arazilerden alınan bozulmamış örnekler 105 °C'de etüv de sabit ağırlığa gelinceye kadar bekletildi ve tartılan fırın kurusu ağırlığın, örnek hacmine (100 cm³) bölünmesiyle hesaplandı (Blake ve Hartge, 1986b). Zerre yoğunluğunun tayininde (Pk) piknometre yöntemi kullanıldı (Blake ve Hartge, 1986a).

Laboratuvar analizlerince belirlenen hacim ağırlığı ve kütle yoğunluğu değerlerinden hesaplama yoluyla porozite (P) bulundu (Eşitlik [1]), (Danielson ve Sutherland, 1986)

$$P = 1 - P_b / P_k \times 100 \quad \text{Eşitlik (1)}$$

Tarla kapasitesi tayini, havada kurutulmuş toprak örneklerinde basınç tablası kullanılarak (10 kPa (TK₁₀) ve 33 kPa (TK₃₃) basınçta) ağırlıkça toprakta tutulan nem yüzdesi olarak belirlendi (Klute, 1986; Gugino ve ark., 2009). Basınç tablası kullanılarak (1500 kPa basınçta) ağırlıkça toprakta tutulan nem yüzdesi solma noktası (SN) olarak belirlendi (Klute, 1986). Faydalı su (FS₁₀₋₁₅₀₀ ve FS₃₃₋₁₅₀₀), laboratuvar koşullarında belirlenen tarla kapasitesi değerlerinden (TK₁₀ ve TK₃₃) solma noktası değeri çıkartılarak bulundu [Eşitlik (2)].

$$FS_{10-1500} = TK_{10} - SN \text{ ve } FS_{33-1500} = TK_{33} - SN \quad \text{Eşitlik (2)}$$

Agregat stabilitesi tayini ise, 40 °C de fırında kurutulan toprak örneklerinde yapıldı. Bunun için üstte 2.0 mm ve altta da 0.25 mm, en altta elek altlığı olan elek serisi hazırlandı ve hazırlanan seriye üstten ilave edilen kurutulmuş toprak elendi. Ayrılan agregatlardan (2-0.25 mm arası) yaklaşık 20 g tartıldı ve agregatlar tek bir tabaka halinde 0.25 mm açıklığa sahip 20 cm çaplı elek üzerine yayılarak yapay yağmur simülatörünün 50 cm aşağısına yerleştirildi. Hazırlanan agregatlar 150 mm saat⁻¹ lik yağış yoğunluğuna sahip yağmur simülatörünün altında 5 dakika bekletilerek toplam 12.5 mm yağış uygulamasına tabi tutuldu. Yapay yağışın ortalama damla çapı 4-5 mm olup, her bir elek üzerindeki agregatlara 0.74 J'lük bir enerji aktarıldı. Agregat stabilitesi, stabil agregatların kütlesinin toplam örnek kütlesine bölünmesiyle bulundu [(Eşitlik (3)) (Gugino ve ark., 2009).

$$\%AS = (\text{Stabil agregatlar-Kum}) / (\text{Toplam örnek ağırlığı-Kum}) \times 100 \quad \text{Eşitlik (3)}$$

3.2.1.2. Kimyasal analiz metotları

Örneklerin pH değeri, cam elektrotlu ve dijital göstergeli pH metre ile 1:1 toprak-saf su karışımında ölçüldü (McLean, 1983). Elektriki iletkenlik (EC) ise 1:1 toprak-saf su karışımında elektrik iletkenlik aleti kullanılarak ölçüldü (Kacar, 2009). Örneklerin kireç içerikleri (CaCO₃) "Scheibler Kalsimetresi" ile hacimsel olarak belirlendi (Nelson, 1983). Örneklerin toplam azot kapsamları (TN) Dumas kuru yakma metodu ile LECO CN-2000 cihazı kullanılarak tespit edildi (Wright ve Bailey, 2001). Toprakların yarıyıllı fosfor kapsamları (YP) belirlenmesinde, pH'sı 8.5'e ayarlanmış 0.5 M NaHCO₃ çözeltisi kullanılarak ekstrakte edilen P miktarına göre oluşan mavi renk optik densitesi Spektrofotometrede 880 nm dalga boyunda okunarak ölçüldü (Nelson ve Sommers, 1983).

3.2.1.3. Biyolojik Analiz Metotları

Organik Madde (OM) tayininde örneklerin toplam organik karbon (OC) kapsamaları Dumas kuru yakma metodu ile LECO CN-2000 cihazı kullanılarak belirlendi (Wright ve Bailey, 2001). Ölçülen organik karbonun organik maddeye dönüştürülmesinde organik maddenin %58'inin organik karbon olduğu kabul edilerek organik karbon yüzdesinin 1.724 sayısı ile çarpılmasıyla yüzde organik madde hesaplandı (Nelson ve Sommers, 1983).

Örneklerin dehidrogenaz enzim ektivitesi (DHA) için toprak örneklerinden alınan 2 mm'lik elekten elenmiş 6 gr taze toprak numunesi 50 mL'lik falkon tüplere konuldu. Örnek üzerine 1mL substrat çözeltisi (%3'lük TTC(2,3,5-trifeniltetrazolium)) ve 2.5mL glikoz çözeltisi (%1.2'lik) ilave edilerek 24 saat boyunca 25 °C'de inkübasyona bırakıldı. Aynı durum topraksız şekilde de kontrol örnekleri için gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda örnekler alındı ve üzerine 10 mL metanol eklenerek whatman 42 filtre kâğıdı ile süzüldü. Bu yıkama işleme yaklaşık 3-4 defa tekrarlandı. Daha sonra, falkon tüpleri son hacim 50mL olacak şekilde metanol ile tamamlandı. Kontrol numuneleri ise direk 50 mL son hacme metanol ile tamamlandı. Standart eğrinin oluşturulmasında ise standart TPF çözeltisinden (trifenilformazan) 0-2.5-5-7.5-10-12.5-15 mL ayrı ayrı alınarak son hacimleri 50 mL olacak şekilde falkon tüplerinde tamamlandı. Oluşan kırmızı rengin optik densiteleri 485 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Elde edilen veriler $\mu\text{gTPF g}^{-1}$ (kuru toprak) 24h^{-1} olarak ifade edildi. Bütün bu yapılan uygulamalar 3 tekrerrür olacak şekilde gerçekleştirildi(Thalmann, 1968).

Toprakların alkalen fosfataz aktivitesinin (ALP) belirlenmesinde hidrolitik parçalanma ürünlerinin ekstraksiyonu ile yapıldı (Tabatabai ve Bremner, 1969). Bu işlemde, 1 g toprak örneği üzerine 4 mL modifiye üniversal tampon (MUB, pH 11) ve 1 mL substrat çözeltisi (0.025 M p-nitrofenil fosfat) ilave edildi, karışım 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Aktivitenin belirlenmesi amacıyla, inkübasyon sonunda karışımın p-nitrofenol içeriği spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu amaçla karışım, 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üzerine 1 mL 0.5 M kalsiyum klorür (CaCl_2) ve 4 mL tris (hidroksimetil) aminometan- sodyum hidroksit (THAMNaOH) çözeltisi ilave edildikten sonra oluşan sarı rengin optik densitesi 410 nm'de standart p-nitrofenol çözeltilerine karşılık gelecek şekilde spektrofotometrede ölçüldü. Elde edilen sonuçlar ise $\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1}$ kuru toprak cinsinden ifade edildi.

Toprak solunumu analizi için filtre kâğıdı yerleştirilmiş delikli metal kap içerisine 20 g toprak tartılıp konuldu. Metal kap üzerine tripod yerleştirilerek kavanozun içerisine

yerleştirildi. Küçük bir behere 9 mL 0.5 M potasyum hidroksitten (KOH) konularak kavanoz içerisinde yer alan tripod üzerine yerleştirildi. Bütün bu işlemler sonrasında 7.5 mL saf su kavanozun tabanına konularak kavanozun kapağı kapatıldı. Örnekler 96 saat boyunca 28°C derecede inkübasyona bırakıldı. Belirlenen süre sonunda numunelerde EC ölçümü yapılarak toprakların solunum değerleri belirlendi.

3.3. Denemenin kurulması

CuO NP süspansiyonları her bir doz ve partikül boyutu için hazırlandı. CuO NP süspansiyonlarının hazırlanmasında deiyonize su kullanıldı. Hazırlanan süspansiyonlar 30 dakika boyunca 5 °C'lik su banyosunda ultrasonik kullanılarak homojenize edildi. Saksı başına 2.5 kg olacak şekilde toprak örnekleri saksılara yerleştirildi. Her bir saksıya hazırlanan CuO NP süspansiyonlarından kg toprak başına 0- 200 ve 400 mg Cu (kuru ağırlık) olacak şekilde her bir CuO NP boyutu için ayrı ayrı uygulama yapıldı. Deneme üç tekerrürlü olarak tasarlandı. Uygulama yapıldıktan üç gün sonrasında toprak örneklerine *C. sativus* tohumlarının ekimleri gerçekleştirildi.

3.4. Bitki Hasadı ve Analizleri

3.4.1. Bitki Büyüme Parametrelerinin Belirlenmesi

Deneme sonucunda gelişimini tamamlayan *C. sativus* bitkisinin hasadı gerçekleştirildi. Bitki örneklerindeki (gövde ve kök) toprak tortularını gidermek için ilk önce çeşme suyu ile yıkandı, ardından seyreltik hidroklorik asit (HCl) çözeltisi (0.2 N) ile yıkama yapıldı ve son olarak bitki örnekleri saf su ile durulandı. Kurutma kağıtlarının üzerinde fazla sularının giderilmesi sağlandıktan sonra bitki gövde ve kök uzunlukları ölçüldü. Bitki örneklerinin gövde ve kök yaş ağırlıkları tartıldıktan sonra örnekler kese kâğıtlarına konularak etüvde 72 saat boyunca 65 °C'de kurutuldu. Kurutulmuş bitki örnekleri, öğütme makinasında öğütülerek gerekli analizler için hazır hale getirildi.

3.4.2. Bitki Örneklerinde TAS, TOS ve OSI Testleri

Bitki etanol (EtOH) ekstraktlarının TAS, TOS ve OSI değerleri Rel Assay kitleri (Rel Assay Kit Diagnostics, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. TAS değeri mmol Trolox eşdeğeri L⁻¹ olarak hesaplandı ve kalibratör olarak Trolox kullanıldı. TOS değeri µmol hidrojen peroksit (H₂O₂) eşdeğeri L⁻¹ olarak hesaplandı ve kalibratör olarak hidrojen peroksit kullanıldı. OSI değeri aşağıda yer alan eşitlik (4) ile hesaplanarak bulundu (Erel, 2004; 2005).

$$OSI = \frac{TOS}{TAS \times 10}$$

Eşitlik (4)

3.5. Hasat Sonrası Toprak ve Bitkide Bakır (Cu^{+2}) İçeriklerinin Belirlenmesi

Yaklaşık 0.5 g kurutulmuş ve öğütülmüş toprak örneklerinin üzerine 15 mL saf nitrik asit (HNO_3) konuldu. Numuneler 200 °C'de bir MARS 5 mikrodalga fırında yakıldı. Parçalama işleminden sonra numuneler Whatman No. 42 ile süzüldü. Süzüntüler 50 mL'lik şişelerde toplandı ve ICP-OES ile analiz edildi. Numunelerin mineral içerikleri, eş zamanlı olarak analiz edilen bilinen konsantrasyonlardaki standart çözeltilere karşı ölçüldü (Skujins, 1998). Bitki kökleri ve gövde aksanında bakır analizi için, 100 mg fırında kurutulmuş örnekler nitrik asit (HNO_3) ve perklorik asit (HClO_4 , 4:1, v/v) ile ekstrakte edilerek deiyonize su ile 10 mL'ye tamamlandı. Element bakır, ICP-OES kullanılarak analiz edildi.

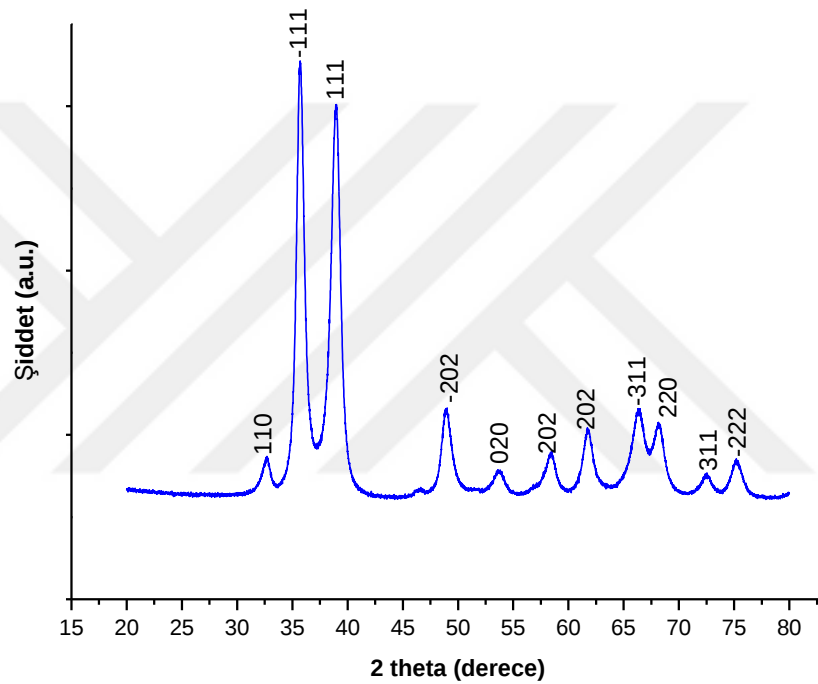
3.6. İstatiksel Analizler

Elde edilen veriler istatistiksel olarak tek yönlü ANOVA ve Tukey testi ile Minitab 17.0 programında analiz edildi ($p < 0.05$).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

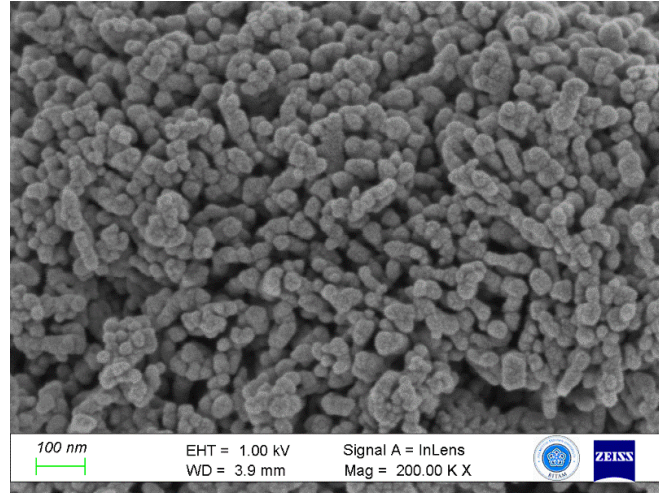
4.1.CuO-NP'lerin Karakterizasyonu

CuO nanopartikülleri için elde edilen kırınım tepe noktaları, üstün kristal kalitesi ile CuO'nun (JCPDS No. 01-080-0076) monoklinik yapısını göstermektedir (Sudha ve ark., 2021).

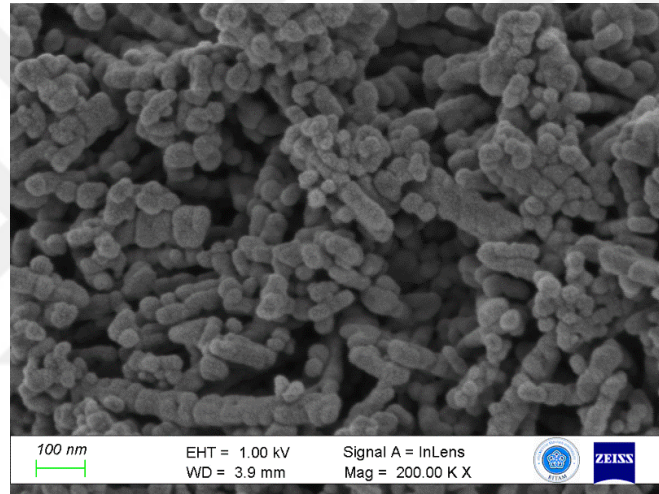


Şekil 4.1. CuO nanopartiküllerin XRD analizleri

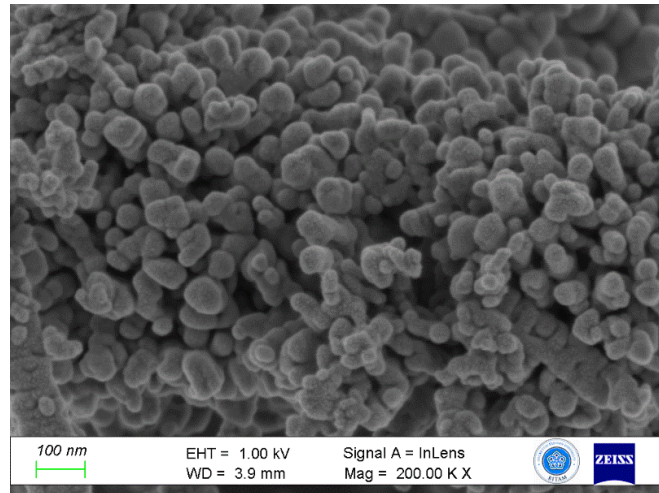
Ticari olarak alınan CuO nanopartiküllerin şekil ve morfolojik incelemesi alan emisyonlu taramalı elektron mikroskopunda (FESEM) gerçekleştirildi. Şekil 4.2, 3 ve 4 nanopartiküllerin 200 kX büyütmelemlerde alınan FESEM görüntülerini göstermektedir. Şekilde nanopartiküllerin küresel formda olduğu ve büyüklüklerinin firma tarafından belirtildiği değerlere yakın olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.2. 30 nm boyutlu CuO nanopartiküllerin FE-SEM görüntüleri



Şekil 4.3. 50 nm boyutlu CuO nanopartiküllerin FESEM görüntüleri



Şekil 4.4. 100 nm boyutlu CuO nanopartiküllerin FESEM görüntüleri

4.2. Denemede Kullanılan Toprağın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Tablo 4.1. Çalışma alanından alınan toprak örneklerinde yapılan bazı fiziksel analizler ve sonuçları

Örnek no	Tekstür	Pb (g cm ⁻³)	Pk (g cm ⁻³)	P (%)	AS (%)	TK (g g ⁻¹)	SN (g g ⁻¹)	FSK (g g ⁻¹)
1	SiCL	1.10	2.42	0.59	18.5	0.31	0.17	0.14

Tablo 4.2. Çalışma alanından alınan toprak örneklerinde yapılan bazı kimyasal analizler ve sonuçları

Örnek no	pH 1:1	EC (μS/cm)	Kireç (%)	OM (%)	TN (%)	YP (mg kg ⁻¹)
1	8.03	244	21.75	1.34	0.058	7.89

Deneme toprağının tekstür sınıfının siltli killi tınlı olduğu ve pH değeri ile alkali sınıfına girdiği belirlendi.

Sarıcalar 0-30 cm derinlikten alınan toprak örneğinin bazı fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları Tablo 4.1-4.2' de verilmiştir. Yapılan fiziksel analizlere göre; Sarıcalar toprak örneğinin tekstür sınıfı siltli killi tın'dır (SiCL). Hacim ağırlığı değerleri 1.04 g cm⁻³, zerre yoğunluğu değerleri 2.42 g cm⁻³ ve porozite değerleri ise %57 olarak belirlendi. Toprak örneklerinin agregat stabilitesi değeri %18.5 olarak ölçüldü. Tarla kapasitesi, solma noktası ve faydalı su içerikleri değerleri sırasıyla 0.31, 0.17 ve 0.14g g⁻¹ olarak bulundu. Toprak örneğinin bazı kimyasal analiz sonuçları ise şu şekildedir; pH, EC, kireç, organik madde toplam azot ve yarıyışlı fosfor içerikleri sırasıyla 8.03, 244 μS cm⁻¹, %21.75, %1.34, %0.058, 7.89 mg kg⁻¹- 4.03 mg kg⁻¹ ve %0.069 - %0.024 olarak ölçüldü (Tablo 4.2).

4.3. Denemenin Kurulması ve Bitkilerin Hasadının Yapılması

Toprakların bazı özelliklerinin belirlenmesinin ardından, topraklar saksılara 2.5 kg olacak şekilde konularak üzerine belirtilen doz ve büyüklüklerde CuO NP ve CuCl₂ uygulaması gerçekleştirildi. Yapılan uygulamalardan 3 gün sonra topraklara *C. sativus* tohumları direk ekilerek toprak nem içeriği tarla kapasitesinin %50'sinde olacak şekilde su uygulaması yapıldı. Saksılar daha sonra 25 °C'de kontrollü bir büyüme odasına konularak ve 16:8 saat aydınlık / karanlık döngüsüne tabi tutuldu. Deneme 8 hafta sonra hasat edildi. Hasat sonrası topraklara uygulanan farklı büyüklük ve dozlardaki CuO NP

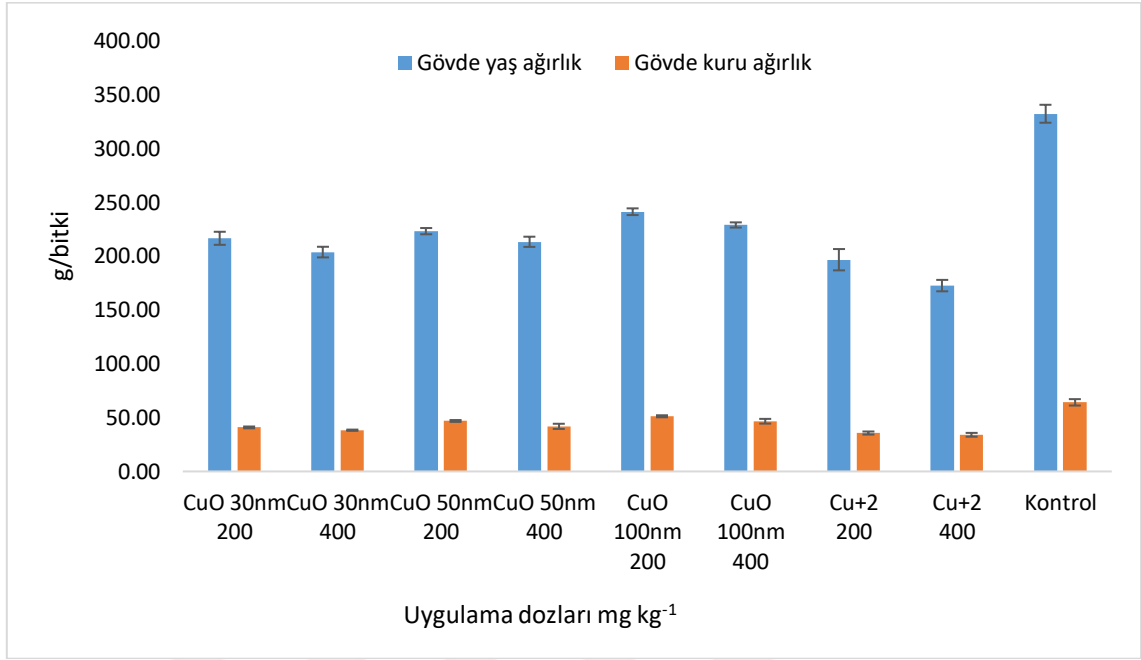
ve CuCl_2 'lerin bitki gelişim ve toprak özelliklerinde meydana getirdiği değişimler belirlendi. Her uygulama üç tekerrür olacak şekilde gerçekleştirildi.



Şekil 4.5. Uygulama sonrası bitkilerin 15 ve 20. gün görünüşleri

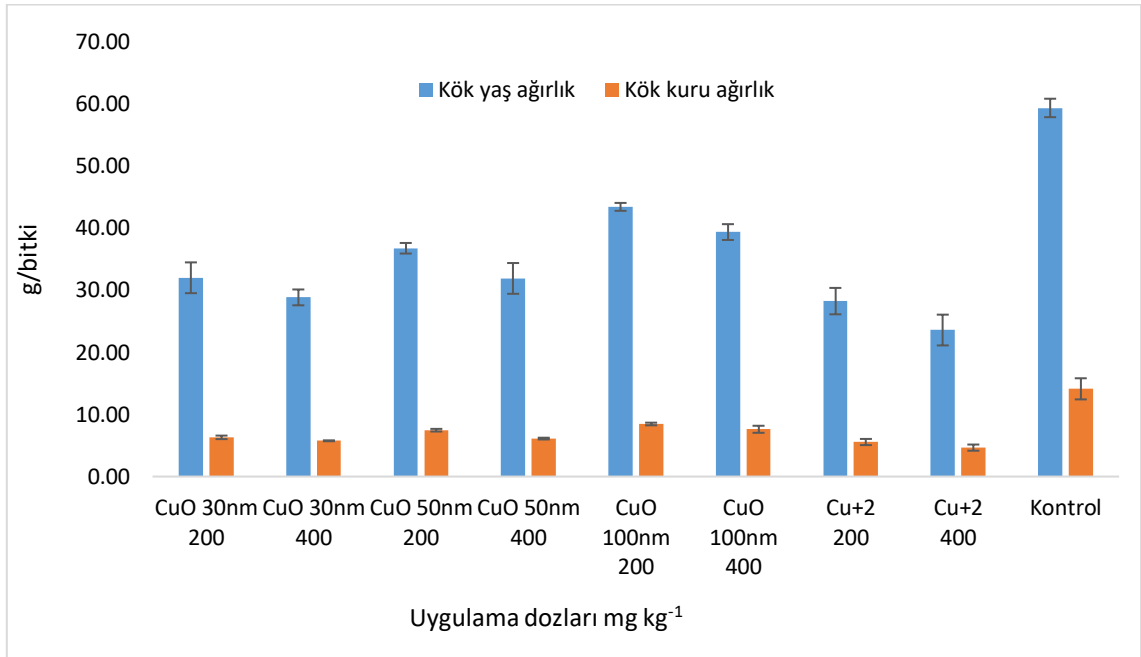
Bitkiler hasat edildikten sonra bitkilerin kök uzunluğu, gövde boyu, bitki gövde yaş ağırlıkları, bitki kök yaş ağırlıkları belirlendi. Salatalık bitkisinin kök ve gövdesi ayrı ayrı kese kağıtlarında $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutularak kök ve bitki yeşil aksan (gövde) kuru ağırlıkları belirlendi. Bitki örneklerinde yapılması planlanan bazı analizler için bitki örnekleri öğütülerek depolandı.

4.3.1. Bitkilerde Fizyolojik Parametreler



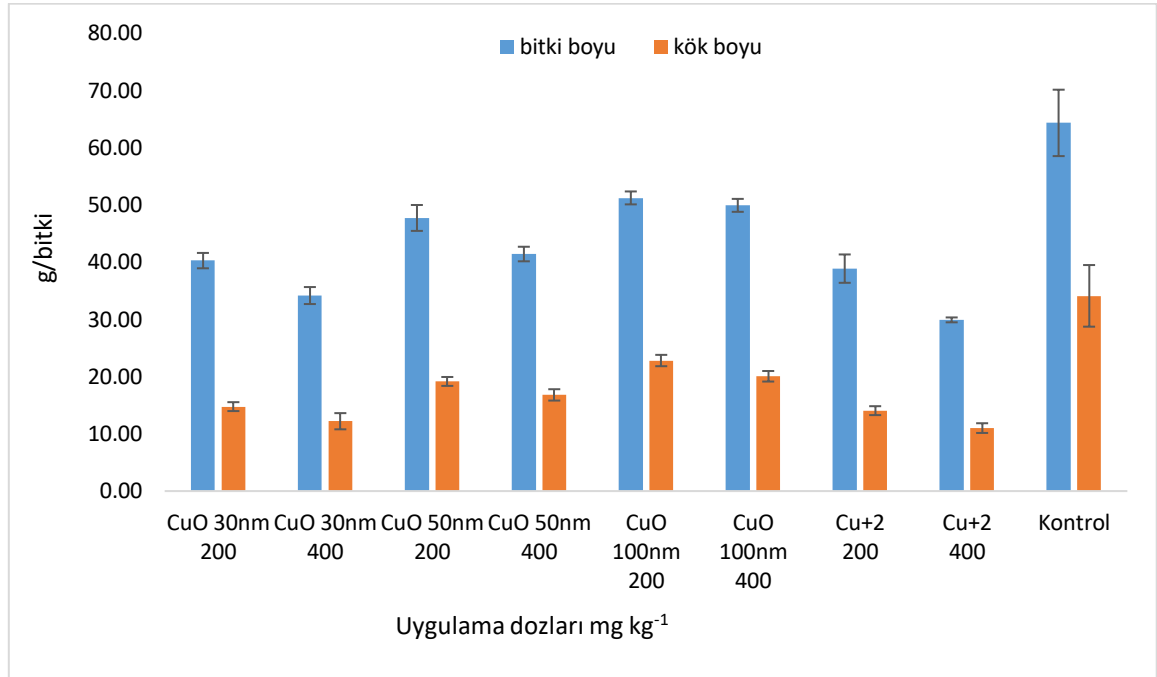
Grafik 4.1. Bitki gövde yaş ve kuru ağırlıkları

Hasat sonrası bitki yaş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Elde edilen bulgular ışığında yapılan bütün uygulamalardaki gövde yaş ve kuru ağırlıkları kontrol örneklerine kıyasla düşüş göstermiştir. Yapılan uygulamalara göre gövde yaş ve kuru ağırlıklarının büyüklük sıralaması $\text{Cu}^{+2} < 30 \text{ nm CuO} < 50 \text{ nm CuO} < 100 \text{ nm CuO} < \text{Kontrol}$ şeklindedir.



Grafik 4.2. Bitki kök yaş ve kuru ağırlıkları

Hasat sonrası bitki kök örneklerinin yaş ve kuru ağırlıkları belirlendi. Elde edilen veriler doğrultusunda uygulamaları değerlendirildiğinde,, kontrol örneklerine kıyasla kök numunelerinin yaş ve kuru ağırlıklarının daha düşük olduğu belirlendi. Sıralama ise gövde yaş ve kuru ağırlığında $\text{Cu}^{+2} < 30 \text{ nm CuO} < 50 \text{ nm CuO} < 100 \text{ nm CuO} < \text{Kontrol}$ şeklinde gözlendi.



Grafik 4.3. Bitki (Gövde) ve kök boyları

Hasat sonrası gövde ve kök boylarının kontrole kıyasla bütün uygulamalarda düştüğü tespit edildi. Xiong ve ark., (2021) tarafından yapılan bir başka çalışmada, CuO NP'lerin marul yapraklarına uygulanması ile marul büyümesini önemli ölçüde engellediği belirlenmiştir. Kontrol bitkilerine kıyasla bitki büyümesi ve bitki kuru ağırlığı (DW) sırasıyla %46-76 ve %25-79 oranında engellendiği ilgili çalışmada tespit edilmiştir. Kök büyümesini ise %1-53 oranında engellendiği ve 15 günlük maruziyetten sonra önemli ölçüde azaldığı belirtilmiştir (Xiong ve ark., 2021). Buna ek olarak; diğer bir çalışmada ise, CuO NP'lerin (500 mg kg^{-1} , 14 gün işlem görmüş) buğdayın gövde ve kök uzunluğunu sırasıyla %13 ve %59 oranında azalttığı ve köklerinin kontrole göre daha ince ve kırılgan olduğu tespit edilmiştir (Dimkpa ve ark., 2012). Bununla birlikte, çok sayıda çalışma, farklı konsantrasyonlardaki CuO NP'lerin marul, turp, salatalık, pirinç, yonca, mısır ve arpada bitki büyümesini doza bağlı bir şekilde olumsuz etkilediğini göstermiştir (Hong

ve ark., 2015b; Adhikari ve ark., 2016). Benzer şekilde, Hong ve ark., (2015) Hoagland besin çözeltisinde (20 ppm) 15 gün süreyle CuO NP'lere maruz kalan marul ve yoncanın kök uzunlukları sırasıyla %50 ve %48 oranında azaldığını ve kontrol bitkilerine göre köklerde kahverengi renklenme olduğunu gözlemlemişlerdir (Hong ve ark., 2015b). Xiong ve ark., (2017), 15 gün boyunca CuO NP'lere (bitki başına 0, 10 veya 250 mg) maruz kalan marul yapraklarında biriken yüksek Cu miktarı bitki su içeriğini, net fotosentez seviyesini ve bitki ağırlığını ciddi seviyede azalttığını belirlemişlerdir (Xiong ve ark., 2017). Bununla birlikte, bu çalışmaların çoğu, tohum çimlenmesine veya NP'lere kök maruziyetine odaklanmıştır.

4.3.2. Bitkilerde TAS-TOS ve OSI değerleri

Tablo 4.3. Bitkilerde TAS-TOS ve OSI değerleri ve standart sapmaları

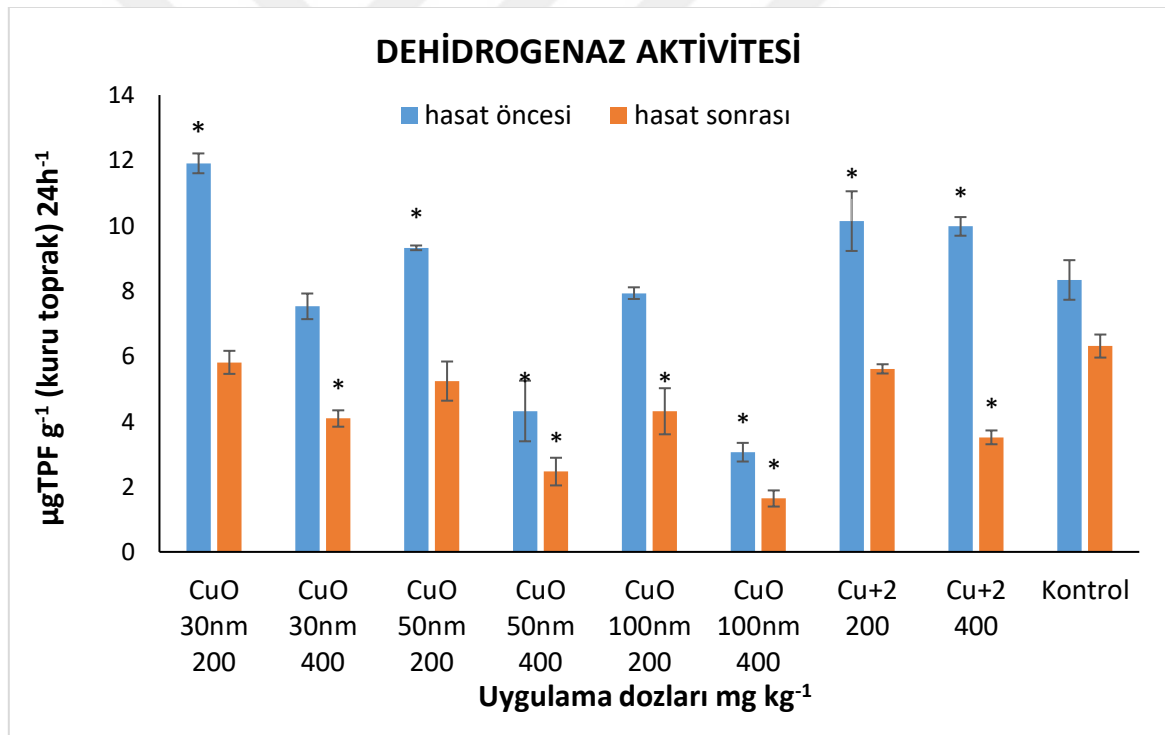
		TAS	TOS	OSI
Kontrol		1.07±0.01	15.25±0.78	1.43±0.09
CuO 30nm	200	1.33±0.04	21.45±0.21	1.61±0.07
	400	1.58±0.11	23.45±0.35	1.49±0.08
CuO 50nm	200	1.29±0.04	18.75±0.78	1.46±0.11
	400	1.43±0.01	21.10±0.28	1.48±0.01
CuO 100nm	200	1.13±0.04	17.8±0.71	1.58±0.00
	400	1.29±0.04	21.00±0.85	1.63±0.01
Cu⁺²	200	1.33±0.06	21.08±0.70	1.59±0.12
	400	1.48±0.06	22.82±0.97	1.55±0.01

Bitki örneklerinde yapılan TAS, TOS ve OSI analizi sonucunda; kontrole kıyasla TAS değerlerinin partikül boyutu küçüldükçe arttığı belirlendi. TOS ve OSI değerleri de paralel şekilde reaksiyon göstermiştir. Yapılan bir çalışmada 2 tür karanfil bitkisine yapılan uygulamalar sonrası 3 farklı periyotta (1., 22. ve 42. gün) alınan örneklerde TOS ve TAS değerleri incelenmiştir. Patojen aşılınmış her iki çeşit karanfil bitkisi için TOS ve OSI düzeylerinin diğer uygulamalara göre tüm dönemlerde önemli ölçüde yüksek

olduğunu ortaya konulmuştur (Atakan ve Ozkaya, 2021). Bu doğrultuda topraklara uygulanan nanopartiküllerin toksik etkisi nedeni ile bitkilerdeki TAS, TOS ve OSI değerlerinde artış gözlemlendiği değerlendirildi. Bu artışın ise partikül büyüklüğü ve uygulama dozu ile değişkenlik gösterdiği tespit edildi.

4.4. Hasat Öncesi ve Sonrası Topraklardaki Dehidrogenaz -Alkalen Fosfataz Enzim Aktiviteleri ve Toprak Solunumlarının Belirlenmesi

Topraklara CuO nanopartikülleri ve Cu⁺² uygulamaları belirlenen dozlarda uygulandıktan 3 gün sonra topraktan alınan örneklerde ve bitki hasadı yapıldıktan sonra alınan toprak örneklerinde dehidrogenaz, alkalen fosfataz ve toprak solunumu ölçümleri gerçekleştirildi. Kontrole göre karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi ve Tukey HSD testi ile gerçekleştirilerek istatistiksel farklı olanlar * olarak belirtildi (p<0.05).



Grafik 4.4. Hasat öncesi ve sonrası dehidrogenaz aktivitesinin değişimi

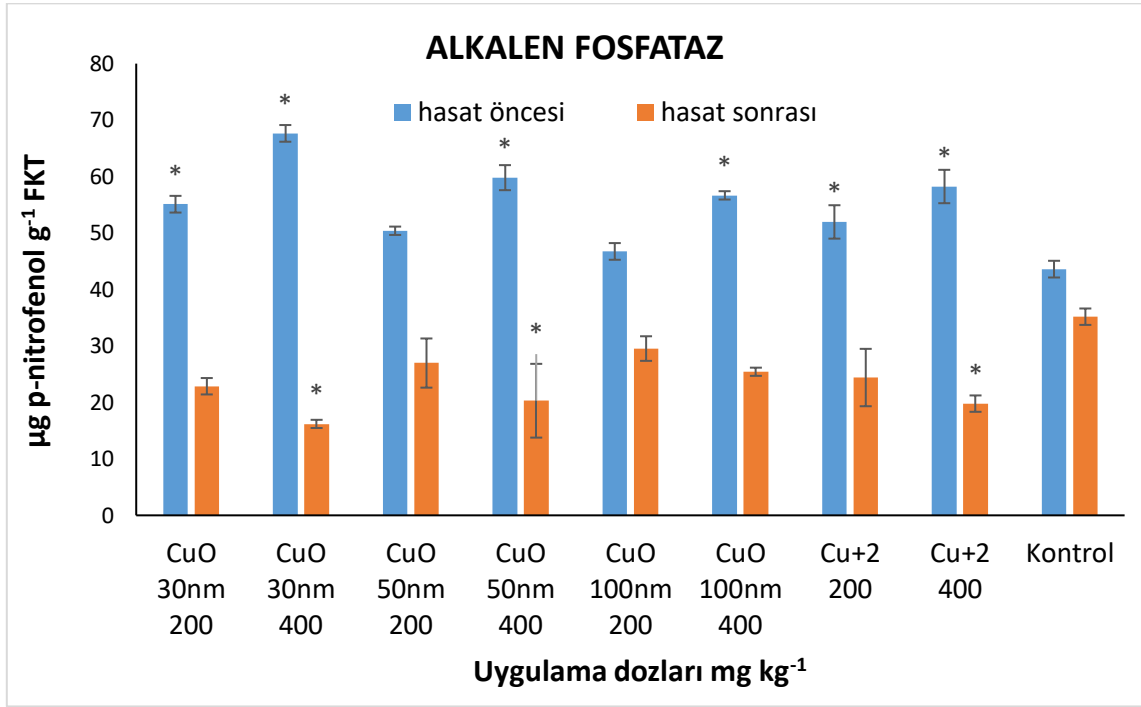
Topraklara yapılan uygulamadan 3 gün sonrasında topraklardaki dehidrogenaz aktivitesini, 200 mg kg⁻¹ CuO NP 30 ve 50 nm partikül boyutunda ve Cu⁺² uygulamaları kontrol uygulamasına kıyasla arttırdığı belirlenirken. 100 nm partikül boyutuna sahip CuO NP'lerinin kontrole kıyasla dehidrogenaz aktivitelerini kısmen inhibe ettiği görüldü. Uygulama konsantrasyonunun 400 mg kg⁻¹'a çıkarılması sonucu topraklardaki

dehidrogenaz aktivitesinde 30-50-100 nm partikül boyutuna sahip CuO NP'lerin ise dehidrogenaz aktivitesini kısmen inhibe ettikleri gözlemlendi. CuCl_2 400 mg kg^{-1} uygulamasında ise topraklardaki dehidrogenaz aktivitesinde kısmen azalma olmasına rağmen NP'lerdeki kadar inhibisyonun olmadığı bulundu.

Bitki hasadı sonrası topraklardaki dehidrogenaz aktivitesinin bütün CuO NP uygulama dozları ve partikül büyüklüğü açısından kontrole kıyasla inhibe olduğu gözlemlendi. Cu^{+2} uygulamalarında da aynı durum tespit edildi.

Yapılan bu çalışmada, topraklara uygulanan nanopartiküllerin dehidrogenaz enzim aktivitesi açısından zamana bağımlı olarak kontrol örneklerine kıyasla inhibe edici olduğu belirlendi. Farklı boyutlarda yapılan uygulamalar kendi içerisinde ele alındığında, ilk 3 günlük süreçte 30 nm partikül boyutuna sahip nanopartiküller diğer boyutlara kıyasla topraklara daha hızla nüfuz etmiş ve bu nedenle de dehidrogenaz aktivitesinde belirgin artış olduğu değerlendirildi.

Genel olarak CuO NP'lere maruz kalan tüm toprak enzimlerindeki genel azalma, CuO NP'lerinin ağır metal özelliklerine bağlanabilir. Çok sayıda çalışma, yüksek toksisiteye sahip ağır metal kirleticilerin varlığında toprak enzim aktivitelerinin azaldığını göstermiştir (Wang ve ark., 2009; Du ve ark., 2011). Buna ek olarak yapılan bazı çalışmalarda dehidrogenaz aktivitesi ile ilgili olarak Cu'nun güçlü bir inhibe edici etkisi olduğunu göstermiştir (Murata ve ark., 2005; Chaperon ve Sauve, 2007; Xie ve ark., 2009). Dehidrogenaz enzimi özellikle ağır metallerle karşı hassastır ve bu nedenle toprağın durumunun iyi bir göstergesidir (Aon ve Colaneri, 2001; Wolińska ve Stępniewska, 2012). Yapılan başka bir çalışmada 10mg kg^{-1} CuO NP (ortalama partikül çapı: 50 ± 10 nm) uygulaması sonrası topraktaki dehidrogenaz enzim aktivitesi miktarının kontrol toprağına göre 2 kat arttığı belirlenmiştir (Joško ve ark., 2019). Literatürde yer alan çalışmalar dikkate alınarak genel bir değerlendirme yapmak gerekirse yapılan CuO NP'leri topraklara uygulandıktan hemen sonra topraklardaki dehidrogenaz aktivitesinde kısmi artışlar meydana getirirse de uzun vadede topraklarda birikim gösteren NP'ler bu durumu tam tersine döndürebilmektedirler. Bu duruma NP'lerin uygulama dozu, partikül boyutu ve uygulama yapılan toprağın etkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, iki farklı toprak örneğinin birinde CuO NP konsantrasyon bağımsız olarak (%68,7-92,9) dehidrogenaz aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ederken, diğer uygulama yapılan toprak örneğinde düşük konsantrasyonlarda bu enzimin aktivitesinin (%22,1-29,6) uyarıldığı belirlenmiştir. Sadece 1000 mg kg^{-1} CuO NP konsantrasyonunda bir engelleyici etkinin (%60 düzeyinde) ortaya çıktığı belirlenmiştir (Joško ve ark., 2014).



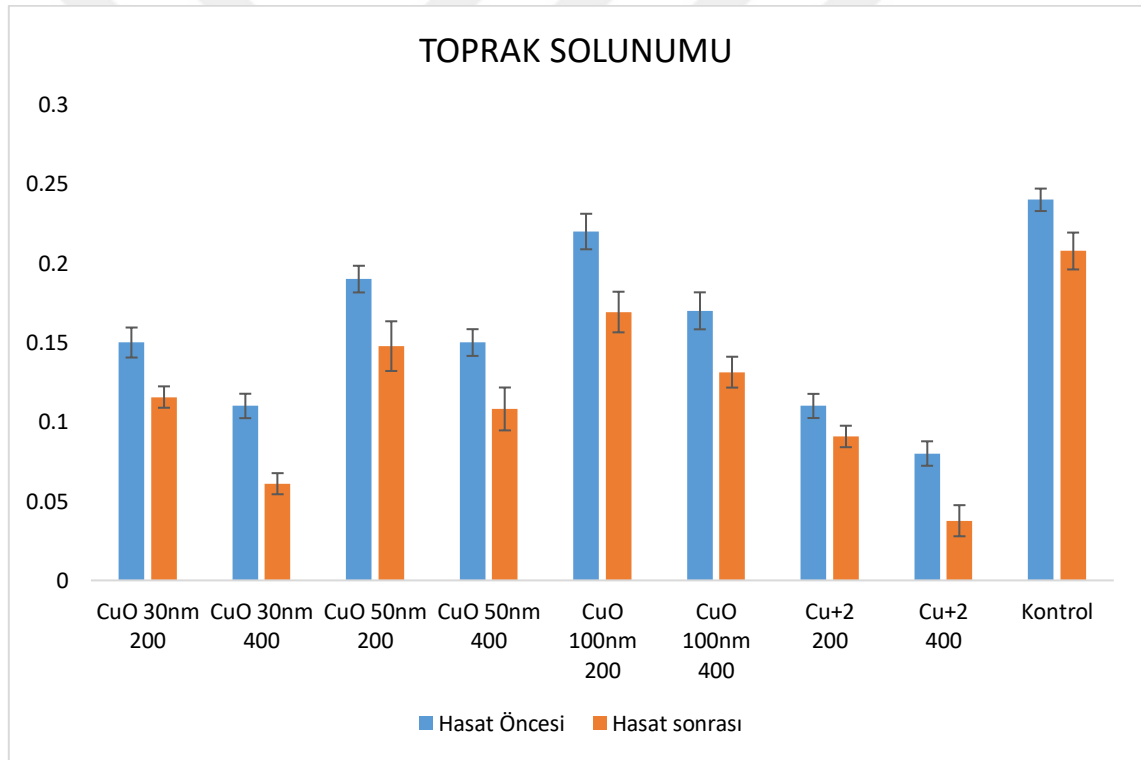
Grafik 4.5. Hasat öncesi ve sonrası akalen fosfataz aktivitesinin değişimi

Topraklara yapılan uygulamadan 3 gün sonrasında topraklardaki alkalen fosfataz aktivitesi kontrole kıyasla 200 mg kg⁻¹ uygulaması için en düşük CuO 100 nm 'de gözlemlenirken en yüksek aktivite 30 nm partikül boyutundaki nanopartiküller ve Cu⁺² uygulamalarında gözlemlendi. Uygulama konsantrasyonunun 400 mg kg⁻¹'a çıkarılması sonucu topraklardaki alkalen fosfataz aktivitesinde kontrole kıyasla en yüksek etkinlik CuO NP 30 nm uygulamasında tespit edildi. Tüm sonuçlar değerlendirildiğine, kontrole kıyasla 400 mg kg⁻¹ uygulamalarının tamamında alkalen fosfataz aktivitesinde artış olduğu belirlendi.

Bitki hasadı sonrası topraklardaki alkalen fosfataz aktivitesinin bütün CuO NP uygulama dozları ve partikül büyüklükleri açısından kontrole kıyasla inhibe olduğu gözlemlendi. En düşük alkalen fosfataz aktivitesi ise 30 nm CuO NP uygulamasının 400 mg kg⁻¹ dozunda bulundu.

Yapılan bu çalışmada, zamanla topraklara uygulanan nanopartiküllerin alkalen fosfataz enzim aktivitesi açısından kontrol örneklerine kıyasla inhibe edici olabildiği belirlendi. Üç farklı nanopartikül boyutu ile yapılan çalışmanın sonuçları değerlendirildiğine, ilk 3 günlük süreçte 30 nm partikül boyutuna sahip nanopartiküllerin diğer boyutlara kıyasla topraklarda alkalen fosfataz aktivitesini arttırdığı gözlemlendi.

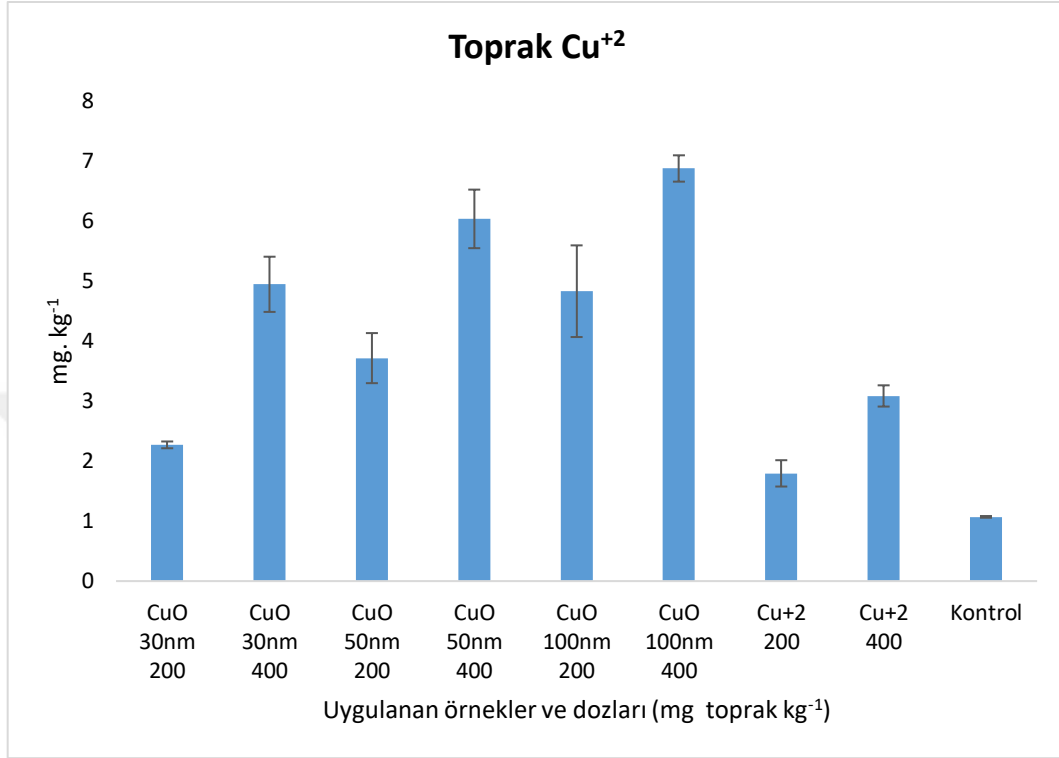
Yapılan bir çalışma NP'lerin ve metal tuzlarının etkisi altında fosfataz aktivitesinin inhibisyonunu/uyarılmasını göstermektedir. İlgili çalışmada, uygulama sonrası işlenmemiş toprakta en yüksek asit fosfataz aktivitesi kaydedilirken (51.3 mg p-nitrofenol $\text{kg}^{-1}\text{sa}^{-1}$) alkalın fosfataz aktivitesi ise en düşük aktivite kaydedilmiştir (21,0 mg p-nitrofenol $\text{kg}^{-1}\text{sa}^{-1}$). Aynı çalışmada, 30 gün sonra fosfataz aktivitesinin sırasıyla 45.0 ve 17.2 mg p-nitrofenol $\text{kg}^{-1}\text{sa}^{-1}$ seviyelerine düştüğü belirtilmiştir (Joško ve ark., 2020). Genel olarak, bakır oksit (CuO) ve çinko oksit (ZnO) NP'lerin varlığının, fosfatazların aktivitesi de dahil olmak üzere toprak enzimatik aktivitesi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu ilgili çalışma sonucunda bildirilmiştir (Joško ve ark., 2014). MNP'ler tarafından enzimatik aktivitenin inhibisyonu, çoğunlukla metal iyonlarının etkisine bağlanmıştır (Rousk ve ark., 2012; Pu ve ark., 2019).



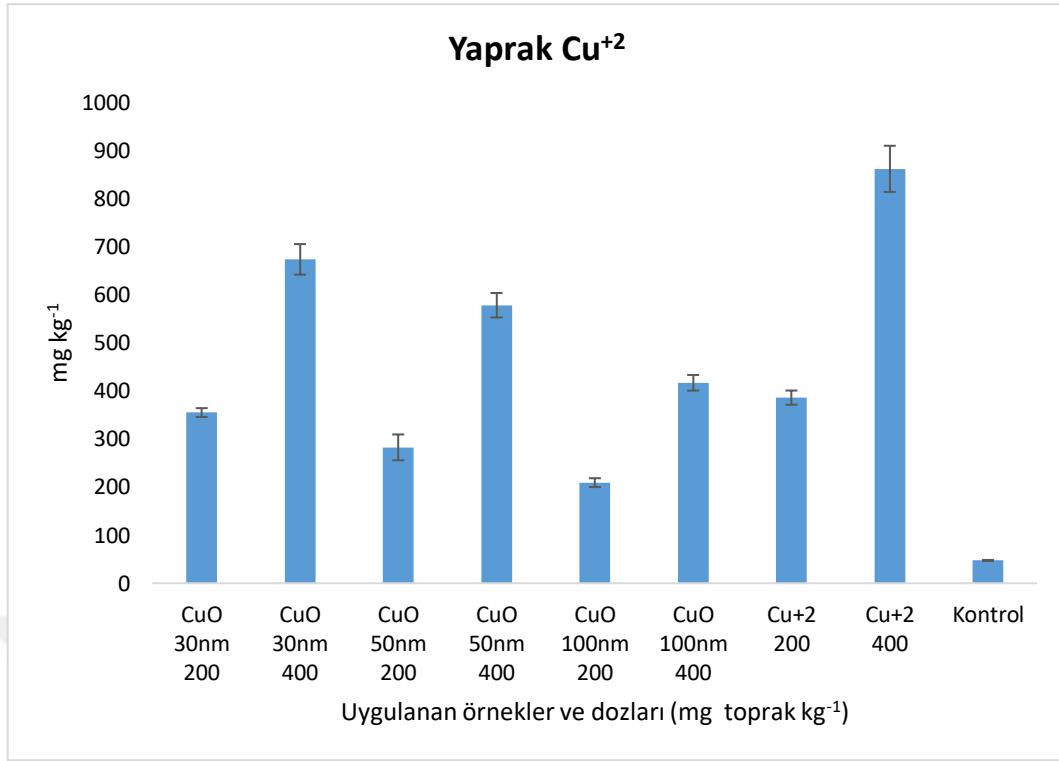
Grafik 4.6. Hasat öncesi ve sonrası toprak solunumu

Hasat öncesi topraklardaki toprak solunumu kontrol örneklerine kıyasla düşüş göstermiş olup en fazla düşüş Cu^{+2} 'nin 400 mg kg^{-1} uygulamasında gözlemlendi. Partikül boyutu ve uygulama dozlarına göre toprak solunumunun doğrusal bir değişiklik gösterdiği ortaya çıkarıldı. Kao ve ark. (2006) tarafında yapılan bir çalışmada, toprağa 100–400 mg Cu kg^{-1} CuCl_2 uygulaması yapılmasının topraklarda yaklaşık %40 oranında solunum inhibisyonuna neden olduğu tespit edilmiştir (Kao ve ark., 2006).

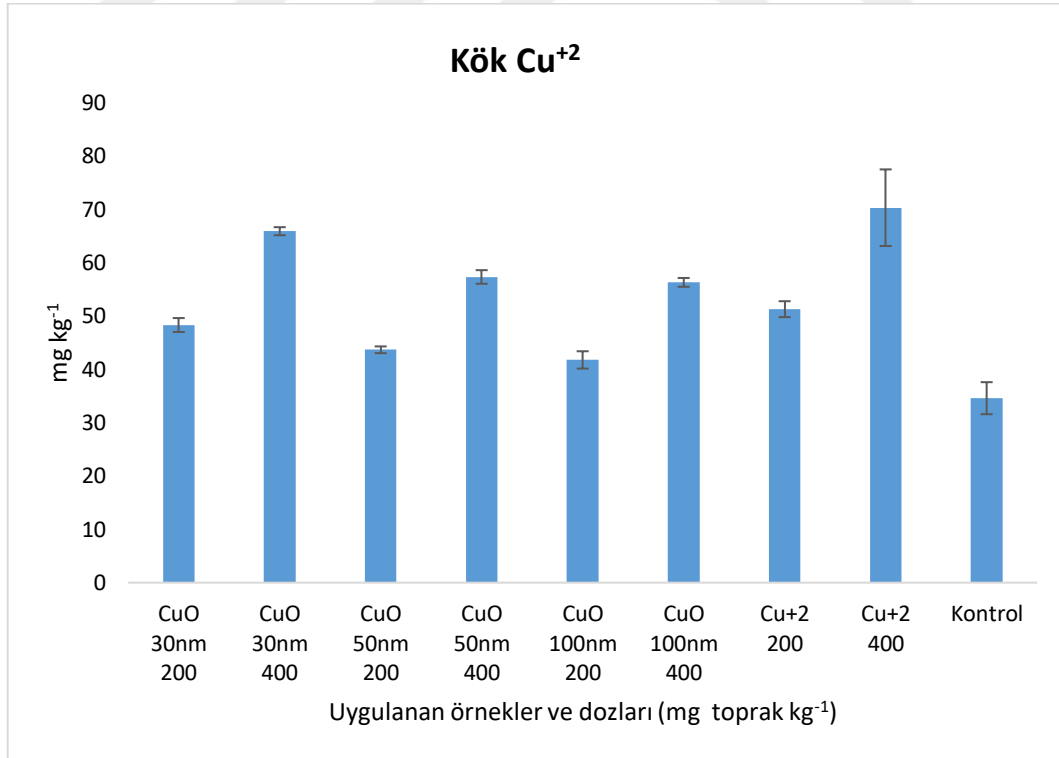
4.5. Toprak ve Bitki Dokularında Cu^{+2} Birikimi



Grafik 4.7. Hasat sonrası topraktaki bakır miktarı



Grafik 4.8. Hasat sonrası bitki yapraklarındaki bakır birikimi



Grafik 4.9. Hasat sonrası bitki köklerindeki bakır birikim değerleri

Hasat sonrası topraklardaki, bitki yeşil aksanındaki ve kök kısmındaki bakır içerikleri kontrol örneğine kıyasla yüksek olup, en yüksek bakır içeriği 100 nm 400 mg kg⁻¹ uygulamalarında gözlemlendi. Partikül büyüklüğü ve doz artışı ile bu durumun bu deneme için paralel hareket ettiği belirlendi.

Xiong ve ark., (2021) tarafından yapılan bir çalışmada uygulama ile ortaya çıkan toksisitenin, maruz kalma süresi ve maruz kalma dozundaki artışla daha şiddetli olduğu bulunmuştur. Bitki dokusunda Cu⁺² birikimi verilerine göre, yeşil aksan büyümesinin 414 mg L⁻¹'in üzerinde Cu⁺² konsantrasyonu olduğunda önlendiğini bulmuşlardır. Bitki köklerindeki Cu⁺² konsantrasyonunun ise 525 mg L⁻¹'ye ulaştığı, kök büyümesini gözle görülebilen bir şekilde inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada CuO NP'ler, marul bitkisinde önemli ölçüde yüksek Cu⁺² seviyelerine neden olduğunu ve muhtemelen yaprak yüzeyinde Cu⁺² kümeleri oluşturarak, besin içeriğini (özellikle Mn, K ve Ca) bozduğunu ve oksidatif hasara neden olarak marul büyümesini ciddi şekilde engellediği tespit ettiler. Bu durumun marulun kalitesini etkilediği sonucuna varmışlardır (Xiong ve ark., 2021). Sebzelerde Cu⁺² birikimi ve ardından alım, insanın günlük inorganik Cu alımına önemli bir katkı sağlayabilir. Yapılan çalışmalarda, CuO NP'lerin buğday (*Triticum aestivum*), salatalık (*Cucumis sativus*) ve *Arabidopsis thaliana*'nın büyümesini azalttığı ve ayrıca bitki dokusunda besin zinciri üzerinde potansiyel sağlık etkilerine neden olabilecek Cu⁺² birikimini önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (Dimkpa ve ark., 2012; Hong ve ark., 2015b; Wang ve ark., 2016). Keller ve ark., (2018) yaptıkları çalışmada, yaprakların CuO NP'lere maruz kaldıktan sonra marulun bitkisinin yıkanmasını sağlamışlardır. Yıkama sonrasında bile yaprak yüzeyinde yüksek miktarda CuO NP'nin tutunduğunu gözlemlemişlerdir (Keller ve ark., 2018). Tüm bu çalışmalar değerlendirildiğinde, CuO NP'lerin belirli fraksiyonlarının bitkiler tarafından alındığını ve bunun da yenilebilir bitki dokularında istenmeyen birikimle sonuçlanabileceğini ve sonuçta insanlar besin zinciri yoluyla ulaşabileceğini göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Nanopartiküllerin (NP) artan üretimi ve ticari kullanımı yaygınlaşması ile bunların bertaraf edilmesine ilişkin bir düzenleme olmayışı NP'lerin topraklara istenmeyen şekilde girmesine neden olabilmektedir. Bu çalışmada, saksı denemelerinde farklı büyüklükteki bakır oksit nanopartiküller ile muamele edilen *Cucumis sativus*'un büyümesi ve toprak enzimleri aktivitesi üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi gerçekleştirildi. 30, 50 ve 100 nm boyutlarda tedarik edilen CuO NP'ler XRD ve FESEM analizleri ile doğrulandı. Çalışma kapsamında kullanılan toprak örneklerinin siltli killi tın tekstürüne sahip ve pH değerinin 8.03 olduğu görüldü. Bitki gövde yaş ve kuru ağırlığı değerlendirildiğinde, nanopartiküllerin kontrole göre bitki büyümesini engelleyici bir karakteristik gösterdiği ortaya çıkarıldı. Nanopartiküller ile Cu^{+2} karşılaştırıldığında nanopartiküllerin daha az bitki büyüme inhibisyonuna yol açtığı belirlendi. Nanopartikül boyutunun ise bitki büyümesinde önemli olduğu, özellikle düşük boyuta sahip nanopartiküllerin daha yüksek oranda bitki büyümesini engellediği sonucuna varıldı. Ayrıca, çalışma kapsamında uygulama yapılan örneklerde bitkilerin nanopartiküllerin maruziyetine kaldığında TAS ve TOS değişimleri incelendi. Buradan elde edilen sonuçlar, tüm örneklerde TAS ve TOS değerlerinin kontrol gurubuna yüksek olduğu görüldü ve bunun partikül büyüklüğü ve uygulama dozu ile değiştiği sonucu çıkarıldı. En yüksek TAS ve TOS değerlerinin 400 mg kg^{-1} uygulamada 30 nm boyuta sahip CuO NP'lerde görüldüğü belirlendi.

NP'lerin toprak enzim aktivitesi üzerindeki etkileri, enzim türüne güçlü bir şekilde bağlı olmaktadır. Hücreler arası bir enzim olarak dehidrogenazın aktivitesi, hücre dışı enzimlere kıyasla kirleticilerin varlığına daha duyarlıdır, bu nedenle ağır metallerle toprak kontaminasyonunun önemli bir göstergesidir (Rogers ve Li, 1985; Dick, 1997; Aon ve Colaneri, 2001). Hücre dışı enzimlerin aktivitesi, toprağın fizikokimyasal özelliklerinden de etkilenebilmektedir (Aon ve Colaneri, 2001; Huang ve ark., 2005). Bu çalışma kapsamında aynı zamanda CuO NP ve Cu^{+2} uygulamalarının toprak solunumu ve enzimleri üzerindeki etkinlikleri hasat öncesi ve hasat sonrasında tespit edildi. Hasat öncesinde dehidrogenaz enzim aktivitesinde doza bağlı bir düşüş olduğu gözlemlendi. Ayrıca CuO NP 30 nm'nin birinci doz uygulamasında en yüksek aktivitenin görüldüğü belirlenirken CuO NP 100 nm'nin ikinci doz uygulamasında ise en düşük aktivite bulundu. Bu durum dehidrogenaz aktivitesinin aynı zamanda CuO NP'lerin boyutuna

bağlı olduğunu gösterdi. Hasat sonrası dehidrogenaz aktivitelerinin ise tüm örneklerde kontrole göre düştüğü tespit edildi. CuO NP ve Cu^{+2} ile muamele edilen toprak örneklerinde incelenen diğer bir enzim alkalen fosfataz enzimi oldu. Buradan elde edilen sonuçlar, tüm uygulamalarda hasat öncesi ölçümlerde kontrole göre enzim aktivitesinde yükselme olduğu belirlenirken hasat sonrasında ise kontrole göre düşüş tespit edildi. Ayrıca, hasat sonrası uygulamalar arasındaki en düşük aktivite 30 nm boyutlu CuO NP'nin yüksek doz uygulamasında gözlemlendi. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde enzim aktivitelerinin farklı bakır oksit nanopartikülleri uygulamalarına farklı davrandıkları ortaya çıkarılmış oldu.

Bu çalışmada, toprak solunumundan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde Cu^{+2} yüksek doz uygulamasının CuO NP'lere göre toprak solunumunu oldukça düşürdüğü sonucunu ortaya çıkardı. Bu sonuç Cu^{+2} 'nin nanopartikül formlarına göre toprak organizmaları üzerinde daha toksik olduğunu gösterdi. CuO NP'ler arasında ise 30 nm boyutunun diğer boyutlara göre toprak solunumunda daha fazla azalışa sebebiyet verdiği anlaşıldı. Ayrıca, gerçekleştirilen uygulamadaki örneklerin bitkinin bünyesine alınma miktarı değerlendirildiğinde, salatalık fidelerinin yaprak ve kök kısımlarında Cu^{+2} 'nin CuO NP'lere oranla daha fazla biriktiği gözlemlenirken, nanopartiküller arasında ise 30 nm boyuta sahip CuO NP'lerin diğer nano uygulamalarına oranla daha fazla biriktiği gözlemlendi.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, bakırın hem iyon formunun hem de nano boyutunun toprak ve salatalık bitkisinde meydana getirdiği değişimler hakkında sonuçlar elde edildi. Sonuç olarak nanomalzemelerde boyut ve uygulama dozunun biyolojik aktivitelerde belirleyici rol aldığı belirlendi.

5.2. Öneriler

Bu tez çalışması kapsamında farklı boyutlara sahip bakır oksit nanopartiküllerinin salatalık bitkisindeki etkileri karşılaştırıldı. Aynı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların toprak özelliklerindeki değişikliklerde değerlendirildi. Çalışmanın sonuçları ile CuO NP'lerin boyuta ve konsantrasyona bağımlı olarak toprakta ve bitki gelişiminde farklı davrandığı ortaya çıkarıldı. Bakır nanopartiküllerin, toprak ve bitki gelişimindeki davranışlarının anlaşılabilmesi için ilerleyen çalışmalarda,

- Biyolojik sentez ile elde edilecek CuO NP'lerin toprak özellikleri üzerindeki etkisi,

- CuO NP'lerin daha küçük boyutlarının ve farklı konsantrasyonlarının bitki gelişimi üzerine farklı bitkilerde kullanılarak araştırılması,
- CuO NP'lerin boyut ve doz etkisinin bitki gelişimi üzerine etkinliğinin farklı analiz yöntemleri ile incelenmesi,
- CuO NP'lerin bitki üretimini artırmak için tarımsal kimyasal gübre kullanımında potansiyelinin araştırılması,
- Nanomalzeme özellikli yavaş salınan gübreleri düşük toksisite ile tasarlanabilme potansiyelinin ortaya çıkarılması önerilmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Adhikari, T., Sarkar, D., Mashayekhi, H. and Xing, B., 2016, Growth and enzymatic activity of maize (*Zea mays* L.) plant: solution culture test for copper dioxide nano particles, *Journal of Plant Nutrition*, 39 (1), 99-115.
- Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M. I., Kumar, R. and Sastry, M., 2003, Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 28 (4), 313-318.
- Al-Warthan, A., Kholoud, M., El-Nour, A., Eftaiha, A. and Ammar, R., 2010, Synthesis and applications of silver nanoparticles, *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 135-140.
- Ali, A., Hira Zafar, M. Z., ul Haq, I., Phull, A. R., Ali, J. S. and Hussain, A., 2016, Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles, *Nanotechnology, Science and Applications*, 9, 49.
- Anjum, N. A., Rodrigo, M. A. M., Moulick, A., Heger, Z., Kopel, P., Zítka, O., Adam, V., Lukatkin, A. S., Duarte, A. C. and Pereira, E., 2016, Transport phenomena of nanoparticles in plants and animals/humans, *Environmental Research*, 151, 233-243.
- Aon, M. and Colaneri, A., 2001, II. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil, *Applied Soil Ecology*, 18 (3), 255-270.
- Atakan, A. and Ozkaya, H. O., 2021, Induced resistance to *Fusarium* wilt in carnation with mixture of mycorrhizal fungi, *Fresenius Environmental Bulletin*, 30 (4 A), 4217-4227.
- Aymonier, C., Loppinet-Serani, A., Reverón, H., Garrabos, Y. and Cansell, F., 2006, Review of supercritical fluids in inorganic materials science, *The Journal of Supercritical Fluids*, 38 (2), 242-251.
- Bhosale, R. R., Kulkarni, A., Gilda, S., Aloorkar, N., Osmani, R. and Harkare, B., 2014, Innovative eco-friendly approaches for green synthesis of silver nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 7 (1), 2328-2337.
- Bhuyan, M. S. A., Uddin, M. N., Islam, M. M., Bipasha, F. A. and Hossain, S. S., 2016, Synthesis of graphene, *International Nano Letters*, 6 (2), 65-83.
- Blake, G. and Hartge, K., 1986a, Particle density, *Methods of soil analysis: Part 1 Physical and Mineralogical Methods*, 5, 377-382.
- Blake, G. R. and Hartge, K., 1986b, Bulk density, *Methods of soil analysis: Part 1 Physical and Mineralogical Methods*, 5, 363-375.
- Chang, Y.-N., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J. and Xing, G., 2012, The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles, *Materials*, 5 (12), 2850-2871.

- Chaperon, S. and Sauve, S., 2007, Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils, *Soil Biology and Biochemistry*, 39 (9), 2329-2338.
- Cioffi, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Tantillo, G., Ghibelli, L., Sabbatini, L., Bleve-Zacheo, T., D'Alessio, M., Zambonin, P. G. and Traversa, E., 2005, Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties, *Chemistry of Materials*, 17 (21), 5255-5262.
- Cushing, B. L., Kolesnichenko, V. L. and O'connor, C. J., 2004, Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles, *Chemical Reviews*, 104 (9), 3893-3946.
- D'Amato, R., Falconieri, M., Gagliardi, S., Popovici, E., Serra, E., Terranova, G. and Borsella, E., 2013, Synthesis of ceramic nanoparticles by laser pyrolysis: From research to applications, *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 104, 461-469.
- Danielson, R. and Sutherland, P., 1986, Porosity, *Methods of soil analysis: Part 1 Physical and Mineralogical Methods*, 5, 443-461.
- Das, V. L., Thomas, R., Varghese, R. T., Soniya, E., Mathew, J. and Radhakrishnan, E., 2014, Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS 11 isolated from industrialized area, *3 Biotech*, 4 (2), 121-126.
- Dick, R., 1997, Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health, *Biological Indicators of Soil Health*, 121-156.
- Dikusar, A., Globa, P., Belevskii, S. and Sidel'nikova, S., 2009, On limiting rate of dimensional electrodeposition at meso-and nanomaterial manufacturing by template synthesis, *Surface Engineering and Applied Electrochemistry*, 45 (3), 171-179.
- Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Latta, D. E., Manangón, E., Britt, D. W., Johnson, W. P., Boyanov, M. I. and Anderson, A. J., 2012, CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat, *Journal of Nanoparticle Research*, 14 (9), 1-15.
- Du, W., Sun, Y., Ji, R., Zhu, J., Wu, J. and Guo, H., 2011, TiO₂ and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil, *Journal of Environmental Monitoring*, 13 (4), 822-828.
- Du, X., Luo, S., Du, H., Tang, M., Huang, X. and Shen, P. K., 2016, Monodisperse and self-assembled Pt-Cu nanoparticles as an efficient electrocatalyst for the methanol oxidation reaction, *Journal of Materials Chemistry A*, 4 (5), 1579-1585.
- Ebbs, S. D., Bradfield, S. J., Kumar, P., White, J. C. and Ma, X., 2016a, Projected dietary intake of zinc, copper, and cerium from consumption of carrot (*Daucus carota*) exposed to metal oxide nanoparticles or metal ions, *Frontiers in Plant Science*, 7, 188.

- Ebbs, S. D., Bradfield, S. J., Kumar, P., White, J. C., Musante, C. and Ma, X., 2016b, Accumulation of zinc, copper, or cerium in carrot (*Daucus carota*) exposed to metal oxide nanoparticles and metal ions, *Environmental Science: Nano*, 3 (1), 114-126.
- Erel, O., 2004, A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation, *Clinical Biochemistry*, 37 (4), 277-285.
- Erel, O., 2005, A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clinical Biochemistry*, 38 (12), 1103-1111.
- Farinha, P., Coelho, J. M., Reis, C. P. and Gaspar, M. M., 2021, A Comprehensive Updated Review on Magnetic Nanoparticles in Diagnostics, *Nanomaterials*, 11 (12), 3432.
- Furneaux, R., Rigby, W. and Davidson, A., 1989, The formation of controlled-porosity membranes from anodically oxidized aluminium, *Nature*, 337 (6203), 147-149.
- Gebre, S. H. and Sendeku, M. G., 2019, New frontiers in the biosynthesis of metal oxide nanoparticles and their environmental applications: an overview, *SN Applied Sciences*, 1 (8), 1-28.
- Gee, G. W., Bauder, J. and Klute, A., 1986, Methods of soil analysis, part 1, physical and mineralogical methods, *Soil Science Society of America Book Series. American Society of Agronomy, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin*, 404-410.
- Ghaffarian, H. R., Saiedi, M., Sayyadnejad, M. A. and Rashidi, A. M., 2011, Synthesis of ZnO nanoparticles by spray pyrolysis method. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 30 (1(57)), 1-6.
- Ghodake, G., Seo, Y. D. and Lee, D. S., 2011, Hazardous phytotoxic nature of cobalt and zinc oxide nanoparticles assessed using *Allium cepa*, *Journal of Hazardous Materials*, 186 (1), 952-955.
- Ghorbani, H. R., 2014, A review of methods for synthesis of Al nanoparticles, *Oriental Journal of Chemistry*, 30 (4), 1941-1949.
- Gugino, B. K., Abawi, G. S., Idowu, O. J., Schindelbeck, R. R., Smith, L. L., Thies, J. E., Wolfe, D. W. and Van Es, H. M., 2009, Cornell soil health assessment training manual, Cornell University College of Agriculture and Life Sciences, p.
- Guzmán, M. G., Dille, J. and Godet, S., 2009, Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity, *International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2 (3), 104-111.
- Handy, R. D., Owen, R. and Valsami-Jones, E., 2008, The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs, *Ecotoxicology*, 17 (5), 315-325.

- Hasnidawani, J., Azlina, H., Norita, H., Bonnia, N., Ratim, S. and Ali, E., 2016, Synthesis of ZnO nanostructures using sol-gel method, *Procedia Chemistry*, 19, 211-216.
- Hoet, P. H., Brüske-Hohlfeld, I. and Salata, O. V., 2004, Nanoparticles—known and unknown health risks, *Journal of Nanobiotechnology*, 2 (1), 1-15.
- Holbrook, R. D., Murphy, K. E., Morrow, J. B. and Cole, K. D., 2008, Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web, *Nature Nanotechnology*, 3 (6), 352-355.
- Hong, W., Wang, J. and Wang, E., 2015a, Facile synthesis of PtCu nanowires with enhanced electrocatalytic activity, *Nano Research*, 8 (7), 2308-2316.
- Hong, Y.-S., Chen, J.-Y., Huang, C.-W., Chiu, C.-H., Huang, Y.-T., Huang, T. K., He, R. S. and Wu, W.-W., 2015b, Single-crystalline CuO nanowires for resistive random access memory applications, *Applied Physics Letters*, 106 (17), 173103.
- Huang, P.-M., Wang, M.-K. and Chiu, C.-Y., 2005, Soil mineral–organic matter–microbe interactions: impacts on biogeochemical processes and biodiversity in soils, *Pedobiologia*, 49 (6), 609-635.
- Islam, M. and Islam, M. S., 2013, Electro-deposition method for platinum nano-particles synthesis, *Saidul, Electro-Deposition Method for Platinum Nano-Particles Synthesis*.
- Ismail, M., Gul, S., Khan, M. A. and Khan, M., 2016, Plant mediated green synthesis of anti-microbial silver nanoparticles—a review on recent trends, *Reviews in Nanoscience and Nanotechnology*, 5 (2), 119-135.
- Javed, R., Mohamed, A., Yücesan, B., Gürel, E., Kausar, R. and Zia, M., 2017, CuO nanoparticles significantly influence in vitro culture, steviol glycosides, and antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131 (3), 611-620.
- Johnson, G. E., Moser, T., Engelhard, M., Browning, N. D. and Laskin, J., 2016, Fabrication of electrocatalytic Ta nanoparticles by reactive sputtering and ion soft landing, *The Journal of Chemical Physics*, 145 (17), 174701.
- Joško, I., Oleszczuk, P. and Futa, B., 2014, The effect of inorganic nanoparticles (ZnO, Cr₂O₃, CuO and Ni) and their bulk counterparts on enzyme activities in different soils, *Geoderma*, 232, 528-537.
- Joško, I., Oleszczuk, P., Dobrzyńska, J., Futa, B., Joniec, J. and Dobrowolski, R., 2019, Long-term effect of ZnO and CuO nanoparticles on soil microbial community in different types of soil, *Geoderma*, 352, 204-212.
- Joško, I., Dobrzyńska, J., Dobrowolski, R., Kusiak, M. and Terpiłowski, K., 2020, The effect of pH and ageing on the fate of CuO and ZnO nanoparticles in soils, *Science of The Total Environment*, 721, 137771.

- Judy, J. D., Unrine, J. M. and Bertsch, P. M., 2011, Evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain, *Environmental Science & Technology*, 45 (2), 776-781.
- Kacar, B., 2009, Toprak analizleri, Nobel Yayın No: 1387, Fen Bilimleri, 90, 459.
- Kammler, H. K., Mädler, L. and Pratsinis, S. E., 2001, Flame synthesis of nanoparticles, *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry-Plant Equipment-Process Engineering-Biotechnology*, 24 (6), 583-596.
- Karnani, R. L. and Chowdhary, A., 2013, Biosynthesis of silver nanoparticle by eco-friendly method, *Indian Journal of Nanoscience*, 1 (1), 25-31.
- Keller, A. A. and Lazareva, A., 2014, Predicted releases of engineered nanomaterials: from global to regional to local, *Environmental Science & Technology Letters*, 1 (1), 65-70.
- Keller, A. A., Huang, Y. and Nelson, J., 2018, Detection of nanoparticles in edible plant tissues exposed to nano-copper using single-particle ICP-MS, *Journal of Nanoparticle Research*, 20 (4), 1-13.
- Kim, S., Sin, H., Lee, S. and Lee, I., 2013, Influence of metal oxide particles on soil enzyme activity and bioaccumulation of two plants, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 (9), 1279-1286.
- Klute, A., 1986, Water retention: laboratory methods, *Methods of soil analysis: Part 1 Physical and Mineralogical Methods*, 5, 635-662.
- Komarneni, S., 2003, Nanophase materials by hydrothermal, microwave-hydrothermal and microwave-solvothermal methods, *Current Science*, 1730-1734.
- Kruis, F. E., Fissan, H. and Peled, A., 1998, Synthesis of nanoparticles in the gas phase for electronic, optical and magnetic applications—a review, *Journal of Aerosol Science*, 29 (5-6), 511-535.
- Kumar, A., Gupta, K., Dixit, S., Mishra, K. and Srivastava, S., 2019, A review on positive and negative impacts of nanotechnology in agriculture, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16 (4), 2175-2184.
- Landage, S., Wasif, A. and Dhuppe, P., 2014, Synthesis of nanosilver using chemical reduction methods, *International Journal of Advanced Research in Engineering and Applied Sciences*, 3 (5), 14-22.
- Leonhardt, U., 2007, Invisibility cup, *Nature Photonics*, 1 (4), 207-208.
- McLean, E., 1983, Soil pH and lime requirement, *Methods of soil analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties*, 9, 199-224.

- Mohanty, U., 2011, Electrodeposition: a versatile and inexpensive tool for the synthesis of nanoparticles, nanorods, nanowires, and nanoclusters of metals, *Journal of Applied Electrochemistry*, 41 (3), 257-270.
- Moon, Y.-S., Park, E.-S., Kim, T.-O., Lee, H.-S. and Lee, S.-E., 2014, SELDI-TOF MS-based discovery of a biomarker in *Cucumis sativus* seeds exposed to CuO nanoparticles, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38 (3), 922-931.
- Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S. R., Khan, M. I., Parishcha, R., Ajaykumar, P., Alam, M. and Kumar, R., 2001, Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis, *Nano Letters*, 1 (10), 515-519.
- Murata, T., Kanao-Koshikawa, M. and Takamatsu, T., 2005, Effects of Pb, Cu, Sb, In and Ag contamination on the proliferation of soil bacterial colonies, soil dehydrogenase activity, and phospholipid fatty acid profiles of soil microbial communities, *Water, Air, and Soil Pollution*, 164 (1), 103-118.
- Nadagouda, M. N., Speth, T. F. and Varma, R. S., 2011, Microwave-assisted green synthesis of silver nanostructures, *Accounts of Chemical Research*, 44 (7), 469-478.
- Narayanan, K. B. and Sakthivel, N., 2010, Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes, *Advances in Colloid and Interface Science*, 156 (1-2), 1-13.
- Nelson, D. a. and Sommers, L. E., 1983, Total carbon, organic carbon, and organic matter, *Methods of soil analysis: Part 2 Chemical and microbiological properties*, 9, 539-579.
- Nelson, R., 1983, Carbonate and gypsum, *Methods of soil analysis: Part 2 Chemical and microbiological properties*, 9, 181-197.
- Nie, M., Sun, K. and Meng, D. D., 2009, Formation of metal nanoparticles by short-distance sputter deposition in a reactive ion etching chamber, *Journal of Applied Physics*, 106 (5), 054314.
- Pandey, P. A., Bell, G. R., Rourke, J. P., Sanchez, A. M., Elkin, M. D., Hickey, B. J. and Wilson, N. R., 2011, Physical vapor deposition of metal nanoparticles on chemically modified graphene: observations on metal-graphene interactions, *Small*, 7 (22), 3202-3210.
- Pantidos, N. and Horsfall, L. E., 2014, Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants, *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 5 (5), 1.
- Pedersen, H. and Elliott, S. D., 2014, Studying chemical vapor deposition processes with theoretical chemistry, *Theoretical Chemistry Accounts*, 133 (5), 1-10.
- Pelegrino, M. T., Kohatsu, M. Y., Seabra, A. B., Monteiro, L. R., Gomes, D. G., Oliveira, H. C., Rolim, W. R., de Jesus, T. A., Batista, B. L. and Lange, C. N., 2020, Effects

of copper oxide nanoparticles on growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings and possible implications of nitric oxide in their antioxidative defense, *Environmental Monitoring and Assessment*, 192 (4), 1-14.

- Perreault, F., Samadani, M. and Dewez, D., 2014, Effect of soluble copper released from copper oxide nanoparticles solubilisation on growth and photosynthetic processes of *Lemna gibba* L, *Nanotoxicology*, 8 (4), 374-382.
- Prasanna, B. and Hossain, F., 2007, Nanotechnology in agriculture, *ICAR National Fellow, Division of Genetics, IARI, New Delhi*, 110012.
- Prathna, T., Chandrasekaran, N., Raichur, A. M. and Mukherjee, A., 2011, Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by *Citrus limon* (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 82 (1), 152-159.
- Pu, S., Yan, C., Huang, H., Liu, S. and Deng, D., 2019, Toxicity of nano-CuO particles to maize and microbial community largely depends on its bioavailable fractions, *Environmental Pollution*, 255, 113248.
- Qu, H., Ma, C., Xing, W., Xue, L., Liu, H., White, J. C., Chen, G. and Xing, B., 2022, Effects of copper oxide nanoparticles on *Salix* growth, soil enzyme activity and microbial community composition in a wetland mesocosm, *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127676.
- Rajput, N., 2015, Methods of preparation of nanoparticles-a review, *International Journal of Advances in Engineering & Technology*, 7 (6), 1806.
- Rajput, V., Minkina, T., Sushkova, S., Behal, A., Maksimov, A., Blicharska, E., Ghazaryan, K., Movsesyan, H. and Barsova, N., 2020, ZnO and CuO nanoparticles: a threat to soil organisms, plants, and human health, *Environmental Geochemistry and Health*, 42 (1), 147-158.
- Rajput, V. D., Minkina, T., Fedorenko, A., Mandzhieva, S., Sushkova, S., Lysenko, V., Duplii, N., Azarov, A. and Chokheli, V., 2018, Destructive effect of copper oxide nanoparticles on ultrastructure of chloroplast, plastoglobules and starch grains in spring barley (*Hordeum sativum distichum*), *International Journal of Agriculture and Biology*, 21, 171-174.
- Rao, T. N., Apparao, K., Murthy, S. and Naidu, T. M., 2016, Applications of zinc oxide nanoparticles as catalyst in dissipation kinetics of S-metolachlor herbicide in different pH waters under direct sun light, *Materials Today: Proceedings*, 3 (10), 3799-3804.
- Rawat, S., Pullagurala, V. L., Hernandez-Molina, M., Sun, Y., Niu, G., Hernandez-Viezcas, J. A., Peralta-Videa, J. R. and Gardea-Torresdey, J. L., 2018, Impacts of copper oxide nanoparticles on bell pepper (*Capsicum annum* L.) plants: a full life cycle study, *Environmental Science: Nano*, 5 (1), 83-95.

- Reina, A., Jia, X., Ho, J., Nezich, D., Son, H., Bulovic, V., Dresselhaus, M. S. and Kong, J., 2009, Large area, few-layer graphene films on arbitrary substrates by chemical vapor deposition, *Nano Letters*, 9 (1), 30-35.
- Rippner, D. A., Green, P. G., Young, T. M. and Parikh, S. J., 2018, Dissolved organic matter reduces CuO nanoparticle toxicity to duckweed in simulated natural systems, *Environmental Pollution*, 234, 692-698.
- Rippner, D. A., Margenot, A. J., Fakra, S. C., Aguilera, L. A., Li, C., Sohng, J., Dynarski, K. A., Waterhouse, H., McElroy, N. and Wade, J., 2021, Microbial response to copper oxide nanoparticles in soils is controlled by land use rather than copper fate, *Environmental Science: Nano*, 8 (12), 3560-3576.
- Roco, M. C., 2011, The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years, In: Nanotechnology research directions for societal needs in 2020, Eds: Springer, p. 1-28.
- Rogers, J. E. and Li, S., 1985, Effect of metals and other inorganic ions on soil microbial activity: soil dehydrogenase assay as a simple toxicity test, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 34 (1), 858-865.
- Rousk, J., Ackermann, K., Curling, S. F. and Jones, D. L., 2012, Comparative toxicity of nanoparticulate CuO and ZnO to soil bacterial communities, *PloS One*, 7 (3), e34197.
- Saifuddin, N., Wong, C. and Yasumira, A., 2009, Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation, *E-journal of Chemistry*, 6 (1), 61-70.
- Saison, C., Perreault, F., Daigle, J.-C., Fortin, C., Claverie, J., Morin, M. and Popovic, R., 2010, Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Aquatic Toxicology*, 96 (2), 109-114.
- Salata, O. V., 2004, Applications of nanoparticles in biology and medicine, *Journal of Nanobiotechnology*, 2 (1), 1-6.
- Sankula, K., Kota, S. and Nissankarrao, S., 2014, Supercritical fluid technology: green chemistry for the 21st century, *The Pharma Innovation*, 3 (5, Part A), 19.
- Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S. K. and Poinern, G. E. J., 2015, Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities, *Materials*, 8 (11), 7278-7308.
- Shi, J., Ye, J., Fang, H., Zhang, S. and Xu, C., 2018, Effects of copper oxide nanoparticles on paddy soil properties and components, *Nanomaterials*, 8 (10), 839.
- Simakin, A., Voronov, V., Kirichenko, N. and Shafeev, G., 2004, Nanoparticles produced by laser ablation of solids in liquid environment, *Applied Physics A*, 79 (4), 1127-1132.

- Singh, A., Singh, N., Hussain, I., Singh, H. and Singh, S., 2015, Plant-nanoparticle interaction: an approach to improve agricultural practices and plant productivity, *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 4 (8), 25-40.
- Singh, D. and Rawat, D., 2016, Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles from *Origanum majorana* and *Citrus sinensis* leaf and their antibacterial activity: a green chemistry approach, *Bioresources and Bioprocessing*, 3 (1), 1-7.
- Singh, P., Kim, Y.-J., Zhang, D. and Yang, D.-C., 2016, Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms, *Trends in Biotechnology*, 34 (7), 588-599.
- Skujins, S., 1998, Handbook for ICP-AES (Varian-Vista), *A short guide to vista series ICP-AES operation. Varian Int. AG, Zug, Version*, 1 (0).
- Sudha, V., Murugadoss, G. and Thangamuthu, R., 2021, Structural and morphological tuning of Cu-based metal oxide nanoparticles by a facile chemical method and highly electrochemical sensing of sulphite, *Scientific Reports*, 11 (1), 1-12.
- Swihart, M. T., 2003, Vapor-phase synthesis of nanoparticles, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8 (1), 127-133.
- Tabatabai, M. A. and Bremner, J. M., 1969, Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity, *Soil Biology and Biochemistry*, 1 (4), 301-307.
- Tavakoli, A., Sohrabi, M. and Kargari, A., 2007, A review of methods for synthesis of nanostructured metals with emphasis on iron compounds, *Chemical Papers*, 61 (3), 151-170.
- Thalmann, A., 1968, A procedure for the determination of dehydrogenase activity in the soil by means of triphenyltetrazolium chloride (TTC), *Landwirt Forsch*, 21, 249-258.
- Thamizharasan, S. and Saravanan, N. A., 2017, Nanosization of Drug Biomaterials and Its Solubility Enhancement by High Energy Ball Milling, *Journal of Nanoscience and Technology*, 237-239.
- Tolochko, N., 2009, History of nanotechnology, *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*.
- Tsuzuki, T. and McCormick, P. G., 2004, Mechanochemical synthesis of nanoparticles, *Journal of Materials Science*, 39 (16), 5143-5146.
- Ullah, M., Ali, M. and Hamid, S. B. A., 2014, Surfactant-Assisted Ball Milling: A Novel Route To Novel Materials With Controlled Nanostructure-A Review, *Reviews on Advanced Materials Science*, 37.

- Verma, S., Gokhale, R. and Burgess, D. J., 2009, A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions, *International Journal of Pharmaceutics*, 380 (1-2), 216-222.
- Vishveshvar, K., Krishnan, M. A., Haribabu, K. and Vishnuprasad, S., 2018, Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Ixiro coccinea* plant leaves and its characterization, *BioNanoScience*, 8 (2), 554-558.
- Wang, B., Zhuang, X., Deng, W. and Cheng, B., 2010, Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles in alkalic carboxymethyl chitosan solution, *Engineering*, 2 (5), 387.
- Wang, Q.-Y., Zhou, D.-M. and Cang, L., 2009, Microbial and enzyme properties of apple orchard soil as affected by long-term application of copper fungicide, *Soil Biology and Biochemistry*, 41 (7), 1504-1509.
- Wang, Z., Xu, L., Zhao, J., Wang, X., White, J. C. and Xing, B., 2016, CuO nanoparticle interaction with *Arabidopsis thaliana*: toxicity, parent-progeny transfer, and gene expression, *Environmental Science & Technology*, 50 (11), 6008-6016.
- White, B., Yin, M., Hall, A., Le, D., Stolbov, S., Rahman, T., Turro, N. and O'Brien, S., 2006, Complete CO oxidation over Cu₂O nanoparticles supported on silica gel, *Nano Letters*, 6 (9), 2095-2098.
- Willems, v. d. W., 2005, Roadmap report on nanoparticles, *W&W Espana sl, Barcelona, Spain*, 157.
- Wilson, M., Kannangara, K., Smith, G., Simmons, M. and Raguse, B., 2002, Nanotechnology: basic science and emerging technologies, CRC press, p.
- Wolińska, A. and Stępniewska, Z., 2012, Dehydrogenase activity in the soil environment, *Dehydrogenases*, 10, 183-210.
- Wright, A. F. and Bailey, J. S., 2001, Organic carbon, total carbon, and total nitrogen determinations in soils of variable calcium carbonate contents using a Leco CN-2000 dry combustion analyzer, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32 (19-20), 3243-3258.
- Xie, W., Zhou, J., Wang, H., Chen, X., Lu, Z., Yu, J. and Chen, X., 2009, Short-term effects of copper, cadmium and cypermethrin on dehydrogenase activity and microbial functional diversity in soils after long-term mineral or organic fertilization, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 129 (4), 450-456.
- Xiong, T., Dumat, C., Dappe, V., Vezin, H., Schreck, E., Shahid, M., Pierart, A. and Sobanska, S., 2017, Copper oxide nanoparticle foliar uptake, phytotoxicity, and consequences for sustainable urban agriculture, *Environmental Science & Technology*, 51 (9), 5242-5251.
- Xiong, T., Zhang, T., Xian, Y., Kang, Z., Zhang, S., Dumat, C., Shahid, M. and Li, S., 2021, Foliar uptake, biotransformation, and impact of CuO nanoparticles in

- Lactuca sativa* L. var. *ramosa* Hort, *Environmental Geochemistry and Health*, 43 (1), 423-439.
- Xu, C., Peng, C., Sun, L., Zhang, S., Huang, H., Chen, Y. and Shi, J., 2015, Distinctive effects of TiO₂ and CuO nanoparticles on soil microbes and their community structures in flooded paddy soil, *Soil Biology and Biochemistry*, 86, 24-33.
- Yadav, T., Mungray, A. A. and Mungray, A. K., 2014, Fabricated nanoparticles: current status and potential phytotoxic threats, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology volume*, 83-110.
- Yadav, T. P., Yadav, R. M. and Singh, D. P., 2012, Mechanical milling: a top down approach for the synthesis of nanomaterials and nanocomposites, *Nanoscience and Nanotechnology*, 2 (3), 22-48.
- Yang, Y., Matsubara, S., Xiong, L., Hayakawa, T. and Nogami, M., 2007, Solvothermal synthesis of multiple shapes of silver nanoparticles and their SERS properties, *The Journal of Physical Chemistry C*, 111 (26), 9095-9104.
- Ye, X. and Wai, C., 2003, Making nanomaterials in supercritical fluids: a review, *Journal of Chemical Education*, 80 (2), 198.
- Yusefi-Tanha, E., Fallah, S., Rostamnejadi, A. and Pokhrel, L. R., 2020, Root System Architecture, Copper Uptake and Tissue Distribution in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Grown in Copper Oxide Nanoparticle (CuONP)-Amended Soil and Implications for Human Nutrition, *Plants*, 9 (10), 1326.
- Zhang, Q.-l., Yang, Z.-M., Ding, B.-j., Lan, X.-z. and Guo, Y.-j., 2010, Preparation of copper nanoparticles by chemical reduction method using potassium borohydride, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 20, s240-s244.