



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TEKSTİL ATIKSULARININ JAPON BALIĞI
(*Carassius auratus* L. 1758) ÜZERİNDEKİ
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN COMET VE
DİFÜZYON ANALİZ YÖNTEMLERİYLE
BELİRLENMESİ**

HURİYE DOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nagihan GÜLSOY

İSTANBUL, 2016



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEKSTİL ATIKSULARININ JAPON BALIĞI
(*Carassius auratus* L. 1758) ÜZERİNDEKİ
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN COMET VE
DİFÜZYON ANALİZ YÖNTEMLERİYLE
BELİRLENMESİ

HURİYE DOĞAN

(520113007)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nagihan GÜLSOY

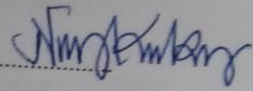
İSTANBUL, 2016

MARMARA ÜNİVERSİTESİ FEN
BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

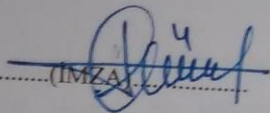
Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Huriye DOĞAN'ın
"Tekstil Atıksularının Japon Balığı (*Carassius auratus* L. 1758) Üzerindeki Genotoksik
Etkilerinin Comet ve Difüzyon Analiz Yöntemleriyle Belirlenmesi" başlıklı tez çalışması,
04/10/2016 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

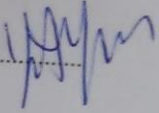
Prof. Dr. Nagihan GÜLSOY (Danışman)

Marmara Üniversitesi (İMZA) 

Prof. Dr. Lütfiye ERYILMAZ (Üye)

Marmara Üniversitesi (İMZA) 

Doç. Dr. Yıldız AYDIN (Üye)

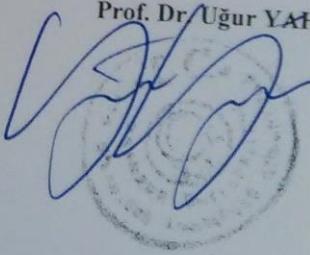
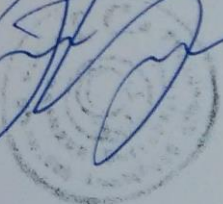
İstanbul Üniversitesi (İMZA) 

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 24.10.2016 tarih ve
2016/24-02 sayılı kararı ile Huriye DOĞAN'ın Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında
Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Uğur YAŞI

TEŞEKKÜR

Tez çalışması boyunca her türlü yardım ve bilgilerini benden esirgemeyen, tez konusu seçiminde ve tezin laboratuvar çalışmaları aşamasında bana yardımcı olan, deneyin biyolojik verilerinin yorumlanmasına katkı sağlayan, tez yazımı sırasında yazıyı kontrol eden ve yapıcı öneriler sunan, insani ve ahlaki açıdan örnek ve deneyimlerinden feyiz aldığım, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü, sabır ve katkılarından dolayı, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum Sevgili Danışman Hocam Prof. Dr. Nagihan GÜLSOY'a,

Her türlü teknik ve bilimsel araştırma imkânını sağlayarak, bana yardımcı olan Hocalarım Doç. Dr. Yıldız AYDIN ve Doç. Dr. Filiz VARDAR'a,

Yüksek lisans eğitimi almam konusunda beni yüreklendiren ve destekleyen, tez çalışması boyunca sevgisini ve güvenini esirgemeyerek varlığıyla güç veren çok sevdiğim dayılarım Ramazan KÜTÜKÇÜ ve Recep KÜTÜKÇÜ'ye,

Deneyin uygulamasına ilişkin bilgiler vererek, Comet tekniğini gösteren Cüneyd YAVAŞ'a,

Atıksu numunesinin alımı ve fotoğrafların çekimleri sırasında her türlü kolaylığı sağlayan ve yıkama prosesleri konusunda önemli bilgiler vererek bu çalışmanın gerçekleştirilmesine önemli katkıda bulunan Kot Yıkama Fabrikası Çalışanlarına,

Bugünlere gelmemde rol oynayan tüm aileme, yakınlarıma ve dostlarıma,

Teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Marmara Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Birimi (BAPKO) tarafından FEN-C-YLP-130515-0183 proje numarası ile desteklenmiştir.

Huriye DOĞAN

Ekim, 2016

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
SEMBOLLER.....	viii
KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Çalışmanın Amacı	3
1.2. Çalışmanın Önemi.....	3
1.3. Genel Bilgiler.....	3
2. MATERYAL VE YÖNTEM	62
2.1. Araç ve Gereçler.....	62
2.2. Kullanılan Solüsyonlar	62
2.3. Kot Yıkama Atık Suyu	63
2.4. Akvaryumların Hazırlanması.....	64
2.5. Model Organizmanın Seçimi	66
2.6. Japon Balıklarının Elde Edilmesi ve Laboratuvar Ortamına Ağıştırılması	68
2.7. Balık Hücre (Eritrosit) Süspansiyonunun Hazırlanması	72
2.8. Lamların, Agaroz Jellerin ve Örnek Preparatların Hazırlanması	72
2.9. Lizis.....	73
2.10. Unwiding: Elektroforez Tamponu Uygulaması.....	73
2.11. Elektroforez	74

2.12. Nötralizasyon.....	74
2.13. Boyama.....	74
2.14. Hücre Sayımı ve İstatistiksel Değerlendirme	75
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	78
4. SONUÇLAR	91
KAYNAKLAR.....	96
ÖZGEÇMİŞ.....	125



ÖZET

TEKSTİL ATIKSULARININ JAPON BALIĞI (*Carassius auratus* L. 1758) ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN COMET VE DİFÜZYON ANALİZ YÖNTEMLERİYLE BELİRLENMESİ

Endüstriyel atık su arıtım tesisleri; kaliteli arıtım sağlayamamaları nedeniyle, içerisinde çok sayıda karsinojenik (azo boyalar, hidrojen peroksit) ve mutajenik (potasyum permanganat) kimyasal maddeler ihtiva eden atıksular üretmektedir. Bu tesislerden biri olan tekstil yıkama atık sularının da içinde olduğu bu atık suların akarsulara, göllere ve denizlere deşarj edilmesi sonucunda, sucul ekosistemde yaşayan akuatik organizmalar olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu kirletici maddelerin hem suda yaşayan canlılarda biyobirikimi, hem de bu organizmalarla beslenen içinde insanların da yer aldığı çok sayıda tüketiciye ulaşması durumunda, canlı yaşamı olumsuz yönde etkilenmektedir. Üstelik canlılığın devamı için gerekli olan suyun geleceği de bu şekilde tehlike altına girmektedir. Bu çalışmanın hedefi; kanalizasyon sistemine bırakılan tekstil atık sularının (TAS) sucul canlılar arasında önemli bir yeri olan balıklar üzerinde genotoksik etkisinin olup olmadığını saptamaktır. Bu amaçla çeşitli konsantrasyonlarda (% 0.5, 5, 10 v/v TAS) hazırlanmış atık su örneklerine maruz bırakılan balıkların eritrositlerinde muhtemel akut genotoksik etkiler *in vivo* ortamda gözlemlendi. Negatif kontrol (boş akvaryum suyu), pozitif kontrol (5 mg/L Etil Metan Sülfonat) ve deney gruplarından (% 0.5, 5, 10 v/v TAS) belirli saatler (24, 48, 72, 96 saat) sonunda heparinize şırınga ile balıklardan kan örnekleri alındı. Kan hücrelerine Comet ve DNA difüzyon testleri uygulandıktan sonra, lamalar CCD kameraya (Canon A640) bağlı floresan mikroskop (BX51TF, Olympus) altında incelendi ve her lamdan 100 adet görüntü fotoğraflandı. ‘Kuyruk % DNA ve Olive Kuyruk Momenti’ Comet data analizinde parametre olarak kullanıldı ve bu parametrelerin ölçümü Kameram Comet Görüntü İşleme ve Analiz Yazılımı (Mikrosistem, Turkey) ile incelendi. DNA’sı hasarlı ve hasarsız olan hücrelere ait veriler elde edilerek, deney ve kontrol grupları arasında $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı bir fark olup olmadığına bakıldı. ‘Ölü hücrelerin sayısı’ ise DNA difüzyon analizinde parametre olarak kabul edildi. Apoptoz veya nekroza uğramış ölü hücrelerin sayıca yüzdesi hesaplanarak, bu veriler ile Comet sonuçları arasındaki ilişki değerlendirildi. Tüm kontrol ve deney grupları sonuçları karşılaştırıldı ve balık eritrositlerinde TAS’ın neden olduğu genotoksik potansiyel tartışıldı. Comet testi için ölçülen Kuyruk % DNA sonuçları dikkate alındığında; en yüksek ölçüm % 10’luk derişimde ve 96. saatte (Kuyruk % DNA: 84,322) gelişirken, en az ölçüm % 0.5’lik

derişimde ve 24. saatte (Kuyruk % DNA: 59,687) meydana geldi. TAS'a maruz bırakılan balık gruplarında görülen DNA hasarının, tüm saat ve konsantrasyonlarda negatif kontrol ile kıyaslandığında, önemli düzeyde ($p<0.05$) arttığı tespit edildi. Olive Kuyruk Momenti sonuçlarına bakıldığında; yapılan doz ve negatif kontrol grupları karşılaştırmalarında, maksimum DNA hasarı % 10'luk derişimde ve 24 saatlik sürede gerçekleşirken (Olive Kuyruk Momenti: 15,5224), minimum hasar % 0.5'lik derişimde ve 24 saatte (Olive Kuyruk Momenti: 7.48) görüldü. İlk 24 saatte % 10 grubunda belirlenen Olive Kuyruk Momentinin (Olive Kuyruk Momenti: 15.5224) kontrol grubuna (Olive Kuyruk Momenti: 10) kıyasla önemli seviyede arttığı gözlemlendi. Comet ve Olive Kuyruk Momenti incelemelerinde; hasarlı DNA sayıları, konsantrasyonlara maruz kalma ile arttı ve daha yüksek konsantrasyonlarda doz yanıtı gözlemlendi. DNA difüzyon testi için ölçülen apoptoz ve/veya nekroz kaynaklı ölü hücre sayısının yüzde miktarının en fazla % 10'luk derişimde, 24. saatte (% 80,99), en az % 0.5'luk derişimde ve 96. saatin sonunda (% 26.82) olduğu görüldü. Negatif kontrol grubuna göre, tüm atıksu muamelesi görmüş gruplarda, hasarlı nükleotidlerin dağılım yüzdesinde belirgin bir artış kaydedildi. Daha sonraki uygulama saatlerinde ölü hücrelerin sayısı kısmen azalmış olsa da, hala negatif kontrole göre oldukça yüksek olduğu izlendi. Yapılan bu çalışmada, tekstil yıkama atıksuyunun balıkların DNA'sı üzerinde etkili genotoksik ajanlar içerdiği tespit edilmiştir. Genotoksik maddelerle DNA onarım sistemi bozulan eritrositlerde gelişen DNA kırıkları tamir edilemediği için hücre apoptoza yönlendirilmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar; belli sürelerde ve farklı konsantrasyonlarda uygulanan atıksu örneklerine maruz bırakılan balıkların, bu riske maruz kalmayan balıklara göre genotoksisite ve kanserojenlik bakımından potansiyel risk taşıdıklarını düşündürmekte ve bu durum yapılan bu ekotoksikolojik çalışma ile doğrulanmaktadır.

Huriye DOĞAN

Eylül, 2016

ABSTRACT

GENOTOXICITY DETERMINATION OF TEXTILE WASTEWATER ON GOLDFISH (*Carassius auratus* L. 1758) USING THE COMET AND DIFFUSION ASSAY

Because of inability to provide quality treatment, industrial wastewater treatment plants produce wastewater contain many carcinogenic (azo dyes, hydrogen peroxide) and mutagenic (potassium permanganate) chemicals. A result of the textile washing wastewater is in one of these plants discharge to rivers, lakes and seas, aquatic organisms live in aquatic ecosystems are affected negatively. In case of these contaminants bioaccumulate in aquatic organisms and also reach to people involved in of many consumers who fed by these organisms, live life is affected adversely. Moreover, the future of water is necessary for the continued vitality also thus come under threat. The aim of this study; to determine whether the genotoxic potential of textile waste water (TWW) discharged into the sewage system on the fish that play an important role in aquatic organisms. For this purpose, possible acute genotoxic effects were observed *in vivo* in erythrocytes of fish exposed to the waste water sample prepared for various concentrations (% 0.5, 5, 10 v/v TWW). Blood samples were taken from fish groups of negative control (only aquarium water), positive control (5 mg/L Ethyl Methane Sulfonate) and experimental (% 0.5, 5, 10 v/v TWW) in the end of specific times (24, 48, 72, 96 hours), with heparinized syringe. After the Comet and DNA diffusion tests are performed to blood cells, slide examined under fluorescence microscope (BX51TF Olympus) connected CCD camera (Canon A640) and 100 images in every slide was photographed. 'Tail DNA % and Olive Tail Moment' was used as a parameter in the Comet data analyzes and these parameters have been investigated by Comet Image Analysis Software (Microsystems, Turkey). The data of cells with damaged and undamaged DNA was obtained, it has been examined whether there is significant difference between experimental and control groups at the level of $p < 0.05$. 'The number of dead cells' was used as a parameter in the DNA diffusion analysis. It was calculated of number % of dead cells underwent apoptosis and necrosis and also evaluated relationship between the results of comet with these data. All the results from experimental and control groups were compared and genotoxic potential in fish erythrocytes caused of TWW were discussed. When considered measured Tail DNA % results for Comet test; the highest measurement was obtained in concentration of 10 % and in 96 hours (Tail DNA %: 84,322), minimum measurement was obtained in 0.5 % concentration and in 24 hours (Tail

DNA %: 59,687). When DNA damage is observed in fish groups exposed to the TWW compared with negative control for all the time and concentration, increases were detected significantly ($p < 0.05$). When looked at the Olive Tail Moment results; it was viewed in doses and negative control group comparisons, maximum DNA damage occurred in a concentration of 10 % and at the 24 hour period (Olive Tail Moment: 15.5224) minimum damage were observed in a concentration of 0.5 % and in 24 hours (Olive Tail Moment: 7.48). In the first 24 hours, it was observed increase Olive Tail Moment was detected (Olive Tail Moment: 15.5224) in 10 % of group significantly when compared to the control group (Olive Tail Moment: 10). In the investigation of Comet and Olive Tail Moment; number of damaged DNA increased with exposure to concentration and the dose response was observed at the higher doses. It was shown that maximum amount occurred in 10 % concentration at 24 hours (80.99 %), least amount occurred in % 0.5 concentration and at 96 hours (26.82 %) for dead cell count % induced apoptosis and/or necrosis measured for DNA Diffusion test. Compared to the negative control group, all the groups were treated wastewater, percent increase in the distribution of damaged nucleotides was recorded. At 24 hours and 10 % exposure group the number of apoptotic and necrotic cells was detected very highly. Although the number of dead cells reduced in later exposure times, it was observed that the number is considerably higher than the negative control. In this study, it was found that TWW contain genotoxic agents which is effective on fish DNA. Cell was directed to apoptosis because of damaged DNA repair system in erythrocytes with genotoxic agents and DNA breaks can not be repaired. All results considered that the fish has potential risk in terms of genotoxicity and carcinogenicity that exposed to samples of wastewater exposed in different concentrations and certain periods when compared to the fish was not expose to those risk factors and this situation confirmed by this ecotoxicological study.

Huriye DOĞAN

September, 2016

SEMBOLLER

TUa	: Acute Toxic Unit (Akut Toksik Birimi)
bp	: Base pairs (Baz çifti)
dk	: Dakika
dwt	: Dead Weight Tonnage (Ölü Ağırlık Tonajı)
dH₂O	: Distile su
g	: Gram
ha	: Hektar
kg	: Kilogram
L	: Litre
µg	: Mikrogram
m	: Metre
m³	: Metreküp
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mg	: Miligram
µl	: Mikrolitre
M	: Molar
mM	: Milimolar
mA	: Miliamper
nm	: Nanometre
ppm	: Part(s) Per Million (Milyonda Bir Birim)
pH	: H ⁺ iyonlarının konsantrasyonu
rad	: Radyasyon
sa	: Saat
°C	: Santigrad Derece
cm	: Santimetre
V	: Volt
v	: Volume (Hacim)
%	: Yüzde
yy	: Yüzyıl

KISALTMALAR

AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome (Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu)
AKM	: Askıda Katı Madde
ALAD	: Amino Levulinik Asit Dehidrogenaz
ALT	: Alanin Transaminaz
ANOVA	: Analysis of Variance (Varyans Analizi)
AOP	: Advanced Oxidation Process (İleri Oksidasyon Prosesleri)
AST	: Aspartat Transaminaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
BOİ	: Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı
CAT	: Katalaz
CI	: Colour Indeks (Renk İndeksi)
CP	: Cyclo Phosphamide (Siklofosfamid)
ÇKM	: Çözünmüş Katı Madde
DAPI	: 4,6-Di Amidino-2-Pheny Indoldilaktat
DDT	: Dikloro Difenil Trikloroethan
DMSO	: Di Metil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DNaz	: Deoksiribo Nükleaz
DTÖ	: Dünya Ticaret Örgütü
EC₅₀	: Effective Concentration % 50 (Deney organizmalarının yarısında olumsuz (semptomik) etki gösteren madde konsantrasyonu)
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik asit
EMS	: Etil Metan Sülfonat
EtBr	: Etidyum Bromür
FEPA	: Federal Environmental Protection Agency (Federal Çevre Koruma Ajansı)
FSH	: Folikül Stimule edici Hormon
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon

GST	: Glutatyon-S-Transferaz
Hb	: Hemoglobin
Hbs	: Hidrolik bekletme süresi
HIV	: Human Immunodeficiency Virus (İnsan Bağışıklık yetmezlik Virüsü)
HMA	: High Melting Agarose (Yüksek Kaynama dereceli Agar)
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
İSKİ	: İstanbul Su ve Kanalizasyon İdaresi
KOİ	: Kimyasal Oksijen İhtiyacı
LC₅₀	: Lethal Concentration % 50 (Deney organizmalarının yarısını öldürmek için gereken letal konsantrasyon)
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LMA	: Low Melting Agarose (Düşük Kaynama dereceli Agar)
LPO	: Lipid Peroksidasyon
MAPK	: Mitogen Activated Protein Kinases (Mitoz bölünmeyi Aktive eden Protein Kinaz enzimleri)
MDA	: Malondialdehit
MCH	: Mean Corpuscular Hemoglobin (Ortalama Eritrosit Hemoglobini)
MCHC	: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu)
MCV	: Mean Corpuscular Volume (Ortalama Eritrosit Hacmi)
•OH	: Hidroksil radikalleri
PAH	: Poli Aromatik Hidrokarbonlar
PBS	: Phosphate Buffer Solution (Fosfat Tampon Çözeltisi)
PCV	: Packed Cell Volume (Paketlenmiş Hücre Hacmi)
RBC	: Red Blood Cells (Kırmızı Kan Hücreleri)
RNA	: Ribo Nükleik Asit
ROM	: Reaktif Oksijen Metabolitleri
ROS	: Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
SCGE	: Single Cell Gel Electrophoresis (Tek Hücre Jel Elektroforezi)
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
T-AOC	: Total Antioxidant Capacity (Toplam Antioksidant Kapasitesi)
TAS	: Tekstil Atık Suları
TBARS	: Tiyo Barbitürik Asit Reaktif Madde

- TÇKM** : Toplam Çözünmüş Katı Madde
- TF** : Toxicity Factor (Toksisite Faktörü: Örneklerin 24 saatlik LC₅₀ değerinin, farklı zaman aralıklarındaki LC₅₀ değerlerine oranı)
- TKN** : Toplam Kjeldahl Azotu
- TOK** : Toplam Organik Karbon
- UF** : Ultra Filtrasyon
- UMBR** : Ultra Membran Biyo Reaktör
- UV** : Ultra Viyole
- WBC** : White Blood Corpuscle (Beyaz Kan Hücreleri)
- ZSF** : Zehirlilik Seyreltme Faktörü



ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil 1.1. Pamuk bitkisinin tekstil ürününden hazır giyime doğru geçirdiği değişim süreçleri	4
Şekil 1.2. Dünyada başlıca tekstil ve hazır giyim ihracatçıları	6
Şekil 1.3. Tekstil atık sularının deşarj edildiği noktada meydana getirdiği olumsuzluklar	7
Şekil 1.4. Tekstil yıkama proseslerinde kullanılan büyük hacimli yıkama (a) ve kurutma (b) makinaları	8
Şekil 1.5. Çeşitli yıkama işlemlerinden geçirilmiş kot mamülleri	9
Şekil 1.6. Denim yıkama fabrikasında yapılan genel yıkama prosesleri	10
Şekil 1.7. Denim mamulüne püskürtme yoluyla $KMnO_4$ / $NaClO$ kimyasalının uygulanması.....	11
Şekil 1.8. $NaClO$ ile ağartma öncesi (Solda) ve sonrası (Sağda).....	12
Şekil 1.9. Kot mamülünün potasyum permanganat ile yıkanmamış (Solda) ve yıkanmış (Sağda) hali	12
Şekil 1.10. Denimin amilaz/selülaz /lakkaz enzim karışımı ile biyoyıkması.....	13
Şekil 1.11. Kot yıkama atıksuyu arıtma tesisinde uygulanan prosesler	25
Şekil 1.12. Tekstil atıksuların hidrojen peroksit ve ultraviyole ışın kombinasyonu ile arıtılması	26
Şekil 2.1. Orta ölçekli bir kot yıkama fabrikasından alınmış atıksu numunesi.....	63
Şekil 2.2. TAS'ın farklı konsantrasyonlarına (sırasıyla % 0.5, 5 ve 10) maruz bırakılmış balıkların bulunduğu akvaryumlar ile negatif kontrol grubu (-c) için hazırlanan akvaryumlar üstten (a) ve yandan (b) görüntüsü	65
Şekil 2.3. Laboratuvar ortamına alıştırılan japon balığı	68
Şekil 2.4. Deney akış şeması	70
Şekil 2.5. Balıktan alınan kana Comet ve DNA difüzyon testlerinin uygulanması	71
Şekil 2.6. Comet uygulaması sonrası elde edilen DNA görüntüleri	75
Şekil 2.7. Comet görüntüsü oluşturan eritrosit hücrelerine ait baş, kuyruk ve kuyruk moment uzunlukları	76

Şekil 2.8. DNA difüzyon uygulaması sonrası elde edilen DNA görüntüleri.....	77
Şekil 2.9. DNA difüzyon testinde belirlenen hasarsız (solda) ve ölü (sağda) hücreler	77
Şekil 3.1. Farklı konsantrasyon ve sürelerde TAS'a maruz kalan japon balığının eritrositlerinde meydana gelen DNA hasarını gösteren Comet görüntüleri	81
Şekil 3.2. Farklı konsantrasyon ve sürelerde TAS'a maruz bırakılan japon balıklarının eritrositlerinde görülen ortalama 'Kuyruk % DNA (\pm Standart hata)' ölçümlerinin negatif ve pozitif kontrol grupları ile karşılaştırılması	82
Şekil 3.3. Farklı konsantrasyon ve sürelerde TAS'a maruz bırakılan japon balıklarının eritrositlerinde görülen ortalama 'Olive Kuyruk Momenti (\pm Standart Hata)' ölçümlerinin negatif ve pozitif kontrol grupları ile karşılaştırılması.....	84
Şekil 3.4. Farklı konsantrasyon ve sürelerde TAS'a maruz bırakılan japon balıklarında görülen apoptoz veya nekroz kaynaklı ölü hücre sayısının yüzde miktarının negatif ve pozitif kontrol grupları ile karşılaştırılması	85
Şekil 3.5. DNA difüzyon testi sonucu japon balığının eritrositlerinde hasarsız (a) ve apoptotik/nekrotik (b, c, d) olarak değerlendirilen DNA fragmentlerinin görüntüleri	86

TABLO LİSTESİ

SAYFA NO

Tablo 1.1. Tekstil sanayi (Pamuklu tekstil ve benzerleri) atık sularının alıcı ortama deşarj standartları	19
Tablo 1.2. Karışık endüstriyel atıksuların (Kompozit numune için) alıcı ortama deşarj standartları	20
Tablo 2.1. Comet ve DNA difüzyon analizleri için deney akvaryumlarının hazırlanması	66
Tablo 2.2. Belli konsantrasyonlarda (% 0.5, 5 ve 10) kot yıkama atık suyu içeren doz grupları ile negatif kontrol grubunun bulunduğu akvaryum sularının deneyden önceki pH ve sıcaklık değerleri.....	66
Tablo 2.3. <i>Carassius auratus</i> balığının sistematığı	69
Tablo 3.1. Kot yıkama atık suyunun fizikokimyasal özellikleri.....	79
Tablo 3.2. 24, 48, 72 ve 96 saatler sonunda % 0.5, 5, 10 deney grupları ile negatif ve pozitif kontrol gruplarında gelişen ortalama ‘Kuyruk % DNA (\pm Standart hata)’ miktarının karşılaştırılması.....	81
Tablo 3.3. 24, 48, 72 ve 96 saatler sonunda % 0.5, 5, 10 TAS deney grupları ile negatif ve pozitif kontrol gruplarında gelişen ortalama ‘Olive Kuyruk Momenti (\pm Standart hata)’nin karşılaştırılması	82
Tablo 3.4. 24, 48, 72 ve 96 saatler sonunda % 0.5, 5, 10 deney grupları ile pozitif ve negatif kontrol gruplarında gelişen ‘Apoptotik/Nekrotik hücre yüzdeleri’	85

1. GİRİŞ

İlk kez 19. yy'da İngiltere'de ortaya çıkan, ardından Batı Avrupa, Kuzey Amerika ve Japonya'ya sıçrayan, daha sonra büyük bir hızla tüm dünyaya yayılan Sanayi Devrimi bilim ve teknolojinin gelişmesiyle birlikte insanların ferah düzeyini arttırmıştır. İlginçtir ki insanoğlunun faydası ve rahatlığı için önemli görülen bu dönem, aynı zamanda çevre felaketlerinin de başlangıcı sayılmıştır. Artan insan nüfusuna bir de doğal kaynakların bilinçsiz ve aşırı miktarda sömürülmesi eklenince, ortaya çıkan manzara içler acısıdır. Tüklenen doğal kaynaklara bakıldığında bu durumdan en çok su kaynaklarının etkilendiği görülmüştür.

Dünyamızın $\frac{3}{4}$ 'ünü oluşturan ve toplam hacmi 1,4 milyar km^3 olarak tahmin edilen suyun % 97,5'i okyanuslarda ve denizlerde tuzlu su olarak, % 2,5'i ise nehir ve göllerde tatlı su olarak bulunmaktadır. Yoğun konsantrasyonda tuz içermesi sebebiyle, tuzlu sular içme suyu olarak kullanıma, tarımsal sulamaya ve endüstriyel kullanıma uygun değildir. Kullanıma uygun olan tatlı suların % 90'ı kutuplardaki buzullarda ve yeraltısularında bulunduğu için, erişilebilir ve içilebilir su miktarı da oldukça azdır (DSİ, 2004).

Nüfus artışı ile beraber artan su kullanımına karşılık, temiz su kaynaklarının azalması nedeniyle, ihtiyaç duyulan temiz su miktarı her geçen gün artmaktadır. Çok sayıda ülke şimdiden su sıkıntısı çekmektedir. İnsan besin almadan haftalarca yaşarken, susuz ancak birkaç gün yaşayabilmektedir. Yeryüzünde canlı yaşamı için mutlak surette gerekli olan su, yüzeysel ve yeraltı su kaynaklarından temin edilmektedir. Tatlı su kaynakları sınırlı olan ülkeler ise ihtiyaç duydukları suyu denizlerden karşılamaktadır. Tuzlu suların arıtılması, maliyet açısından pahalı ve zahmetli işlemleri barındıran bir süreç olmasına rağmen tatlı su kalitesine de hiçbir zaman ulaşamamaktadır.

Tatlı suların en önemli kaynağı yağışlardır. Ne var ki yıllık yağıştaki önemli düşüş son yıllarda etkisini arttıran küresel ısınma ve sera etkisi nedeniyle dikkat çekici boyutlara varmaktadır. Birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de tatlı su kaynakları oldukça sınırlı olup, ancak ihtiyaca cevap vermektedir. Türkiye, kişi başına yıllık 1555 m^3 su tüketimiyle su azlığı çeken bir ülke konumundadır. 95 milyar m^3 yüzey suyu potansiyelimizin ancak 27,5 milyar m^3 'ünden (% 29) yararlanılabilirken; yararlanılan su potansiyelinin 20,9 milyar m^3 'ü (% 76) tarımsal sulamada, 3,85 milyar m^3 'ü (% 14) belediyeler tarafından içme suyu olarak, 2,75 milyar m^3 'ü (% 10) de sanayide tüketilmektedir (Akın ve Galip, 2007).

Dünyadaki en büyük endüstri kollarından biri olan tekstil ve hazır giyim sanayi, gelişmekte olan diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye’de de son yıllarda önem kazanmıştır. Tekstil ve hazır giyim endüstrisi, gelişmekte olan ülkelere Türkiye’nin en önemli ve en büyük sanayi kollarından birini oluşturmaktadır. Evsel atık sularla kıyaslandığında tekstil ve diğer endüstriyel atık sular, taşıdıkları kirlilik yükü ve atık kompozisyonu bakımından dikkat çekmekte; biyolojik olarak bozulamayan ve toksik özelliği kanıtlanmış, çok sayıda ağır metaller ve kimyasal maddeler içermektedir. Ne yazık ki bu zararlı maddelerin en ileri tasfiye yöntemleri kullanıldığında bile zararsızlaştırılıp, ortamdaki elimine edilemediği bilinmektedir.

Ülkemizdeki tekstil fabrikalarının atık sularını alıcı ortam olan suya deşarj ederken uymaları gereken kirlilik sınır değerleri, Resmi Gazete’de yayınlanan Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği’nde belirtilmiştir (Su kirliliği Kontrolü Yönetmeliği, 2004). Ne var ki bu konuda ne alınan çevresel koruma önlemleri, ne de yasal düzenlemeler yeterli olamamıştır. Çevre kanununda yer alan maddelere uymayarak, atık sularını arıtmadan doğrudan evsel atık sularla birlikte aynı alıcı ortama bırakan işletmeler, yetersiz denetimlerden aldığı güçle yollarına devam ederken, küresel kirlilik dünyamızı, içinde barındırdığı doğal yaşamla birlikte, tehdit altında bırakmaktadır.

Endüstriyel atıksuların çeşitli canlılar üzerindeki olumsuz etkilerine dair yapılan çok sayıda bilimsel araştırma mevcuttur. Bu araştırmalardan yalnızca çok az bir kısmının tekstil atık sularına (TAS) maruz kalan organizmalarla ilgili olduğu söylenebilir. Bunun yanında TAS içerisinde önemli bir alana sahip olan kot (denim) yıkama atıksularının, balıklar üzerindeki genotoksik etkilerinin, Comet ve DNA difüzyon analiz metotları kullanılarak araştırılması konusunda herhangi bir toksikolojik çalışmaya rastlanılmamıştır. Ülkemizde daha önce bu konuyla ilgili yapılmış bilimsel bir çalışmanın bulunmaması nedeniyle de Türk Bilim literatürüne sağlayacağı katkının önemli olacağı düşünülmektedir. Bu bakımdan bu tez çalışmasında, İstanbul’da küçük çapta faaliyet gösteren bir denim yıkama fabrikasından, arıtımı yapılmış çıkış suyu alınmış ve alınan atıksu numunesinin balıklar üzerindeki muhtemel genotoksik etkileri ‘Comet’ ve ‘DNA difüzyon’ analiz yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Bu eko-genotoksikolojik çalışmadan elde edilen bulgular, endüstriyel kirlenmenin canlılardaki zararlı sonuçlarını bilimsel anlamda ortaya koymanın yanı sıra, doğaya insan eli ile yapılan yapay müdahalelerin karşılıksız ve sonuçsuz kalmadığını da göstermiştir.

1.1. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın temel amacı; kimyasal arıtımı gerçekleştirilmiş ve İSKİ (İstanbul Su ve Kanalizasyon İdaresi) tarafından kontrolleri yapılmış, kanalizasyon sistemine bırakılan ve tekstil endüstrisinin önemli bir ürünü olan denim yıkama işlemleri sonucunda ortaya çıkan atık suyun içerisinde genotoksik ajan olup olmadığını saptamak, deney süresince test organizması olarak kullanılacak japon balığının belirli süre ve konsantrasyonlarda bu atık suya maruziyeti sonucunda göstereceği genotoksik cevabı öğrenmek ve balıkta genotoksik hasar oluşmuş ise bu hasarın derecesini belirlemektir.

1.2. Çalışmanın Önemi

Balıkta genotoksik hasara neden olan maddelerin ortamda var olduğunun saptanması, genotoksik hasara uğrayan balıkları tüketen canlılarda biyolojik birikimin izlenmesini sağlayacaktır. Balıkta görülen genotoksik etkilerin balıklarla beslenen insanlarda da benzer etkilerin görülmesine yol açmasını kaçınılmaz hale getirecektir. Zira insan için karsinojen olan pek çok bileşiğin aynı zamanda genotoksik olduğu saptanmıştır. Bu durum hücredeki genetik hasarın biyogöstergesi olan Comet ve DNA difüzyon testlerinin, kanser riskinin tahmin edilmesini ve kanserin izlenmesini sağlamayı mümkün kılmıştır (Tozan-Beceren ve ark., 2011). Bu tez çalışması, toksik maddelerin ortamdaki güvenli bir şekilde uzaklaştırılması için gerekli önlemlerin alınması ve bu maddelere maruz kalan bireylerin kontrol altında tutulabilmesi amacıyla dikkat çekicidir. Ayrıca balıklarda genotoksik etki gösteren atıksu konsantrasyon değerinin belirlenmesiyle birlikte, alıcı ortama verilecek genotoksik olmayan limit düzeyinin tespiti de sağlanacaktır. Toksikolojik yönden incelenen denim yıkama atık suyunun hedef olmayan organizmalardan balıklar üzerinde oluşturabileceği genotoksitenin anlaşılması ve elde edilecek sonuçların değerlendirilmesi ile literatüre katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

1.3. Genel Bilgiler

Tekstil ham maddesi olan lifler (fibril, fiber, elyaf) en az 5 mm uzunluğunda ve değişken kalınlıklardaki yapılardan meydana gelmiştir. Doğal ve yapay (sentetik, kimyasal) liflerin eğrilerek önce ipliğe dönüştürülmesi, sonrasında ise bu ipliklerin el ya da dokuma makinelerinde dokunarak kumaş ve halı gibi çeşitli ürünlere dönüştürülmesine 'tekstil (dokuma)' denmektedir. Hazır giyim (konfeksiyon); dokunmuş kumaşın kesimhanelerde kesildikten sonra, dikiş makineleriyle belli standart ölçülere göre isteğe uygun biçim ve

şekillerde dikilmesi ve seri olarak hazırlandıktan sonra da satışa sunulmasını kapsayan, kısaca giyim eşyasının üretimini yapan sektördür. Beslenme ve barınmadan sonra insan hayatının en önemli ihtiyaçlarından biri haline gelen tekstil ve hazır giyim, günlük yaşantımızın vazgeçilmez bir parçasıdır. Zira yatak örtüsünden, perdeye, havludan, giydiğimiz giysilere kadar, insan hayatının her aşamasında tekstil ürünlerine rastlamak mümkündür.

Doğal liflerin insan sağlığı yönünden olumlu özelliklere sahip olması, yapay liflere oranla, bu liflere olan ihtiyacı arttırmaktadır. Diğer yandan teknoloji ve sanayide gelişen yeniliklerle birlikte doğal liflere genelde belli oranlarda yapay liflerin karıştırılması ile farklı kombinatif ürünler ortaya çıkmıştır. Dünyada çeşitli amaçlar için kullanılan liflerin % 61'i bitkisel (selüloz), % 5'i hayvansal (protein), % 34'ü kimyasal kökenlidir. Bitkisel lifler içinde yer alan pamuk, lif üretiminin % 54'ünü kapsadığı için endüstride önemli bir yere sahiptir (MEB, 2011) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Pamuk bitkisinin tekstil ürününden hazır giyime doğru geçirdiği değişim süreçleri (Mert Pazar, 2010; Cardiner, 2012; Akbulut İplik, 2016; Aydın Ticaret Borsası, 2016; İşkur Denim, 2016)

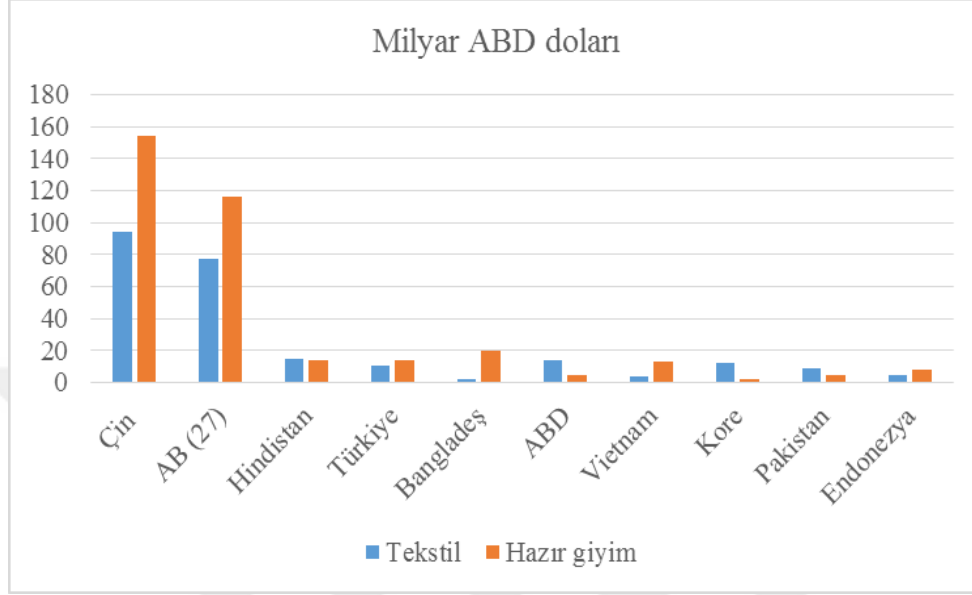
En yaygın kullanılan liflerden biri olan ve bu tez çalışmasındaki kotun üretiminde kullanılan pamuk; direkt, indigo (çivit) ve naftol boyalar ile boyanabilse de, esas olarak

reaktif boyalar ile boyanmaktadır. Reaktif boyalar, lif molekülü ile kovalent bağ oluşturma kapasitesine sahiptir ve bu boyaların kullanılan en etkili ve en kalıcı boya olduğu kabul edilir. Piyasada en sık kullanılan reaktif boyaları; Procion MX, Cibcron F, Sabracron F, Drimarene K, Remazol'dur. İndigo boyalar mavi kotların primer rengini oluşturur. Direkt boyalar kumaşlar üzerine uygulandıktan sonra lif molekülleri ile güçlü bağlar oluşturmamışlarından, diğer boyalar arasında en ucuz olanıdır. Naftol boyalar ise diğer reaktif boyalardan daha tehlikeli kimyasallar ihtiva etmesi nedeniyle ev kullanımı için kullanıma fazla uygun değildir (Holme, 2000; Lorimer ve ark., 2001; Valh ve Le Marechal, 2009; Hanu, 2010; Burch, 2013). Azo boyaları, tekstil endüstrisinde kullanılan tüm boyaların en büyük grubunu oluşturmakla beraber, 10.000'den fazla renk endeksi (CI) ile en büyük boya sınıfıdır. Bu nedenle üretilen tüm boyar maddelerin % 60-70'ini azo boyaları oluşturur. Bunlar sülfonat grupların yerine geçen aromatik halkalar ile bir ya da daha fazla azo gruplarına (R-N=N-R) sahiptir. Kumaş içine yerleşen ve burada birleşmiş halde tutunan bu kompleks aromatik yapılar; yoğun renkten, yüksek çözünürlükten ve doğal koşullar altında bozunmaya dirençli olmaktan sorumludurlar (Manu, 2003; Khehra ve ark., 2006; Robert ve Alexander, 2008; Sri, 2008; Arya ve Kohli, 2009; Hanu, 2010).

Geçmiş yıllarda bitkisel, hayvansal ve mineral (bakır sülfat ve kalay klorid) gibi doğal boyalar geniş çapta kullanılırken, günümüzde bu tür boyaların neredeyse tamamı sentetik boyalar ile yer değiştirmiştir. Bu değişimin nedenleri arasında, geleneksel boyama proseslerinin yavaş ve pahalı olması, sentetik boyaların doğal boyalara nazaran daha güçlü renkler verme özelliğine sahip olması sayılabilir. Ancak bazı sentetik boyaların mutajenesinin bildirilmesi nedeniyle, insan ve hayvan sağlığı için artılmamış tekstil boya atıksularının etkin bir şekilde temizlenerek ortadan kaldırılması, su ve çevresinin güvenliği hakkındaki endişeyi arttırmaktadır. Ticari boyaların geniş çapta kullanıldığı Çin, Hindistan gibi tekstil sanayinin en fazla gelişme gösterdiği ülkelerde, gözlenen problemlerin büyüklüğü dikkat çekici boyutlara varmaktadır. Öyleki Çin'den sonra ikinci büyük boyarmadde ve ara bulucu ihracatçısı olan Hindistan'da tekstil sektörü tek başına üretilen toplam boyar maddenin % 80 kadarını tüketmektedir. Çin ve Hindistan aynı zamanda dünyanın en büyük tekstil ve hazır giyim ihracatçısı olan iki büyük ülkesidir.

Dünya çapında mevcut en büyük ve en eski sektörlerinden biri olan tekstil ve hazır giyim endüstrisi; Bangladeş, Vietnam, Sri Lanka ve Maritus gibi yoksul ülkelerde istihdam sağlamada ve bu ülkelerin Gayri Safi Yurtiçi Hasılat değeri artışında önemli bir rol oynamaktadır. Bu sektör, gelişmiş ülkelerin 18. yüzyılda gerçekleştirdikleri sanayileşme sürecine katkı sağlamış, bu ülkelerin izini süren ve gelişmekte olan devletlerin ekonomik

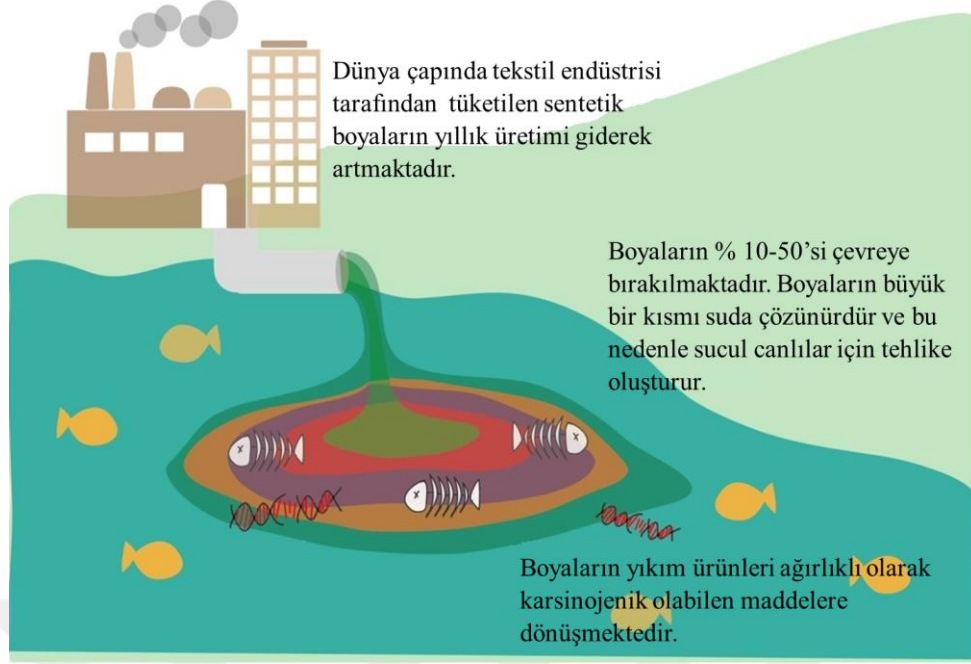
kalkınma süreçlerinde de önemli roller oynamıştır. Ülkemiz işgücü, hammadde ve pazarlama faktörleri dikkate alındığında; Çin, Hindistan ve Güney Kore ile birlikte, dünyanın en rekabetçi ülkeleri arasında yer almaktadır. Türkiye, 2011’de dünya tekstil ve hazır giyim ihracatında 4. sırada yer almıştır (DTÖ 2011 verileri) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Dünyada başlıca tekstil ve hazır giyim ihracatçıları (DTÖ 2011 verileri)

2012 yılında % 3,5’lik pay ile 7.’likle bir düşüş yakalayan Türk tekstil piyasası 2013’de tekrar yükselişe geçerek 5. büyük ihracatçı konumunda yer almıştır. Hammadde, işgücü ve teknolojik donanımın yeterliliği sayesinde dünya ülkeleriyle yarışacak konuma gelen ülkemiz Almanya, İngiltere, Fransa, İtalya gibi başta Avrupa ülkeleri olmak üzere gelişmiş pek çok ülkeye önemli ihracat hamleleri gerçekleştirerek, ekonomik kalkınma alanında ciddi adımlar atmaktadır. Öyle ki Türkiye’de, 20.000’nin üzerinde tekstil imalatı yapan firma bulunmaktadır (Gereffi, 2002; Keane ve Velde, 2008; DTÖ 2011 verileri).

Dünyada üçüncü büyük sektör haline gelen tekstilin Türkiye’de hızla büyüyen bir sektör olması, atık su sorununu da beraberinde getirmektedir. Tekstil boyamada ve yıkamada kullanılan çok sayıda kimyasal madde, durulama sonrası açığa çıkan atıksu ile birlikte çeşitli arıtma yöntemleri kullanılarak ya da herhangi bir arıtım yolu izlemeden alıcı ortam olan kanalizasyona verilmektedir. Buradan akarsulara, göllere denizlere ve toprağa ulaşan atıksular, taşındığı ortamda yaşayan bitkileri, sucul canlıları ve suyu olumsuz yönde etkilemektedir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Tekstil atık sularının deşarj edildiği noktada meydana getirdiği olumsuzluklar (IGEM, 2016'dan değiştirilerek)

Doğal ya da yapay liflerden ya da bu ikisinin değişik miktarlardaki karışımından üretilen tekstil ürünleri, **boyama** ve ardından dikim işlemleri sona erdikten sonra '**yıkama**' adı verilen çok önemli bir aşamadan geçer. Her çeşit tekstil mamulüne uygulanan bu işlem, kumaş üzerinde geçici tutunmuş fazla boyayı kumaştan uzaklaştırarak, yıkama sırasında ürünün fazla boya vermesinin önüne geçer. Böylece klasik deterjan ile yıkanan ve yumuşatıcı madde yardımıyla yumuşatılan giyim ürünleri, sağlık ve kullanım açısından da gerek satışı ve gerekse kullanıma uygun hale getirilir. Tekstil ürünlerinin kimyasal yolla yıkanabilmesi için endüstriyel yıkama ve kurutma makinaları kullanılmaktadır (Şekil 1.4).



(a)



(b)

Şekil 1.4. Tekstil yıkama proseslerinde kullanılan büyük hacimli yıkama (a) ve kurutma (b) makinaları

Yıkama; önceleri dikim aşaması tamamlanmış tekstil kumaşındaki haşılın sökülmesi için ve giyilebilir temizlik ve yumuşaklığın sağlanması amacıyla uygulanan deterjan ve yumuşatıcı gibi basit işlemleri kapsarken, sonraları ürüne çeşitli renk, efekt ve tuşe (doku) kazandırma amacına yönelik farklı işlemlerin kullanılmasını gerekli kılmıştır. Önemli tekstil ürünlerinden denim mamülleri, kullanım süresince aşınmakta, fakat giysiye kazandırdığı bu aşınma göze hoş gelmeyecek bir biçimde, yıpranmış bir görüntü vermekteydi. Üreticiler kot giysilerinin göze havalı ve güzel gelecek şekilde aşınma efekti kazanması, aynı zamanda da eskimiş bir görüntü alması için birtakım yıkama yöntemleri geliştirmiştir (Şekil 1.5).

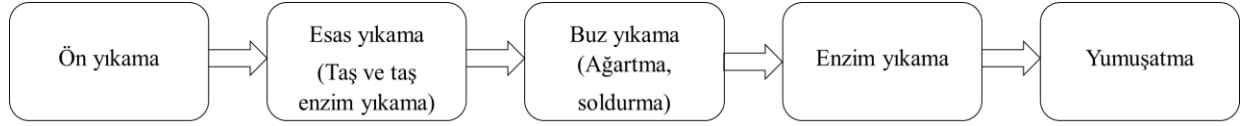


Şekil 1.5. Çeşitli yıkama işlemlerinden geçirilmiş kot mamülleri (Periyasamy, 2014)

Bu da denime uygulanan yıkama işlemlerinin ve yıkama esnasında kullanılan kimyasal maddelerin çeşitlenmesine yol açmıştır. En dayanıklı kumaşlar arasında gösterilen ve % 100 pamuktan imal edilmiş ‘denim’ sağlam yapısı nedeniyle, üzerine en fazla kimyasal yıkama işleminin yapıldığı giyim malzemesidir. Yırtılmaya karşı gösterdiği direnç ve sağlamlığı nedeniyle diğer tekstil ürünlerine uygulanan kimyasal yıkama işlemlerine karşı nisbeten daha fazla dayanıklılık göstermesi, kimyasalların kullanma miktarındaki artışı da beraberinde getirmiştir. Bu durum atık su bileşiminin olumsuz yönde etkilenmesine neden olmuştur.

Kota uygulanan yıkama işlemleri; kotun cinsine, istenen görüntüye, kotun yıkama işlemlerine göstereceği dayanıklılığa ve kullanılan aksesuarların özelliklerine göre belirlenir. Bir denim yıkama fabrikasında yapılan belli başlı yıkama prosesleri genel olarak 5 başlık altında toplanır. Bu prosesler 1. Ön yıkama, 2. Esas yıkama (taş ve taş enzim yıkama), 3. Buz

yıkama (ağartma, soldurma), 4. Enzim yıkama ve 5. Yumuşatma aşamalarından meydana gelir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Denim yıkama fabrikasında yapılan genel yıkama prosesleri

Ön yıkama: Denim kumaşının fazla boyasını almak ve yıkama esnasında boya vermesinin önüne geçmek için, belli bir süre ile (15 dakika) deterjan ve ‘dispergator’ adı verilen kimyasal maddelerle muamele edilmesi ‘ön yıkama’ işlemi olarak tanımlanmaktadır. Fosfatlı deterjanlar geçici tutunmuş fazla boyayı kumaştan uzaklaştırır. Dispergatorler (naftalin sülfonatlar, anyonik yüksek polimerler, poliglikoeterler, yüksek etoksile yağ alkoller) ise kalıcı tutunmuş boyayı kumaş üzerine daha sıkı bağlayan özel bileşimlerdir.

Esas Yıkama (Taş ve Taş Enzim Yıkama): Kot kumaşının çok hızlı bir şekilde yıkama efekti kazanması için pomza, perlit gibi doğal taşların, nötral taş enzimiyle birlikte kullanılmasıyla yapılan fizikokimyasal bir yıkama şeklidir. Taşlar kot üzerindeki indigo boyaları aşındırarak kumaşa efekt kazandırır. Enzimler ise olası tüylenmeleri ortadan kaldırarak bu aşınmayı hızlandırır ve taş kullanımını azaltır, böylece ürün ve yıkama makinesi fazla zarar görmez. Böylece ürün yüksek kontrast kazanarak, daha canlı ve daha parlak hale gelir. Günümüzde kot giysileri % 100 pamuk yerine poliamid, poliester ve likra karışımı ipliklerden üretilmektedir. Bu bakımdan yıkama öncesi kotun taşa ve fiziki sürtünmelere dayanıklı olmasına dikkat edilmelidir. Çünkü yaklaşık 40 dakika (dk.) süren bu işlem sırasında kot hem taş, hem diğer kotlar, hem de yıkama makinesiyle temas ederek sürtünmektedir. Yıkama sırasında kullanılacak taşların boyutları mamulün dokusuna, kalınlığına ve istenen efektin miktarına göre değişkenlik göstermektedir.

Buz Yıkama (Ağartma, Soldurma): Denim mamullerinin boyanmasında kullanılan indigo boyarmaddenin, açık tondaki mavi renge indirgenmesi için kotun sodyum hipoklorit (NaClO) veya potasyum permanganat (KMnO₄) kimyasalıyla muamele edilerek renginin açılması işlemidir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Denim mamulüne püskürtme yoluyla KMnO_4 / NaClO kimyasalının uygulanması

Ağartıcı kimyasalların kontrollü kullanılmaması ya da gereğinden fazla kullanılması sonucu, mamülde zayıflama ve sararmalar olacağından, kullanılan aksesuarlarda pas ve leke sorunları ortaya çıkabileceğinden bu konuda dikkatli olunmalıdır. İşlem sonrasında, istenen renge ulaşıldığında, ağartıcıların etkisini öldürmek için kullanılan kimyasal artıkları kumaştan uzaklaştırmak için hidrojen peroksit (H_2O_2) veya sodyum bisülfid (NaHSO_3) ile nötralizasyon işlemleri yapılmalıdır, aksi takdirde sararma ve zayıflama gelişebilmektedir. H_2O_2 kalıntılarını oksijene parçalamak ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) için katalaz enzimi kullanılarak daha kesin bir nütürleme işlemi yapılmalıdır. Böylece işlem süresi kısalmakta, durulama gerekmediğinden su ve enerji tasarrufu sağlanmaktadır. NaClO ile yapılan ağartmalar sayesinde buz mavisi (çok açık mavi) renklere ulaşılmaktadır (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. NaClO ile ağartma öncesi (Solda) ve sonrası (Sağda) (Kaser, 2013)

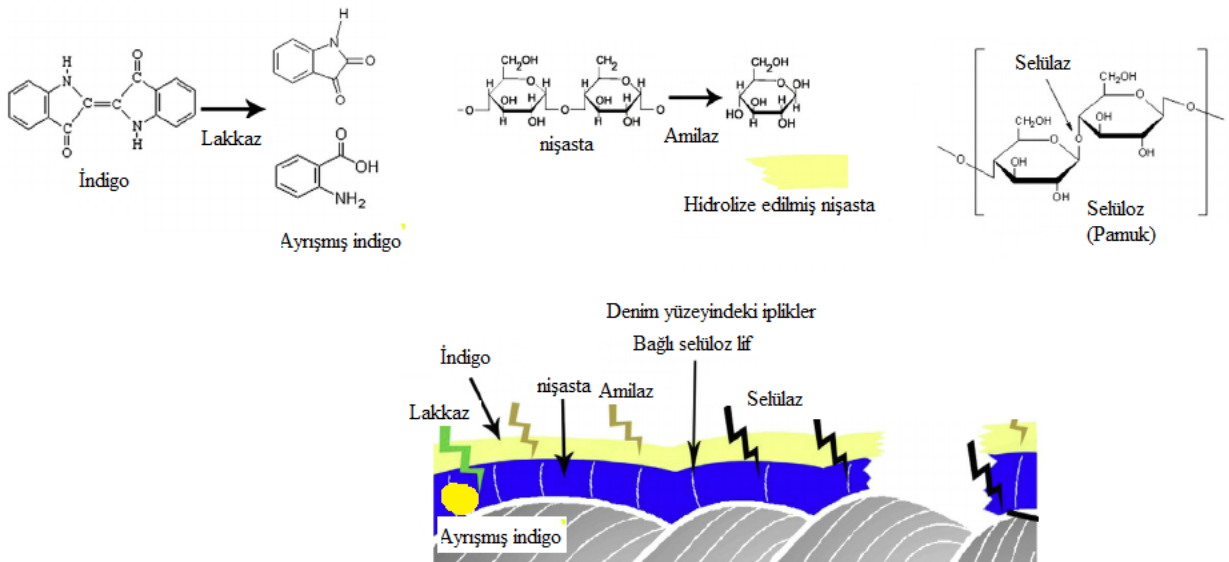
Likralı kotta likra bozulmasına neden olmaması için, NaClO yerine $KMnO_4$ kullanımı tercih edilir. $KMnO_4$ ile ağartma, daha çok lokal olarak yapılan işlemlerde (tabanca ile püskürtme gibi) ve likra gibi sıcaklık ve NaClO etkisi altında zarar gören elyafların ağartılmasında kullanılır. $KMnO_4$ moleküllerinin büyük oluşu renk açma işleminin daha kontrollü ve yavaş olmasını sağlar ve açık mavi renge ulaşılır (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Kot mamülünün potasyum permanganat ile yıkanmamış (Solda) ve yıkanmış (Sağda) hali (Heddels, 2016)

Enzim yıkama: Kumaş yüzeyindeki haşılı, tüylenmeyi, tiftiklenmeyi ve organik maddeleri giderebilmek ve aşınmayı hızlandırabilmek için organik, asidik ya da nötral yapıdaki enzimlerin kullanılması işlemidir. Yaklaşık 20 dk. süren tüy giderme işlemi sonunda

kot kumaşında parlak, temiz ve pürüzsüz bir yüzey elde edilir. Yüzeyi temizlenen ürünün renklerinde canlılık, dokusunda yumuşaklık ve efekt meydana gelir. Haşıl malzemeleri; boyanan denim ipliklerinin dokunması sırasında, yüksek hız ve sürtünme nedeniyle oluşabilecek iplik kopmalarına ve toz oluşumlarına karşı, kayganlık ve sağlamlık vermesi için ipliklere sürülen selülaz, nişasta türevleri, karboksi metil selüloz ve polivinil alkol gibi maddelerdir. Sentetik haşıllar, su ile yıkandığında ürünün üzerinden kolayca uzaklaşabilirken, nişasta bazlı doğal haşıllar suda çözünemediklerinden, parçalanması ve iplikten uzaklaştırılması güçtür. Bu nedenle bu haşılların kumaştan etkili bir biçimde sökülmesi için genelde alfa amilaz enzimleri kullanılmaktadır. Kullanılan enzimlerden amilaz nişastayı, selülaz pamuktaki selülozu, lakkaz ise indigo boyayı parçalama etkisine sahiptir (Çetinaslan ve ark., 2013; Toksöz ve Mezarcıöz, 2013). Lakkaz enzimleri, selülozik bir lif olan pamuğun yüzeyindeki yağ, mum, pektin, protein, pigment gibi organik maddeleri uzaklaştırma, haşılı parçalayabilme, denim yüzeyindeki indigo boya moleküllerini ayrıştırabilme, fenolik hem de fenolik olmayan lignin esaslı bileşenleri yükseltgeyebilme yeteneği sayesinde tekstil endüstrisinde önemli bir yere sahiptir. Ayrıca bu enzimler lif yüzeyini aşındırıcı etkiye sahip olduklarından, taş yıkama görüntüsünü elde etmek için ponza taşlarının görevini kısmen görmektedirler, bu sayede indigo boyalı denim giysileri daha açık tonlara ağartabilme etkisine de sahiptirler (Arık ve ark., 2008) (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Denimin amilaz/selülaz /lakkaz enzim karışımı ile biyoyıkaması (Shahid ve ark., 2016)

Yumuşatma: Kumaşı yumuşak, kaygan, buruşmaz hale getirmek ve dikiş kolaylığı sağlamak için silikon yağı, payet gibi maddelerin kullanılmasıdır.

Ürüne istenilen renk ve nüansta sararmış veya kirli görünüm kazandırmak amacıyla, tüm yıkama işlemlerinden sonra ek boyama işlemi olan **Tint (kirli) boyama** yapılabilir. Tint boyama, boyanmış üründe normal boya prosesinin kısalmasını sağlamaktadır.

Her bir tekstil yıkama aşamaları sonrası oluşacak atık sular, hangi yıkama işlemine tabi tutulacaksa, yıkama esnasında kullanılan kimyasalların çeşidine göre farklı karakterler kazanmaktadır. Yukarıda anlatılan yıkama aşamaları sonucunda denim atık suyunda fosfatlı deterjanlar, yumuşatıcı maddeler, naftalin sülfonatlar, anyonik yüksek polimerler, boyalar (indigo, reaktif v.b), NaClO, KMnO₄, H₂O₂, NaHSO₃ gibi kimyasallarının bulunduğu muhtemeldir. Tüm yıkama işlemlerinden sonra çıkışına izin verilen, yüksek oranda boya ve çeşitli kimyasal maddeler içeren bu atık sular, çevreye ve biyotik elemanlara zararlı olabilmektedir. Görüldüğü gibi su kaynaklarını tehdit eden en büyük tehlikelerden biri kabul edilen tekstil sanayi üretim sürecinde, ıslak işlemler için çeşitli kimyasallar ve üretilen tekstil ürünlerini durulamak için büyük miktarlarda su kullanılmaktadır. Öyle ki; 1 kg tekstil (kumaş) üretmek için yaklaşık 80-150 m³ su tüketilmektedir. Günde yaklaşık 12-20 ton tekstilin işlenmesinden sonra, çıkmasına izin verilen atık suyunun yaklaşık 1000-3000 m³ olduğu tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, tüketilen ve serbest kalan net su miktarı, boyama işlemi ve üretilen kumaşların tipine bağlı olarak değişmektedir. Tekstil atıksularının toksisite veya zararlılık seviyeleri, endüstriler arasında değişiklik göstermektedir. Boyama işlemi esnasında, boyaların ancak çok az bir kısmı üzerine uygulandığı kumaşlara sabitlenebilir. Boyamada kullanılan boyaların büyük bir bölümü kumaş üzerine kalıcı tutunamadığından, bahsedildiği gibi, yıkamalar sırasında kumaştan hızla uzaklaştırılmaktadır. Tekstil endüstrisinde gerçekleştirilen çeşitli işlemler sonunda sıvı atıkların yanı sıra aynı zamanda büyük miktarlarda katı ve gaz atıklar da üretilebilmektedir. Tekstil üretiminde gerçekleştirilen boyama ve terbiye gibi ıslak işlemler küçük, kuru işlemler ise büyük miktarlarda katı atık oluşumuna neden olmaktadır. Büyük kısmı, kumaş ve ambalaj malzemeleri parçalarından kaynaklanan katı atıklar, kuru çamur oluşumuna da katkıda bulunabilmektedir. Bu katı atıklar, atıksudan uygun şekilde uzaklaştırılmadığı takdirde, deşarj edildiği sularda çökeltiler oluşturarak su canlıları için olumsuz etkilere yol açabilmektedir. Tekstil endüstrisinde gaz emisyonları üreten kazanlar (kükürt oksitleri ve nitrojeni oluşturur), fırınlar ve depolama tankları, hava kirliliğinin en önemli üç tekstil kaynağını oluşturmaktadır. Yüksek sıcaklıkta yapılan tekstil kurutma işlemleri hidrokarbonlar yayar. Isı çöktürme işlemi sırasında elyaf hazırlığı kalıntılarında kirletici maddeler yayılır. Boyama işlemi sırasında kullanılan

kimyasallardan da gazlar salınabilmektedir (Kiriakidou ve ark., 1999; Atif, 2002; Georgiou ve ark., 2003; Sunny, 2003; Ntuli ve ark., 2009; Kiron, 2012).

Tekstil üretimi sırasında oluşan sıvı haldeki TAS; küçük işletmelerde arıtılmadan, büyük ölçekli fabrikalarda ise yetersiz arıtılarak alıcı ortam olan kanalizasyona verilmektedir. Gerekli çevresel denetimlerin yapılmadığı ya da yetersiz yapıldığı ülkemizde, atık su arıtım tesislerinin kaliteli arıtım sağlayamamaları nedeniyle, içerisinde çok sayıda karsinojenik ve mutajenik kimyasal maddeler ihtiva eden kot ve diğer tekstil yıkama atık sularının denizlere deşarj edilmesi sonucunda, sucul ekosistemde yaşayan akuatik organizmaların, bu organizmalarla beslenen içinde insanların da yer aldığı çok sayıda tüketici canlıının ve canlılığın devamı için gerekli olan suyun geleceği tehlike altına girmektedir. Bu nedenle yürürlüğe girdiği 2004 yılından itibaren uygulanan Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği'nde belirtilen deşarj standartlarına uyulmak kaydıyla, TAS, tekstil fabrikaları tarafından alıcı su ortamlarına verilebilmektedir. Tekstil endüstrisinden kaynaklanan kirlilikten çevre ve insan sağlığını dünya çapında korumak için çok sayıda çevre koruma kuruluşları tarafından, birtakım kurallar koyulmuştur. Bu kuruluşlar atıkların çevreye verilmesine belirli deşarj sınırları koyarken, yapılacak bertaraf limitleri de ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Deşarj kontrollerinin sağlanması, sucul ortamın güvenliği ve sağlığının korunması açısından gereklidir (Yusuff ve Sonibare, 2004). Ülkemizde bu amaçla uygulanan Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği'ne göre; tekstil sanayisi, atık sularını alıcı ortama deşarj ederken, bazı parametrelerin belli sınır değerlerinde yer almasına dikkat etmek zorundadır. TAS tasfiye standartları; kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ), askıda katı madde (AKM), amonyum azotu ($\text{NH}_4\text{-N}$), serbest klor (Cl^-), toplam krom (Cr), sülfür (S^{-2}), sülfat (SO_4^{-2}), yağ ve gres, balık biyodenyi (ZSF: Zehirlilik Seyreltme Faktörü), pH ve ancak 2011'de yürürlüğe girmiş olan renk parametrelerini kapsamaktadır (Tablo 1.1).

Tablo 1.1. Tekstil sanayi (Pamuklu tekstil ve benzerleri) atık sularının alıcı ortama deşarj standartları (Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği, 2004)

Parametre	Birim	Kompozit numune	
		2 saatlik	24 saatlik
Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ)	mg/L	250	200
Askıda Katı Madde (AKM)	mg/L	160	120
Amonyum Azotu (NH ₄ -N)	mg/L	5	-
Serbest Klor (Cl ⁻)	mg/L	0.3	-
Toplam Krom (Cr)	mg/L	2	1
Sülfür (S ⁻²)	mg/L	0.1	-
Sülfid (SO ₃ ⁻²)	mg/L	1	-
Yağ ve Gres	mg/L	10	-
Balık Biyodeneyi (ZSF)	-	4	3
pH	-	6-9	6-9
Renk	Pt-Co	280	260

(Ek satır: RG-24.4.2011-27914)

Bazı tekstil sanayi kuruluşları, atık sularını alıcı ortama deşarj etmeden önce yukarıda verilen ölçümler yerine aşığıdaki limit değerleri esas alırlar (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. Karışık endüstriyel atıksuların (Kompozit numune için) alıcı ortama deşarj standartları (Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği, 2004)

Parametre	Birim	Limit Değer	
		(2 saatlik)	(4 saatlik)
pH (25°C)	-	6-9	6-9
Toplam Siyanür (CN ⁻)	mg/L	1	0,5
KOİ	mg O ₂ /L	400	300
Yağ ve Gres	mg/L	20	10
Askıda Katı Madde (AKM)	mg/L	200	100
Toplam Fosfor (P)	mg/L	2	1
Florür (F ⁻)	mg/L	15	-
Balık Biyodeneği (ZSF)	-	10	10
Krom (Cr ⁺⁶)	mg/L	0,5	0,5
Bakır (Cu)	mg/L	3	-
Civa (Hg)	mg/L	-	0,05
Çinko (Zn)	mg/L	5	-
Demir (Fe)	mg/L	10	-
Kadmiyum (Cd)	mg/L	0.1	-
Toplam Krom (Cr)	mg/L	2	1
Kurşun (Pb)	mg/L	2	1

Tekstil yıkama işletmeleri belirli arıtma basamaklarına tabi tutulan atıksularını yukarıdaki tabloda verilen parametrik koşulların sağlanması şartıyla kanalizasyon şebekesine bırakabilirler. Bu durum 31.12.2004 tarihli, 25687 sayılı Resmi Gazete’de yayınlanan Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliğinde şöyle açıklanmıştır: 25. Madde’nin (e) bendine göre; ‘Bir endüstriyel atıksuyun kanalizasyon sistemine doğrudan bağlanabilmesi için biyolojik arıtma tesisinde arıtılmayacak maddeler içermemesi gerekmektedir’. 26. Maddenin (a) bendine göre; ‘Atıksu altyapı tesisi bulunan yörelerde endüstri kuruluşları kanalizasyon sistemine bağlantı esaslarına uyulmak şartıyla, atıksularını kentsel kanalizasyon sistemine deşarj edebilir. Kent dışında kalan ve doğrudan alıcı ortama deşarj yapan atık su kaynakları için

münferit veya ortak arıtma tesisleri yapılarak bunların atık sularının arıtılması gereklidir.’ Aynı yönetmelikte yer alan 48. Madde’ye göre; ‘Atık sularının özellikleri nedeni ile atık su altyapı tesisine doğrudan bağlantıları, atık su altyapı tesisleri yönetimleri tarafından uygun görülmeyen endüstriler; kuruluş, işletme, bakım, kontrol ve belgeleme harcamaları kendilerine ait olmak üzere, bu yönetmelikte tanımı yapılmış olan bir ön arıtma sistemini kurmak ve işletmek yükümlülüğündedir’.

İSKİ tarafından çalışmaları denetlenen tekstil işletmelerinin atıksularını uygunsuz bir biçimde deşarj etme durumlarının tespiti halinde, gereken resmi prosedür uygulanır. Bu durum şu şekilde açıklanmıştır: 50. Maddeye göre; ‘Bağlantı ile ilgili kısıtlamalar ve bununla ilgili yasaklara ilişkin belirlenen maddelerdeki hükümlerin aksine, bağlantısı yasaklanan atık sular veya maddeler atık su sistemine boşaltılıyorsa veya atık su bağlantı kalite kontrol izin belgesinde öngörülen sınır değerler aşıyorsa ya da ön arıtmasız olarak atık su altyapı sistemine veriliyorsa, bu davranışları gerçekleştiren gerçek ve tüzel kişiler hakkında ilgili idare kendi mevzuatı çerçevesinde gerekli işlemleri yapar. Atık su alt yapı sistemi sonunda alıcı ortamda kirliliğin tespit edilmesi hâlinde 2872 sayılı Çevre Kanunu çerçevesinde ilgili atık su altyapı yönetimine gerekli işlem uygulanır’ (Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği, 2004).

Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği ve bu yönetmeliğin denetimini yapan İSKİ prosedürlerine göre, endüstri atıksularının izlenmesi için kullanılan parametreler aşağıda açıklanmıştır.

Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ): KOİ, sudaki organik maddelerin kimyasal yolla oksitlenmesi için gereken oksijen miktarıdır. Oksidasyon sonucu karbonlu organik maddeler karbondioksit ve suya, azotlu organikler ise amonyak (NH_3) haline dönüşmektedir. KOİ testi için, atık su numunesinde bulunan organik maddeler asidik şartlarda, potasyum bikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) gibi kuvvetli bir yükseltgeyicinin ve gümüş sülfat (Ag_2SO_4) isimli bir katalizörün yardımıyla okside edilir. 2-3 saat gibi kısa bir sürede sonuçlanan KOİ, biyolojik olarak bozunabilen ve bozunamayan organik madde arasında bir ayrım yapamamaktadır. Kimyasal olarak oksitlenebilecek bileşikler, biyolojik olarak oksitlenebileceklerden daha fazla olduğundan bir atık maddenin KOİ’si, BOİ’sinden genel olarak daha büyüktür. Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı (BOİ); suda bulunan mikroorganizmaların atık sudaki organik maddeleri parçalaması için ihtiyaç duyduğu oksijen miktarına denmektedir. BOİ miktarının yüksek olması, organik karbon miktarının fazla olması ile eşdeğerdir, bu da sudaki kirliliğin bir göstergesidir. TAS’da bulunan organik bileşikler, bozunma sırasında mikroorganizmaların var

olan oksijeni tüketmesine neden olduğu için sudaki oksijen oranının düşmesine diğer bir deyişle BOİ'nin yükselmesine sebep olurlar. Karbonlu bileşikler karbondioksit'e çevrilirken, azotlu bileşikler nitrata dönüşmekte ve bu yıkım sırasında BOİ azalması hızlanmaktadır. TAS'da BOİ genelde yüksektir. BOİ ölçümü en az 5 günde sonuçlandırıldığı için bu parametre çoğu kez BOİ₅ olarak isimlendirilmektedir. BOİ; kentsel ve endüstriyel atıksuların alıcı ortama verilmeden önceki kirlilik durumunu ve deşarj limitlerine uygunluğunu belirlemek ve biyolojik arıtma sistemlerinin performansını ölçmek için tercih edilen önemli bir parametredir. Bu parametre, 'içinde toksik maddeler bulunmayan' sanayi atıksularının fizikokimyasal analizinde önem taşımaktadır. Yani BOİ, atıksuda bulunan toplam organik bileşiklerin yalnızca mikroorganizmalar tarafından parçalanabilir organik madde miktarını belirlemeye fırsat vermektedir. Öte yandan TAS, mikroorganizmalar tarafından biyolojik oksidasyon yoluyla parçalanması zor, toksik organik bileşikleri içermektedir ve BOİ bu atıksuların organik madde ölçümünde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle BOİ yerine, mikroorganizmaların parçalamada etkisiz kaldığı zararlı organik maddeleri ayrıştırabilmek için kimyasal oksidasyon yöntemine dayanan KOİ parametresine ihtiyaç duyulmaktadır.

Askıda Katı Madde (AKM): Suda çözülmüş halde bulunmayan bu maddeler dipte birikmeye ve bulanıklığa yol açar, balıkların solunum yollarını tahriş eder. Metalik yapıda olanları balıklara zararlı etkinin yanı sıra, bazı durumlarda öldürücü olabilmektedir (Göknil ve ark., 1984).

Amonyum Azotu (NH₄⁺-N): Azot suda ya organik (R-NH₂) ya da inorganik azot (NH₃, NH₄, NO₂, NO₃ ve NO_{2(g)}) formunda yer alır. Düşük pH'nın gözlemlendiği asidik koşullarda, balık metabolizmasının bir yıkım ürünü olan amonyak (NH₃) azotu, suda amonyum (NH₄⁺) iyonlarına hızla dönüşebilmektedir (NH₃ + H₂O ⇌ NH₄⁺ + OH⁻). Amonyak, nitrit ve nitratta olduğu gibi alg ve yeşil bitkiler tarafından kullanılarak organik besin moleküllerine de dönüştürülebilmektedir. Toplam Kjeldahl azotu yani toplam azot, atıksudaki azot miktarının 'amonyak' olarak tayin edilmesiyle hesaplanır. Bu amaçla laboratuvar koşullarında sudaki organik azot oksitleyici maddeler yardımıyla amonyağa dönüştürülürken, nitrat önce amonyuma, sonrasında amonyum amonyağa dönüştürülür. Bunun yanında amonyum azotu kirlenmiş sularda ölçülen bir diğer azot formudur. Su içerisinde serbest amonyumun uzun süre kalması durumunda nitrifikasyon olayı yaşanabilir. Suda yaşayan aerobik ve nitrifikasyon bakterileri amonyumu ve nitriti kullanarak nitrata dönüştürebilir. Nitrit ve nitratın belirli dozların üzerinde oral yoldan alınması, insanlarda anemi, A vitamini eksikliği, kanser gibi rahatsızlıklara sebep olabilmektedir. Balıklarda boşaltım atıkları olarak suya verilen amonyak birikimi, çok düşük konsantrasyonda bile

balıklarda ciddi oranda strese neden olurken, balığı hastalıklara karşı savunmasız hale getirerek yaşam ömürlerinin kısalmasına neden olmaktadır. Balıklarda yüksek amonyak birikimi toksik olmanın yanı sıra ölümcül sonuçlar da doğurabilmektedir. 0,53-22,8 mg/L arasında değişen NH₃ konsantrasyonunun tatlı su organizmaları için toksik olduğu rapor edilmiştir. Tatlı sularla karşılaştırıldığında, tuzlu sularda daha toksik olduğu tespit edilen amonyağın, sıcaklık ve pH değişiminden etkilendiği bilinmektedir. Amonyanın toksisite seviyeleri pH ve sıcaklığa bağlı olarak değişme gösterir, yani pH ve sıcaklık arttıkça azot toksisitesi artmaktadır. Diğer yandan pH'nın yükselmesi, amonyak azotunun iyonize haldeki amonyuma dönüşmesini inhibe eder, sudaki azot toksisitesinde artış gözlenir. Bitkiler hayvanlara göre, omurgasızlar ise balıklara göre amonyağa daha fazla tolerans göstermektedir. Önerilen sınır değerleri aşan NH₃ seviyeleri sucul yaşama zarar verebilir. NH₃ toksisitesinin balık üretme çiftliklerinde açıklanamayan kayıpların başlıca nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir. NH₃'ın toksik konsantrasyonu; balıkların kuluçka süresini azaltabilir, onların büyüme hızını düşürerek morfolojik gelişmelerinde aksamalar yaratabilir. Aşırı NH₃'ın organizmada birikmesi; vücut pH'sında artışlar yaparak, metabolizmada değişikliklere neden olabilir. Balıkta denge kaybı, hipertansiyon, kalp hızında artış, solunum aktivitesinde ve oksijen alımında yükselme ve nefes darlığı görülebilir. Aşırı NH₃ düzeyine sahip balıkta; konvülsiyon (vücuttaki kaslarda anormal kasılma), koma ve ölümlerle karşılaşılabilir. 0,1 mg/L konsantrasyonda ve kısa süreli mazuriyette bile deri, göz ve solungaçta hasarlar meydana gelebilir. Solungaç dokusunda hiperplazi (hücre sayısının artışı nedeniyle bir organ ya da dokunun büyüklüğündeki artış) ile birlikte filamentlerde şişmeler ve yaralar oluşabilir, karaciğer ve böbrek dokularında yaralanmalar ve hasarlar meydana gelebilir. Farklı balık türleri farklı düzeylerde NH₃ tolerans edebilse de, NH₃'a hiç maruz kalmamak en iyisidir. NH₃'e en hassas balığın alabalık, en az duyarlı olanın sazan olduğu görülmüştür (Oram B., 2014).

Serbest klor (Cl⁻): Klorla yapılan dezenfeksiyon işlemi sonrası suda kalan ve HOCl, OCl⁻ ve Cl₂ gibi bileşiklerden oluşan bağımsız klor miktarına 'serbest klor' denir. Denim yıkama proseslerinden biri olan buz yıkama aşaması sonunda TAS içerisinde serbest klor içeren NaClO kimyasalı geçmektedir. Serbest klor sudaki amonyak ile reaksiyona girerek, balıklar üzerinde öldürücü etkilere sahip ve kanserojenliği ile bilinen 'kloraminleri' meydana getirebilir. Kloraminleri oluşturma riski dikkate alındığında, deşarj edilecek atıksuyun serbest klor miktarı önem taşımaktadır.

Krom (Cr): Doğada yaygın şekilde bulunan bir element olmasına karşın, doğal sularda çok nadir bulunabilir. Bulunan konsantrasyonlar da 1 µg/L'nin altında olmaktadır.

Krom, tuzlarında çeşitli değerlikte bulunabilir. Bunlardan en çok rastlanılanları Cr^{+3} ve Cr^{+6} tuzlarıdır. Krom su yaşamına zararlıdır. Krom tuzlarının zehirli etkisi, pH ve kromun değeri ile değişmektedir. Kromun zehirliliğinin çözülmüş oksijen ve ortamdaki organik madde konsantrasyonu ile ilgili olduğu da öne sürülmektedir. Kromun fotosentez üzerinde etkili olduğu ve fitoplanktonlar ile su bitkilerine zararlı etki yaptığı bilinmektedir. Ayrıca kromun besin zincirine girerek diğer su canlılarında biyolojik olarak biriktiği saptanmıştır. Krom için verilen kalite kriterleri su yaşamı için 0,1 mg/L, içme suyu için 0,05 mg/L dir (Göknil ve ark., 1984). Krom (Cr^{+6}) bileşiklerinin insanda akciğer kanseri ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Bir toksik endüstriyel kirletici olan krom ağır metal zehirlenmesi yapabilen, kanserojen, mutajenik ve teratojenik özelliklere sahip metal olarak sınıflandırılır. Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı'nın (IARC) yapmış olduğu araştırmalara göre, kromun hayvanlar için kanserojen olduğunu tespit etmiştir. Krom, boyama prosesinde hem boya hem de katalizör olarak kullanılmaktadır. Kromlu bir bileşik olan potasyum bikromat, pamuk ve yün (protein lifler) endüstrisinde boyama işlemlerinde tercih edilmektedir. Kromat içeren boyalar ile boyanmış tekstil ürünlerinin insanda dermatite, cilt döküntüsüne ve alerjik reaksiyonlara yol açtığı ileri sürülmektedir. Kroma maruz kalınması, sucul ekosistemlerdeki canlı yaşamı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Sudaki krom toksisitesi, biyotik (canlının türü, yaşı, gelişim aşaması) ve abiyotik (krom konsantrasyonu, kromun oksitlenme durumu, pH, alkalinite, tuzluluk, suyun sertliği) faktörler tarafından etkilenmektedir. Kroma maruz kalan balıkta fizyolojik, histolojik, biyokimyasal, enzimatik ve sitotoksik ve genotoksik anormallikler oluşmaktadır. Biyolojik parçalanamayan ve biyobirikme özelliğine sahip olan krom balıkta çok düşük konsantrasyonda bile zararlı kümülatif etkiler gösterebilmektedir. Balıkta artan krom miktarı, lenfosit ve lökosit sayısında azalmaya, solungaç, kas ve karaciğer dokularındaki glikojen, lipid ve protein düzeylerinde azalmalara sebep vermektedir. 2-200 $\mu\text{mol/L}$ Cr^{+6} 'nın sazan balığının bağışıklık hücrelerinin (lenfosit ve nötrofil) şekli üzerinde değişiklikler, metale bağlı sitotoksikite, lenfosit kaynaklı mitojen aktivasyonunda azalma yaptığı bildirilmiştir. Krom artışının balıklarda ülsere, bağışıklık sisteminin zayıflamasına, böbrek ve karaciğer hasarına ayrıca ölüme neden olduğu bildirilmiştir. Kromatlı bileşiklerden sodyum kromat (Na_2CrO_4) sitotoksik bir madde olup, kromozomal anormalliklerini uyaran kromatid lezyonlarına neden olmaktadır (Steinhagen ve ark., 2004; Velma ve ark., 2009).

Sülfür (S^{2-}): Çözülmüş sülfür tuzları, suyun pH'ını düşürür. Sülfürlü çözeltilerin balıklara olan toksisite etkisi, pH değeri düştükçe artar. Sülfürler suda bulunan çözülmüş oksijen ile kimyasal reaksiyona girerek suyun oksijen seviyesini düşürür. Demir veya diğer

metallerle reaksiyona girerek siyah bir çökeleğe, koku problemine sebep olur ve sudaki yaşama toksik etki yaparlar (Göknil ve ark., 1984).

Sülfid (SO_3^{2-}): Sülfid içeren atıksular balık ve diğer sucul canlılarda hızlı oksijen tüketimine yol açarak toksik etki yapar. NaClO ile yapılan ağartma sonrasında NaHSO_3 ile nötralizasyon işlemi yapıldığı bilinmektedir. Bu nedenle buz yıkama aşamasında TAS içine sülfid bileşikleri girmektedir.

Yağ ve gres: Serbest ve emülsiyon halinde bulunabilen bu maddeler, su üstünde bir film tabakası oluşturur. Işık ve oksijen transferi olumsuz etkilenir. Balıkların solunum yollarını tıkayarak zehir etkisi yapar. Dibe çöktüğünde dipteki canlı hayatını özellikle de balık yumurtalarını tahrip eder. Koku oluşumu da görülür (Göknil ve ark., 1984).

Balık biyodeneyi (ZSF): Balıkların 48 saatlik bir süre içinde yaşamasını sağlayan en düşük atıksu seyreltme hacmine 'zehirlilik seyreltme faktörü' denilmektedir. ZSF'nin pamuklu TAS için öngördüğü değer '4' karışık endüstriyel atıksular için ise '10' olarak belirlenmiştir. ZSF: 4 değeri, balıkların hiçbirinin ölmemesi için 1 hacim atıksuyun 3 hacim su ile seyreltilmesi gerektiği anlamına gelmektedir. Yani ZSF, kullanılan birim atıksu hacmine göre bağıl seyreltme suyu hacimlerinin toplamı olarak ifade edilmektedir.

pH: Sudaki asitliğin veya bazikliğin bir ölçüsü olan pH, su hayatında da önemli bir parametredir. Düşük pH'ya sahip sular korozyona sebep olur. pH'nın 5-9,5 arasında öldürücü etkisi olmamasına karşın, organizmaların üretkenlikleri üzerine etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca ani pH değişimleri zararlı etkilere ve balık ölümlerine yol açabilir, birçok maddenin de zehirlilik derecesini etkiler (Göknil ve ark., 1984).

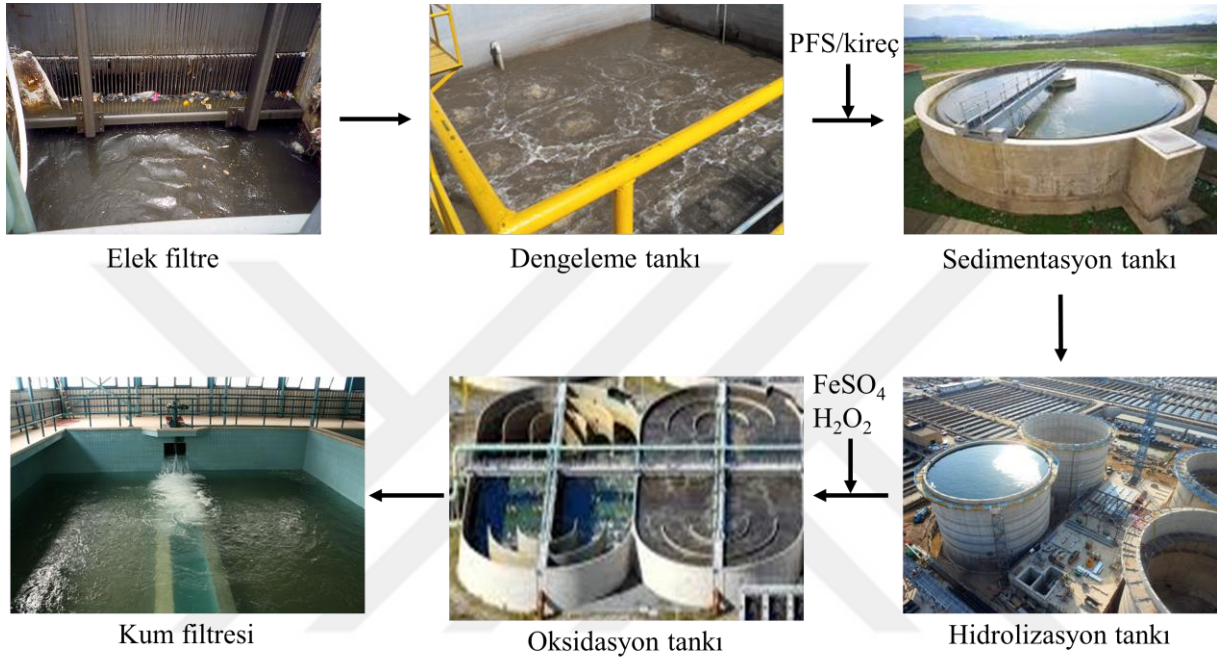
Renk: Kullandığı boyar maddeler ve kimyasallar nedeniyle renk bakımından zengin karaktere sahip TAS estetik ve sağlık açısından ciddi problemler yaratmaktadır. Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği'ne geç de olsa 2011 yılında yürürlüğe girebilmiş renk parametresinin belli bir sınırdan olmasına dikkat eden işletmeler, atıksudaki rengin etkili bir şekilde giderilmesi için gerekli arıtma önlemlerini almakla yükümlüdürler. Renk standart skalası platin/kobalt oranı ile ifade edilerek, 0-500 arasında bir değer alır. Distile suyun Pt/Co birimiyle ifade edilen rengi sıfır olduğu için, saf suyun rengi 'beyaz' kabul edilir. Atıksuyun renk ölçümünde, belli derişimlerde hazırlanan potasyum heksakloroplatinat (K_2PtCl_6) ve kobalt klorür (CoCl_2) çözelti karışımları, standart (500 birim renk) olarak kabul edilir. Hazırlanan standart stok çözeltiden belli miktarlarda hacimler alınarak distile su ile seyreltilir. Atıksuyun rengi, standart renk serileri ile görsel olarak karşılaştırılır ve eşleştiği renk birimine sahip olduğu kabul edilir.

Boya ve pigmentlerin küresel üretimi 7×10^5 ton/yıl'dır ve bunun yaklaşık 2/3'si sadece tekstil endüstrisinde tüketilmektedir. Tekstil fabrikaları piyasada mevcut yaklaşık 3000 farklı boya kullanır. Kullanılan boyar maddeler; polisiklik ve trifenil metan grubu akridin, antrakinon, diarilmetan, triarilmetan, azo, oksazon, tiazin, tiazol, ve flor gibi organik bileşikler içerir. Boyama ve baskı da dâhil olmak üzere, tekstil imalatının çeşitli süreçlerinde 8000'den fazla kimyasal madde kullanılmaktadır. Günde yaklaşık 8000 kg kumaş üretimine sahip olan ortalama büyüklükte bir tekstil fabrikasının günlük su tüketimi yaklaşık 1,6 milyon L'dir. Bunun % 16'sı boyamada ve % 8'i baskıda tüketilmektedir. Boyama için spesifik su tüketimi, kullanılan boya tipine bağlı olarak, kumaşın kg'ı başına 30-50 L arasında değişmektedir. Tekstil boyama ünitelerindeki boyaların % 10-15'inin boyama işlemi sırasında kullanılan su ile birlikte atık su içinde kaybolduğu tahmin edilmektedir. Atık su arıtma işlemleri atık sudan gelen bu boyları kaldırmak için etkili değildir, kumaşa tutunamayan boyalar atıksudaki diğer kimyasal maddelerle birlikte sucul sistemlerin içine deşarj edilmektedir (Nigam ve ark.,1996; Wasif ve Kone, 1996; Mall ve Upadhyay, 1998; Rajaguru ve ark., 1999; Vijayraghavan, 1999; Robinson ve ark., 2001; Puvaneswari ve ark., 2006; Balter, 2009; Kant, 2012).

Tekstil endüstrisi; kimyasal ya da biyolojik arıtımı kolay olmayan, farkedilir miktarlarda organik ve inorganik bileşikler içeren, mikrobiyal yabancı maddeler de ihtiva eden büyük hacimli ve kirli atıklar üretir. TAS; sadece yüksek konsantrasyonda boya içermekle kalmamakta, aynı zamanda çeşitli proses aşamalarında kullanılan birtakım kimyasalları da içermektedir. Tekstil atığındaki önemli kirleticiler bozunması zor organik maddeler, renk oluşumundan sorumlu boya molekülleri, emilebilir organik halojenler, ağır metaller, toksik maddeler ve inhibitör bileşikler, yüzey aktif maddeler, klorlanmış bileşikler ve tuzlardır. TAS'ın biyolojik olarak parçalanamamış olması; genel olarak karmaşık yapıları organik bileşikler olan boya maddeleri, yüzey aktif maddeler ve yüksek katkı madde içeriğinden kaynaklanmaktadır. Biyolojik ayrışamayan ve kanserojen karakterde olabilen, kimyasal madde ve boyalar bakımından oldukça zengin olan TAS, doğru arıtılmadığı takdirde sağlığa ve çevreye büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Jean üreten fabrikalardan gelen kot boyama ve yıkama atıksuları; güçlü renk, büyük miktarda AKM, çözülmüş tuzlar, son derece değişken pH ve yüksek KOİ konsantrasyonu sergiler en önemlisi de biyobozunurluğu zayıf olarak karakterize edilmektedir (Kdasi ve ark., 2004; Xu ve ark., 2004; Nese ve ark., 2007; Eswaramoorthi ve ark., 2008; Moustafa, 2008; Wang ve ark., 2008; Laxman, 2009; Dyes and Pigments, 2010; Ghaly ve ark., 2014).

Atık suların arıtımında çeşitli türde arıtma prosesleri kullanılmaktadır. Arıtımda kullanılan prosesler atıksuyun doğuracağı zararları ortadan kaldırmada yetersiz olurken, arıtılmamış atıksuyun meydana getireceği zararların büyüklüğünden ise söz edilememektedir. Kot yıkama atıksuların arıtımında genel olarak şu yol izlenmektedir. TAS ilk önce lif, iplik, kumaş parçaları, tiftik ponza taşı gibi büyük parçalı maddelerin ve süspanse katıların azaltılması ve atıksudan uzaklaştırılması için, 2,0 mm ve 0,5 mm açıklığındaki elek filtrelerden geçirilir. Elekten geçirilen atık su, bir dengeleme havuzunda homojenleştirilir. Elekten geçirilen ve dengeleme tankından gelen atıksu, sulu fazdan katı parçacıkların ayrılması ve asılı partiküllerin çıkarılması için eğimli sedimentasyon (çökeltme, çöktürme) havuzuna alınır. Burada koagülasyon (pıhtılaştırma) işlemi için atıksuya polimerik demir sülfat (FeSO_4), polimerik alüminyum sülfat, hidratlanmış demir sülfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) kireç ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), alüm ve demir klorid gibi koagülant (pıhtılaştırıcı) maddeler kullanılır. Bunlardan en yüksek KOİ/reng giderme verimliliği ve en az koagülant tüketimi sağlayan dolayısıyla da en sık kullanılan pıhtılaştırıcı demir sülfattır. Atıksuya eklenen bu kimyasallar, sudaki kolloidal parçacıkların yüzeylerinde taşıdıkları yükleri değiştirerek, onların bir araya gelmesine neden olur, atıksuda çözünemeyen katıların pıhtılaşmasını sağlayarak bunların çöktürülmesine öncülük eder. Küçük parçacıkların bir araya gelip, daha ağır partikülleri oluşturması için, atıksu çarklar yardımıyla yavaş karıştırılır. Bu fiziksel işleme ‘mekanik flokülasyon (yumaklaştırma)’ denir. Çökmüş partiküller çamur olarak çöktükten sonra toplanarak atıksudan uzaklaştırılır. Yüzer parçacıklar da mekanik sıyırma sistemleri ile uzaklaştırılır. Askıda olmayan çözünmüş katı maddeler (ÇKM) bu aşamada uzaklaştırılmamaktadır. Atıksuyun pH değerini $9,0 \pm 0,5$ aralığında düzenlemek ve sabit tutmak için 20 g/L yoğunluğundaki kireç kullanılır. Sedimentasyon tankından gelen atıksular hidrolizasyon-asidifikasyon tankına alınır. Tankın içindeki dolgu maddeleri üzerinde biyofilm tabakası oluşturan anaerobik bakteriler organik maddeleri O_2 'siz koşulda parçalayarak CH_4 ve CO_2 'e indirger, böylece AKM ve çamur oluşumunu azaltırlar. Bu havuzun içine eklenen bir miktar çamur sayesinde mikroorganizmalar ve bunların üremesi için gerekli N, P besinleri ortama katılmış olur. Mikroorganizmalar atıksudaki boyarmadde moleküllerinin kromoforik gruplarını kolayca yıkabildiğinden, renk etkili bir biçimde kaldırılabilir ve biyobozunması zor kirleticiler atıksudan uzaklaştırılabilir. Atıksuyun pH değerini düşürülmesiyle de, fenton oksidasyonunda kullanılacak fenton reaktif dozu azaltılmış olur. Hidrolizasyon/asidifikasyon tankından gelen atıksular tankın dibine kurulan kanallar ile oksidasyon tankına alınır. Burada OH radikallerini üretmek dolayısıyla ayrışması güç organik maddeleri aerobik ortamda CO_2 ve H_2O 'ya parçalayarak ve çamur giderimini sağlamak için düşük pH'da, (2-4) fenton

reaktifleri ($H_2O_2 + FeSO_4$) kullanılır. Oksidasyon tankından gelen atıksu, son olarak kuvars kum ile doldurulmuş kum filtrelerden süzülür. Kot yıkama atıksuyu arıtma tesisinde uygulanan ve yukarıda bahsedilen bu proseslere ait diyagram Şekil 1.11’de gösterilmiştir (Das, 2000; EPA, 2003; Georgiou ve ark., 2003; Meric ve ark., 2004; Yang ve ark., 2004; Chen ve ark., 2005; Perez ve ark., 2005; Tripathy ve De, 2006; Xing ve ark., 2006; Babu ve ark., 2007; Eswaramoorthi ve ark., 2008; Wang ve ark., 2008).



Şekil 1.11. Kot yıkama atıksuyu arıtma tesisinde uygulanan prosesler (SASKİ, 2011; Bregman, 2013; RizeSu Yap-İş, 2015; Crom, 2016; Eckhardt, 2016; Vaidya, 2016)

Tekstil boyama ve yıkama atık sularının arıtılmasında kullanılan ve yüksek maliyet gerektiren tasfiye metotları, atık su kalitesini istenilen noktaya taşıyamamakta, uygulanan fiziksel, kimyasal ve biyolojik tasfiye işlemleri bu anlamda yetersiz kalmaktadır. Bozunmaya dirençli olan çeşitli boyaların mikroorganizmalara karşı gösterdiği toksik tutum, bu boyaların aerobik ve biyolojik arıtılmasını zorlaştırmaktadır. Ozon veya fenton oksidasyonu ile yapılan kimyasal yükseltgenme reaksiyonları büyük ilgi çekmektedir, ancak bunların maliyetleri ham TAS’ın arıtılması için yüksektir. İleri arıtma yöntemleri, TAS tarafından oluşturulan potansiyel risklerin bertaraf edilmesi açısından ve ekosistemler ve insan sağlığı yönünden gereklidir. Gelişmiş oksidasyon prosesleri (AOP); serbest hidroksil radikalleri ($\bullet OH$) oluşturmak için farklı oksidanların (H_2O_2 , UV, TiO_2 , O_3 , fenton, foto-fenton) farklı kombinasyonlar altında kullanılmasına dayalı bir yöntemdir. Genelde H_2O_2 , H_2O_2 -UV veya TiO_2 -UV kullanılarak gerçekleştirilebilen bu yöntemde üretilen yüksek oksidasyon gücüne sahip $\bullet OH$ ’ler sayesinde, atıksuda bulunan ve geleneksel oksidasyon işlemleri altında

parçalanamayan karmaşık yapıları kirletici organik maddeler etkili ve hızlı bir şekilde inorganik maddelere yıkılır. KOİ giderimi biyolojik arıtılan atıksularda yalnızca % 30-45 iken, bu oran AOP işlemi ile arıtılan atıksularda % 70-80 olarak tespit edilmiştir. Bu teknolojiye çok düşük miktarlarda atık ve çamur üretimi sağlanır ve TAS'daki katı organik bileşenlerin neredeyse tümünün parçalanarak okside edilmesi gerçekleştirilebilir. Kısa ömürlü $\bullet\text{OH}$; renk oluşumundan sorumlu aromatik bileşiklerin uzaklaştırılmasında, rengin kısa sürede açılmasında, azo boyaların kromofor yapısının yok edilmesinde, toplam organik maddenin (TOK) çıkarılmasında, fenolik ve klorlanmış bileşikler ile klorofenoller kolayca uzaklaştırmada oldukça etkili maddelerdir. KOİ ve renk giderme etkinliği gözönüne alındığında, kullanılan oksidanların etkinlik sırası azdan çoğa doğru; $\text{O}_3 < \text{O}_3 - \text{UV}$, $\text{H}_2\text{O}_2 < \text{H}_2\text{O}_2 - \text{UV}$, $\text{O}_3 < \text{H}_2\text{O}_2 < \text{TiO}_2$ ve $\text{H}_2\text{O}_2 - \text{O}_3 < \text{H}_2\text{O}_2 - \text{UV} < \text{TiO}_2 - \text{UV}$ şeklinde sıralanabilmektedir. TAS'ın içinden elektrotlar kullanılarak elektrik akımının geçirilmesi işlemine dayanan elektrolitik çökeltmede, elektrokimyasal reaksiyonların bir sonucu olarak, ağır metal iyonlarının bir araya gelerek çözülmüş metal iyonları ile çökmesi ve daha sonra uzaklaştırılabilmesi mümkün hale gelmektedir (Arslan ve ark., 1999; Das, 2000; Munter, 2001; Alaton ve ark., 2002; Perkowski ve Kos, 2002; Pia ve ark., 2002; Rodriguez, 2003; Kdasi ve ark., 2004; Goi, 2005; Kestioglu ve ark., 2005; Montano, 2007; Stasinakis, 2008; Zhang ve ark., 2012; Karos, 2013; Wright, 2013).



Şekil 1.12. Tekstil atıksuların hidrojen peroksit ve ultraviyole ışın kombinasyonu ile arıtılması (Angel, 2016)

Azo boyalarının bozulmasıyla, fonksiyonel OH grupları ve aldehitler gibi yan ürünler oluşur. Oluşan bu yan ürünler, orijinal organik bileşikten daha zararlı olabildiğinden, çevreye atık bırakmadan önce üretilen bu ara ürünleri analiz etmek önemlidir. Boyaların basit yapıya

sahip yan ürünleri, basit prosedürler ile tespit edilebilir. Atıksuya karışan karmaşık yapıları olan boyalar; HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi), gaz kromatografisi gibi kromatografik teknikler kullanılarak tanımlanabilir. Arıtılmış atıksudaki kimyasalların miktarını belirleyen KOİ analizi gibi ek testler de yapılabilmektedir (Martins ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2007).

Endüstriyel sanayi kuruluşlarından gelen atıksuların alıcı su ortamlarına deşarj edilmesi nedeniyle, bu atıksular alıcı su kaynaklarının kirletilmesinden, sucul organizmaların çeşitli olumsuz etkiler görmelerinden ve nihayetinde ölümünden sorumlu tutulmaktadır. Öyle ki H₂S, NH₃ ve Cl₂'u içermesi nedeniyle sanayi atıksularını alan bir gölette balık ölümleri kaydedilmiştir. Nehirlere, derelere ve karalara bırakılan atık sudaki kirletici maddeler besin zincirinde artış göstererek biyolojik birikim meydana getirmektedir. Sanayi atıksularında bulunan bazı toksik maddelerin doza ve maruziyet süresine bağlı olarak toksisitesinin arttığı ve bunların sucul yaşam için ciddi hasarlar verdiği rapor edilmiştir (Mishra ve ark., 1990; Das, 2003; Adewoye ve Lateef, 2004; Yusuff ve Sonibare, 2004; Adewoye ve ark., 2005; Vinodhini ve ark., 2009; Ogundiran ve ark., 2010).

Önemli sanayi kuruluşlarından biri olan tekstil sanayi, yüksek hacimlerde temiz su kullanımını gerektirir ve çoğu kez arıtılmamış atıksularını kanalizasyon içine deşarj etmektedir. Tekstil fabrikalarından gelen atık sulardaki kirleticilerin bileşimi ve TAS'ın deşarj edildiği suda meydana getirdiği kirliliğinin boyutu, büyük ölçüde, ıslak işlemlerde kullanılan suya, kullanılan arıtma işlemlerine ve kullanılan kimyasal maddelere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Organoklorid tabanlı pestisitler içerdiği de tespit edilen ham TAS koyu renklidir, toplam alkalın miktarı azdır, toplam katı madde açısından zengindir, önemli miktarlarda N, Cl₂, PO₄, SO₄, Na ve Ca ve yok denecek kadar az K içermektedir. Tekstil endüstrilerinden gelen atıksular ve arıtma işleminden sonra oluşan çıkış suları; çevre ve insan sağlığına zarar verebilen yüksek konsantrasyonda eser-ağır metaller (Pb, Cd, Fe, Hg Cr, As, Cu ve Zn gibi) içeren kimyasalları ve boya maddelerini içeren pek çok kirletici maddenin kompleks bir karışımıdır. TAS içindeki ağır metallerin ve çeşitli kimyasal maddelerin boya ve boyama prosesleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Yoğun renk oluşumundan sorumlu tutulan bu atıkları alıcı akarsulara bırakmak, suya estetik olarak kötü bir görüntü ve koku vermesi nedeniyle sakıncalı olabilmektedir. Sudaki kirleticilerin en açık göstergesinin suya verdiği renk olduğu bilinmektedir. TAS'da bulunan mevcut kirleticiler; erimiş tuzlar, biyolojik olarak çözünebilir organik maddeler, biyolojik olarak kolay ayrışamayan toksik organik bileşikler (alkil fenol, etoksilatlar gibi tehlikeli yüzey aktif maddeleri) içermektedir. TAS çoğunlukla

çeşitli organizmalara toksik, karsinojenik, mutajenik veya teratojenik olabilen katkı maddeleri, deterjanlar, sürfaktanlar (yüzey aktif maddeler) ve boyalar gibi bazı kimyasal maddeler içerir. Tekstil endüstrileri tarafından kullanılan boyar maddelerin büyük bir kısmı, indirgemesi zor ve aerobik bozunmaya karşı dayanıklı olan organik maddeler ihtiva eder. Bu organik maddeler anaerobik koşullar altında parçalanıp bozulmaya uğradığında, son derece toksik ve kanserojen ajanlar oluşturabilir. TAS içerisinde bulunabilen HCl, NaClO, NaOH, NaHSO₃ ve reaktif boyalar gibi bazı inorganik kimyasallar deniz yaşamına toksik etki gösterir. Bu yüzden tekstil sanayi, çevreye bırakılan toksik deşarjların önemli kaynaklarıdır. Tekstil atıkları deşarj düzenlenmesine gösterilen ilginin az olması sebebiyle, TAS'daki kirleticilerin aşırı konsantrasyonu suyun doğal yapısını bozarak, su kullanımını uygunsuz kılmaktadır. BOİ, KOİ, AKM, ÇKM ve pH artışı oluşturan arıtılmamış ham TAS, su ekosisteminde normal yaşam için ihtiyaç duyulan çözünmüş oksijen miktarında azalmaya neden olur. Böylece tekstil atıklarında bulunan kimyasal maddeler çok düşük miktarlarda olsa bile hem fauna hem de flora için ortamı toksik hale getirir. Yüzey suların özellikle tekstil boyama endüstrisinden gelen atıksular ile kirletilmesi ciddi bir ekolojik problem oluşturmaktadır. Havuz ve göletlere verilen kirli atıksuların bu alanlarda birikmesi, geçirgen kumlu topraklar nedeniyle yeraltını da olumsuz etkilemektedir (Mishra ve ark., 1990; Correia ve ark., 1994; Blomqvist, 1996; Suzuki ve ark., 2001; Jain ve ark., 2003; Pandey, 2004; Mathur ve ark., 2005b; Ali ve ark., 2006; Karthikeyan ve ark., 2006; Bae ve Freeman, 2007; Sharma ve ark., 2007; Tholoana, 2007; Eswaramoorthi ve ark., 2008; Arya ve Kohli, 2009; Laxman, 2009; Neumann ve Fatula, 2009).

Boyar maddelerden azo boyalarının ve bunların bozulması sonucu oluşan yıkım ürünlerinin sitotoksik veya kanserojen olduğu belgelenmiştir. Kanserojen olduğu belgelenen benzidin merkezli azo boyaları, yaygın olarak boya imalatında ve tekstil boyama sektörlerinde kullanılmaktadır. Protein liflerinin boyanmasında geniş ölçüde kullanılan ve azo boya grubundan olan asit red boyasının (asit kırmızısı) balığın DNA'sı ile etkileşime girme ve DNA hasarını uyarma yeteneğine sahip kimyasallar içerdiği dolayısıyla da sucül organizmaların genetik bütünlüğüne zararlı etkileri olduğu ortaya çıkarılmıştır. Moleküler toksisitesi düşünüldüğünde, bu boyaların devamlı kullanılması sucül ekosistemlere zararlı olabilir ve maruz kaldığı organizmalar için ciddi sonuçlara izin verebilir. Sentetik tekstil boyalarını (dispers turuncu 37, dispers mavi 373 ve dispers menekşe 93) içeren bir TAS'da, karsinojenik bileşik olarak bilinen benzidin tespit edilmiştir ve AMES testleri kullanılarak toplam yedi boyada (cremazoles mavi S1, cremazoles kahverengi GR, cremazoles turuncu

3R, direkt bordo, direkt koyu mavi, direkt kongo kırmızısı ve direkt mor) mutajenik ajanlar saptanmıştır (Haley, 1975; Robens ve ark.,1980; Rajaguru ve ark., 1999; Mathur ve ark., 2003b; Mathur ve ark., 2005b; Khehra ve ark., 2006; Lima ve ark., 2007; Deepa ve ark., 2011).

TAS'ın diğer endüstriyel atık sularına kıyasla artış göstermesi son yıllarda faaliyete geçen tekstil firma sayısının arttığına işarettir. Kuşkusuz üretim sırasında tonlarca su tüketilmekte ve sonrasında aynı hacimlerde kirletilmiş su oluşmaktadır. En fazla atık su, **boyama** ve **yıkama** sırasında oluşmaktadır (Şen ve Demirer, 2002; Işıldak, 2011). Boyama ve yıkamada kullanılan yoğun orandaki zararlı ve kimyasal maddeler, bırakıldığı ortamın doğal yapısını ve ekolojik dengeyi bozmakta, çevrenin biyotik ve abiyotik elemanlarından bir ya da birkaçını yok ederek ekosistemin en son halkası olan insanı direkt veya dolaylı olarak etkilemektedir. Zira arıtılan ya da arıtılmayan TAS'ın önemli bir kısmı şehir kanalizasyonuna deşarj edilmekte olup, oradan denizlere ve akarsulara karışmaktadır.

Boyalarda üretimi sırasında açığa çıkan atıksular, boyama işlemi sırasında kullanılan ve yıkama sırasında kumaştan uzaklaştırılan fazla boya kalıntıları göz önüne alındığında, TAS'ın esas sorunun yoğun miktarlarda organik ya da kimyasal kökenli boyalar olduğu düşünülebilir. Tekstil endüstrisinde kullanılan boyalar, alıcı su ortamında suyun doğal renginde değişiklik yaparak, estetik açıdan problem yaratmaktadır. Suyun berraklığında azalma ve bulanıklık yapan organik ve inorganik maddeler; güneş ışığının suya geçişini engelleyerek, sucul bitkilerin fotosentez yapmalarını engellemekte ya da fotosentetik faaliyetini önemli ölçüde azaltmaktadır. Suda bulunan kimyasallar, su yüzeyinden güneş ışığının girmesini engelleyerek fotosentezi önlemektedir. Atıksu içindeki AKM konsantrasyonları, hava-su arayüzünde oksijen transfer mekanizmasına müdahale ederek ve yağlı köpük ile birleşerek çevreyi etkilemede önemli bir rol oynamaktadır (Laxman, 2009). Boyalar ve toksik ağır metaller içeren TAS, alıcı suyun biyokimyasal oksijen tüketimini artırarak reoksijenizasyon sürecini azaltır. Bu nedenle fotototrofik organizmaların büyümesi engellenir. Organik bileşenler, kimyasal ve biyolojik değişikliklere uğrayarak, sudaki O₂'nin uzaklaştırılmasına neden olur. Sucul habitatlar içindeki çözülmüş O₂ miktarı düşer (Nese ve ark., 2007; Tholoana, 2007). Sudaki çözülmüş O₂ derişiminin düşmesine bağlı olarak oksijenli solunum gerçekleştiren canlı türleri solunum yapamaz duruma gelmekte, bu durum anaerobik ve fakültatif mikroorganizmalar açısından avantaj oluşturmaktadır. Oksijensiz ortamda hızlıca çoğalan bu organizmalar sudaki organik maddeleri tüketerek kötü koku oluşumuna neden olmaktadır. Öte yandan yüksek oksijene gerek duyan balıklarda ölümler

yaşanmakta, aerobik mikroorganizmaların sayısında düşüş meydana gelmektedir. Alıcı su ortamına deşarj edilen az miktardaki fenol bile sudaki klor ile birleşerek kötü koku ve tat problemi oluşturabilecek klorofenol'ü meydana getirmektedir. Biyolojik olarak bozunmaya karşı direnç gösteren toksik organik maddeler zamanla canlılarda birikmekte, belli bir konsantrasyona ulaştığında zehirleyici etki göstermekte ve besin zinciri ile kendisiyle beslenen diğer canlılara geçerek zararlı etkisini arttırmaya devam etmektedir. Çökelebilen organik ve inorganik maddeler su tabanında birikerek biyokimyasal ya da kimyasal yolla okside olmaktadır. Zamanla çürümeye başlayan ve kokuşmalara neden olan bu nütrientlerin suyun fiziksel ve kimyasal parametrelerinde önemli değişiklikler yaptığı bilinmektedir. Balıkların solungaçları atık suyun içerdiği iri taneli partiküller tarafından tıkanmaktadır. Su dibine çökmeyerek yüzeyde kalan partiküller, suda köpük oluşumuna neden olmaktadır. Köpük ise; tekstil işletmesinde kullanılan toz deterjanlardan gelişmekte, alıcı ortamda renk ve kokuya neden olmaktadır. Tekstil endüstrisinden çıkan atık sular genelde yüksek sıcaklıkta olduğundan, deşarj edildiği suyun sıcaklığını arttırmaktadır. Bu da ani sıcaklık artışına duyarlı sucul canlı türlerinin ortadan kalkmasına neden olabilmektedir. Ayrıca bazı canlıların üreme hızını ve diğer metabolik faaliyetlerini arttırarak, bunların baskın duruma geçmesine de sebep olabilir.

TAS ile oral yoldan beslenen wistar albino sıçanlarının (*Rattus norvegicus*) karaciğer dokularında histolojik olarak, hücresel nekroz, sitoplazmik (hücresel) vakuolleşme, doku, hücre ya da organel gibi canlı kısımlarında dejenerasyon (doğal yapının bozulması nedeniyle işlevlerde azalma meydana gelmesi) ile pinotik çekirdek, hepatik bağların bozulması ve sinüzoidlerin tıkanması görülmüştür. Ayrıca nükleer karyoliziz artmış, hepatositlerde iki çekirdekli durum gözlenmiştir. Erkek sıçan testislerinde spermatogonya, birincil spermatosit, spermatid ve spermatozoada azalma göstermiştir. Testislerdeki leydig hücre sayısında azalma, tübüllerde çeşitli derecelerde dejeneratif değişiklikler, ikincil spermatosit seviyesinde spermatogenez önlenmesi gözlenmiştir. TAS içindeki ağır metal içeriği, oksidatif fosforilasyonda rol alan enzimatik reaksiyonlara müdahale edebilir. Böylece ATP'de azalma meydana gelir, bu da olgun sperm akrozom reaksiyonlarının azalmasına yol açar. Sperm hareketinde inhibisyona yol açan metalik toksik maddeler spermatogenezini önler. Ağır metaller aynı zamanda büyüme oranını yavaşlatır ve mortalite ile ilişkilidir. Testis ve karaciğerinin her ikisinde de atık süresinin artmasına bağlı olarak toplam lipid ve toplam kolesterol içeriğinde ciddi bir artış (hiperkolesterolemia), toplam glikojen ve protein seviyesinde azalış (disproteinemia) görülmüştür. TAS'daki toksik maddeler, hormon sentezlemek için kandaki

kolesterolu kullanan leydig hücrelerini yıkar. Leydig hücrelerinin yıkımı nedeniyle kullanılmayan kolesterol, dokulardaki toplam kolesterol içeriğini yükseltir. TAS'ın sıçanlarda eritrosit sayımı ve hemoglobin (Hb) içeriğindeki azalmadan sorumlu olduğu bulunmuştur (Gupta ve ark., 1983; Kurde ve Singh, 1995; Stocco, 2001; Mathur ve ark., 2003a).

Tekstil boyalarına uzun süre maruz kalan işçilerde; dermatit (deri iltihabı), şiddetli cilt tahrişi, deri ülseri, astım, burun problemleri, kanama ve rinitis hastalıklarının kazanıldığı tespit edilmiş; böbrek, karaciğer ve mesane (idrar kesesi) kanserlerinin oluştuğu bildirilmiştir. Boya ile kontamine olmuş TAS içinde mevcut olan Cr, As, Cu ve Zn gibi bazı eser metallerin insanlarda; baş ağrısı, mide bulantısı, akciğer tahrişi ve konjenital malformasyonlar gibi birçok sağlık problemi meydana gelmiştir. Boyayla ilişkili endüstri çalışanlarında ciddi böbrek hasarları, karaciğer, beyin, üreme sistemi ve merkezi sinir sistemine dair hastalıklar rapor edilmiştir. İnsan sağlığındaki bozulmalara neden olarak, boyalar ve su içinde bozulma ürünlerinin (ara maddelerin) varlığı gösterilmektedir. Yüksek düzeydeki kirleticilere maruz kalma sebebiyle oluşan oksidatif stresi inhibe etmek için gerçekleşen aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi sitotoksosite işareti olarak yorumlanabilir (Nilsson ve ark., 1993; Morikawa ve ark., 1997; Mathur ve ark., 2005a; Nese ve ark., 2007; Agrawal ve ark., 2014). Kot ürünlerinde ağartıcı ajan olarak kullanılan $KMnO_4$ 'ün insan vücuduna oral yolla alınması sonucu, $KMnO_4$ 'daki serbest radikaller koagülasyon nekrozuna (sitoplazma proteinlerinin pıhtılaşp, denatüre olması sonucu hücrenin ölmesi) yol açabilir. Ölümcül dozda alınan $KMnO_4$, insanda toksisiteye neden olur ve sistemik belirti olarak karaciğer fonksiyon bozukluğunun yanı sıra koagülopatiye (sıvı kanın pıhtılaşarak katı hale gelmesi) neden olur. $KMnO_4$ 'ın insan üzerindeki etkileri gözönüne alındığında, balıklar üzerinde oluşturacağı etkinin büyüklüğünü tahmin etmek hiç de zor olmayacaktır.

Ağır metal zehirlenmelerinin hematopoetik sistemi bastırarak farelerin hematolojik parametrelerini etkilediği ortaya çıkarılmıştır. Bir ağır metal olan Pb'nin eritrosit sentezinde (eritropoietin) ve salgısında azalma yaparak anemiye yol açtığı ve eritrositlerde oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir. Pb aynı zamanda eritrosit zarındaki fosfatidilkoline de doğrudan bağlanabilip, fosfolipid düzeyinde bir azalma yaratabilir. Ağır metaller; farelerde eritrositlerin hücre boyutunda artış ve anormal hücre tiplerinin (akantositler, çapak hücreler ve sferositler gibi) oluşmasına neden olmaktadır (Sharma ve ark., 2007; Goyal ve ark., 2014).

Ağır metaller, hücresel savunma mekanizmasından sorumlu olan enzim ve proteinlerindeki tiyol grupları için yüksek affiniteye sahiptir. Delta amino levulinik asit dehidrogenaz (ALAD) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimleri gibi bazı spesifik sülfidrin'lerin

düzeyleri Pb tarafından yüksek affinite nedeniyle inhibe edilmektedir. Ağır metaller uzun süre maruz kalma, apoptoza yol açabilmektedir. Ağır metaller; büyüme faktörü reseptörleri, G proteinleri, MAPK (Mitoz bölünmeyi Aktive eden Protein Kinaz enzimleri) ve transkripsiyon faktörler gibi çeşitli sinyal bileşenlerini etkilemektedir (Ahmad ve ark., 2005; Flora ve ark., 2008).

Organik besinlerin oksijenle tepkimeye sokulması sonrasında reaktif oksijen türleri (ROS) oluşmaktadır. Serbest radikal ya da non-radikal olmak üzere iki grup halinde sınıflandırılabilen bu oksidan moleküller, ortadan kaldırılamadığı takdirde, hücrenin protein, yağ, karbonhidrat, DNA gibi organik yapıları bileşenlerine zarar verir. Oksidatif strese neden olan oksidanların yıkıcı etkilerine karşı, canlı hücrede birtakım antioksidan metabolitler üretilir. Enzim (protein), vitamin (A, C, E) ya da elementer (Se) halde bulunabilen bu metabolitler, hücrenin savunma sisteminin önemli birer parçasıdır. Antioksidanlar, oksidanların moleküler yapısını kimyasal tepkimeler ile değiştirerek onların hücre bütünlüğüne vereceği hasarları ortadan kaldırır. Antioksidan karakterde olan enzimlerin doku içindeki artışı, oksidatif zararın büyüklüğü hakkında önemli fikirler verirken, bu enzimler kanser araştırmalarında biyomarker olarak kullanılır. Çünkü oksidanlar DNA hasarına ve genotoksisiteye yol açabilmektedir.

Metabolizmanın büyük bir organı olan karaciğer, çevreden absorbe edilen ksenobiyotikler ile yakın temas içine girdiği için, karaciğer lezyonları sıkça akuatik kirlilik ile ilişkilidir. Karaciğer; detoksifikasyon ve biyotransformasyon süreci ile ilişkili olan, konumu ve çok sayıda kan damarı içermesi nedeniyle sudaki kirleticilerden en fazla etkilenen organlardan biridir. Karaciğer ekzojen toksik kimyasal maddeler veya ağır metallerin yanı sıra, endojen artıkların da önemli detoksifikasyon rolüne sahiptir. Karaciğerdeki antioksidatif ve detoksifikasyon edici enzimlerin miktarındaki değişimler oksidan maddelerin varlığını tespit etmede birer biyomarker olarak değerlendirilir. Organizmaları oksi-radikal hasara karşı koruyan ve oksidanlara karşı geliştirilen antioksidan göstergelerden enzimatik temizleyiciler; katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), aspartat transaminaz (AST), alanin transaminaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon (GSH), lipid peroksidasyon (LPO) şeklinde sıralanabilmektedir. TAS'ın yapısında bulunan kirletici bileşenler nedeniyle sucul canlılarda meydana gelen oksidatif strese karşı organizmada hücrenin savunma sistemleri geliştirilir (Weinstein ve ark., 2003; Authman ve Abbas, 2007; Camargo ve Martinez, 2007; Abdel-Moneim ve ark., 2008).

Hipoklorit; hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksit (NO) gibi non-radikal oksidanlardan biridir. Denim yıkama proseslerinden biri olan buz yıkama sırasında, daha açık bir tona ulaşması ve renginin açılması için kota sodyum hipoklorit (NaClO) kimyasalı uygulanmaktadır. TAS'ın sucul sisteme verilmesi halinde, NaClO suya giriş yaparak, burada yaşayan sucul organizmalar için oksidatif strese neden olabilmektedir. Oksidatif stres oluşumunu uyaran oksidanlara karşı sucul canlılarda antioksidan yanıtları gelişmektedir.

CAT; oksijenli solunum yapan hücrelerin peroksizom organelinde, sitozolde, glioksizomda ve mitokondride bulunan önemli antioksidanlardan biridir. Karaciğer dokusunda sık rastlanan CAT enzimi, H_2O_2 'i H_2O ve O_2 'e dönüştürerek denatüre etmektedir. H_2O_2 'nin hücresel bileşenlere vereceği zararı önleyen CAT enziminin, tekstil boyalarına maruz kalan balıklarda arttığı bulunmuştur. Protein liflerin boyanmasında kullanılan azo boyalardan HC Orange No:1 (2-nitro-4-hidroksidifenilamin)'e maruz kalan japon balığı karaciğerinde CAT aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Sun ve ark., 2006; SriPriya ve ark., 2014). Cd, Cr, Cu ve Zn gibi ağır metallerin karaciğerdeki CAT faaliyetini uyardığı tespit edilmiştir. Artmış katalaz aktivitesi, Hg'ye maruz bırakılan *Brycon amazonicus* karaciğerinde de gözlenmiştir (Atlı ve ark., 2006; Monteiro ve ark., 2010). Yeşil dudaklı midyenin (*Perna canaliculus*) karaciğer dokusunda, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) nedeniyle CAT aktivitesi artmıştır (Bruce ve ark., 2008). CAT faaliyeti, NH_3 azotuna maruz bırakılmış Tilapia (*Oreochromis niloticus*) karaciğerinde de belirgin bir şekilde yükselmiştir (Mona ve ark., 2010). Artmış CAT aktivitesinin gösterildiği bu çalışmaların yanı sıra azalmış CAT aktivitesinden de bahsedilebilmektedir. Ağır metallerin canlıda yarattığı süperoksit radikaller nedeniyle CAT aktivitesinin inhibe edildiği bildirilmiştir. Katalaz aktivitesi, balıklardaki As maruziyeti süresinin artmasına bağlı olarak karaciğerde önemli ölçüde azalmıştır. 0.4 mg/L Cu'ya maruz kalma, *Piaractus mesopotamicus*'un karaciğerinde CAT aktivitesini azaltmıştır. CAT aktivitesi, ağır metal ile kirlenmiş Ogun Nehrinden toplanan *Clarias gariepinus*'un karaciğerinde önemli ölçüde ve % 50 oranında azalmıştır. Ag metaline maruz kalan *Oreochromis niloticus*'ta CAT aktivitesinde de keskin bir düşüş gözlenmiştir (Stanic ve ark., 2005; Atlı ve ark., 2006; Farombi ve ark., 2007; Sampaio ve ark., 2008; Soundararajan ve ark., 2009).

Bir tekstil boyası olan HC Orange No 1'e maruz bırakılan japon balığı karaciğerinde GST enziminin arttığı tespit edilmiştir (Sun ve ark., 2006). Ağır metallerle kirlenmiş Ogun nehrinden toplanan *Clarias gariepinus*'un karaciğerinde GST aktivitesi önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. GST aktivitesinde önemli yükselmeler, Cd ile uyarılarak strese sokulması

nedeniyle, tatlı su kemikli balıklarından *Oreochromis mossambicus* karaciğerinde de kaydedilmiştir. HgCl₂'ye maruz kalan *Brycon amazonicus* karaciğerinde ve *Oreochromis niloticus* karaciğer ve kasında GR artışı gözlenmiştir (Basha ve Rani, 2003; Farombi ve ark., 2007; Mona ve ark., 2010; Monteiro ve ark., 2010). Kâğıt fabrikası atık suyuna maruz kalan tatlısu yayın balığı (*Channa punctatus*) karaciğerindeki GST aktivitesinde, zamana bağlı bir artış gözlenmiştir. GST aktivitesi, inorganik kirleticiler ile kirlenmiş nehirde toplanan *Leuciscus alburnoides*'in karaciğerinde daha yüksek bulunmuştur (Paula ve ark., 2001). PAH nedeniyle, *Perna canaliculus* 'nin hepatik dokularında GST aktivitesi artmıştır (Bruce ve ark., 2008). NH₃ azotuna maruz bırakılmış *Oreochromis niloticus* kasındaki GST aktivitesinde önemli ölçüde artış gözlenmiştir (Mona ve ark., 2010).

AST ve ALT, protein katabolizması sırasında, amino asitlerin keto asitlerine dönüşümünü sağlayan enzimlerdir. AST ve ALT aktivitesi; As'e maruz kalan *Clarias gariepinus* karaciğerinde, Pb'ye maruz kalan *Oreochromis niloticus* karaciğerinde, Cd ve Zn'nin farklı konsantrasyonlarına maruz kalan beyaz karides (*Litopenaeus vannamei*) karaciğerinde anlamlı olarak artmıştır. Cu, Cd, Zn ve Ag gibi metallere maruz kalan *Oreochromis niloticus*'un karaciğerinde AST aktivitesi uyarılmıştır. Öte yandan tekstil boya maruz kalma nedeniyle balıkların karaciğerindeki AST aktivitesinin azaldığı görülmüştür. (Dai ve ark., 2009; Nassr Allah, 2009; Öner ve ark., 2009).

Anaerobik glikoliz sırasında piruvatın laktata dönüşümünde önemli bir rol oynayan ve kilit bir enzim olan LDH; tekstil boya maruz kalan balık gruplarında artmıştır. Öte yandan, Cd'a maruz kalan kemikli balıklardan *Channa punctatus*'un karaciğerinde ve *Oreochromis niloticus*'un beyaz kasında LDH aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir. Benzer azalma Hg'ye maruz kalan *Sarotherodon mossambicus* karaciğer dokusunda ve Cd'a maruz kalmış yenilebilir yengeçte (*Scylla serrata*) de gözlenmiştir (Naidu ve ark., 1984; Sreenivasula ve Bhagyalakshmi, 1994; Sastry ve Shukla, 1994; Almeida ve ark., 2001). Gübre endüstrisi atıklarının % 7'sine maruz kalan tatlı su kemikli balıklarından *Channa striatus* kasında, LDH aktivitesinde % 78 kadar önemli bir azalma gözlenmiştir (Yadav ve ark., 2007).

TAS'a maruz bırakılan balıkların karaciğer dokularında askorbik asit (C vitamini), folik asit (B9 vitamini) ve lizin gibi esansiyel besinlerin düzeyinde azalmalar tespit edilmiştir. Askorbik asit; tüm sucul canlı yemlerinde önemli olan ortak bir gıdadır ve balık da dâhil olmak üzere farklı hayvanların fizyolojik süreçlerini korumak için gerekli vazgeçilmez bir besin maddesidir. Askorbik asit eksikliği; düzensiz ve çırpınarak yüzmeye, karında su toplanması, iştahsızlık, kıkırdak anormalliği, bitkinlik, uyuşukluk, kuyruk yüzgecinde aşınma,

cilt ve solungaç kanamaları, hematokrit azalması, hemoglobin düşüklüğü; böbrek, karaciğer, cilt ve göz lezyonları ve omurga kaymasına öncülük etmektedir (Soliman ve ark., 2008). Folik asit eksikliği, DNA sentezi ve tamiri sırasında homosistein birikimi ve metilasyon bozulmasına neden olabilmektedir (Weinstein, 2003). Tekstil boyalarının yüksek konsantrasyonlarına maruz kaldığı için strese giren balıklarda oksidatif metabolizma ve enerji üretimi amacıyla serbest bir aminoasit olan lizinde tükenme meydana geldiği bildirilmiştir (Milligan, 1997; Waagbo ve ark., 2008).

Canlı vücut sıvılarında Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} gibi katyonlardan ve Cl^{-1} , HCO_3^{-1} gibi anyonlardan oluşan inorganik iyonlar bulunur. Serbest ya da bağlı formda bulunabilen bu iyonlar hücrel metabolizmada önemli bir rol oynar. Bu elektrolitlerin vücuda giriş ve çıkışı sayesinde tatlı sudaki organizmaların iç dengesi korunur. Bu bakımdan sucul organizmalarda su girişi ve iyon çıkışının düzenlenmesi için bu iyonların konsantrasyonu sabit tutulmalıdır. Elektrolitler tüm doku tiplerinin düzgün işleyişinden de sorumludurlar. Vücuttaki elektrolitlerin temel işlevleri; sıvı dağılımını sağlamak, hücre içi ve hücre dışı asit-baz dengesini muhafaza etmek, vücut sıvısı osmotik basıncı korumak ve nöron-kas sinirliliğinin kontrolünü sağlamaktır. Kanın pıhtılaşmasında görev alan Ca^{+2} , su ve inorganik iyonların hücre zarından geçirgenliğinin düzenlenmesinde de büyük önem taşır. Ayrıca Ca^{+2} , kas ve sinirde aksiyon potansiyelinin gelişiminin yanısıra membran potansiyelinin korunmasına da katkıda bulunur. Mg^{+2} ; bazı enzimatik reaksiyonlarda yer alan temel bir elementtir. Hücre arası sıvının ana katyonu ve aynı zamanda hücre dışı sıvının önemli bir bileşeni olan K^{+1} , sinir aktivitesi için gereklidir ve karbonhidrat metabolizması ile ilişkili olan sinir liflerinde bulunmaktadır (Lewis ve Lewis, 1971; Mohanty ve Mishra, 1983; Mayer ve ark., 1992; Shaanmugam, 1993; Karthikeyan ve ark., 2006). Tekstil boyasının subletal konsantrasyonu ile muamele edilen balıkların karaciğer, böbrek ve kas dokularında Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^{+1} , Cl^{-1} gibi elektrolitlerin miktarında azalmalar tespit edilmiştir. Osmoregülasyonun ve stresin bir göstergesi olarak kullanılan iyon konsantrasyonlarındaki azalışların, hücre membran sisteminin geçirgenlik özelliklerinde yaşanan değişiklikten kaynaklandığı öne sürülmektedir. Osmotik basıncın düzenlenmesini sağlamada önemli bir hücre dışı anyon olan Cl^{-1} azalmasının, karbonik anhidraz aktivitesinin azalması nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Cd ve Cu'nun Tilapia üzerindeki kombine etkisi nedeniyle, plazmadaki Ca^{+2} ve Na^{+1} konsantrasyonu belirgin bir şekilde düşmüştür. Cu'ya maruz kalma nedeniyle Tilapia larvasında Ca^{+2} iyon seviyeleri anlamlı bir şekilde azalmıştır. Hg'nin akut konsantrasyonuna maruz kalma nedeniyle *Pila globosa* ve *Lamellidens marginalis*'in hepatopankreasında Ca^{+2} ,

Na⁺ ve K⁺ iyon seviyeleri giderek azalmıştır. Asit baskısı altında kalan gökkuşuğu alabalığı, *Salmo gairdneri*'nin kaslarında Na⁺ ve Cl⁻ seviyeleri azalmıştır (Thomas ve Murthy, 1976; Pic, 1978; Kabeer, 1979; Ando, 1981; Raymond ve ark., 1983; Pelgrom ve ark., 1995b; Sivaramakrishna ve Radhakrishnaiah, 2000; Wu ve ark., 2003). Cd maruziyeti sonrası, gökkuşuğu alabalığının plazmasında Ca²⁺ düzeyleri düşmüş, ancak K⁺ düzeyi yükselmiştir (Chowdhury ve ark., 2004). Tekstil boyaları ile yapılan başka çalışmalarda, Na⁺ ve Cl⁻ 'un azaldığı ancak, Ca²⁺, Mg²⁺ ve K⁺ iyonlarının konsantrasyonunun arttığı bulunmuştur (Shaanmugam, 1993). Aşırı Ca²⁺ iyonu, böbrekler tarafından aşırı Ca²⁺ iyonlarının aktif olarak salgılanmasına bağlı olabilmektedir (Larsson ve ark., 1981). Bundan başka, Ca²⁺ ve Mg²⁺ gibi iki değerli katyonlardaki artışın, ayrıca membran geçirgenliğini bozduğu rapor edilmiştir (Hoar, 1989). Böbrek fonksiyon bozukluğunun, Mg²⁺ seviyesinde önemli bir artışa neden olacağı belirtilmiştir (Ebel ve Günther, 1980). Vücut sıvısındaki Mg²⁺ ve Ca²⁺ artışı pestisit stresine bağlı olarak gerçekleşen parathormon hiperaktivitesi nedeniyle olabilmektedir (Shaanmugam, 1993).

Proteinler; enzim, hormon, immünoglobulin gibi hücre protoplazmasının başlıca bileşenleri ve yapısal eleman olarak hizmet eder. Spektrum; protein, lipid, glikojen, nükleik asit ve diğer biyomoleküllerin sahip olduğu farklı fonksiyonel grupların katkısından ortaya çıkan çeşitli absorpsiyon bantları içermektedir. Proteinlerin infrared spektrum bantları 'amid' olarak bilinen bir dizi absorpsiyon bölgesi ile karakterize edilir. Tekstil boyalarına maruz kalma nedeniyle strese giren balığın karaciğer dokusunun protein bantlarında gerilmeler ve yapısal kayıplar görülmüştür. Karaciğer dokusundaki farklı biyomoleküllerin miktarındaki farklılıklar nedeniyle absorpsiyon yoğunluklarında önemli varyasyonlar olabilmektedir. TAS karaciğerdeki protein bantlarında yer alan amidlerdeki dalga sayısının değişmesine sebep verirken, proteinlerinin metil grubu üzerinde önemli etki de gösterir. Yağ asitlerinin karboksilik asit gruplarında önemli değişiklikler yapar. As ile zehirlenmiş *Labeo rohita*'nın karaciğer dokusunda yer alan protein bantlarında değişim sıklığı görülmüştür (Palaniappan ve Vijayasundaram, 2008; Sripriya ve ark., 2014).

Tekstil boyalarına maruz kalan balıkların karaciğerinde çok sayıda histolojik değişiklik tespit edilmiştir. Toksik hasarın birer göstergesi olan bu histopatolojik değişiklikler; kan dolaşımının durmasından sorumlu hepatik nekrozis, pankreas asinüs hücrelerinde dejenerasyon ve atrofi, merkezi vende (toplardamarda) trombozis, dejeneratif çekirdek, kan damarlarında intra-vasküler hemoliz, kan damarında tıkanıklık, vasküler genişleme, kan sinüs ve sinüzoidlerinin genişlemesi, vasküler dejenerasyon, hepatositlerde vakuolar dejenerasyon,

fibrozis ve hücrelerde inflamasyon (iltihap) şeklinde sıralanabilir. Bu durum, tekstil boyalarının içindeki ağır metallerin kümülatif (birikmeli) etkisinden kaynaklanmaktadır. Bu histopatolojik değişimlerin bir kısmı atık su içinde bulunan ağır metallere maruz kalan gökkuşuğu alabalığı karaciğerinde de gözlenmiştir. Cd'a maruz kalan beyaz levrekte (*Lates calcarifer*) de dejeneratif ve nekrotik değişiklikler gözlenmiştir. Farklı kirleticiler ile kirlenmiş Mısır'daki Karun gölünden toplanan *Tilapia zilli* ve *Solea vulgaris*'in hepatositlerinde yukarıdaki patolojik değişimlerin birçoğu bildirilmiştir. Her türlü toksin ve kimyasalların detoksifikasyon yeri olmasından dolayı karaciğerde görülen tüm bu histopatolojik değişiklikler, kirleticilerin hepatositler üzerindeki doğrudan toksik etkilerinin birer sonucudur (Thophon ve ark., 2003; Soufy ve ark., 2007; Mohamed, 2008; Atamanalp ve ark., 2008; Mohamed, 2009; Sripriya ve ark., 2014).

Tekstil sanayi atıksuyunda yer alan boyalar ve ağır metaller taşıdığı su ortamını kirletir. Bu kirleticilerin taşıdığı reaktif oksidanlar; canlı hücreleri etkileyerek ROS oluşumuna neden olur. Fizikokimyasal analizi yapıldığında, TAS'ın ROS üretme yeteneğine sahip çinko, fenol ve sülfat bileşiklerini içerdiği tespit edilmiştir. TAS içindeki ksenobiyotik kaynaklı bileşiklere karşı geliştirilen aşırı ROS üretimi, hücreler için kümülatif zararlar üreterek, oksidatif stres'e neden olabilir. Sadece TAS değil diğer endüstriyel atıksular da sahip olduğu serbest radikal bileşenler nedeniyle etkileşim içine girdiği dokularda oksidatif stres oluşumunu uyarır. Bu durumda atıksulardaki kirleticiler ile ilişkili olan oksidatif harabiyetin üstesinden gelebilmek için, stresten sorumlu enzim sistemlerinin sürekli uyarılması ya da faaliyetlerinin artırılması gerekli hale gelir. Bazen de harekete geçen endojen detoksifikasyon mekanizmaları oksidatif stresin zararlı etkilerini ortadan kaldırmada yetersiz kalabilir. Kirli suda biriken bu maddeler sucul organizmalar için önemli bir toksisite kaynağıdır ve fizyolojik işlevlerdeki aksamalardan kısmen sorumlu tutulmaktadır. SOD ve CAT enzimleri bir süperoksit radikal olan H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 'e dönüştürerek ortamdan kaldırabilir. Böylece bu enzimlerin varlığında, O_2 toksisitesine karşı H_2O_2 'i detoksifike edilmiş olur. Toksik madde ve geçiş metalleri içeriğinden dolayı önemli bir kirlilik faktörü olan TAS muamelesi gören ya da kirli alanlarda yaşayan balıkların karaciğer ve solungaç dokularında genelde SOD ve CAT enzim aktiviteleri, tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) içeriği ve LPO düzeyi büyük bir artış göstermektedir. Kirli sularda yaşayan *Oreochromis niloticus*'un karaciğerinde SOD aktivitesinin belirgin bir şekilde arttığı ve arıtımı yapılmış kâğıt atık suyuna maruz bırakılan *Channa punctatus*'nun karaciğerindeki SOD aktivitesinin önemli derecede yükseldiği bildirilmiştir. Benzer şekilde; CAT

aktivitesinin kirli su çevresinde yaşayan *Mugil cephalus* ve *Platichthys flesus*'un karaciğer dokularında önemli bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Tarım kimyasalları, ağır metaller ve kentsel atıksu ile kirletilmiş doğal sucul ortamlarda yaşayan *Anguilla anguilla* balığının solungaçlarında CAT aktivitesinin arttığı belirtilmiştir (Oikari ve ark., 1985; Suntio ve ark., 1988; Mather ve Digiulio, 1991; Dimitrova ve ark., 1994; Bairy ve ark., 1996; Ahmad ve ark., 2000; Livigstone, 2001; Gül ve ark., 2004; Oakes ve ark., 2004; Ferriera ve ark., 2005; Ahmad ve ark., 2006; Grinevicius ve ark., 2009; Zagal ve Mazmanci, 2011; Demirci ve Hamamcı, 2013).

Balık gibi sucul omurgalılar su kaynaklı kirleticilere duyarlı olmalarını sağlayan solungaçları ile dış çevreleri ile yakın temas halindedir. Solungaçlar; solunum, iyon-osmoregülasyon ve asit-baz dengesi için primer organlardır. Gösterdiği fizyolojik fonksiyonlar nedeniyle balığın genel yaşam performansını korumada önem arzeden ve homeostazi sağlayan solungaçlar TAS etkisiyle zarar görebilmektedir. TAS'ın tatlı su balıklarının osmoregülasyonu üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı, deşarj edildiği su ortamında yaşayan balık türlerinde yoğun bir azalmaya neden olduğu kanıtlanmıştır (Karthikeyan ve ark., 2006).

Tekstil endüstrisinden gelen TAS'ın arıtılmadan doğrudan toprağa, nehir ve kanal gibi yüzey sularına deşarj edilmesi; alıcı su ortamı kirleterek, mevcut su kaynaklarını sulama ve içme için elverişsiz hale getirmektedir. Atıksular toprağın gözenekli yapısı sayesinde süzülerek sızıntı ile yeraltı sularına karışabilir, toprağı ve yeraltı suyunu kirletir. İçerdiği ağır metal kontaminasyonu nedeniyle kirlettiği suyun fizikokimyasal özelliklerini etkileyebilmektedir. Dahası TAS insan sağlığını, sucul hayatı ve bitkisel üretimi olumsuz yönde etkilemektedir. Tekstil katı atıklarının toprak dolgusu olarak kullanılması sonucunda bu atıklar ile beraber Cu, Zn, Pb, Cr, Cd, Co, As, Hg, Mn, Ni ve Fe gibi ağır toksik metaller toprağa giriş yapmaktadır. Toprakta bulunan ağır metaller, yine burada yaşayan bitkilerin kökleri ile alınarak, gövde aracılığıyla bitkinin yaprak ve diğer dokularına ulaşır ve buralarda birikme gösterir. Öyle ki TAS'ın kullanıldığı tarımsal alanlarda ve belediye kanalizasyon çamuru ile değiştirilmiş toprakta yetişen sebzelerin farklı kısımlarında ağır metal birikimi olduğu bildirilmiştir. Metal birikimi; çevresel koşullara, metal türüne ve bitki türüne bağlı olarak farklılık göstermektedir. Ağır metallerle kirlenmiş ortamda büyüyen gıda bitkileri, yüksek konsantrasyonda iz elementler biriktirebilmekte, bitkilerdeki ağır metal içeriği, toprağın kirlilik derecesi ile artmaktadır. Bu elementler gıda tüketimi yoluyla insan vücuduna girebilmekte, bu durum tüketici sağlığı için doğrudan bir tehdit teşkil edebilmektedir.

Topraktaki bu ağır metallerin aşırı alımı ve birikimi, bitki ve hayvan gibi tüketici canlılar için tehlikeli ve zehirli olabilir. Eser miktarda bulunan bu metaller, canlı hücrelerin enzimlerini tahrip edebilir. Tarım arazilerinde sulama amaçlı kullanılan TAS, toksik kimyasal maddeler nedeniyle doğrudan ve dolaylı olarak bitki ve toprak florası için çeşitli hasarlara neden olur ve toprak verimliliğini de azaltır. TAS ile sulanan alanlar ve bu alanlarda yetiştirilmiş tarımsal bitkiler, hem nitelik hem de nicelik bakımından olumsuz etkilenir. Atık suların topraklara kimyasal bileşikler eklemesi, üretken toprakları tahrip eder. Sezon sonunda yaşanan mahsuldeki verim kaybının en önemli iki parametresi gecikmeli tohum çimlenmesi ve erken yaprak yaşlanmasıdır. Ürün sulamada kullanılan endüstriyel atıksuların ve TAS, tuzluluk ve iletkenlik geliştiren yüksek dozda toplam çözünmüş katı madde (TÇKM) içermektedir. Toprakta TÇKM artışı nedeniyle, osmotik basınca bağlı olarak tohum tarafından emilen suyun miktarı azalır, tohum çimlenmesinde durma ya da gecikme yaşanır. Bu da fide büyümesini engelleyerek, bitkisel üretimin azalmasına yol açar. Benzer etkiler; Cd, Cu, Ni ve Zn ağır metal karışımlarının uygulandığı safran çiçeğinde ve tuzluluk konsantrasyonu yüksek atık suyun uygulandığı domates, biber, su kabağı, salatalık ve soğan gibi mahsul türlerinde de görülmüştür. Kuvvetli alkali yapıda olan yüksek pH'lı tekstil durulama atıksuları, bitkilerde olumsuz etkilere neden olan yüksek organik yükler taşıdığından tarım ürünlerinde kaliteyi düşüren zararlı etkiler gösterebilmektedir. Pb'nin varlığına bağlı olarak bitkide N içeriğinde azalma meydana gelirken, Cu'nun artışı da N'nin azalmasına neden olmaktadır (Hawley, 1985; Hellawell, 1986; Breekle ve Kahle, 1992; Bishoni, 1993; Cambra ve ark., 1999; Dudka ve Miller, 1999; Khan ve Marwari, 2002; Ramana ark., 2002; Damek ve Sawicka, 2003; Khan ve Marwari, 2003; Khan ve ark., 2003a,b; Long ve ark., 2003; Türkdogan ve ark., 2003; Singh ve ark., 2004; Karthikeyan ve ark., 2006; Lokeshwari ve Chandrappa, 2006; Mathur ve ark., 2007; Nath ve ark., 2007; Dhanam, 2009; Kumar ve ark., 2009; Albino ve Murugan, 2010; Antonious ve ark., 2011; Begüm ve ark., 2011; Houshmandfar ve Moraghebi, 2011; Malaviya ve Sharma, 2011; Marwari ve Khan, 2012; Varma ve Sharma, 2012; Goyal ve ark., 2014). Aşırı Zn'nun seçilen çin lahanası ve kereviz sebzelerinin her ikisinde de toksisiteye neden olduğu ve genç yapraklarda klorozis (klorofilin parçalanması), köklerin kararması ve bitki büyümesinde ciddi inhibisyon gibi belirtiler gösterdiği bulunmuştur (Long ve ark., 2003). Atık su ile muamele edilen bitkiler, kontrol bitkileriyle kıyaslandığında, bir tatlı su bitkisi olan Vallisneria (şerit çim) yapraklarında toplam klorofil içeriğinde bir azalma olduğu gösterilmiştir. Pigmentlerdeki bu azalma, bitkilerin fotosentez ve dolayısıyla verimliliğini ciddi şekilde etkileyecektir (Sahai ve ark., 1993; Sinha ve ark., 2002; Garg ve Kaushik, 2007). Singh ve Agarwal (2006); ağır metallerle kirlenmiş topraklarda yetiştirilen farklı kültür

bitkilerinin (börülce, bamyaya turpu, ıspanak, nohut, bezelye ve buğday) farklı kısımlarının biyokütle, verim ve metal dağılımından etkilendiğini rapor etmiştir. Tarla bitkileri içinde metal birikiminin en fazla olduğu, ıspanak ve bamyaya turpu gibi yapraklı sebzeler olmuştur. Ispanak ve bamyaya sırasıyla Pb ve Cd'nin maksimum alımını ortaya çıkarırken, kültür bitkileri arasında yer alan buğday, maksimum Cu ve Zn alımı göstermiştir. Ürünler tarafından vejetatif sürgünlerde (yaprak, gövde ve kök) absorbe edilen ağır metallerin oranı maksimum biriktirilmiş olmasına rağmen, metallerin önemli bir kısmı tohumlara ve meyvelere de taşınmıştır. Athar ve Ahmad (2002)'nin yapmış olduğu bir çalışmada bazı ağır metallerin bitki büyümesi ve buğday (*Triticum aestivum* L.) tahılının tane verimi üzerinde önemli azalmalar meydana getirdiği tespit edilmiştir. Cd'nin Cu, Ni, Zn, Pb ve Cr tarafından takip edilen en toksik metal olduğu ortaya çıkarılmıştır. Topraktaki Cd varlığının, kontrole göre serbest yaşayan *Azotobacter chroococcum* sayısında maksimum inhibisyon (% 84,9) ile sonuçlanacak kadar toksik düzeyde olduğu ortaya çıkarılmıştır. Protein içeriği, kirli toprakta bulunan metallere maruz kalan bitkilerde % 71,4'den 19,0'e düşmüştür. Bitki numunesindeki N ve protein içeriği önemli düzeyde azalmıştır. Topraktaki yüksek Cu konsantrasyonunun *Poa annua* bitkisi için hayatta kalmada düşüş, toplam bitki biyokütlesinde düşüş, çiçeklenme ve meyve vermede gecikme ve düşük tohum olgunlaşması ile sonuçlandığı bulunmuştur (Brun ve ark., 2003). Yüksek S ve Cu birikiminin önemli ölçüde mikrobiyal biyokütleyi ve toprak mikroorganizmalarının işlevini azalttığı bildirilmiştir (Klumpp ve ark., 2003). 270 mg/kg Cu içeren toprak bahçesinde hiçbir solucan bulunmadığı bildirilmiştir (Zwetien ve ark., 2004).

Arıtılmadan ya da kaliteli arıtım metotları kullanılmadan arıtılan TAS; toprağa deşarj edilerek sulama amaçlı kullanıldığında bitki büyümesi üzerinde olumsuz etkiler gösterebilmektedir. Öte yandan etkili arıtım sistemleri kullanıldığında, TAS'ın sahip olduğu organik ve inorganik maddelerin mahsul veriminde olumlu etkiler göstereceği düşünülmektedir. Çünkü yanlış kullanıldığı için azalan ve sınırlı miktarlarda olan mevcut doğal tatlı su kaynakları, bazı bölgelerde sulama suyu talebini karşılayamamaktadır. Sulama suyunun yetersiz olduğu yerlerde endüstriyel atık suların kullanımı, su kaynaklarını tamamlayıcı bir faktördür. Bu nedenle, tarım üreticileri tarımsal üretimde kullanılmak üzere geleneksel olmayan su kaynaklarına yönelmek zorunda kalmışlar. Farklı sektörlerden gelen talepler doğrultusunda, % 95 su ve organik-inorganik besin maddeleri içeren sanayi atık suların, uygun şekilde bertaraf edilmesi halinde, diğer kullanımlar için uygun olduğu görülmüştür. Seyreltilmiş çeşitli endüstri atık suları, önceki çalışmaların aksine çimlenme yüzdesini artırmıştır. Ancak yine de, TAS kullanılarak yetiştirilen sebzelerde besin zinciri

yoluyla oluşacak biyolojik metal birikimini azaltmak amacıyla düzenli kontrol uygulamaları gerçekleştirilmelidir (Saleemi, 1993; Tiwari ve Mahapatra, 1999; Behera ve Reddy, 2002; Vijayakumari, 2003; Buechler ve Mekala, 2005; Padmaparna, 2005; Saravanamoorthy ve Ranjitha Kumari, 2007; Kalaiselvi ve ark., 2009).

Sumathi ve ark. (2001); TAS'ın % 0.1, 2, 5, 10 konsantrasyonlarına ve referans mutajen olarak kullanılan 2 mg/L CP'ye (siklofosfamid) 3, 9 ve 15 günlük sürelerle maruz bırakılan sazan balığının (*Cyprinus carpio*) karaciğer ve kan hücrelerindeki genotoksik etkileri Comet yöntemiyle gözlemlenmişlerdir. Test solüsyonu içeren suyu, her 24 saatte bir yenilerken, iyileşmenin değerlendirilmesi amacıyla, 15 günlük muamele süresinden sonra, diğer 15 gün için balıkları klorsuz musluk suyuna aktarmışlardır. Yapılan deney sonucunda; negatif kontrole göre, TAS'a ve CP'ye maruz kalan her iki dokuda ve her periyotta tüm muamele gruplarının DNA boy-en oranında önemli bir artış ($p < 0.01$) gösterdiği görülmüştür. Her iki dokuda da, DNA hasarı ve TAS dozu arasında güçlü bir doğrusal ilişki olduğunu, artan atık dozuna bağlı olarak DNA'nın ortalama boy-en oranında kademeli bir artış meydana geldiği bulunmuştur. Buna karşın, azalan TAS konsantrasyonu ile birlikte DNA zincir kırıklarında bir azalma eğilimi olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda maruziyet durdurulup, hayvanlar klorsuz musluk suyuna aktarıldıktan sonra, DNA boy-en oranında kademeli bir azalış meydana geldiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak TAS'ın, sazan hepatosit ve hemositlerinde DNA'nın morfolojik yapısında farklılıklara yol açacak düzeyde genotoksik ajan içerdiği kanıtlanmıştır.

Saxena ve ark. (2005); dört ticari deterjanın bir tatlı su balığı olan sivrisinek balığının (*Gambusia affinis*) davranış, mortalite (ölüm) ve RBC (eritrosit) sayımı üzerindeki etkisini akut (96 saat) ve kronik (30 gün) olarak incelemişlerdir. 96 saat süren akut toksisite çalışmasının 24. saatinde, dört deterjanın yüksek konsantrasyonlarında (> 10 ppm), balıktaki yüzey hareketlerin sayısı önemli ölçüde artmıştır. Akut çalışma sırasında, 'deterjanın sudaki atık organik maddeler ile birleşerek oluşturduğu kalıntı kirin ($LC_{50} = 6,69-19,98$ ppm)' 'deterjan tozlarından ($LC_{50} = 18.34-20.72$ ppm)' daha toksik olduğu bulunmuştur ($LC_{50} =$ Deney organizmalarının % 50'sini yani yarısını öldürmek için gereken letal konsantrasyon). Kontrol balıklarıyla karşılaştırıldığında, kalıntı kirlerine maruz kalanlarda daha belirgin olmak üzere, deterjana maruz kalan balıklarda RBC (eritrosit) sayımları (% 12-64) azalmıştır. 30 günlük kronik bir süreyle subletal konsantrasyondaki (10 ppm) deterjan tozlarına maruz bırakılan balıkların halsiz ve dipte sakin olduğu görülmüştür. Deterjanlara maruz kalan balıkların, derilerinin bol mukus salgısı nedeniyle kaygan olduğu ve solungaçlarının üzerinde

hemoroid (kanama) bölgeleri oluştuğu tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlu (> 10 ppm) deterjan muameleleri ile suda çözülmüş oksijen içeriğinin % 10-18 oranında azaldığı görülmüştür. 30 gün sonunda balıkların RBC sayımlarında büyük oranda azalma (% 41-58) meydana gelmiştir. Buradan test edilen dört deterjanın da *Gambusia affinis* balığına karşı toksik olduğu sonucuna varılmıştır.

Soni ve ark. (2006); arıtılmamış ve arıtılmış (fizikokimyasal ve biyolojik) tekstil boya atıksularının *Gambusia affinis* üzerinde meydana getirdiği sitotoksik değişimleri (mortalite, RBC sayımı ve morfolojisi) araştırmak için toksikolojik bir çalışma yürütmüşlerdir. Yapılan çalışma sonrasında, toksisitesi test edilen atıksuların muamele edildiği balıkların RBC sayımlarında yüzdece azalma ve alyuvarların şekil (poikilositoz) ve büyüklüğünde (en, boy, çap) (anizositoz) değişimler yaşanmıştır. Düşük konsantrasyonlarda balıklara uygulanan arıtılmamış ve arıtılmış atıksuyun her ikisinin de toksisite ölçümleri için mortalite ve RBC sayısı arasında en iyi göstergenin poikilositoz olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni poikilositoz'un mortalite ve RBC'nin normal olduğu durumda bile görülmüş olmasından kaynaklanmaktadır. Öte yandan anizositoz ile karşılaştırıldığında, EC₅₀ (deney organizmalarının % 50'sinde yani yarısında olumsuz yani semptomik etki gösteren madde konsantrasyonu) değerlerinin poikilositoz ve mortalite açısından daha yüksek (değer olarak daha az), dolayısıyla da daha hassas olduğu görülmüştür. Bu çalışma sayesinde TAS'ın eritrosit üzerinde oluşturduğu sitotoksik etkilerin yanı sıra sitotoksisite ölçümü için en hassas parametrenin EC₅₀ olduğu anlaşılmıştır.

Karthikeyan ve ark. (2006); tekstil boyamada kullanılan asit mavisi 92 (CI.No. 13390) boyasının yenilebilir tatlı su yılan balığının (*Mastacembelus armatus*) karaciğer, böbrek ve kas dokuları üzerindeki osmoregülatif etkisini incelemişlerdir. 35 günlük bir maruz bırakma döneminden sonra, kontrole kıyasla balığın sözkonusu dokularındaki Na⁺ ve Cl⁻ iyonları konsantrasyonunda bir azalma, Ca⁺², Mg⁺² ve K⁺ iyonlarının konsantrasyonunda ise bir artış gözlenmiştir. Tekstil boyası uygulaması yapılan balıkların dokularında meydana gelen önemli iyonik değişimlerin DNA yapısındaki değişimler ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir.

Sharma ve ark. (2007a); arıtılmamış ve arıtılmış TAS'ın balık (*Gambusia affinis*) mortalitesi, RBC sayısı ve morfolojisi ile monokotil bir bitki olan su mercimeğinin (*Lemna aequinoctialis*) büyümesi üzerinde toksik etkilere neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Atık su içeriğinde bulunan asitlerin (HCl ve H₂SO₄), alkali maddelerin (Na₂O, SiO₂), tuzun (NaNO₂) ve ağır metallerin (Cu) boyalara nazaran maksimum toksisiteye daha fazla katkı sağladığı ileri sürülmüştür. Bunun yanında; kimyasal testler ile birlikte biyolojik testlerin

verileri arasında kesin bir korelasyon olmasına rağmen, kimyasal testler ile karşılaştırıldığında biyolojik testlerin (LC₅₀/EC₅₀ değerleri) atık sulara karşı göreceli olarak daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Sharma ve ark. (2009); tekstil boyası atıksularının ve bunların seçilmiş bileşenlerinin (metil kırmızısı azo boyası ve Cd, Cu, Ni ve Zn gibi ağır metaller), *Gambusia affinis* balığı üzerindeki, akut toksisitelerini belirlemişlerdir. Sonuçta; eritrosit sayılarında % 50 düzeyinde azalma olduğunu görülmüş, bu azalmanın mortalite duyarlılığı ile benzer olduğu ve eritrosit morfolojisinde önemli bozukluklar (poikilositoz) ortaya çıktığı farkedilmiştir.

Ogundiran ve ark. (2010); doğrusal alkil benzen sülfonatlar içerdiği bilinen evsel deterjan atıksularının, Afrika yayın balığı (*Clarias gariepinus*) yavrularının davranış ve mortalitesini, ayrıca balık karaciğeri üzerindeki toksikoloji ve histopatoloji açısından olası etkilerini akut (96 saat) ve kronik (56 gün) vadede araştırmışlardır. Balıklar; deterjan atıksuyunun 0.00 (kontrol), 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ve 0.05 mg/L letal konsantrasyonlarına (x2 kez tekrarlanmış) ve 0.000 (kontrol), 0.002, 0.003, 0.004, 0.005 ve 0.006 mg/L subletal konsantrasyonlarına (x2 kez tekrarlı) maruz bırakılmıştır. Letal ve subletal testler için, LC₅₀ değerleri sırasıyla 0.0166 mg/L ve 0.0038 mg/L olarak ölçülmüştür. Deterjana maruz kalan balıklarda toksik maddenin konsantrasyonundaki farklılıklara bağlı olarak solunum bozukluğu (nefes almada zorluk), düzensiz hareket (yüzme), denge kaybı, uyuşukluk, deride aşırı mukus salgısı, değişen ortamı tolera edip uyum gösterememe, giderek zayıflama, tankın altına yerleşme, deri renginde parlama gibi pek çok stres işaretleri ve sonrasında ise ani ölüm gözlenmiştir. Balık mortalitesinin, atık su konsantrasyonundaki artış ile birlikte anlamlı düzeyde (p<0.05) arttığı görülmüştür. Kontrol grubundaki balıkların karaciğeriindeki hepatosit hücreleri normal parankima görünümünü göstermiştir. Ancak atıksu muamelesi görmüş balıkların karaciğer dokularında; merkezi ven tıkanıklığı, hepatositte vakuol oluşumu, ödem, hücresel infiltrasyon (hücrelerin ya da hücresel maddelerin normal koşullarda bulunmaması gereken bir dokuya göç etmesi ve burada normalden fazla ve patolojik düzeyde birikmesi durumu) ve hücresel nekroz (fizyolojik olmayan şartlarda görülen hücre ölümü) oluşmuştur. Sonuç olarak deterjan atık suyunun, *Clarias gariepinus* juvenillerine karşı son derece toksik olduğu kanıtlanmıştır.

Zagal ve Mazmancı (2011); çinko, fenol ve sülfat içeren TAS'ın öldürücü olmayan konsantrasyonlarına (% 0.1, 1 ve 10 v/v), dinamik bir sistemde ve kronik süreler ile (15, 30 ve 45 gün) maruz bıraktıkları Nil tilapyası balığının (*Nile tilapia-Oreochromis niloticus*) karaciğer ve solungaç dokularında, SOD ve CAT enzim aktiviteleri (U/mg protein) ve

TBARS (nmol/mg protein) düzeylerinde önemli ($p<0.05$) artışlar tespit etmişlerdir. Böylece TAS'da superoksit radikallerin bulunduğu ve bu radikallerin balıklarda oksidatif stres biyomarkörleri olan antioksidan enzimlerini uyardığı açıkça ortaya konmuştur.

Deepa ve ark. (2011); çeşitli konsantrasyonlarda (6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 mg/L) hazırlanan tekstil boyasına (asit kırmızısı) statik bir sistemde 96 saat boyunca maruz bırakılan sazan balıklarının (*Cyprinus carpio*) solungaç hücrelerine yaptığı genotoksik etkiyi Comet testi ile incelemişler ve nükleotidleri hasarsız ve hasarlı olmak üzere görsel olarak değerlendirmişlerdir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda; boya ile muamele edilen balık gruplarındaki hasar derecesi (hasarlı hücrelerin yüzdesi) frekansının ($p<0.05$) kontrole kıyasla önemli ölçüde farklı olduğu, dolayısıyla kullanılan asit red boyasının balıklar için genotoksik olduğu sonucuna varılmıştır.

Roopadevi ve Somashekar (2012); tekstil sanayisinden gelen giriş (arıtılmamış) atıksuyu için % 0 (kontrol), 5, 10, 15, 20, 25, 30 (v/v) ve çıkış (% 69.16 verimlilikte arıtılmış) atık suyu için % 0 (kontrol), 20, 30, 40, 50, 60, 70 (v/v) konsantrasyonlarının kullanıldığı statik bir ortamda, ticari öneme sahip bir tatlı su balığı olan sazandaki (*Cyprinus carpio*) akut süreli toksisiteyi değerlendirmişlerdir. Atıksuyun arıtma öncesi ve sonrası 24, 48, 72 ve 96 saatlik LC_{50} değerleri sırasıyla % 25.90, % 21.10, % 15.66, % 11.11 ve % 63.18, % 54.89, % 48.62, % 36.04 (v/v) olarak ölçülmüştür. Maruz kalma süresi arttıkça, LC_{50} değerleri azalmıştır (Örneğin; arıtılmış atıksuyun 96. saatteki LC_{50} değeri % 36.04 iken, arıtılmamış olanda bu değer % 11.11 olmuştur). Arıtılmamış ve arıtılmış atık suyu için, akut toksik birimi ($TU_a = 100 / LC_{50}$) değerlerinin 24, 48, 72, 96 saatler için sırasıyla 3.85, 4.73, 6.38, 8.99 ve 1.58, 1.82, 2.05, 2.77 olduğu belirtilmiştir. Elde edilen TU_a değerleri arıtılmamış atıksuda daha yüksek bulunmuştur. TF (toksikite faktörü)'nin; giriş atık suyu için 1, 1.22, 1.65 ve 2.33, çıkış atık suyu için 1, 1.15, 1.29 ve 1.75 olduğu bulunmuştur. Arıtılmış çıkış suyunun TF değeri, arıtılmamış atıksuyununkinden 1.33 kat daha az bulunmuştur. Arıtılmış olanla karşılaştırıldığında, arıtılmamış atıksuyun göreceli olarak balıklar için daha toksik olduğu gösterilmiştir.

Li ve ark. (2012); tekstil boyamada kullanılan üç farklı direkt boyanın (D-BLL-direct blending rebine, D-GLN-direct blending scarlet, D-3RNL-direct blending yellow) japon balığı (*Carassius auratus*) üzerinde oksidatif strese neden olup olmadığını araştırmışlardır. Balıklar; 100 mg/L boya bileşiklerine maruz bırakılmış ya da buna karşılık gelen 200 µg/kg boya ile enjekte edilmiştir. Sonra SOD, CAT ve malondialdehit (MDA) içeriğinin analizi için, farklı zamanlarda (0.5, 1, 3, 5, 7, 10, 13, 17 ve 22 gün) karaciğer numuneleri toplanmıştır. Farklı

varyasyon eğilimi gösteren ve karaciğerde artış gösteren SOD, CAT ve MDA enzim düzeyleri karşılaştırıldığında, toksisite sırasının D-BLL>D-GLN>D-3RNL olduğu görülmüştür. Böylece bu çalışmada tekstil boyaalarının balık karaciğerindeki antioksidan enzimlerini uyardığı, dolayısıyla da balıklarda oksidatif strese neden olduğu ortaya konulmuştur.

Zhang ve ark. (2012); tekstil fabrikasının ağartma, durulama ve sabunlamadan gelen ve atıksu arıtma tesislerinin farklı evrelerinden toplanan (anoksik-oksik arıtma prosesi) atık su örneklerinin zebra balığı (*Danio rerio*) üzerinde oluşturduğu akut etkiyi değerlendirmişlerdir. SOD ve GST faaliyetlerinde düşüş, GSH ve toplam antioksidant kapasitesi (total antioxidant capacity, T-AOC) miktarında artış gibi oksidatif stres biyomarkerlerinde değişiklikler görülmüştür. Atıksudaki prooksidan bileşiklerin varlığını gösteren MDA miktarında artış bulunmuştur. SOD ve GST etkinliklerinde gözlenen azalmalar, ROS'un aşırı üretilmesi nedeniyle bir sitotoksikite işareti olarak yorumlanmıştır. Negatif kontrollerle karşılaştırıldığında, Comet analizinde, atıksu konsantrasyonu arttıkça (% 5, 10, 20, 30, 50) ortalama Kuyruk Momentinde ve mikronükleus sıklığında artış gözlenmiştir. Mikronükleus testinin sonuçları Comete benzer bir eğilim göstermiştir. Ağartma (hidrojen peroksit) işlemi diğer işlemlerle karşılaştırıldığında en yüksek akut toksisite ile sonuçlanmış ve atıksuyun genotoksisitesi çoktan aza doğru sırasıyla ağartma-sabunlama-durulama-fiber temizleme şeklinde sıralanmıştır. Anoksik-oksik arıtma işlemi sonrası atık suyunda renk ve KOİ, Kanalizasyon Deşarj Standart kriterleri içinde kalarak, sırasıyla % 40 ve % 84 azaltılmıştır. Buna rağmen fizikokimyasal indeksleri uygun aralıkta olan arıtılmış atıksu numunelerinin yüksek toksisite ve genotoksikite sergilediği tespit edilmiştir. Ayrıca arıtılmış atık suyun genotoksisitesi, arıtılmamış atıksuyundan önemli ölçüde farklı olmamıştır. Bu da uygulanan arıtma proseslerinin atıksu içindeki toksik ara maddelerin giderilmesinde etkili olmadığını düşündürmüştür.

Sripriya ve ark. (2014); farklı konsantrasyonlarda (0.5, 1.0 ve 1.5 ppm) hazırlanan sentetik tekstil boyaalarının, kronik süreler (7, 14 ve 21 gün) ile yenilebilir bir tatlı su balığı olan Tilapia'da (*Oreochromis mossambicus*) test etmişlerdir. Kontrol grubuna göre, doz grubundaki balıklarda, iyonik ve osmotik regülasyonda önemli rol oynayan Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Na^{+1} konsantrasyonunda bir azalma, büyümeyi ve metabolizmayı olumlu yönde etkilediği bilinen askorbik asit, folik asit ve lizin gibi esansiyel besinlerin miktarında önemli düzeyde azalmalar olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında karaciğer dokusunda hiperemi (arterier damarın genişlemesi ve/veya kan basıncının artmasından dolayı ya da venüllerdeki kanın kalbe dönüş yapamaması nedeniyle bulunduğu dokuda birikmesinin bir sonucu olarak

dokuların normalden fazla kanlanması durumu), nekroz ve dejenerasyon gibi temel histolojik değişiklikler gözlenmiştir. Atığa maruziyet attıkça, CAT, GST, GR, AST, ALT, LDH gibi antioksidan enzimlerinin aktivitelerinde önemli yükselmeler kaydedilmiştir. Özellikle 21. günde 1.5 ppm konsantrasyon uygulanan balıklarda, antioksidan elemanların ve enzim aktivitelerinin önemli ölçüde değişmiş olduğu belirlenmiştir. Ayrıca proteinde yer alan spektrum bantlarının kontrole göre yapısal değişime uğradığı kanıtlanmıştır. Balıkta meydana gelen bu değişimler, tekstil boyalarının balıklar üzerinde genotoksik/nekrotik olması ile ilişkilendirilebilmektedir.

Agbon ve ark. (2014); TAS'ın ekonomik öneme sahip tatlı su balık türlerinden *Clarias gariepinus* ve *Oreochromis niloticus* üzerindeki olası letal ve subletal etkileri akut süreyle statik yenilenme koşullarını sağlayarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada boya atıksuyunun fiziko-kimyasal parametrelerinin önemli ölçüde ($p<0.05$) farklı olduğu bulunmuştur. 96 saat- LC_{50} değerlerinin *C. gariepinus* ve *O. niloticus*'in yavruları için sırasıyla % 1.70 ve % 1.85; yetişkinleri için ise sırasıyla % 17.58 ve % 4.66 olduğu görülmüştür. Bu veriler ışığında, yavru aşamasındaki balıkların yetişkinlere kıyasla TAS'a daha hassas bireyler olduğu ortaya çıkmıştır. *C. gariepinus*'un yavrular içinde en duyarlı, erişkinler içinde ise en dayanıklı balık türü olduğu bulunmuştur. Boya atık suyunun subletal konsantrasyonlarına maruz bırakılan yetişkin balıkların hematolojik parametreleri (PCV, Hb, RBC, glikoz ve toplam protein) yavrular ile kıyaslandığında anlamlı derecede ($p<0.05$) azalmıştır. TAS'ın balıkların hematolojisini olumsuz etkileyerek, kan değerlerinin azalmasından sorumlu zararlı maddeler içerdiği kanıtlanmıştır.

Banerjee ve ark. (2014); arıtılmamış (ham) (% 40 v/v) ve ultra membran biyoreaktörde (UMBR) arıtılmış TAS'ın yayın balığının (*Heteropneustes fossilis*) karaciğer ve solungaç hücreleri üzerindeki oksidatif stresi ve genotoksik etkileri karşılaştırmalı olarak analiz etmişlerdir. Aktif çamur sisteminin geliştirilmiş bir şekli olan UMBR'den izole edilen bakteriyel konsorsiyum uygulaması (*Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Shigella sp.* ve *E. coli*) ve ultrafiltrasyondan süzülme işlemi sonrasında atıksuda % 98,62 oranında renk giderimi ve detoksifikasyon sağlanmıştır. Periferik kan eritrositlerinde yapılan mikronükleus sayımı ve Comet analizi, ham atıksuyla muamele edilmiş bireylere kıyasla, arıtılmış atıksuya maruz kalan balıklarda nükleer hasarın ve enzim aktiviteleriyle desteklenen oksidatif stres tepkisinin önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Bu da geleneksel arıtma yöntemleri ile birlikte kullanıldığında UMBR ve ultrafiltrasyon yöntemlerinin, atıksu arıtımında yüksek verim

sağlayarak, muhtemel genotoksisiteyi ve oksidatif stresi önlemede etkili olduğunu doğrulamaktadır.

Güngördü ve ark. (2013); altı farklı tekstil boyasının (astrazon red FBL, astrazon blue FGRL, remazol red RR, remazol turquoise blue G-A, cibacron red FN-3G ve cibacron blue FN-R) öldürücü konsantrasyonlarını, statik test koşullarında 168 saat boyunca Afrika pençeli kurbağa (*Xenopus laevis*) yavrularına uygulamışlar ve her bir boyanın subletal etkilerini değerlendirmişlerdir. Erken gelişim evrelerindeki iribaşlar için her bir boyanın 168 saatlik LC₅₀ değerlerinin sırasıyla 0.35, 0.13, 112, 7, 359 ve 15.8 mg/L olduğu tespit edilmiştir. Boyaya maruz kalan iribaşlarda, GST indüksiyonu (uyarımı) veya inhibisyonu ile LDH indüksiyonunun meydana geldiği belirtilmiş, söz konusu boyaların aerobik solunum süreçlerinde meydana gelebilen oksidatif stresi uyardığı bildirilmiştir.

Gupta ve ark. (1983); Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından izin verilen sınırlarda ağır metal (Cu, Cd, Pb, Zn ve Cr) içeren TAS'ın erkek sıçanların (*Rattus norvegicus*) karaciğer dokusu ve üreme sistemi üzerindeki etkilerine dair bir çalışma yapmışlardır. TAS muamelesi gören sıçanların karaciğer dokularında toplam protein, sialik asit ve glikojen miktarının azaldığı tespit edilmiştir. Üreme sisteminde yer alan elemanlardan testis, epididimis ve seminal vezikül ağırlıklarında önemli ölçüde ($p<0.001$) azalmalar gözlenmiştir. Spermatogonya, birincil spermatozoid ve ikincil spermatozoidler sırasıyla % 67.2, 71.1 ve 73.2 oranında azalmıştır. Testislerde sperm sayısı ve sperm hareketliliği azalmış, spermatidlerin üretimi % 70.8 ile inhibe edilmiştir. Sertoli hücrelerinin toplam sayısında ve bu hücrelerin yüzey alanında önemli ölçüde ($p<0.001$) azalmalar görülmüştür. Seminifer tübül ve Leydig hücrelerinin nükleer çapları önemli ölçüde azalmış, Leydig hücrelerinin toplam hacmi azalmıştır. TAS maruziyeti yaşayan erkek sıçanlarda, fertilité (üreme) oranı % 80'e kadar düşmüştür. TAS'ın içerdiği toksik maddeler sebebiyle sıçanların karaciğer dokularında bulunan yapısal organik moleküllerinde üzerinde olumsuz tesir gösterdiği ve sıçanların üreme işlevlerinde birtakım aksaklıklara yol açtığı görülmüştür.

Mathur ve ark. (2003); TAS'ın sıçanların (*Rattus norvegicus*) testis ve karaciğerinde oluşturduğu toksik etkileri histopatolojik ve biyokimyasal yöntemler ile belirlemişlerdir. TAS'ın deney süresinin artışıyla birlikte, sıçan karaciğerinde nekroza, sitoplazmik vakuolleşmeye, hepatosit hücrelerinde dejenerasyona, pinotik çekirdeğe, hepatik bağların bozulmasına, sinüzoidlerin tıkanmasına ve nükleer karyoliziz artışına neden olduğu gözlenmiştir. Testislerde spermatozoaların, spermatidlerin, Leydig hücrelerinin ve ikincil spermatozoid sayısının azalması ile spermatogenezin önlediği bildirilmiştir. Atıksuyla

muamele sonrası, tüm deneysel zaman aralıkları için kontrollerle kıyaslandığında, testis ve karaciğerin her ikisinde de toplam lipid ve toplam kolesterol içeriğinde önemli bir artış olduğu bulunmuştur. Diğer taraftan karaciğerdeki glikojen ve protein düzeylerinin deney süresinin artmasına bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca karaciğer hasarı ve fonksiyon bozukluğu nedeniyle, kolesterolün eşey steroidleri ve safra asitlerine dönüşmesinde inhibisyon meydana geldiği 'hiperkolesterolemia' durumu izlenmiştir.

Sharma ve ark. (2007b); arıtma tesisinden toplanan arıtılmamış (giriş suyu) ve arıtılmış (çıkış suyu) TAS'ın sıçanlar (*Rattus norvegicus*) üzerindeki toksik etkilerini 15 gün süre ile araştırmışlardır. Bu araştırmanın sonucunda TAS'a maruz kalan hayvanlarda RBC, WBC (lökosit), Hb, PCV (paketlenmiş hücre hacmi), MCV (ortalama eritrosit hacmi), MCH (eritrositte bulunan ortalama hemoglobin miktarı) ve MCHC (ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu) değerlerinin kontrole göre önemli ölçüde azaldığı (% 12-46) tespit edilmiştir. RBC boyutunda % 13-27 oranında azalma ve morfolojik anormallik (poikilositoz); buna karşılık, WBC boyutunda % 8-23'lik bir artış gözlenmiştir. AST, ALT, üre, kreatinin ve bilirubin düzeyinde önemli ölçüde artış (% 5-97), ancak kolesterol, glikoz, toplam protein, albümin ve globülin içeriklerinde (% 8-53) azalış kaydedilmiştir. Değerlerdeki değişiklik, arıtılmamış atık su ile muamele edilmiş hayvanlarda daha belirgin olmuştur. Öte yandan atık suya maruz kalan hayvanlar 45 günlük bir süre için içme suyunun sağlandığı kontrol koşulları altında tutulduğunda, kontrollere benzer parametre değerleri göstererek daha hızlı iyileşmiştir.

Priyadarshani ve ark. (2013); arıtılmamış ipek boyası atıksuyunun (% 50 ve % 75 konsantrasyon) swiss albino faresinin (*Mus musculus*) kan profili ve serum kolesterolü üzerindeki toksisitesini uzun dönemde (15, 30, 45 ve 60 gün) değerlendirilmişlerdir. Oral yolla atıksu verilen farelerden alınan kan örneklerinde çalışılan hematolojik parametrelerden RBC, % Hb, PCV, MCV ve MCHC'nin kontrol grubuna kıyasla, tüm maruz kalma süreleri boyunca belirgin bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Bunun aksine, vücudun savunma mekanizmasında yer alan lökositlerin sayısını ifade eden WBC değeri artış göstermiştir. Tekstil boyası atıksuyunun fareler üzerinde toksik yanıt oluşumuna neden olan zararlı bileşenler içerdiği bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Goyal ve ark. (2014); oral yoldan TAS verdikleri farelerde (*Mus musculus*) RBC boyutunda anlamlı bir azalma, WBC boyutunda ise anlamlı bir artış görmüşlerdir. Hb konsantrasyonunda (% 10), RBC (% 8,9), PCV (% 7,4), WBC (% 7,1) sayımlarında azalmalar saptanmıştır. MCH ve MCHC ise sırasıyla % 1.97 ve % 2.57 oranında ve önemli olmayan ölçüde azalırken, MCV ise önemli olmayan ölçüde (% 0.02) artmıştır. Karaciğer

histopatolojisinde mikrositoz (hücre şişmesi) ve makrositoz (hücre boyutunda önemli bir artış) görülmüştür. TAS'ın farelerin hematolojik parametrelerinde anormal düzeyde değişimlere neden olduğu ortaya çıkmıştır.

Kanthariya ve Tank (2015); distile su içinde çözülmüş TAS örneklerini sıçanlara (*Rattus norvegicus*) 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 gün sürelerle 0 (kontrol), 2.5, 10 ve 20 ml/kg/gün vücut ağırlığının doz seviyelerinde oral yoldan uygulamışlardır. TAS muamelesi görmüş deney gruplarının karaciğerlerinde; periportal inflamasyon, hepatoselüler hipertrofi (hücrelerin hacimce artışı nedeniyle bir organ ya da dokunun büyüklüğündeki artış) ve safra kanalı proliferasyonu (yayılması, çoğalması) gözlenmiştir. Hepatoselüler hipertrofisi ve safra kanalı proliferasyonunun '20 ml TAS/kg vücut ağırlığı' doz grubundaki hayvanlarda daha yüksek bir sıklıkta olduğu bulunmuştur. Sıçanların vücut ağırlıkları ve yiyecek tüketimleri 10 ve 20 ml/kg doz gruplarında önemli düzeyde azalmış ve prostat iltihabı 10 ve 20 ml/kg doz grupları için daha yüksek bir sıklıkta kaydedilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında muamele gruplarının kan serumlarındaki trigliserid düzeyleri önemli ölçüde ($p \leq 0.05$) azalmıştır. Sıçanlar için hiçbir yan etkinin gözlenmediği TAS konsantrasyon seviyesi '2,5 ml/kg' olarak kabul edilmiştir.

Demirci ve Hamamcı (2013)'nin yapmış olduğu bir çalışmada; astrazone red FBL boyasının bir mantar türü olan *Phanerochaete chrysosporium*'un antioksidatif savunma sistemi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Deney gruplarında ölçülen CAT, GR, GST ve GSH enzim aktiviteleri, kontrol grubuna kıyasla daha düşmüş ve yüksek konsantrasyonlu grupların (20 ve 50 ppm) her maruz kalma süresi için azalmıştır. Böylece TAS'ın balıklarda olduğu gibi mantarlarda da antioksidan yanıtları teşvik ettiği anlaşılmıştır.

Singh ve ark. (2001); farklı oranlardaki TAS'ın sekiz aylık ağaç fidelerinin (*Acacia nilotica*, *Acacia tortilis*, *Albizia lebeck*, *Azadirachta indica*, *Parkinsonia aculeata* ve *Prosopis juliflora*) büyümesi ve toprağın kimyasal özellikleri üzerine etkisini incelemek için bir saha çalışması yürütmüşlerdir. Bu çalışma sonucunda 'TAS ile sulanan toprakla muamele edilmiş odun külü' ile gerçekleştirilen sulamanın bitki büyümesi için en iyi orana sahip atıksu olduğu tespit edilmiştir (ortalama 6 tür ile 173 cm yükseklik, 138 cm taç çapı ve 28 aylıkken 9,2 cm yaka çevresine sahip bitkilerin elde edildiği atıksu). En fakir büyüme ise 'atıksuyla muamele edilmiş jips (alçıtaşı) ile sulama' muamelesi için gözlenmiştir. Maksimum büyüme *P. juliflora* için kaydedilirken (188 cm yükseklik, 198 cm taç çapı ve 10 cm yaka çevresi), en az büyüme *A. lebeck*'de kaydedilmiştir. Atık su ile sulama, elektriksel iletkenliğin yanı sıra yüzde organik madde artışıyla da sonuçlanmıştır. TAS'ın odun külü ilavesi ile birlikte A.

lebbeck hariç çalışılan diğer ağaç türleri için kullanılmasının bitki gelişimini olumlu etkileyeceği düşünülmüş, bu nedenle kurak bölgelerde sözkonusu bitkilerin (bilhassa *P. juliflora*) başarılı bir şekilde yetiştirilebileceği önerilmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan odun külünün, jips ile karşılaştırıldığında TAS'ın muhtemel olumsuz etkilerini azalmada rol oynadığı desteklenmektedir.

Begum ve ark. (2011); endüstriyel atıksuların sulama amaçlı tarımsal alanlarda kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla bir deney yürütmüşler ve TAS'ın pirinç (*Oryza sativa*) üzerinde etkilerini incelemişlerdir. Tekstil sanayi bölgesinde ardışık iki yıldır tekrarlamalı (x3) olarak süren bu çalışma sonucunda, pirinç bitkileri hazırlanan altı farklı muameleden geçirilmiştir. Altı muamele arasında, 'kirlenmemiş alan + tatlı su' grubu, pirinç üzerinde en olumlu etkiyi göstermiş ve N, P, K ve S besin içerikleri ve bunların alımı bu grupta en yüksek olmuştur. Bitki bu muamele sırasında, her iki büyüme mevsiminde de en yüksek tane verimini vermiştir (1999'da 5.23 ton/ha ve 2000'de 5.40 ton/ha). 'Atıksuyla kirlenmiş alan + kirli su' grubunda ise Zn, Mn, Fe, Cu ve Pb gibi ağır metal içerikleri en yüksek bulunmuştur. Pb oranı en yüksek dozdaki atıksu grubunda maksimum olduğu için, bu atıksu ile muamele gören bitkilerdeki Pb oranı da maksimum bulunmuştur. Atıksu kirliliği arttıkça; atık suda yetiştirilen pirinçte N, P, K ve S içeriğinde azalma, öte yandan Mg, Fe, Cu, Mn, Pb ve Zn içeriğinde önemli ölçüde ve toksik seviyede artmalar görülmüştür. Emilimleri nedeniyle bitkideki ağır metallerin içeriğinde artışlar tespit edilmiştir. Ağır metal birikimindeki artışın temel bitki besinlerinin alımında azalmalara neden olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca kullanılan atık su, toprak verimini azaltmış, dolayısıyla da bitkide kök ve sürgün boyunun kısılmasına neden olmuş, üründe büyüme ve gelişmeyi engelleyerek yavaşlatmıştır. Öte yandan izin verilebilir limitlerdeki ağır metallerin varlığı, en yüksek bitki büyümesiyle sonuçlanmıştır. Bu çalışma yardımıyla ağır metal içeriğinin pirinçte atık su konsantrasyonu ile önemli ölçüde arttığı ve bitkinin büyümesinde ve gelişmesinde önemli rol oynayan temel besinlerin alımını engellediği ve bu inorganik besinlerin emilimi üzerinde antagonistik etkilere sahip olduğu açıkça gösterilmiştir.

Marwari ve Khan (2012); % 20 ve % 30'luk TAS ile muamele ettikleri domates (*Lycopersicon esculentum*) bitkilerinde yaşanan yapısal değişimleri incelemişlerdir. Bu çalışma ile birlikte, bitkideki toplam klorofil içeriğinin atıksudaki metal konsantrasyonu artışı ile ileri derecede etkilendiği ve % 72,44'lük bir azalma gösterdiği ortaya konmuştur. Karbonhidrat, protein ve azot içeriğinin sırasıyla % 46.83, 71,65 ve 71,65'lik bir düşüş gösterdiği saptanmıştır. Ekin hasatı sonrası, TAS'ı alan bitkilerin kök ve sürgün (yaprak ve

dal) uzunluğunda artış, kuru ve toplam kuru ağırlığında ise azalış tespit edilmiştir. % 30 TAS'da yetiştirilen meyve örneklerinin 2.570 mg/g dwt (ölü ağırlık tonajı) Zn, 0.800 mg/g dwt Cu, 1.520 mg/g dwt Cr ve 2.010 mg/g dwt Pb ihtiva ettiği bulunmuştur. Bu ağır metallerin bitki organları tarafından absorbe edilip, biriktirilmesinin en fazla, büyüme aktivitesinin en yoğun olduğu dönemde (çiçeklenmenin pik zamanında) gerçekleştiği izlenmiştir. Böylece TAS'ın domates bitkisinin büyümesi üzerinde olumsuz etkiye sahip ağır metaller içerdiğini desteklenmiştir.

Varma ve Sharma (2012); süt ve TAS'ın her ikisi için % 0 (kontrol), 25, 50, 75 ve 100 konsantrasyonlarını kullanarak buğday (*Triticuma estivum*) bitkisinin büyüme ve gelişmesi üzerindeki etkilerini anlamak için bir çalışma yürütmüşlerdir. Atıksu muamelesi gören tohumlar % 25 konsantrasyonda maksimum çimlenme yüzdesi göstermiş ve konsantrasyon arttıkça çimlenme oranı da kademeli olarak azalmıştır. 48 saat sonra kontrol grubunda % 100 tohum çimlenmesi yaşanırken, minimum toksisite yüzdesinin (% 25) artışı ile birlikte tohum sayılarında azalmalar yaşanmıştır. Bunun da bitki üretiminde azalma ile sonuçlandığı ortaya konulmuştur. Daha düşük konsantrasyondaki (% 10'un altında) atık su, tohum çimlenmesini etkilemezken, daha yüksek atık su konsantrasyonu (% 25'in üstünde) buğdayın tohum kalite parametrelerini azaltmıştır. Tohum çimlenmesi gecikmiş, tohumdaki radikula ve plumula uzunlukları atık su konsantrasyonu arttıkça azalmıştır. Atık suyun dozu arttıkça fide ağırlığı, fide uzunluğu ve tohum sayıları azalmış, ancak bu etkinin TAS'ın kullanıldığı gruplarda daha fazla olduğu bildirilmiştir. Süt atık suyu % 100 konsantrasyonda daha fazla toksisiteye neden olmuştur. TAS'ın süt atıksuyu ile karşılaştırıldığında göreceli olarak daha fazla toksisiteye sahip olduğu ve şiddetli toksisite yanıtı verdiği sonucuna varılmıştır.

Ravi ve ark. (2014); artırılmamış ve çeşitli aşamalarda artırılmış (birincil ve ikincil) TAS'ın kronik sürelerde (20, 40, 60 ve 80 günler) soya fasulyesi bitkisinin tohum çimlenmesi ve fide büyümesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Artırılmış atık suyun, büyüme parametrelerini çok fazla etkilemediği, düşük tuzluluklarda fide başına düşen yaprak sayısının maksimum değerlere ulaştığı saptanmıştır. Öte yandan artırılmamış atık suyun büyümeyi maksimum ölçüde inhibe ettiği bulunmuş, yüksek tuzluluk nedeniyle, mahsülün yaprak sayısında önemli ölçüde azalmalar tespit edilmiştir. 40., 60. ve 80. günlerde TAS'ın, sürgün ve kök uzunlukları üzerinde büyük etkisi olduğu gözlenmiştir. Kontrol bitkileriyle kıyaslandığında, artırılmamış atık su ile muamele edilen bitkilerin yapraklarındaki toplam klorofil içeriğinde bir azalma olduğu görülmüştür. Tohum çimlenme yüzdesinin kontrol grubunda % 96; ham, birincil ve ikincil artırılmış tekstil boya atıksularının uygulandığı deney

gruplarında ise sırasıyla % 12, 56 ve 71 sınırlarında kaldığı tespit edilmiştir. Arıtılmamış atıksuların arıtılmış atıksulara nazaran daha fazla toksik kimyasallar içermesi nedeniyle, bitkinin çimlenme, büyüme ve gelişme parametrelerini olumsuz yönde etkilediği açığa çıkarılmıştır.

Cordova ve ark. (2001); TAS'ın arıtılmasında kullanılan ozonlama sisteminin fizikokimyasal performansını değerlendirmek için ham ve arıtılmış (ozon yöntemiyle) TAS'ın; bakteri (*Vibrio fischeri*), alg (*Scenedesmus subspicatus*), su piresi (*Daphnia magna*), balık (*Poecilia reticulata*) ve bazı bitkiler (soya fasülyesi-*Glycine max*, pirinç-*Oryza sativa* ve buğday-*Triticum aestivum*) üzerindeki genotoksik etkilerini mikronükleus testi ile karşılaştırmışlardır. Her iki TAS için de hiçbir anlamlı genotoksik etki bulunamadığı için, ozonlamanın TAS'ın toksisitesini azaltmada çok fazla etkili olmadığı sonucuna varmışlardır.

Genotoksisite; bir madde (kimyasal ajanlar) ya da ışının (ultraviyole ışınları, X ışınları gibi radyasyon kökenli fiziksel ajanlar) hücrenin genetik materyali olan DNA ya da onun yoğunlaşmış şekli olan kromozomlar üzerinde oluşturduğu zararlı mutajenik etkidir. Bu etki, hücrenin kalıtım maddesi olan DNA molekülünün yapısında meydana gelen kimyasal ve fiziksel bir değişimdir. Bu değişim; anabolizma, katabolizma (O₂'li solunum sonucu oluşan reaktif O₂ metabolitleri), gibi doğal ve endojen nedenlerden ileri geldiği gibi, ekzojen kökenli çevresel faktörlerin etkisiyle de oluşabilmektedir. Genetik bilginin nesilden nesile sağlıklı olarak aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemlidir. DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür ve üzerinde sürekli olarak hasar oluşmaktadır. İnsan DNA'sında her gün yaklaşık 10.000 adet kodlanmayan veya yanlış kodlanan hasar meydana gelmektedir. Hücrede oluşan hasarlar DNA onarım sistemleri tarafından tamamen, eksik ya da hatalı tamir edilmektedir. Eğer eksik ya da hatalı tamir gerçekleşirse; hücre karsinojenlik için potansiyel risk taşır. Eğer hasar, DNA onarım sisteminin kapasitesini aşacak düzeyde çok fazla olursa veya onarım sistemleri yetersiz kalırsa söz konusu hasarlar kalıcı hale gelerek mutasyona, hatta hücre ölümüne (apoptozis) kadar varan etkilere neden olmaktadır (Dinçer ve Akçay, 2000; Andican ve Burçak, 2004; Fidan, 2007). Genotoksik ajanlar DNA ile etkileşime girdiğinde DNA kırıkları gibi modifikasyon yaklaşımlarıyla karşılaşır. Genotoksik ajanların DNA formlarıyla etkileşimi, alkali değişken eklentileri ve diğer değişiklikler, DNA iplikçisindeki kırıkların ve hasarlı nükleotidlerin enzimatik yollar ile kaldırılmasına katkıda bulunabilmektedir. Onarım sistemi enzimatik olarak bu hasarlı nükleotidleri kaldırdığında kırılma düzeyleri azalır. Onarılmadığında ya da yanlış onarıldığında DNA bütünlüğü bozulur ve eğer DNA'nın bütünlüğündeki bu bozulma onarılmamışsa ya da yanlış onarılsa,

mutasyona ve neoplastik dönüşümlere neden olabilmektedir (Deepa ve ark., 2011; Sumathi ve ark., 2001). Genotoksik harabiyete neden olan genotoksinler, temelde yumurta ve sperm gibi üreme hücrelerini etkilediği için, gelecek kuşaklara aktarılabilir. Genotoksik ajanlar; sarmal DNA'nın tek ya da çift zincirinde kırıklar oluşturma, nükleotidlerde tek ya da çok değişiklik meydana getirme, genin fonksiyonunu değiştirme ya da kaybetme, DNA zincirinin kırılıp, farklı bir DNA molekülüne katılması anlamına gelen rekombinasyon gibi sonuçlar doğurabilmekle birlikte hücre apoptozise de yönlendirilebilmektedir. Hatta genotoksik faktörler, vücuttaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesiyle sonuçlanan kansere neden olabilmektedir. DNA hasarının; yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immun sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi doku fonksiyonlarının bozulması ile ortaya çıkan hastalıkların etiolojisinde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (Ames ve Shigenara, 1992; Halliwell ve Dizdaroglu, 1992; Kılınç ve Kılınç, 2002). Son yıllarda genetik hastalıkların ve kanser vakalarının sayısında görülen önemli derecedeki artışın temelinde de insanların günlük hayatta çok sık maruz kaldığı ksenobiyotikler yatmaktadır. Günümüzde yapılan bilimsel araştırmalar günlük yaşamda sıkça karşılaştığımız pek çok ürünün DNA hasarında rol oynadığını ileri sürmektedir. Genotoksikiteye neden olan faktörler arasında; gıda katkı maddeleri tarım ilaçları (DDT gibi pestisidler, insektisitler), makyaj malzemeleri, kozmetik ürünler, temizlik ürünleri, sigara, bazı çevresel kirleticiler, nanomateryaller, bazı plastikler, poliaromatik hidrokarbonlar (PAH), ağır metaller, sanayi kimyasalları, mantar (miko) küflerindeki aflotoksinler ve bazı ilaçlar gösterilmektedir (Ayar ve Uysal, 2013). Genotoksik ajanların etkilerinin genelde hücre ve doku için spesifik olmasından dolayı, DNA hasarının bir ifadesi olan kromozomal parçalanmayı ortaya çıkarabilen tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Genotoksik hasarın tespiti için güvenilir ve pratik çok sayıda inceleme yöntemleri kullanılmaktadır. Bunların başında diğer analizlere kıyasla daha basit, hızlı, hassas ve düşük maliyetli olmasıyla bilinen 'Comet tekniği' gelmektedir. Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında Comet'in sucul organizmaların biyoizleme çalışmalarındaki yaygın kullanımının en büyük nedeni olarak kimyasallara daha fazla duyarlılık göstermesi gösterilebilir. 'Microgel electrophoretic technique' olarak da adlandırılan, yaygın olarak 'Comet assay' (kuyruklu yıldız deneyi) ismiyle bilinen SCGE (single cell gel electrophoresis, tek hücre jel elektroforezi), ilk olarak Singh tarafından 1988'de ortaya atılmış olup, gerçekte nötr Comet tekniğinin, alkali olarak geliştirilmiş bir versiyonudur. Genotoksikitenin belirlenmesinde kullanılan Comet, hücre düzeyinde DNA hasarını saptamak ve miktarını belirlemek için uygulanan bir floresan mikroskopik yöntemdir (Fairbain ve ark., 1995; Pandrangi ve ark., 1995; Mitchelmore ve Chipman, 1998; Cotelle ve Ferard, 1999; Rojas ve ark., 1999; Lee ve Steinert, 2003; Frenzilli

ve ark., 2009). Nötral şartların sağlandığı Comet tekniği, yalnızca çift sarmal kırıklarının tespit edilebilmesi ve proteinlerin tam olarak uzaklaştırılmaması nedeniyle günümüzde tercih edilmezken; alkali ortamda gerçekleştirilen alkali Comet tekniği ise, DNA'nın hem tek hem de çift sarmalındaki kırıklarını ortaya çıkarması bakımından son yıllarda önem kazanmıştır. Çünkü DNA'da hasar oluşturan ajanların çoğu, DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Tek zincir kırıkları genotoksisitenin direkt bir göstergesidir ve alkali Comet analizi ile etkili bir şekilde değerlendirilebilir (Sardas ve ark., 1998; Ünal, 1998). Çekirdeksiz hücreler üzerine hiç yapılmamış olan Comet yöntemi; düşük düzeydeki DNA hasarlarını gösterebilmesi, az sayıda hücre ile analizin gerçekleştirilebilmesi, fazla ekipman gerektirmediği için, maliyetinin düşük ve ekonomik olması, fazla zaman almadan, kısa sürede gerçekleşmesi, kolaylıkla uygulanabilmesi, değişik hücre tipleri ve doku grupları ile çalışılabilmesi, neredeyse tüm ökaryotik hücrelere kolaylıkla uygulanabilmesi, sonuçların birkaç saat içinde elde edilip hızlıca değerlendirilebilmesi, radyoaktif işaretleme gerektirmediğinden güvenli ve güvenilir olması gibi pek çok nedenle giderek yaygınlaşan bir kullanım alanı bulmaktadır. Kimyasalların genotoksisitesini belirleyici olarak kullanılan ve duyarlılığı yüksek olan bu teknik, histopatolojik olarak ya da diğer genotoksik belirleme yöntemleri ile ortaya çıkarılmayan çok düşük seviyedeki DNA hasarının büyüklüğünü direkt gösterebilmektedir. Öyle ki Sumathi ve ark. (2001) yapmış oldukları bir çalışmada, doz grubundaki balıklarda, mikronükleus sıklıklarında önemli bir değişme gözlenmeyen eritrositler üzerinde uyguladıkları Comet yönteminin pozitif sonuç vermesi üzerine, Comet'in klasik mikronükleus testinden daha duyarlı olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca Comet analizinde kullanılacak kromozomların boyut ve sayısının önemli olmaması ve mitotik aktivitenin gerekli olmaması, bu tekniği avantajlı kılmaktadır (Singh ve ark., 1990; Sumathi ve ark., 2001). Öte yandan metabolik oran ve metabolik gösterge sıcaklıkla önemli dalgalandığından, mitotik olarak aktif olan dokunun izole edilmesi güçtür. Dahası bu teknikte kullanılan agaroz konsantrasyonu, yüklenen hücre miktarı, elektroforez süresi gibi uygulama aşamalarındaki bazı farklılıklar farklı sonuçlara yol açabilmektedir. Aynı protokolü uygulayan farklı laboratuvarların sonuçları da farklı olabileceğinden sonuçların güvenilir olması için Comet sayımının deneyimli bir kişi tarafından gerçekleştirilmesi ve başından sonuna kadar aynı kişi tarafından yürütülmesi gereklidir (Sumathi ve ark., 2001; Forchhammer ve ark., 2008). Comet analizi ilk önce ekotoksikolojik çalışmalar için uygulanmış, *in vivo*, *in vitro* ve *in situ* maruziyetler arasından sucul hayvanlarda DNA zincir kırıklarını belirlemek için popüler testlerden birisi haline gelmiştir. DNA hasarının Comet deneyi ile analizi, geniş bir aralıktaki kirleticilerin düşük konsantrasyonuna maruz kalan sucul hayvanlardaki genotoksik

etkiyi belirlemek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. DNA zincir kırıklarının özellikle Comet analizi ile ölçülerek, balıkta ve diğer sucul türlerde genotoksisitenin biyomarkeri olarak davrandığı bildirilmiştir. Kızılgerdan, güneşbalığı, sert kafalı kedi balığı ve sazan balığı gibi balıklarda *in vivo* Comet verileri gözlenmiştir. Comet balıkların yanında midye, amfibi, deniz aslanları gibi organizmaları kullanarak bu organizmalara ait çeşitli dokuların mutajen içeren çevresel su örneklerine karşı duyarlı olduğunu göstermiştir. Comet testi ile DNA parçalanması bu canlıların yanı sıra insan için de gözlenmiştir (Fairbairn ve ark., 1994; Al-Sabti, 1995; Fairbairn ve ark., 1995; Pandrangi ve ark., 1995; Ralph ve Petras, 1996; Steinert, 1996; Mitchelmore ve Chipman, 1998; Cotelle ve Fierard, 1999; Tice ve ark., 2000; Lee ve Steinert, 2003; Rajaguru ve ark., 2003; Ohe ve ark., 2004; El-Zein ve ark., 2006; Díaz ve ark., 2009). Belirli hücre ve dokularda biyobirikimin ya da genotoksisitenin izlenmesi, tüm vücut analizinden daha iyi temel teşkil etmektedir. Bu nedenle balıkların karaciğer, sperm, kan, solungaç gibi pek çok hücre çeşidi için çeşitli testler uygulanmaktadır. Balık kanı; hücre sayısının fazla olması, hücrelerin bulunduğu kan sıvısından kolayca izole edilebilmesi, homojenizasyon için belirli işlemlere ihtiyaç duyulmaması ve nükleuslu eritrositler içermesi nedeniyle en fazla tercih edilen doku olmuştur. Balıktaki DNA hasarının Comet deneyi kullanılarak değerlendirilmesi, hazır bulunması ve toplama kolaylığı açısından sıkça eritrositleri gerektirmektedir. Kan, çevresel toksik maddelere karşı birincil hedefidir. Kirletici maddelerin eritrosit membranının geçirgenliğini tahrip ettiği, eritrosit morfolojisinde şekil ve boyut açısından değişiklik meydana getirdiği, hücre zarının yapı ve fonksiyonu üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Ray ve ark., 1990; Pandrangi ve ark., 1995; Moretti ve ark., 1998; Udden, 2000; Suwalsky ve ark., 2004). Comet tekniğinin genotoksik, karsinogenik ve mutajenik maddelerin genetik materyal üzerindeki etkisini ve bireylerin bu kimyasallara vereceği genetik cevabı önceden belirleyerek ortaya çıkarması bakımından çok çeşitli uygulama alanları vardır: İlaçların piyasaya sürülmeden önce hastalar üzerindeki toksik etkisini ve güvenilirliğini araştırmak; sperm kalitesini test ederek bu sayede fertilizasyon şansını önceden tahmin etmek, embriyonun maruz kalabileceği riskleri belirlemek, tiryakilerde sigaranın DNA üzerindeki etkilerini gözlemek, kadınlarda menopoz sonrası hormon tedavisini incelemek; beslenme, yaşlanma, egzersiz gibi biyolojik süreçleri izlemek, genetik hasar ile hastalıklar arasındaki ilişkileri belirlemek, ekotoksikolojik çalışmalarda çevresel değişikliklerin canlı sistemlerdeki etkisini belirlemek; bitkisel moleküllerin antioksidan özellikleri olup olmadığını araştırmak (antioksidan, kanser diyabet gibi hastalıkların temelinde yatan oksidatif hasarı önleyen ya da sınırlayan maddeler); bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısını koymak; diabetes mellitus, katarakt polikistik over sendromu,

alzheimer gibi hastalıklarda artmış DNA hasarını göstermek, metabolizma bozuklukları ve kanser gibi hastalıkları klinik belirti vermeden önce tarayarak hastalığa yatkın bireyleri saptamak ve gerekli önlemlerin alınmasını sağlamak, genetik toksikolojide, kanser hastalarında DNA hasarının derecesini artışı ve tamirini hızlı test etmek, kansere duyarlılığı tayin etmek, kanserden korunma ve tedavisini takip etmek; hipoksi, O₃ ve kemoterapi etkilerini değerlendirmek; UV ışınlarının neden olduğu ve cilt kanseriyle yakından ilişkili olan pirimidin dimerlerinin varlığı ve sıklığını, UV spesifik endonükleazlar kullanarak belirlemek gibi alanlarda önem kazanmaktadır. Hasarlı DNA taşıyan spermlerin Cometle tespiti; fertilizasyon yeteneğindeki azalmaya bağlı olarak implantasyon öncesi embriyo ölümü ve anormal embriyo gelişiminin önüne geçilmesine imkân sağlamıştır. Sperm DNA'sında oluşabilecek yüksek hasarın gebelik oluşturma şansını düşürdüğü göz önüne alındığında Cometin tıp dünyası için harikulade bir biyoizlem testi olduğu yadsınamaz bir gerçektir (Kleiman ve Spector, 1993; Betti ve ark., 1994; Alapetite ve ark., 1997; Anderson ve ark., 1998; Collins ve ark., 1998; Dinçer ve ark., 2002; Kruman ve ark., 2002; Dinçer ve ark., 2003; Kadioglu ve ark., 2004; Migliore ve ark., 2005; Dinçer ve ark., 2005; Yeni ve ark., 2010). Comet Assay Protokolü sırasıyla sekiz adımdan oluşmaktadır. Bunlar; 1. Materyalin hazırlanması, 2. Lamaların hazırlanması, 3. Lizis İşlemi, 4. Elektroforez tamponu uygulaması, 5. Elektroforez işlemi, 6. Nötralizasyon, 7. Boyama işlemi, 8. Hücre sayımı ve değerlendirme (Koçyiğit ve ark., 2005). Comet yönteminde; organizmalardan elde edilen dokulardan izole edilmiş hücreler mikroskop lamı üzerindeki agaroz jel üzerine gömülür. Lizise uğratarak sitoplazma ve nükleus zarları patlatılan hücrelerden açığa çıkan DNA zincirleri, alkali (bazik) pH'da oluşturulan elektriksel bir alanda yürütülerek elektroforez edilir. Hasarsız hücrelerde bulunan sağlam DNA'lar, elektroforezde bütünlüğünü kaybetmeden yürürken, kuyruk oluşturmamaktadır. Diğer yandan çeşitli genotoksik ajanlarla hasar alan bozuk DNA'lar kendini tamir mekanizmalarıyla onaramadığında, hasarın derecesine göre farklı boyut ve sayılarda parçacıklara ayrılmaktadır. Farklı molekül ağırlık ve elektrik yüklerine sahip kırık DNA fragmentleri ise katottan anota doğru farklı hızlarda hareket ederek, çekirdek dışına çıkmakta ve çekirdek çevresinde adeta bir kuyruk görüntüsü oluşturmaktadır. Yönteme ismini veren 'Comet' de zaten bu kuyruklu yıldız görüntüsünden kaynaklanmıştır. Hasarsız DNA'nın toplandığı baş ve hasarlı DNA'nın saçıldığı yer olan kuyruk kısımlarının ölçülerek karşılaştırılması da genetik bozulmanın ölçüsünü belirlemektedir. Göçün uzunluğu DNA kırığının miktarını belirtir ve DNA hasarı el mikroskobu ve bilgisayarlı görüntü analizi ile birlikte tahmin edilebilir. Comet formasyonu için DNA'nın yalnızca 1 mm oranında ilerlemesi yeterli sayılmaktadır. Doğal DNA zincir kırıklarının yanı sıra kesip-çıkarma

onarımı sırasında oluşan geçici zincir kırıkları da elektroforezde DNA göçünü arttırmaktadır (Ostling ve Johanson, 1984; Singh ve ark., 1988; Olive ve ark., 1990; McKelvey ve ark., 1993; Fairbairn ve ark., 1995; Kobayashi ve ark., 1995; Rojas ve ark., 1999; Horoz ve ark., 2006). Bu tez çalışmasında kullanılan 'Kameram Comet Assay' otomatik olarak cometleri bulan, Cometin 19 farklı özelliğini ölçebilen, doğru ve güvenilir bir bilgisayar programı olup, genetik hasar derecesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan Comet ölçüm parametreleri 'Kuyruk % DNA ve Olive Kuyruk Momenti'dir.

Kelime anlamı 'ayrılarak düşmek' olan 'apoptozis' vücutta ihtiyaç duyulmayan veya anormalleşmiş hücrelerin programlanmış ölümü demektir. 'Hücre intiharı' da denen bu fizyolojik olay, organizmanın yaşam döngüsü için gerekli ve oldukça da yararlıdır. Zira çok hücreli canlıların genetik belleğinde yer alan intihar programları sayesinde, vücudun sağlığı için zararlı ve yaşlanan hücreler ayıklanarak yerine yenilerinin gelmesi sağlanmaktadır. Ayrıca vücudun sağlığı için zararlı olan DNA'sı hasar görmüş hücreler de bu sayede yok edilebilmektedir. Yunanca 'ölü' anlamına gelen apoptozis, hem gelişme sırasında hem de gelişme sonrasında meydana gelen normal bir olaydır. Bu olay, gelişme ve yaşlanma sırasında dokuların yeniden şekillenmesinde önemli ve kaçınılmazdır (Searle ve ark., 1982; Von Wangenheim ve Peterson, 1998). Kuyruksuz kurbağaların metamorfoz sırasında kuyruğunu kaybetmesi, insanın embriyonik gelişim sırasında parmakları arasındaki perdelere yok edilmesi, böceklerin metamorfoz geçirmesi, dişi fetüste wolf erkek fetüste müller kanalının körelmesi, doğum sonrası uterusun küçülmesi, insan embriyosunda göz kapakları arasındaki boşluğun şekillenmesi, kadında adet döngüsünde uterusun iç katmanındaki endometriyal hücre tabakasının yıkılması, tümoral hücrelerin ortadan kaldırılması, virüsle enfekte olan hücrelerin öldürülmesi, enfeksiyona uğrayan hücrelerin T lenfositler tarafından etkisiz hale getirilmesi, omuriliğin şekillenmesi gibi pek çok durumda apoptoz olayına rastlanmaktadır. Toksik ajanlar nedeniyle hücrelerde meydana gelen apoptoz olayı, kanser hücrelerinin ortadan kaldırılması için önemli bir işlemdir (Guchelaar ve ark., 1997). Hatalı genlere sahip olan hücrelerin, üretiminin engellenmesi için, bu hücreler aktive edilen DNA endonükleaz enzimleri tarafından parçalanır. AIDS (HIV virüsü), alzheimer, parkinson gibi hastalıklarda doku hücrelerinde apoptoz görülmesi, hasarlı ve mutajenik hücrelerin ortadan kaldırılması amacına yöneliktir. Ancak tümör hücreleri apoptoza karşı dirençli olduğundan, yok edilmesi oldukça güçtür. Bu yüzden kanserleşmiş doku ve hücrelerin DNA'sı, radyasyon ya da kimyasal maddelerin (kemoterapi) kullanımı ile ağır bir şekilde hasara uğratılmaktadır. Yaşlanma ve yaşa bağlı bozukluklarda apoptoz çalışmanın önemi pek çok bilim adamı

tarafından kabul edilmiştir. Hücrelerde apoptoz oranı yaşla birlikte artmakta ve apoptoz yaşa ilişkin pek çok hastalıkta önemli bir faktör olabilmektedir. Apoptoz; alzheimer, parkinson ve amiyotropik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların nedeni olabilmektedir. Enfeksiyonlara karşı savaşmada önemli olan T lenfositlerin azalmasından apoptoz'un sorumlu olduğu düşünülmektedir (Orrenius, 1995; Gorman ve ark., 1996; Temlett, 1996; Singhal ve ark., 1997; Warner ve ark., 1997; Aggarwal ve Gupta, 1998; Aguila ve ark., 1998; Sabbah ve Sharov, 1998; Tomei ve Umansky, 1998). Glikoz, aminoasit, oksijen gibi besinlerin yokluğu, Ca^{+2} artışı, büyüme hormonunun hücreden geri çekilerek azalması ve tüm bu işaretler ölüm sinyallerini devreye sokmakta ve apoptozu mümkün kılmaktadır. Plazma zarındaki ölüm reseptörleri dış ortamdan gelen sinyalleri algılayarak hücre içine iletir. Mitokondrinin dış zarı şişerek patlar, iç ve dış zar arasındaki proteinler sitoplazmaya geçer. Sitokrom c enzimi bu durumdan olumsuz etkilenir. Endoplazmik retikulum bozulur. Hücre iskeletinin yıkımını sağlayan proteaz enzimleri aktifleşir. Hücrede yeni proteinler sentezlenir. Hücre membranı büzülerek kıvrılır ve katlanır, dolayısıyla hücre boyutça küçülür. Sitoplazma, çekirdek ve kromatin iplikçik yoğunlaşır. Enerji üretimi, genetik materyal ve metabolizma işlevi bozulur. Tüm bu apoptotik olaylar birkaç dk. içinde son bulurken, hücre kendi ya da komşu hücrelerin lizozomları vasıtasıyla parçalanır ya da diğer hücreler tarafından endositozla 12-18 saat içinde fagosite edilir. Genotoksik ajanlarla DNA'sı hasara uğratılmış hücrelerde oluşan DNA kırıklarının önemli bir kısmı apoptotik veya nekrotik nedenlerle oluşmaktadır. Oluşan apoptoz veya nekroz kaynaklı DNA hasarı, Comet assay'da DNA fragmentlerinin elektroforez sırasında hücreden dışarıya göç yapmasından dolayı gözlenemeyeceğinden, gerçekte Comet assay'in modifiye edilmiş bir versiyonu olan 'DNA difüzyon assay' adında bir yöntem tercih edilmektedir. Bu yöntemde lamlar tıpkı Comet assay'de tanımlandığı gibi hazırlanmakta, sadece elektroforez kısmı atlanmaktadır. Comet'e benzer şekilde sırasıyla yedi aşamadan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla; 1. Materyalin Hazırlanması, 2. Lamaların Hazırlanması, 3. Lizis İşlemi, 4. Elektroforez Tamponu Uygulaması, 5. Nötralizasyon, 6. Boyama İşlemi, 7. Hücre Sayımı ve Değerlendirme şeklinde sıralanabilir. Diğer yöntemler ile kıyaslandığında 'DNA difüzyon' testi, tek tip hücrelerde apoptozu tahmin etmek için basit, hassas, güvenilir ve hızlı bir yöntemdir. Deney, agaroz ile hücrelerin karıştırılması ve mikroskopik lam üzerinde mikro jelin yapılmasını gerektirir. Daha sonra gömülmüş hücreler agaroz içinde küçük molekül ağırlıklı DNA'nın difüzyonuna izin vermek için tuz ve deterjan ile liziz edilir. Tüm apoptotik hücreleri ortaya çıkarmak için, liziz sonrası alkalın muamelesinin kullanımı çok önemlidir. Apoptotik hücrelerin yaklaşık % 40'ı alkalın işlemi aşaması olmadan tespit edilememiştir. Öyle ki lize edilmiş kontrol örneklerindeki apoptotik hücre yüzdesi, lize edilmiş ve alkali ile

muamele görmüş kontrol örneklerinde apoptotik hücrelerin yüzdesinden nisbeten daha düşüktür. Son olarak DNA, yoğun ve hassas floresan boya olan YOYO-1, DAPI (4,6-Di Amidino-2-Pheny Indoldilaktat) ya da EtBr ile görüntülenir. 180 bp'lik küçük nükleozomal boyutlu DNA fragmanlarının tespit edilmesinde gösterdiği yüksek duyarlılık gözönüne alındığında, YOYO-1'in DNA Difüzyon Testi için en uygun ancak en pahalı floresan boya olduğu bilinmektedir. Doza bağlı artış gösteren apoptotik ve nekrotik hücrelerin sayısının tespiti için laboratuvar çalışmalarında, daha ekonomik bir boya olan EtBr kullanılmaktadır (Singh, 2000a; Gichner ve ark., 2005). Hücre ölümünün ilk aşamalarında, yüksek molekül ağırlıklı DNA'nın parçalanması ile üretilen düşük molekül ağırlıklı DNA fragmanları göç artışına katkıda bulunur. Bununla birlikte hücre ölümü ilerledikçe, oluşan çok daha küçük DNA parçaları Comet analizi sırasında hücrelere uygulanan liziz ve elektroforez aşamaları sırasında kaybolduğu için elektroforezde DNA göçünü azaltabilir. İşte DNA difüzyon testi, Comet deney sonuçlarının yorumlanmasını etkileyecek DNA fragmentasyon kaynaklı sitotoksik ölçümler için duyarlı bir testtir (Vasquez ve Tice, 1997). Bu yöntem, apoptoz ve nekroz sırasında oluşturulmuş ve elektroforez sırasında agaroz matrisi içinde difüze olmuş düşük molekül ağırlıklı DNA parçalarının belirlenmesinde önem taşımaktadır. Apoptotik ve nekrotik çekirdek arasındaki yapısal farklılıklara dayanan DNA difüzyon assay, nekrotik hücrelerden apoptotik olanları ayırt etmek için kullanılmaktadır. Sağlam DNA, ışık halkası genel görünümü veren yoğun merkezi bir bölge ile tanımlanırken, hasarlı ve tanecikli DNA merkezi bölgenin etrafında dairesel bir görüntü ile karakterize edilir. Apoptotik hücre çekirdeği, DNA'nın yüksek dağılımının bir sonucu olarak, ana çekirdek çapından 3 kat daha büyük belirgin bir çapı vermektedir. Difüzyon tekniğinde test edildiğinde, apoptotik hücre çekirdeği, agaroz içine difüze olmuş nükleozomal boyutlu DNA kırıkları nedeniyle herhangi bir net sınır olmadan bulanık, puslu veya tanımlanmamış bir anahata sahiptir. Buna karşılık nekrozis nedeniyle difüze olmuş çekirdek DNA'sı nisbeten temiz, homojen ve dış sınırı iyi tanımlanan net bir görünüm göstermektedir. Çünkü nekrotik hücreler, apoptotik hücrelerdeki daha küçük fragmentlerin olduğu kadar difüze olamayan daha büyük boyutlu DNA fragmentleri içermektedir. Bu özellikleri sayesinde apoptotik hücreler, nekrotik hücrelerden ayrılmaktadır. DNA difüzyon deneyinden elde edilen veriler, Comet assay verilerinin daha sağlıklı yorumlanmasına katkı sağlamaktadır. Bu amaçla DNA difüzyon testi, DNA hasarını belirlemek için Comet assay ile birlikte tamamlayıcı bir araç olarak kullanılmalıdır (Singh ve ark., 1988, 1990; Singh, 2000a,b; Diaz ve ark., 2009; Frenzilli ve Brett, 2013; Frenzilli ve Lyons, 2013). Ağır metaller, organoklorinler ve PAH gibi çevresel deniz kirleticileri apoptoza neden olabilmektedir (Steinert, 1996; Salas ve Burchiel, 1998; Shenker ve ark., 2000; Shin ve

ark., 2000; Waalkes ve ark., 2000; Frenzilli ve ark., 2004). Bazı çevresel çalışmalardan elde edilen sonuçlar, apoptozun belirlenmesinde DNA difüzyon assay'in kullanılması için umut verici olmuştur (Nigro ve ark., 2002; Frenzilli ve ark., 2004; Singh, 2005; Del Barga ve ark., 2006). Díaz ve ark. (2009); takımadalarda yakalanan deniz memelilerinden şişe burunlu yunusların (*Tursiops truncatus*) periferik kan lökositlerindeki DNA hasarını Comet ve DNA difüzyon analizleri ile ölçerek tespit etmişlerdir. Lökositlerdeki DNA zincir kırılmaları ile kan serumundaki Cu düzeyleri arasında zayıf, ama anlamlı korelasyon bulunmuştur. Lökositlerde oluşan DNA hasarının deniz kirleticilerinden (ağır metaller) kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Oluşan DNA kırıklarının yaklaşık üçte birinin (~% 29) nekrotik/apoptotik nedenlerle ortaya çıktığı gösterilmiştir. % 23'e karşılık gelen ortalama Kuyruk % DNA'nın hasarsız çekirdekler için belirtilen sınırdan (% 20) biraz daha yüksek olduğu belirtilmiştir. DNA hasarının, yunus yaşı ile önemli ölçüde arttığı ve dişilere göre erkeklerde anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür. Hücre ölümünün izlenmesi için önemli bir potansiyele sahip olan DNA difüzyon deneyi kullanılarak apoptotik hücreler saptanabilmektedir. Bu teknik, insan ve yaşayan diğer organizmalar için beslenme, yaşlanma ve çeşitli çevresel saldırıların etkilerini keşfetmek için değerli bir araçtır. Bu tekniğin aynı zamanda kanser tedavisinin verimliliğini izleme ve farklı organlarda gelişim sırasında apoptozun gözlenmesinde faydalı olduğu kanıtlanabilmektedir (Singh, 2000a). Öte yandan diğer araştırmacılar bu deneyi kullanırken apoptotik ve nekrotik hücreler arasında ayırım yapmakta zorlanmaktadır. Apoptozis için; kromatin yoğunlaşması, tek bir hücreden apoptotik cisimlerin (her biri uygun bir hücre zarı ile çevrili çekirdeğin parçalanmış bir parçasına sahip) oluşumu, sitoplazma büzülmesi ve düzensiz anahat gösteren plazma membran kabarcığı gibi hücrenin morfolojik özelliklerine bakılabilir. Erken apoptotik hücreler, apoptozun bu klasik özelliklerini göstermeyebilir. Geç apoptotik hücreler ise küçük boyutlu ve son derece yoğun kromatin oluşumları nedeniyle ışık mikroskobu ile tespit edilemeyebilir (Searle ve ark., 1982; Gichner ve ark., 2005). DNA difüzyon tekniğinde; hipertermi, H₂O₂, mitoksantron (bir topoizomeras II inhibitörü), novobiosin (bir topoizomeras I inhibitörü), sodyum askorbat, düşük dozlardaki iyonlaştırıcı radyasyon ışınları (X-ışınları) gibi bilinen bazı apoptoz ve nekrozu indükleyici ajanlar kullanılmış ve bu uyarıcı ajanlara maruz kalan MOLT-4 (apoptozu incelemek için kullanılan insan lösemi T-hücresinden türetilmiş bir hücre hattıdır) kültür hücrelerinde apoptozun teşvik edildiği doğrulanmıştır. Böylece DNA difüzyon testinin duyarlılığı, normal hücrelerden apoptotik hücreler oluşturularak doğrulanmıştır. Apoptotik hücrelerin, bulanık bir dış sınır ile granül DNA'nın bir ışık halkasını gösterdiği farkedilmiştir. Öte yandan hipertermi işlemlerinden ortaya çıkan nekrotik hücrelerde, açık bir şekilde tanımlanmış sınırı olan

normalden büyük bir homojen çekirdek gözlenmiştir. DNA difüzyon testinin apoptotik hücrelerin tahmini için doğru ve basit bir metot olduğu kanısına varılmıştır (Minowada ve ark., 1972; Alnemri ve Litwack, 1990; Gorczyca ve ark., 1993; Peitsch ve ark., 1993; Ray ve ark., 1994; McClain ve ark., 1995; Yanagisawa ve ark., 1995; Nakano ve ark., 1997; Nakano ve Shinohara, 1999; Vial ve ark., 1997; Zhao ve ark., 1999; Singh, 2000a). Gichner ve ark. (2005); 6 ve 10 mM H₂O₂ (30 dk.), 20 mM EMS (2-24 sa.) 0.5 U DNase I (Deoksiribo Nükleaz-I) (1 dk.) genotoksinlerinin, 50°C ısı (1-15 dk.) altında, tütün fidelerinin kök ve yaprak dokularında yol açtığı genotoksik etkiyi DNA difüzyon testini kullanarak gözlemlenmişlerdir. Muamele sonrası doz gruplarındaki hücrelerde ortalama nükleer alanın büyüdüğü farkedilmiştir. Eşzamanlı gerçekleştirilen negatif kontroller ile karşılaştırıldığında, apoptoz ve nekroz sırasında oluşan fragmanların deney gruplarında anlamlı sayıda olduğu düşünülmüştür. Apoptotik DNA parçalanmasını uyaran DNaz ile nekrotik DNA parçalanmasını temsil eden ısı uygulamaları sonrası, her iki tütün hücre çekirdeği yapısında yalnızca çok ufak farklılıklar bulunmuştur. Bu da DNA Difüzyon testinin, bitki hücrelerinde DNA hasarına neden olan çeşitli genotoksinlerin apoptotik ve nekrotik DNA parçalanması arasındaki farklılıkları ortaya koymada yetersiz kaldığını ortaya koymaktadır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Araç ve Gereçler

Cam malzemeler

Beher

Cam çubuk

Erlenmayer

Lam (26x76 mm)

Lamel (24x60 mm)

Aletler

Akvaryum düzeneği (30x60x40 cm)

Bilgisayar (Windows XP ve daha üstü)

Buzdolabı (Vestel)

Buz makinesi (Scotsman)

Elektroforez tankı (Scie-Plas)

Ependorf (polipropilen tüp) (1 ml, 500 µl)

Floresan mikroskopu (Olympus BX51TF)

Fotoğraf makinesi-Kamera (Canon A640)

Güç kaynağı (Cleaver Scientific)

Hassas dijital terazi (Mettler Toledo)

Heparinli şırınga (1 ml) (0,45x13 mm) (Set Medikal, GmbH)

Manyetik karıştırıcı-ısıtıcı tabla (IKA RCT classic)

Mikrodalga fırın (Arçelik)

Pipet ve otomatik mikro pipetler (Axypet)

Su banyosu (Elektro-Mag)

2.2. Kullanılan Solüsyonlar

dH₂O (distile su)

DMSO (Dimetil Sülfoksit) (Prolabo) (K40377143945)

EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik asit) (Sigma Aldrich) (E5134-500G)

EtBr (Etidyum Bromür) (Sigma Aldrich) (46065-1G)

HMA (High Melting Agarose, yüksek kaynama dereceli agaroz) (Applichem) (A2115,0100)

LMkumaşA (Low Melting point Agarose, düşük erime noktalı agar) (Applichem)

(A2114,0100)

MS 222 (Tricaine Methanesulfonate) (Aldrich Chemistry) (E10521-10G)

NaCl (Sodyum Klorür) (Merck KGaA) (S7653-1KG)

NaOH (Sodyum Hidroksit) (Sigma Aldrich) (B612662619)

PBS (Phosphate Buffered Saline, Ca⁺², Mg⁺², free Fosfat Tamponu) (Sigma-Aldrich) (P-5368)

Trisma Base (Sigma Aldrich) (T5941-500G)

Trisma HCl (Sigma Aldrich) (T1378-500G)

Triton-X (Sigma Aldrich) (A4975, 0100)

2.3. Kot Yıkama Atık Suyu

Yıkama işlemi öncesi boyanan ve dikimi tamamlandıktan sonra çeşitli kimyasal yıkama işlemlerinden (ön yıkama, esas yıkama, buz yıkama, enzim yıkama, yumuşatma) ve son olarak tint boyamadan geçirilen arıtılmış atıksu, İstanbul'un Güngören ilçesinde lokalize olmuş orta ölçekli bir tekstil (kot) yıkama fabrikasından elde edildi (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Orta ölçekli bir kot yıkama fabrikasından alınmış atıksu numunesi

Genel yıkama işlemleri sonrası oluşan ve yapısında yoğun oranda kimyasal maddeler ihtiva eden örnek atık sudan 5 L hacminde numune alındı. Sıcaklık, ışık gibi çevresel değişikliklerden etkilenmemesi ve özelliklerinde herhangi bir değişiklik meydana gelmemesi için +4 °C’de ve karanlıkta muhafaza edildi. Atıksu numuneleri içerisinde bulunan iri tanecikli deterjan parçacıklarından arındırılmak üzere süzgeçten geçirildi. Bu sayede kaba deterjan tanelerinin test balıkları tarafından yutulması önlenmiş oldu. Arıtılmış atıksuyun fizikokimyasal özellikleri standart yöntemlere göre ölçülerek, 24 saat içinde analiz edildi. Elde edilen tüm parametrik ölçümler kaydedilerek, bu değerlerin İSKİ Deşarj Standart Kriterlerini karşılayıp karşılamadığı tespit edildi.

2.4. Akvaryumların Hazırlanması

DNA zincir kırıklarının oluşacağı, fakat hücrelerin canlılığını kaybetmeyeceği optimum konsantrasyon ve uygulama süresini belirlemek için daha önceki çalışmalardan faydalanıldı. Uygulanacak konsantrasyonun belirlenmesi için, Sumathi ve ark. (2001)’nin yapmış olduğu çalışmada kullandığı seri konsantrasyonlar (% 0.1, 2, 5, 10) referans olarak kabul edildi. Deney grupları için kullanılacak atık su konsantrasyonları % 0.5, 5 ve 10 (v/v) olarak belirlendi. Atıksu örneği (TAS) konsantrasyonu stok olarak kabul edildi, çalışma solüsyonları üç farklı derişimi elde etmek için havalandırılmış ve filtre edilmiş şebeke suyu ile seyreltildi. % 0.5, 5 ve 10 konsantrasyonlarında TAS içeren akvaryumlar hazırlanarak üç deney grubu oluşturuldu. Deneyin sağlıklı yürüyüp yürümediğini kontrol etmek için iki kontrol grubu hazırlandı (Kontrol değerlerinin elde edilmesi, çalışmanın doğruluğu ve sonuçların güvenilirliği açısından gereklidir). Negatif kontrol grubuna sadece boş akvaryum suyu ilave edildi. Pozitif kontrol grubu için 10 L akvaryum suyuna genotoksik etkisi bilinen EMS (Etil Metan Sülfonat) 5 mg/L olacak şekilde ayarlandı (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Comet ve DNA difüzyon analizleri için deney akvaryumlarının hazırlanması

% 0.5 TAS	50 ml TAS	Toplam hacim akvaryum suyuyla 10 L’ye tamamlanır.
% 5 TAS	500 ml TAS	Toplam hacim akvaryum suyuyla 10 L’ye tamamlanır.
% 10 TAS	1000 ml TAS	Toplam hacim akvaryum suyuyla 10 L’ye tamamlanır.
-C (% 0 TAS)	- ml TAS	10 L akvaryum suyu konur.
+C (5 mg/L EMS)	50 mg EMS	Toplam hacim akvaryum suyuyla 10 L’ye tamamlanır.

Deney öncesi hazırlanan tüm akvaryumların sıcaklık ve pH değişimleri ölçülerek, kaydedildi (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Belli konsantrasyonlarda (% 0.5, 5 ve 10) kot yıkama atık suyu içeren doz grupları ile negatif kontrol grubunun bulunduğu akvaryum sularının deneyden önceki pH ve sıcaklık değerleri

Parametre	% 0.5	% 5	% 10	-C
Ph	8.23	8.08	8.39	8.12
Sıcaklık (°C)	27.5	27.0	28.9	26.7

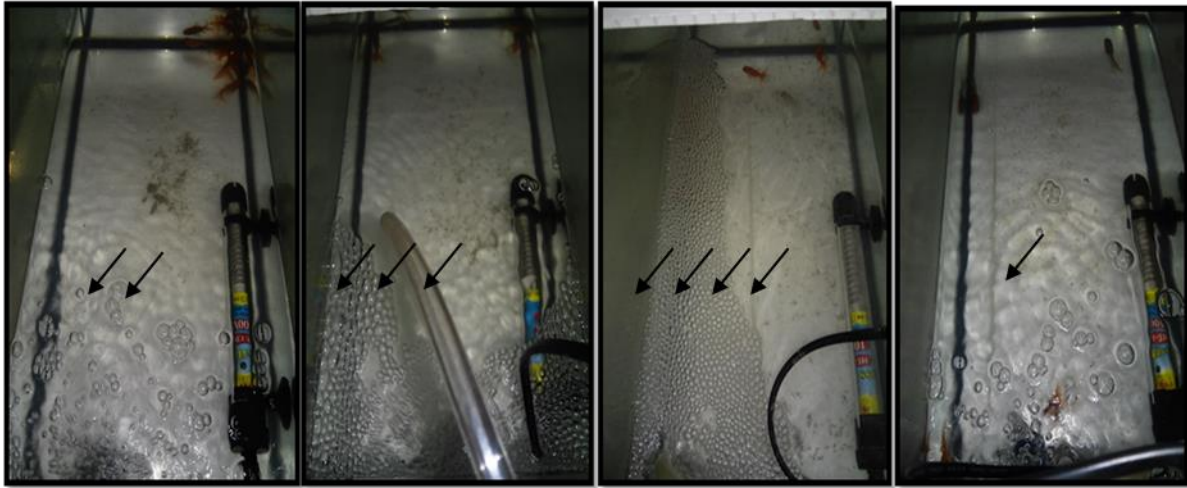
Tüm akvaryumlarda (30x60x40 cm) n=7 olacak şekilde balıklar konuldu. Balıklar akvaryumlara konulmadan önce, sıcaklık ve pH ölçümlerinin balıkların tolerans aralığında olmasına dikkat edildi. Balıkların sağlıklı kalabilmesi için akvaryum suyu sıcaklığı, termostatlı ısıtıcı kullanılarak $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlandı ve deney süresince aynı seviyede sabit tutuldu. Su sıcaklığı düzenli olarak termometre ile kontrol edildi ve kaydedildi. Hazırlanan akvaryumlar sırasıyla incelendiğinde en fazla köpük ve bulanıklığın, % 10 derişimli TAS'nın uygulandığı deney akvaryumunda oluştuğu göze çarptı (Şekil 2.2).

% 0,5

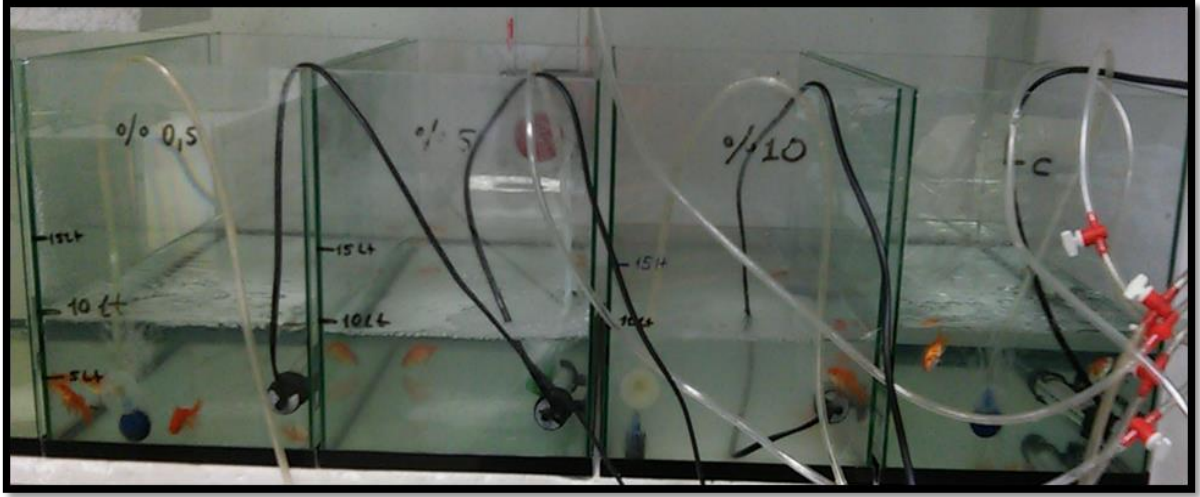
% 5

% 10

-c



(a)



(b)

Şekil 2.2. TAS'ın farklı konsantrasyonlarına (sırasıyla % 0,5, 5 ve 10) maruz bırakılmış balıkların bulunduğu akvaryumlar ile negatif kontrol grubu (-c) için hazırlanan akvaryumlar üstten (a) ve yandan (b) görüntüsü.

2.5. Model Organizmanın Seçimi

Sitogenetik metotlar muhtemelen genotoksinlerin etkilerini belirlemede en etkili ve en duyarlı yoldur. Balıklar suyla taşınan kirleticileri metabolize ve konsantre edebilen ve bunları vücutlarında depolayabilen su canlılarıdır. Bu nedenle, su numunelerinin potansiyel mutajenik ve/veya karsinojenik olup olmadıklarının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar için balıklar en mükemmel model organizmalardır. Balıklar etrafını saran su ile hassas solungaçları aracılığıyla yakın temaslar kurar. Toksik maddelere maruz bırakılan balıklar, vücut yüzey alanının yarısından fazlasını oluşturan solungaçları vasıtasıyla bu maddeleri vücut içine alır. Diğer deney hayvanlarına göre daha kolay ve daha fazla sayıda temin edilebilmesi, sınırlı bir çevrede yaşaması, dolayısıyla test edilmek istenen maddelerin kontrollü ortamda verilebilmesi, sudaki kirleticilerden kısa sürede etkilenmesi, kısaca uygulama ve analizinin kolaylığı nedeniyle balıklar ekotoksikolojik çalışmalar için vazgeçilmez test materyalleri arasında yerini almıştır. Ayrıca TAS ile yapılan bir biyomonitoring çalışmasında, balıkların bakteri, alg, bitki, su piresi gibi canlılar arasında göreceli olarak en duyarlı canlı olduğu da bildirilmiştir (Al-Sabti, 1991; Wendelaar, 1997; Cordova ve ark., 2001; Güner ve Gökalp, 2013).

Kemikli tatlı su balıklarından biri olan japon balıklarının omnivor oluşu, çökelti ve döküntülerde yaşaması, genotoksik ajanlara maruz kalmanın biyolojik sonuçlarını göstermesi bakımından önem taşımaktadır. Öte yandan sucul bir omurgalı olması sebebiyle, balıkta

genotoksik etkiyi gözlemlemek, bir bakıma akraba olarak insan hücrelerinin doza vereceği yanıtın tahmin edilmesine de olanak verecektir. Japon balığının diğer balık türlerine göre oldukça dayanıklı olması ve deney süresi boyunca ölmeden direnç gösterebilmesi, deneyin sonucunu sağlıklı bir biçimde sonlandıracaktır (Sumathi ve ark., 2001).

'*Carassius auratus*' latince 'altın yıldızlı Avrasya balığı' anlamına gelir ve halk arasında 'japon balığı' ya da 'Avrupa havuz balığı' olarak da bilinmektedir. Sarı, kırmızı, turuncu, beyaz, siyah, kahverengi gibi farklı renkte kombinasyonları mevcuttur. Değişik renklerde olan bu balıkların izlenmesi keyifli olduğu için tüm akvaryumcular tarafından bilinir. Ucuz olan ve kolayca temin edilebilen japon balıkları, havuz ve akvaryumlarda süs balığı olarak değerlidir ve çok nadir yenilir. Çok sayıda alt türü bulunan bu balığın en iyi bilinen alt türü '*Carassius auratus auratus*'tur (Wikipedia, 2016) (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. *Carassius auratus* balığının sistematığı

Regnum	Animalia
Phylum	Chordota
Superclass	Osteichthyes
Class	Actinopterygii
Ordo	Cypriniformes
Familya	Cyprinidae
Genus	<i>Carassius</i>
Species	<i>Carassius auratus</i> (Linnaeus, 1758)
Subspecies	<i>Carassius auratus auratus</i>

Yaşam alanlarını ötrofik yapılı nehir, göl ve gölet gibi durgun ve yavaş akan tatlı sular oluşturur. Kökeni Çin, Japonya gibi Orta Asya ülkelerine dayanmaktadır. Subtropik bölgelerde bentopelajik yaşam sürerler. pH aralığı 6-8 olan suları isterler. 0-20 m aralığındaki derinliklerde yaşarlar. Genelde 10 cm uzunluğunda olsalar da, maksimum 48 cm boyunda olanları da vardır. Ortalama yaşam süreleri sağlıklı bir balıkta 25 yıl kadardır, bunun yanında maksimum 41 yıl ömür de sürebilirler. Vahşi türleri 4-30°C, yapay seleksiyon türleri ise 14-26°C sıcaklık ister. Vücut pullarla kaplıdır. Alt ve üst çenelerinde dişler olmadığından, yediği besinleri ancak yutak bölgesindeki farinks dişleri sayesinde öğütebilirler. Omnivor canlılardır; genel olarak plankton, bentik omurgasızlar, bitki materyalleri ve döküntüler ile beslenirler. İki odacıklı yüzme keseleri mevcuttur. Ergin erkekler üreme döneminde solungaç kapağının

kenar kısımlarında beyaz renkli lekeler taşırken, dişilerde bu lekelenmelere rastlanmaz. Dişiler senede 2-4 kez yumurtlar. Dişinin bıraktığı yumurtalar 4 saat içinde erkek balığın bıraktığı sperm tarafından döllenir. Döllenmiş yumurtalar 4-6 gün içinde açılır. Larvalar pelajiktir (Wikipedia, 2016).

Türkiye'deki petshopların çoğunda yaygın bulunan ve akvaryumcularda hobi amaçlı yetiştirilen '*Carassius auratus*' (Familya: Cyprinidae) bu deney için model organizma olarak seçildi (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Laboratuvar ortamına alıştırılan japon balığı

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen genotoksikolojik incelemede, mitotik olarak inaktif durumdaki nükleuslu alyuvar hücrelerinde spesifik etkiyi belirlemek için materyal doku olarak 'kan sıvısı' kullanıldı ve kanın hücresel elemanlarından olan 'eritrosit' hücreleri üzerinde çalışıldı.

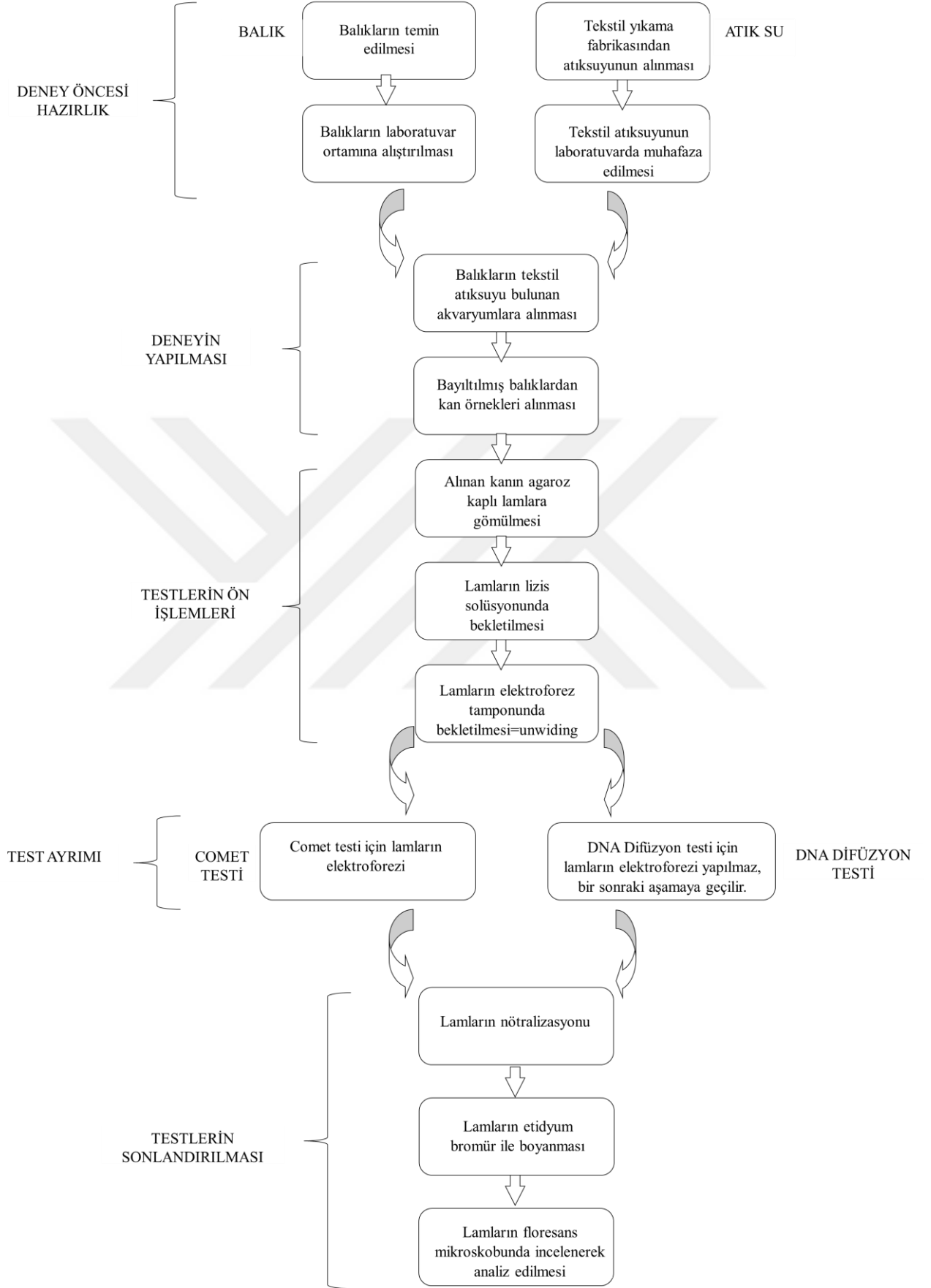
2.6. Japon Balıklarının Temini ve Laboratuvar Ortamına Alıştırılması

Çalışmanın başında tanklar deterjan çözeltisi ile dezenfekte edildi ve herhangi bir mantar enfeksiyonu oluşumuna karşı balıkların konulmasından önce iyice yıkandı. Kullanılacak akvaryum suyu, klor ve organik madde içeriğinden arındırılması için bir hafta öncesinden dinlendirildi, havalandırıldı ve karbon filtreden geçirildi. Tüm akvaryumlar kloru giderilmiş ve filtre edilmiş çeşme suyu kullanılarak hazırlandı.

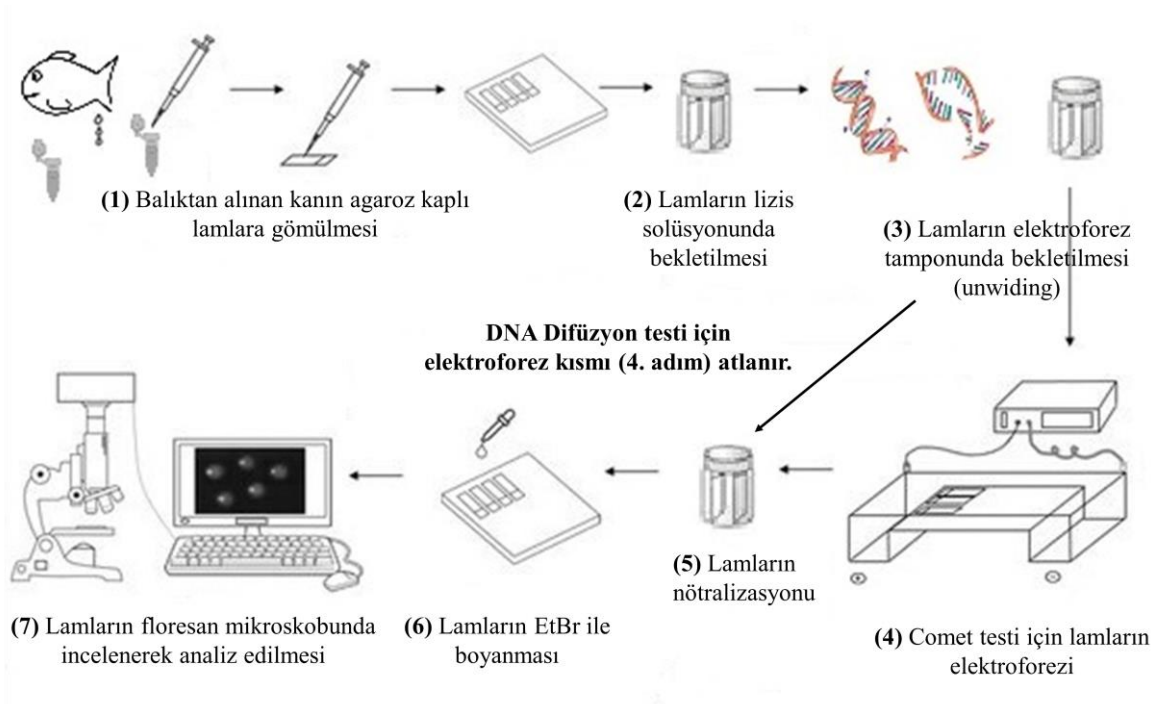
Yerel bir pet shop'tan temin edilen balıklar, standart laboratuvar koşulları altında korundu. Tüm deney serileri iki tekrarlı olarak çalışıldı ve toplam 70 (35x2) balık kullanıldı. Dişi+erkek japon balıklarının boy (total ortalama boy 5 ± 2 cm) ve ağırlıkları (ortalama ağırlık $7\pm 0,5$ gr) birbirlerine yakın değerlerde seçildi (Şekil 2.3). Böylece genotoksik hasarın boy ve ağırlık ile ilişkisinden ortaya çıkacak hata payı azaltılmaya çalışıldı. Balıklar 20 L'lik üç ayrı akvaryumda alışma süresince tutuldu. Sağlıklı ve asemptomatik olduğu düşünülen balıklar, bir hafta süre (7 gün) ile ticari balık yemiyle günlük (x2 defa/gün) beslenip, doğal gün ışığında laboratuvar koşullarına alıştırıldı. Böylece balıkların ortama adapte olmaları

sağlanarak, stres kaynaklı toksisitenin oluşumu engellendi. Su sıcaklığının $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, pH'nın $8\pm 0,5$ olduğu akvaryumlarda tutulan balıkların genel durumu, davranış ve hareketleri gerek deney öncesi, gerekse deney sonrası rutin olarak izlendi, meydana gelen balık ölümleri kaydedildi. Ayrıca su, deneyden önce iki günde bir, balıklar tarafından salgılanan metabolik (azotlu) artıkların giderimini kolaylaştırmak ve tüketilmemiş gıdaların uzaklaştırılması için periyodik olarak değiştirildi.

Hayvanları az çok aynı metabolik durumda tutmak için, toksisite testinin başlamasından 24 saat önce yemlemeye son verildi. Biyoindikatör amaçlı kullanılan balıklar, deney boyunca beslenmedi. Yemlemesi kesilen balıkların her biri 7 birey içeren 10 gruba ayrıldı. Grup 1 (% 0.5 TAS), grup 2 (% 5 TAS), grup 3 (% 10 TAS), grup 4 (-c), grup 5 (+c) olarak belirlenen balıklar sırasıyla tanklara aktarıldı. Balıklar 96 saat boyunca akut toksisitenin belirlenebilmesi için, atık su numuneleriyle hazırlanmış akvaryumlara konuldu. Grup 4'deki balıklar sadece klorsuz ve filtre edilmiş çeşme suyu bulunan akvaryumda negatif kontrol olarak değerlendirildi. Grup 5'teki balıklar ise, bu deneyde referans mutajen olarak kabul edilen EMS (5 mg/L) içeren akvaryumda, pozitif kontrol amacı ile kullanıldı. Deneylerin tümü akvaryum suyunun kısmen yenilendiği yarı-statik bir sistemde gerçekleştirildi. Her gün deney gruplarındaki akvaryum sularının % 80'i test solüsyonları ile yenilendi. Tam test süreleri sonunda her gruptan birer balık iki tekrarlı olarak çalışıldı. Balık gruplarından 24, 48, 72 ve 96 saatlik süreler sonunda kan örnekleri alınarak, genetik hasarın tahmini için prosedüre uygun şekilde Comet (Cavas ve Konen, 2007) ve DNA difüzyon testleri (Díaz ve ark., 2009) uygulandı (Şekil 2.4 ve Şekil 2.5).



Şekil 2.4. Deney akış şeması



Şekil 2.5. Balıktan alınan kana Comet ve DNA difüzyon testlerinin uygulanması

Comet ve DNA difüzyon deneylerine başlamadan önce kan hücrelerine ‘Hücre Canlılık Testi’ uygulandı. Canlılık yüzdesi; hücrelerin tripan mavisi ile muamele edilip, boyanıp boyanmamalarına göre değerlendirildi. Bu amaçla hücre (kan) süspansiyonundan ($1-2 \times 10^5$ hücre/ml) ependorf tüpüne 500 μ l alındı. Üzerine % 0,4’lük (w/v) derişimdeki tripan blue solüsyonundan 100 μ l eklendi. 5 dk. beklendikten sonra, örnek, pipetörle hemositometre lamına yerleştirildi. Hücreler ışık mikroskobu altında 10X objektif ile incelendi. Tripan mavisi boyasını absorbe eden (cansız) ve absorbe etmeyen (canlı) hücreler tek tek sayıldı. Canlı hücre yüzdesi = (canlı hücre sayısı / toplam hücre sayısı) x 100 şeklinde hesaplandı. Ve hücrelerin % 90 canlı olduğu görüldü. Daha sonra Comet ve DNA difüzyon analizlerine başlandı. Comet analizi temelde Cavas ve Könen (2007) tarafından tanımlandığı gibi gerçekleştirildi. Bu amaçla çeşitli derişimlerde hazırlanmış atık su örneklerinin, balıkların eritrosit hücrelerine yapacağı akut etkileri *in vivo* ortamda gözlemlemek için, değişken konsantrasyonlara (% 0.5, 5, 10 TAS) maruz bırakılmış balık gruplarından, belirli saatler sonunda (24, 48, 72, 96 sa) heparinize şırıngalar ile kan örnekleri toplandı. Bu işlem sırasında balığın strese girmesinden doğacak DNA hasarını önlemek amacıyla, balık konsantrasyonu 140 mg/L olan ‘Tricaine Methanesulfonate (MS 222)’ ile hazırlanmış bir behere alındı ve balığın bayılması beklendi. Solungaç ve kalp atışı hareketinin azalması, denge kaybı ve tepkisizlik gibi belirtileri gözlenerek bayıldığı tespit edilen balığın kaudal veninden, 1 ml’lik heparinize enjektör yardımıyla 10 μ l kan alındı.

2.7. Balık Hücre (Eritrosit) Süspansiyonunun Hazırlanması

Balığın kaudal veninden alınan kan örnekleri Comet ve difüzyon testleri yapılmak üzere, içerisinde daha önceden hazırlanmış 1 ml soğuk PBS çözeltisi bulunan ependorflara konuldu. Buzda 5' dk. bekletilerek hazırlanmış hücre süspansiyonundan 120 µl alındı, içinde 400 µl eritilmiş LMA'nın bulunduğu ependorfa konularak karıştırıldı, önceden hazırlanmış ve buzdolabında bekletilen HMA kaplı lamlara yayıldı.

2.8. Lamların, Agaroz Jellerin ve Örnek Preparatların Hazırlanması

HMA'lı Lamların Hazırlanması: Hücrelerin deney sonuna kadar bozulmadan kalmasını ve doğru görüntülenmesini sağlamak için hücreler agarozla kaplanmış lama gömülmelidir. Mikroskopik inceleme sırasında temiz-net bir görüntü verebilmesi için, agaroz jelin Comet testinin son basamağına kadar bozulmadan kalabilmesi sağlanmalıdır. Yüksek agaroz konsantrasyonu, DNA'nın göç hızını ve diğer işlem basamaklarını olumsuz yönde etkileyeceğinden, protokolde belirtilen esaslara dikkatlice uyulmalıdır. Bu amaçla toz haldeki 0.65 gr HMA ile 100 ml dH₂O küçük bir beher içerisinde karıştırılıp, mikrodalga fırında çözdürüldü. Donmaması için 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletilen % 65'lik HMA çözeltisi içerisine lamlar daldırılarak lamlar üzerinde ilk jel tabakası oluşturuldu. HMA ile kaplanan bu lamlarda hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterildi. Lamlarda oluşacak tozlanmanın önüne geçmek ve kurumalarını sağlamak için lamlar kurutma kâğıdı üzerinde dizilmiş halde oda sıcaklığında 1 gece çeker ocakta bekletildi. Bu lamlar nemli ve ışığı geçirmeyen lam kutularında, kullanana kadar buzdolabında saklandı.

LMA'nın Hazırlanması ve Hücre Süspansiyonu ile Karıştırılıp HMA'lı Lam Üzerine Yayılması: Toz halindeki 0.65 gr LMA ile 100 ml PBS küçük bir beher içerisinde karıştırılıp (% 65), mikrodalga fırında çözüldü. Hazırlandıktan hemen sonra her bir ependorf içerisine 400 µl olacak şekilde konuldu. Soğuk PBS içinde hazırlanmış olan balık eritrosit hücre süspansiyonundan 120 µl alınarak, içinde eritilmiş 400 µl LMA bulunan ependorfa konularak mikropipet ile karıştırıldı (Hücreler, DNA'nın hasar görmesini önlemek için kullanım sırasında buz üzerinde tutuldu). Daha önceden HMA ile kaplanmış lamlar üzerine 75 µl bu karışımdan konularak, lamel (24x60 mm) ile kapatıldı. Yayma işlemi erime noktası çok düşük olan LMA agarozun donmaması için çok hızlı yapıldı. LMA+hücre süspansiyonu HMA'lı lamlar üzerine yayılmadan önce lamlar konsantrasyon ve zaman bilgilerini gösterecek şekilde kodlandı. Kan doku örnekleri daha sonra donması için +4°C'de 10 dk. bekletildi. Her konsantrasyon ve saat için ikisi Comet, ikisi difüzyon olmak üzere 4 lam

hazırlandı. Böylece kan hücreleri lam üzerinde hazırlanan agaroz katmanları içine gömülmüş oldu.

2.9. Lizis

Lizis Stok Çözeltisinin Hazırlanması: 73.05 gr NaCl, 18.60 gr EDTA, 0,6 gr Trisma Base'den oluşan içerik 350 ml dH₂O ile karıştırıldı. Çözeltinin pH'sı 10 M'lık NaOH (100 g NaOH/250 ml dH₂O) ile 10 olacak şekilde ayarlandı ve son hacim dH₂O ile 445 ml'ye tamamlandı. Deney öncesinde hazırlanan lizis stoğu +4 °C'de kullanılıncaya kadar saklandı.

Lizis Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması: 66.75 ml lizis stok solüsyonu, 7,5 ml DMSO, 750 µl Triton-X şale içerisine sırasıyla alındı. Oluşan köpüğün giderilmesi için en az yarım saat (30 dk.) +4 °C'de bekletildi. Her deneyden önce taze hazırlandı.

Lizis İşlemi: Hazırlanan tüm lamaların üzerindeki lameller kaldırıldı ve soğuk lizis çalışma solüsyonunun bulunduğu şaleye tek tek dizildi. +4 °C'de 1 saat boyunca bekletildi. Böylece hücre, nükleus ve nükleolus membranlarının parçalanarak erimesi ve nükleusta yer alan superkoil DNA sarmallarının bağlı bulunduğu nonhiston proteinleriyle birlikte agaroz içinde serbest kalması sağlandı. Lizis işleminde serbestleşen DNA, ultraviyole ışığına karşı duyarlı olduğundan, çevre kaynaklı DNA hasarı önlemek ve ilave kırıkların oluşmaması için bundan sonraki tüm basamaklar gün ışığında yürütüldü.

2.10. Unwiding: Elektroforez Tamponu Uygulaması

NaOH Stok Çözeltisi: 100 gr NaOH/250 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü. Böylece 10 M'lık NaOH stok çözeltisi hazırlanmış oldu.

EDTA Stok Çözeltisi: 14.89 gr EDTA/200 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü. Derişik NaOH çözeltisi ile pH 10'a ayarlandı. Böylece 200 mM = 0,2 M'lık EDTA çözeltisi hazırlanmış oldu.

Elektroforez Tamponu Çalışma Çözeltisi: 10 M NaOH stok çözeltisinden 30 ml ve 0,2 M'lık EDTA stok çözeltisinden 5 ml alınarak 1000 ml dH₂O ile karıştırıldı. NaOH çözeltisi ile pH 13'e ayarlandı. Bu çözelti her deneyden önce taze olarak hazırlandı ve +4 °C'de soğuk kullanıldı.

Elektroforez İşlemi: Lizis işleminden sonra unwinding için lamalar elektroforez çalışma çözeltisinin bulunduğu şale içine dikkatlice dizildi ve sonrasında +4 °C'de ve karanlıkta 20 dk. boyunca bekletildi. Bu süre sonunda yüksek pH ve kuvvetli alkali ortamda

çift sarmal DNA'nın superkoil yapısı gevşeyerek çözülmüş, böylece DNA zincirleri birbirinden ayrılmış oldu. Bu sırada zincirdeki kırıklar da ortaya çıktı ve buldukları noktalardan açılmaya başlayarak denatüre oldu.

2.11. Elektroforez

Daha önceden hazırlanmış olan elektroforez tampon çözeltisi siyah Comet tankına yavaşça boşaltıldı. Bu çözelti lamların yüzey kısmını ıslatacak kadar kondu (Elektroforez çözeltisinin çok fazla olması halinde lamlardaki agar tabaka elektroforez sırasında sürüklenip lamdan uzaklaşabilmektedir). Comet analizi için, horizontal yönde tanka dizilen lamlar +4 °C'de, 15 volt ve 300 mA (miliamper) elektrik akımına 30 dk. süreyle maruz bırakıldı (DNA difüzyon analizi için, lamlar elektroforez işlemi yapılmadan bir sonraki aşamalara geçildi). Böylece lam üzerindeki agaroz gömülen hücrelere ait sağlam ve kırılmış DNA parçaları, elektroforezde oluşturulan elektriksel bir alanda, elektroforez tamponuyla birlikte yürütülmüş oldu. Alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve elektriksel yüklere sahip hasar görmüş DNA parçacıklarının katottan anoda doğru farklı hızlarda hareket ederken, çekirdekten dışarı doğru göç ettiği ve jel üzerinde bir kuyruklu yıldız görüntüsü meydana getirdiği görüldü.

2.12. Nötralizasyon

Nötralizasyon Tamponu Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması: 63.04 gr (0.4 M) Trisma HCl az miktarda dH₂O da çözüldükten sonra, 10 M'lık NaOH ile pH 7.5'e (nötr pH) ayarlandı. En son dH₂O ile toplam hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Böylece nötralizasyon çalışma çözeltisi hazırlanmış oldu.

Nötralizasyon İşlemi: Elektroforezde yürütülen lamlar nötralizasyon çözeltisinin bulunduğu şalede 15 dk. boyunca buzdolabında bekletildi. Süre sonunda nötralizasyon tamponuyla yıkanarak nötralize edilen lamlardan alkali tampon çözeltisi uzaklaştırılmış oldu.

2.13. Boyama

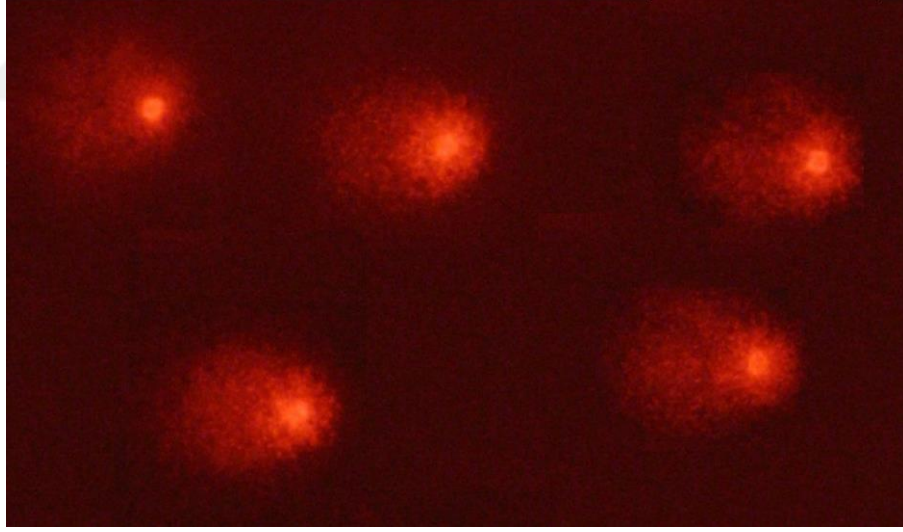
10 X'lik Boyama Stok Çözeltisi: 10 mg EtBr/50 ml dH₂O içerisinde çözüldükten sonra çözelti şişesi içinde +4 °C'de karanlıkta saklandı.

Boyama Çalışma Çözeltisi: 400 µl boyama stok çözeltisi, 1600 µl dH₂O mikrosantrifüj tüpü içerisinde vorteks ile karıştırıldı ve +4 °C'de karanlıkta saklandı.

Boyama İşlemi: Lamların her biri floresan bir işaretleyici olan 75 µl'lik EtBr boyasıyla boyandı, üzeri 24x60 mm'lik lamelle 45° 'lik açıyla ve dikkatlice kapatılarak, boyayı alması için 5 dk. bekletildi.

2.14. Hücre Sayımı ve İstatistiksel Değerlendirme

Etidyum bromür çalışma çözeltisi ile boyanmış lamlar 20X'lik büyütme ile floresan mikroskopunda (Olympus BX51TF) incelendi. Lamların kenar kısımlarında kalan DNA'ların hasar oranı daha yüksek olacağından bu bölümde yer alan DNA'lar dikkate alınmadı, sayım lamların orta kısmında ve tüm çalışma boyunca aynı kişi tarafından yapıldı. Objektif bir değerlendirme için, sayımı yapan kişi incelediği lamın numarasını ve hangi çalışma grubu olduğunu göremeyecek şekilde lamların kodları kapatıldı. İncelenen lamlardaki DNA görüntülerinin 4 saat içinde fotoğrafları çekildi. Dijital kamera (Canon A640) ve Kameram Comet Görüntü İşleme ve Analiz Yazılımı (Mikrosistem, Turkey) yardımıyla hem fotoğrafları çekilen hem de bilgisayar ortamına aktarılan DNA görüntüleri dikkatlice kaydedilerek DNA hasar değerlendirilmesi için saklı tutuldu (Şekil 2.6).



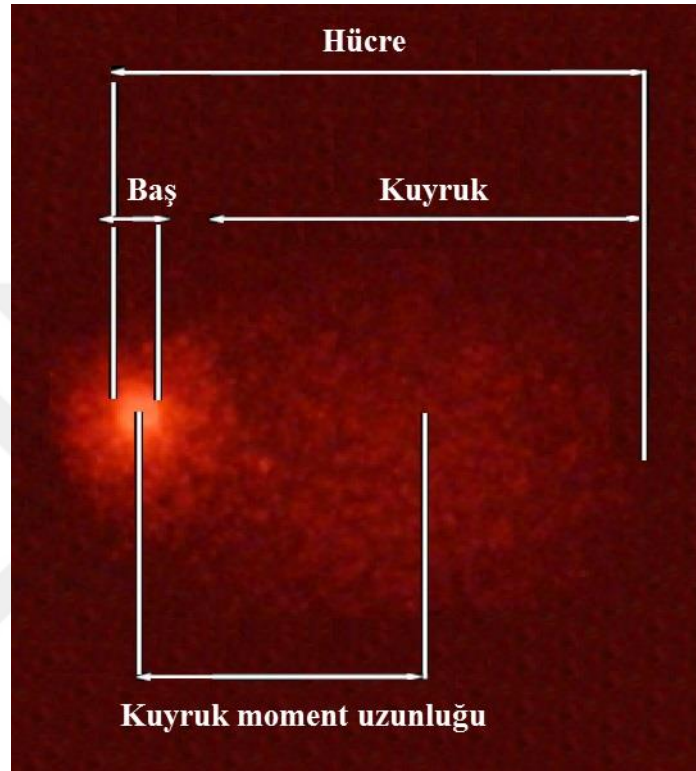
Şekil 2.6. Comet uygulaması sonrası elde edilen DNA görüntüleri

İnceleme, fotoğraflama ve bilgisayara kaydetme işlemleri hem Comet hem de DNA difüzyon işlemlerine tabi tutulan lamlar için gerçekleştirildi.

DNA hasarının değerlendirilmesi için, her bir konsantrasyon ve kontroller için örnek başına rastgele toplam 100 hücre sayılarak (lam başına 50 hücre, kan örneği başına 2 lam), bu hücrelerin verileri Microsoft Excel programına kaydedildi. Aynı işlem difüzyon testi için de tekrarlandı. Comet hasarları 'Kuyruk % DNA' ve 'Olive Kuyruk Momenti' parametreleri kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen tüm verilerin ortalaması alınarak standart hataları

hesaplandı.

Hücrenin çekirdek bölgesinden gelen DNA göçüne 'kuyruk' bu mesafeye de 'kuyruk uzunluğu' denir. Hücrenin kuyruk kısmını oluşturan DNA miktarı yüzdesine 'Kuyruk % DNA' denir. Kuyruk momenti; hem Comet kuyruk uzunluğunun yansıttığı DNA göçünün ölçüsünü, hem de kuyruktaki DNA kırıklarının yoğunluğunu temsil eder. Kuyruk Moment Uzunluğu, kafanın merkezinden kuyruğun merkezine doğru ölçülür (Şekil 2.7).



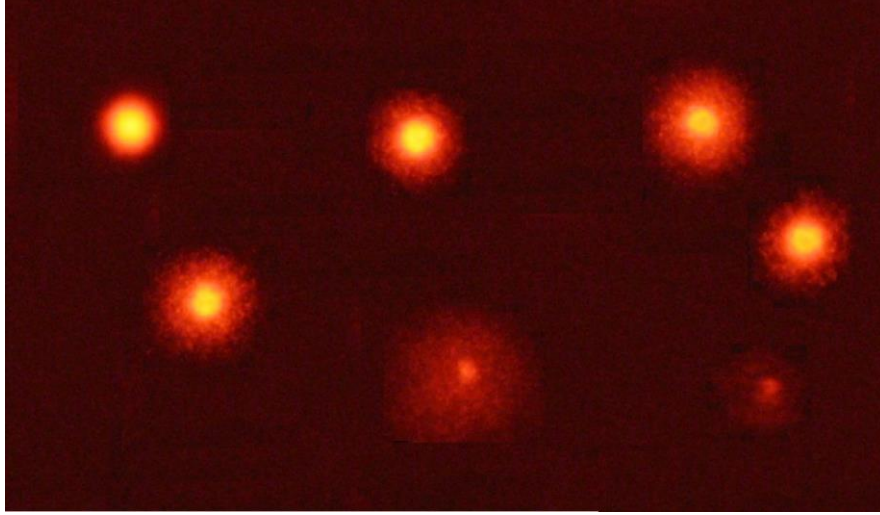
Şekil 2.7. Comet görüntüsü oluşturan eritrosit hücresinin ait baş, kuyruk ve kuyruk moment uzunlukları

Kuyruk % DNA ve Olive Kuyruk Momenti aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

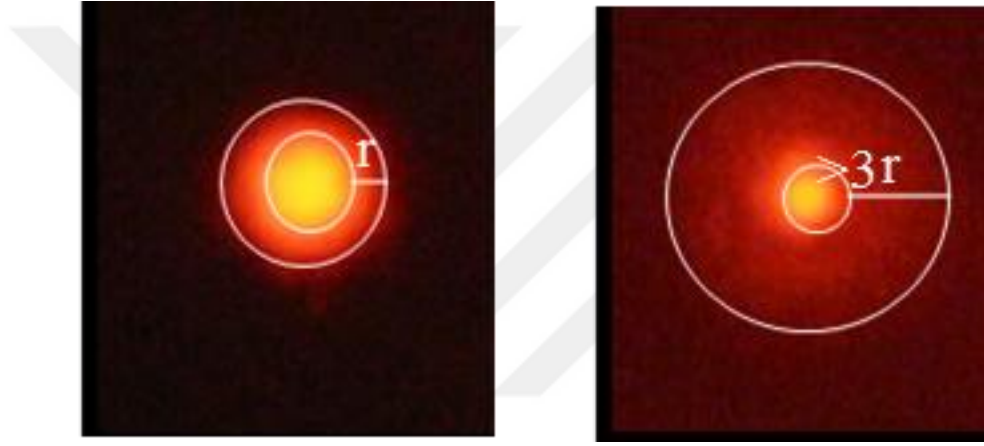
Kuyruk % DNA: $(\text{kuyruktaki DNA yoğunluğu} / \text{hücredeki DNA yoğunluğu}) \times 100$

Olive kuyruk moment: $\text{kuyruk \% DNA} \times \text{kuyruk moment uzunluğu}$

DNA difüzyon hasarları 'apoptotik/nekrotik (ölü) hücre yüzdesi' parametresi kullanılarak değerlendirildi. Ölü hücrelerin sayıca yüzdesini bulmak için, örnek başına en az 100 çekirdek sayıldı. Ardından bu 100 çekirdek içinde ölü olan çekirdeklerin sayısı sayıldı. Ölü çekirdek sayısının toplam çekirdek sayısına oranı 'ölü hücre yüzdesi' olarak ifade edildi. DNA'sı hücre dışına göç etmeyen hücreler 'hasarsız' kabul edilirken, ana çekirdek çapının 3 katından daha büyük çekirdeksel çapa sahip hücrelerin 'ölü' olduğu kabul edildi (Nigro ve ark., 2002) (Şekil 2.8 ve Şekil 2.9).



Şekil 2.8. DNA difüzyon uygulaması sonrası elde edilen DNA görüntüleri



Şekil 2.9. DNA difüzyon testinde belirlenen hasarsız (solda) ve ölü (sağda) hücreler

Comet testinden gelen tüm verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS 22 sürümlü bilgisayar programı ve One way ANOVA (Analysis of Variance) (Tek Yönlü Varyans Analizi) testi kullanılarak gerçekleştirildi. DNA hasarına bağlı atık su-konsantrasyon-zaman arasındaki ilişkiyi kurmak için, TAS'ın farklı muamele sonuçları hem birbirleri ile hem de kontrol grupları ile karşılaştırıldı. Comet testi için, kontrol grupları ile doz gruplarına ait parametreler (Kuyruk % DNA ve Olive Kuyruk Momenti için ayrı ayrı) arasında anlamlı düzeyde farklılık olup olmadığına bakıldı. Yanılma düzeyi (önem sınırı) $p < 0.05$ ve güven aralığı % 95 olarak belirlendi. DNA difüzyon testi için ise, kontrol grupları ile doz grupları için hesaplanan hasarlı hücre yüzdesi karşılaştırıldı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

TAS'ın Çevre Endüstriyel Analiz Laboratuvarında gerçekleştirildiği fiziko-kimyasal analiz raporu Tablo 3.1'de verilmiştir. Rapor incelendiğinde atıksu örneğinin pH, KOİ, AKM, TKN ve toplam fosfor parametrelerinde büyük artışlar tespit edilmiştir. En dikkat çekici yükseliş ise AKM'de yaşanmıştır. Diğer yandan atıksu numunesinin ağır metaller yönünden deşarj standart limitlerini aşmadığı görülmüştür (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Kot yıkama atık suyunun fizikokimyasal özellikleri

Parametre	Birim	Limit Değer*	Ölçülen Değer	Bilgi
pH (25°C)	-	6-9	12.63	1
Sülfat	mg/L	1500	116	
Siyanür (Toplam)	mg/L	1	<0.03	2
KOİ	mg O ₂ /L	400	561	3
Yağ ve Gres	mg/L	20	<10	3
Askıda Katı Madde (AKM)	mg/L	200	3450	
Toplam Kjeldahl Azotu (TKN)	mg/L	20	34.5	3
Fosfor (Toplam)	mg/L	2	4.6	3
Florür	mg/L	15	1.2	
Renk (Pt-Co)	Pt-Co	280	55	4
Balık Biyodenyeyi (ZSF)	-	10	<10	
Krom (Cr ⁺⁶)	mg/L	0.5	<0.01	
Bakır	mg/L	3	<0.05	5
Civa	mg/L	-	<0.001	5
Çinko	mg/L	5	<0.05	5
Demir	mg/L	10	<0.1	5
Kadmiyum	mg/L	0.1	<0.002	5
Krom (Toplam)	mg/L	2	<0.01	6
Kurşun	mg/L	2	<0.005	5

*** TAS analizinde dikkate alınan limit değerler, Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği'nin 1 R.G.31.12.2004 tarih ve No: 25687 sayılı kararı ile Tablo 19'da yer alan 2 saatlik Kompozit Numune için Karışık Endüstriyel Atıksuların Alıcı Ortama Deşarj Standartlarından alınmıştır.**

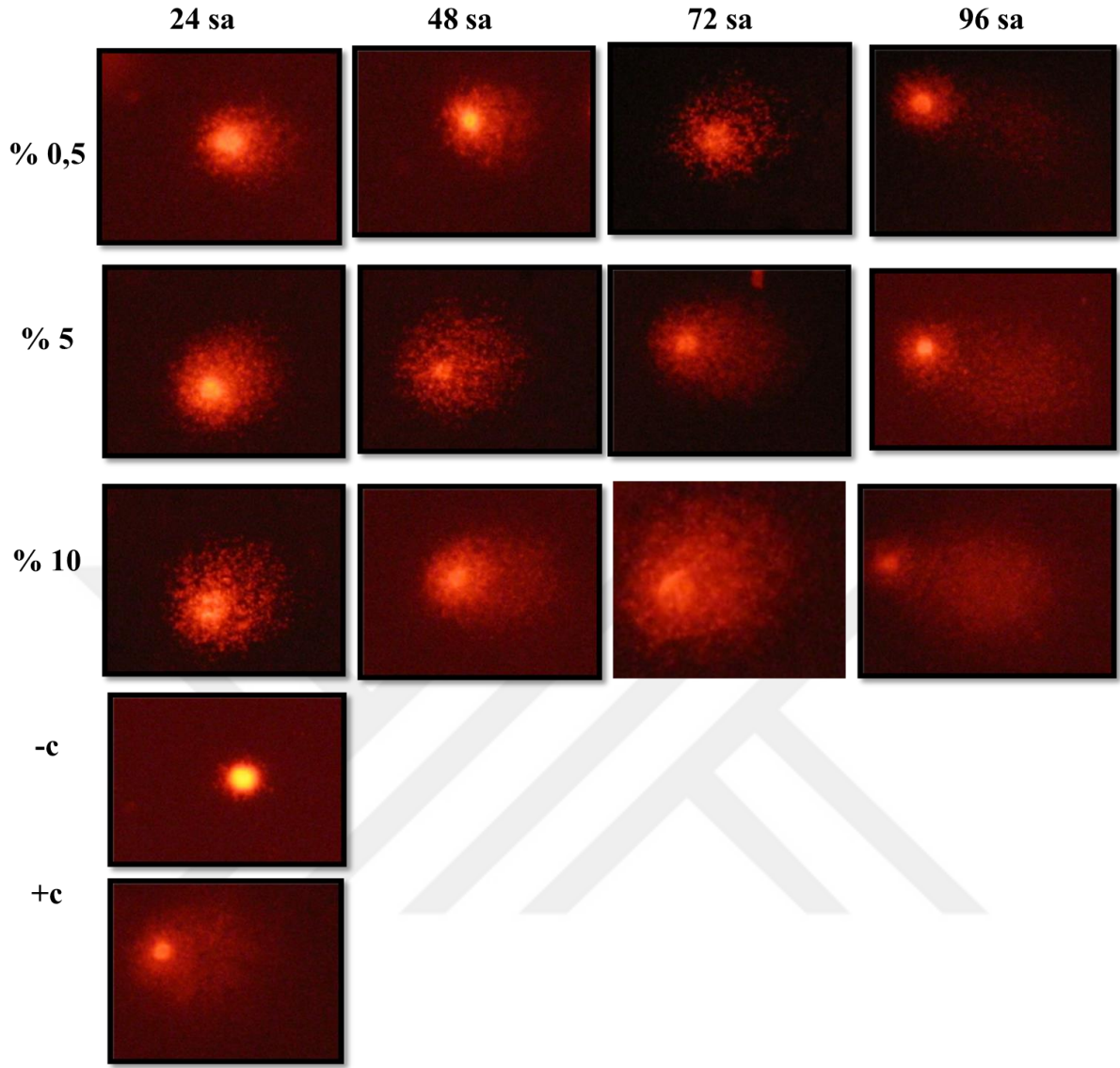
- 1) Analiz özel laboratuvarında yapılmıştır.
- 2) ISO 5667-3 standardına uygun olarak pH>12'ye kadar NaOH ilave edilmiştir.
- 3) ISO 5667-3 standardına uygun olarak H₂SO₄ ile pH 1-2 olacak şekilde asitlendirilmiştir.
- 4) Örnek 0.45 µm gözenekli membran filtreden süzölmüştür.
- 5) 0.45 µm'lik filtreden süzöldükten sonra ISO 5667-3 standardına uygun olarak HNO₃ ile pH 1-2 olacak şekilde asitlendirilmiştir.
- 6) ISO 5667-3 standardına uygun olarak HNO₃ ile pH 1-2 olacak şekilde asitlendirilmiştir.

Tekstil yıkama fabrikası kapsamında, fiziksel ve kimyasal arıtıma tabi tutulduğu öğrenilen atıksuyunun beş parametrik değer için öngörölen deşarj limitlerini aşması (Tablo 3.1) uygulanan arıtım metotlarının yetersiz kaldığına işaret etmektedir. Yıkama sırasında kullanılan toz çamaşır deterjanlarının pH'daki yükselişten sorumlu olduğu düşünülmektedir. Suda tespit edilen yüksek miktardaki azot ve fosforun sudaki KOİ parametresini yükselttiği bilinmektedir. Yüksek fosfor ve AKM'nin tekstil yıkamada kullanılan deterjanlardan kaynaklandığı, yüksek azot'un protein içeriği yaklaşık % 20'yi bulan pamuktan imal edilen kot ürünlerinden ileri geldiği sanılmaktadır. Atıksuda bulunan aşırı miktardaki azot ve fosfor gibi nütrient maddelerinin göl, akarsu, deniz gibi alıcı su ekosistemlerinde artarak birikmesi, su bitkileri, siyanobakteri, plankton ve alg gibi canlılarının sayıca çoğalması ile karakterize edilen 'ötrofikasyon' olayını meydana getirebilmektedir. Deterjan parçalarının getirdiği kirlilik yükü, suda çözünmüş oksijen miktarının azalmasına sebep olurken, bu azalma oksijenli solunum yapan balık, su kuşları ve diğer sucul canlıların ölmesine neden olmaktadır.

TAS ile yapılan bazı akademik çalışmalarda atıksuyun içerdiği ağır metaller sebebiyle çeşitli canlılarda olumsuz etkiler göröldüğü bildirilmiştir. Ancak bu tez çalışmasında kullanılan TAS numunesinin ağır metaller (siyanür, krom, bakır, civa, çinko, demir, kadmiyum, krom ve kurşun) yönünden deşarj standartlarını karşıladığı ve uygun aralıkta olduğu görölmüştür (Tablo 3.1).

Ağır metal içeriği konusunda tehlikesiz görölen mevcut TAS'ın balıklar üzerinde genotoksik etki yapıp yapmayacağı Comet analizi ile ortaya konulmuştur. Comet testi için ölçölen 'Kuyruk % DNA' sonuçları dikkate alındığında; en yüksek hasar % 10 TAS

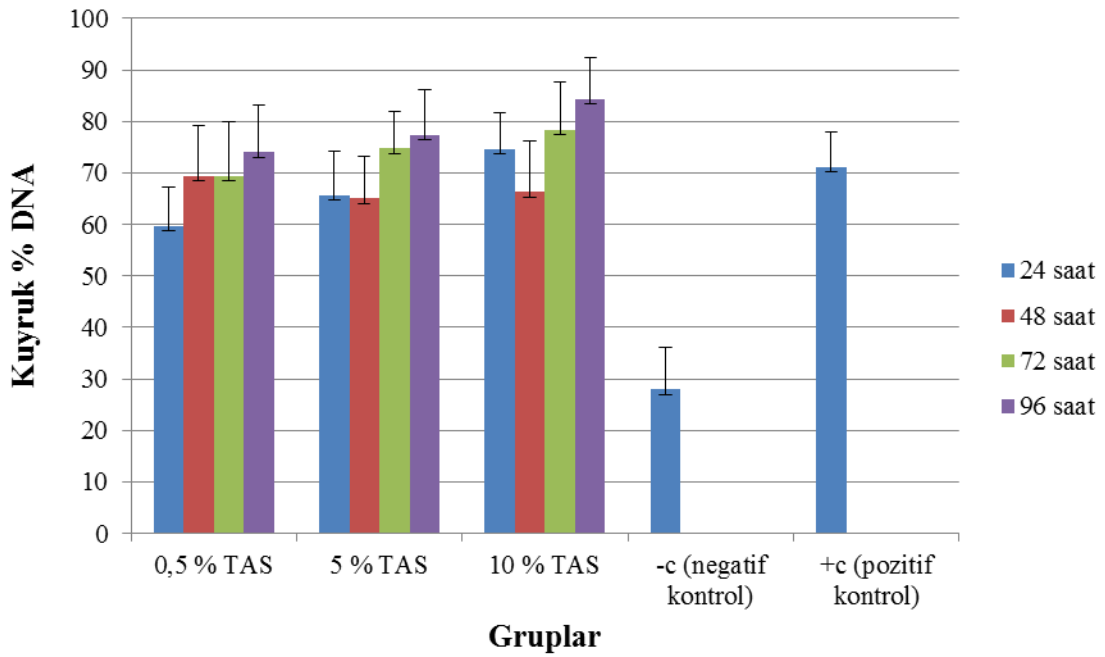
derişiminde ve 96. saatte (Kuyruk % DNA: 84,322) gelişirken, en az hasar % 0.5'lik TAS derişiminde ve 24. saatte (Kuyruk % DNA: 59,687) meydana geldi. TAS'a maruz bırakılan balık gruplarında görülen DNA hasarının, tüm saat ve konsantrasyonlarda negatif kontrol ile kıyaslandığında, önemli düzeyde ($p<0.05$) arttığı tespit edildi. Yapılan değerlendirmede, 24. saatin sonunda % 10'luk uygulama grubuna ait Kuyruk % DNA hasarının (Kuyruk % DNA: 74.695) pozitif kontrolden (Kuyruk % DNA: 71.18) önemli ölçüde ($p<0.05$) yüksek olduğu görüldü. Pozitif kontrol ve konsantrasyon gruplarından elde edilen Comet görüntüleri, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; kuyruk oluşumunun belirgin bir şekilde arttığı belirlendi. 72 saatlik süre sonunda balık eritrositlerinden kuyruk kısmına göç eden DNA miktarının, artan atıksu konsantrasyonuna bağı olarak rastlantısal olmayacak düzeyde ($p<0.05$) artış gösterdiği tespit edildi. Kuyruk % DNA ölçümlerinin 96. saatte artan doza bağı olarak kademeli ve istatistiksel bir artış ($p<0.05$) gösterdiği bulundu (Şekil 3.1, Tablo 3.2 ve Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Farklı konsantrasyon ve sürelerde TAS'a maruz kalan japon balığının eritrositlerinde meydana gelen DNA hasarını gösteren Comet görüntüleri

Tablo 3.2. 24, 48, 72 ve 96 saatler sonunda % 0.5, 5, 10 deney grupları ile negatif ve pozitif kontrol gruplarında gelişen ortalama ‘Kuyruk % DNA (\pm Standart hata) miktarının karşılaştırılması

Gruplar	Kuyruk % DNA (\pm Standart hata)			
	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
% 0,5	59,687 \pm 7,599	69,375 \pm 9,880	69,422 \pm 10,471	74,056 \pm 9,024
% 5	65,705 \pm 8,448	65,013 \pm 8,122	74,782 \pm 7,151	77,386 \pm 8,870
% 10	74,695 \pm 7,038	66,316 \pm 9,778	78,442 \pm 9,180	84,322 \pm 8,024
-c (negatif kontrol)	28 \pm 8,043	28 \pm 8,043	28 \pm 8,043	28 \pm 8,043
+c (pozitif kontrol)	71,180 \pm 6,833	71,180 \pm 6,833	71,180 \pm 6,833	71,180 \pm 6,833

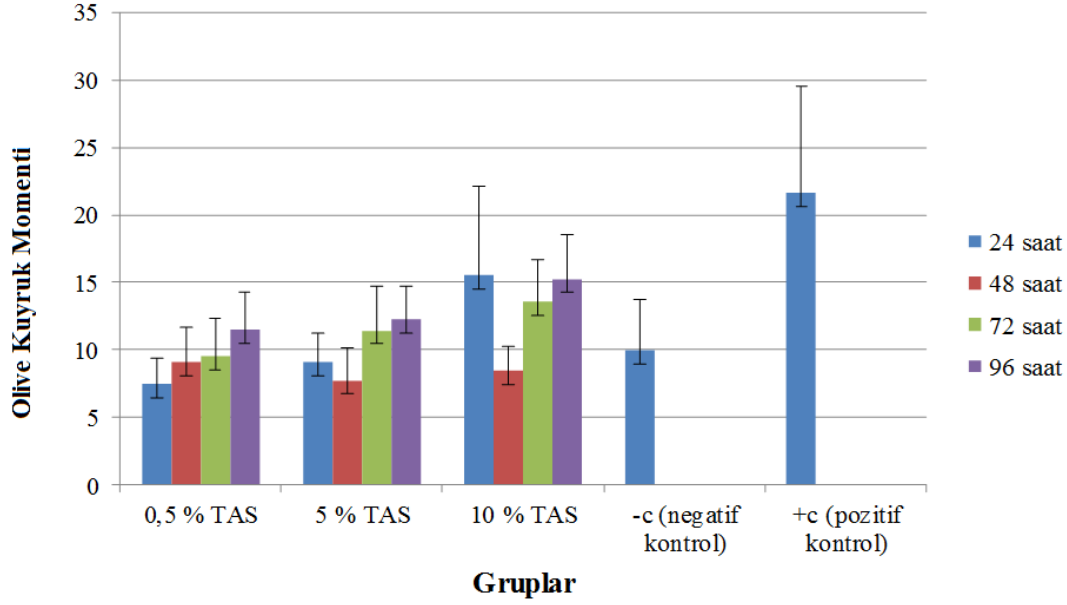


Şekil 3.2. Farklı konsantrasyon ve sürelerde TAS’a maruz bırakılan japon balıklarının eritrositlerinde görülen ortalama ‘Kuyruk % DNA (\pm Standart hata)’ ölçümlerinin negatif ve pozitif kontrol grupları ile karşılaştırılması

‘Olive Kuyruk Momenti’ sonuçlarına bakıldığında; uygulanan konsantrasyon ve negatif kontrol grupları karşılaştırmalarında, maksimum DNA hasarı % 10’luk derişimde ve 24 saatlik sürede gerçekleşirken (Olive Kuyruk Momenti: 15,5224), minimum hasar % 0.5’lik derişimde ve 24 saatte (Olive Kuyruk Momenti: 7.48) meydana geldi. Edilen bulgulara göre; uygulama grupları arasındaki karşılaştırmalarda maksimum DNA hasarı en yüksek konsantrasyon (% 10 TAS) grubunda elde edildi. İlk 24 saatte % 10 grubunda belirlenen Olive Kuyruk Momentinin (Olive Kuyruk Momenti: 15.5224) kontrol grubuna (Olive Kuyruk Momenti: 10) kıyasla önemli seviyede arttığı gözlemlendi. 48 saatlik süre ile % 10 TAS konsantrasyon verilen balıkların Olive Kuyruk Momenti ölçümlerinde (Olive Kuyruk Momenti: 8.467) % 5 grubuna göre (Olive Kuyruk Momenti: 7.742) anlamlı oranda ($p<0.05$) bir yükselme kaydedildi. Olive Kuyruk Momentinin 72. saatte artan doza bağlı olarak kademeli ve istatistiksel bir artış ($p<0.05$) gösterdiği belirlendi. 96. saatte yapılan ölçümlerde % 10’luk uygulama grubuna ait DNA hasarı (Olive Kuyruk Momenti: 15.234), % 0.5 (Olive Kuyruk Momenti: 11.493) ve % 5 (Olive Kuyruk Momenti: 12.222) gruplarına göre önemli ölçüde ($p<0.05$) yüksek hesaplandı (Tablo 3.3 ve Şekil 3.3).

Tablo 3.3. 24, 48, 72 ve 96 saatler sonunda % 0.5, 5, 10 TAS deney grupları ile negatif ve pozitif kontrol gruplarında gelişen ortalama ‘Olive Kuyruk Momenti (\pm Standart hata)’nin karşılaştırılması

Gruplar	Olive kuyruk momentini (\pm Standart hata)			
	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
% 0,5	7,480 \pm 1,879	9,091 \pm 2,548	9,560 \pm 2,777	11,493 \pm 2,824
% 5	9,076 \pm 2,203	7,742 \pm 2,354	11,441 \pm 3,289	12,222 \pm 2,465
% 10	15,522 \pm 6,597	8,467 \pm 1,811	13,569 \pm 3,151	15,234 \pm 3,258
-c (negatif kontrol)	10 \pm 3,766	10 \pm 3,766	10 \pm 3,766	10 \pm 3,766
+c (pozitif kontrol)	21,640 \pm 7,917	21,640 \pm 7,917	21,640 \pm 7,917	21,640 \pm 7,917



Şekil 3.3. Farklı konsantrasyon ve sürelerde TAS'a maruz bırakılan japon balıklarının eritrositlerinde görülen ortalama 'Olive Kuyruk Momenti (\pm Standart hata)' ölçümlerinin negatif ve pozitif kontrol grupları ile karşılaştırılması

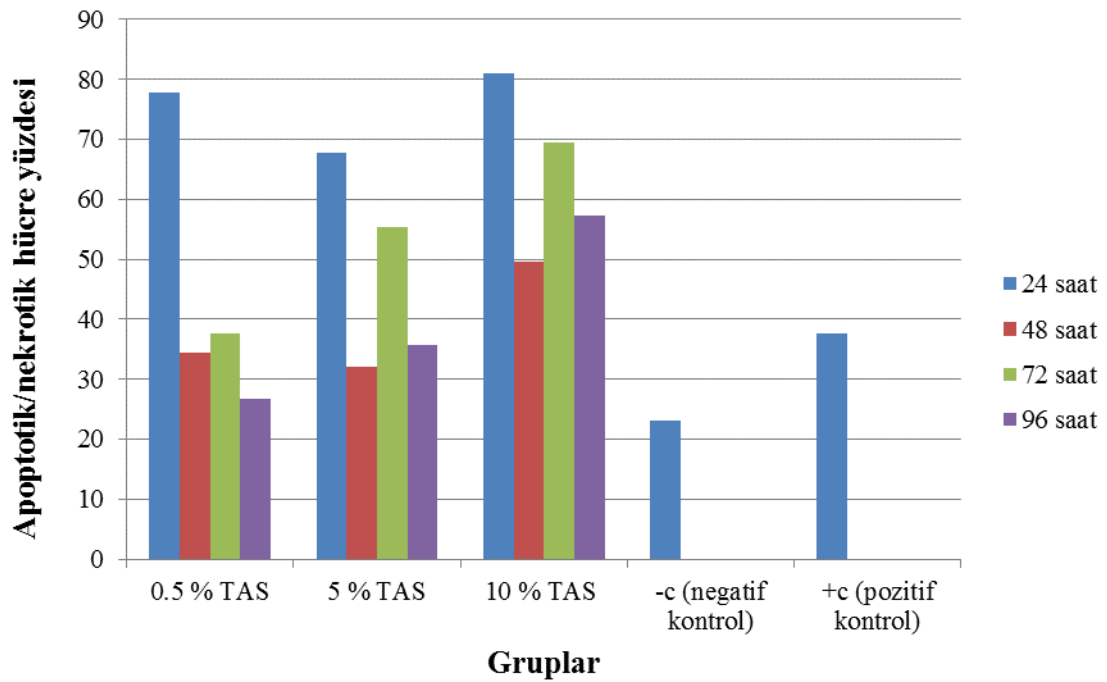
Yapılan Comet incelemelerinde; kontrol ve deney grupları (% 0.5, 5 ve 10 TAS) için kaydedilen parametrelerin (Kuyruk % DNA ve Olive Kuyruk Momenti) frekans değerleri arasında anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde bir farklılık olup olmadığına bakılmış ve elde edilen tüm bulgular istatistiksel açıdan karşılaştırılmıştır. Doz gruplarında görülen parametrik değerler ile negatif kontrol grubu arasında anlamlı düzeyde farklar olduğu tespit edilmiştir. Özellikle % 10'luk TAS konsantrasyon grubunda uygulama süresine bağlı olarak eritrositlerdeki DNA hasar seviyesinin belirgin bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Hasarlı DNA sayıları, konsantrasyonlara maruz kalma süresi ile artmış ve artan konsantrasyonlarda genotoksisite yanıtı gözlenmiştir. Diğer yandan, 48. saatte TAS konsantrasyonu % 0.5'den % 5'e çıkarıldığında, Kuyruk % DNA ve Olive Kuyruk Momenti parametrelerinde önemli oranda ($p < 0.05$) azalmalar tespit edilmiştir. DNA hasarının bu süreler sonunda ve artan doz karşısında $p < 0.05$ düzeyinde azalma göstermesi, söz konusu sürelerde DNA onarım mekanizmasının devreye girdiğini ve bütünlüğü bozulmuş DNA molekülünün spesifik enzimler yardımıyla kendini tamir ettiğini düşündürmektedir.

DNA difüzyon testi için ölçülen apoptoz ve/veya nekroz kaynaklı ölü hücre sayısının yüzde miktarının en fazla % 10'luk derişimde, 24. saatte (% 80,99), en az % 0.5'luk derişimde ve 96. saatin sonunda (% 26.82) olduğu görüldü. Negatif kontrol grubuna göre, tüm

atıksu muamelesi görmüş gruplarda, hasarlı fragmentlerin dağılımında yüzdece bir artış kaydedildi. 24. uygulama saatinde % 10 TAS uygulama grubunda oldukça yüksek oranda apoptotik ve nekrotik hücre tespit edildi. Daha sonraki uygulama saatlerinde ölü hücrelerin sayısı azalmış olsa da, bu sayının negatif kontrole göre oldukça yüksek olduğu izlendi (Tablo 3.4 ve Şekil 3.4).

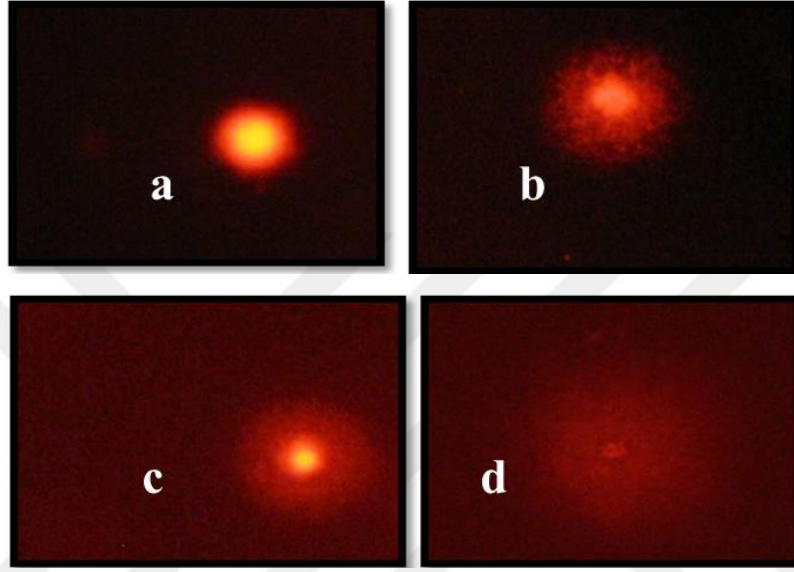
Tablo 3.4. 24, 48, 72 ve 96 saatler sonunda % 0.5, 5, 10 deney grupları ile pozitif ve negatif kontrol gruplarında gelişen ‘Apoptotik/Nekrotik hücre yüzdeleri’

Gruplar	Apoptotik/Nekrotik hücre yüzdesi			
	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
% 0,5	77,86	34,35	37,70	26,82
% 5	67,82	32,07	55,45	35,71
% 10	80,99	49,60	69,56	57,22
-c (negatif kontrol)	23,00	23,00	23,00	23,00
+c (pozitif kontrol)	37,71	37,71	37,71	37,71



Şekil 3.4. Farklı konsantrasyon ve sürelerde TAS'a maruz bırakılan japon balıklarında görülen apoptoz veya nekroz kaynaklı ölü hücre sayısının yüzde miktarının negatif ve pozitif kontrol grupları ile karşılaştırılması

Yapılan difüzyon testinde; DNA'sı hücre dışına göç edemeyen hücreler 'hasarsız' kabul edilirken, ana çekirdek çapının 3 katından daha fazla çapa sahip hücreler 'ölü (apoptotik/nekrotik)' olarak değerlendirildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. DNA difüzyon testi sonucu japon balığının eritrositlerinde hasarsız (a) ve apoptotik/nekrotik (b, c, d) olarak değerlendirilen DNA fragmentlerinin görüntüleri

Bu çalışmada Comet ve DNA difüzyon tekniği kullanılarak tekstil yıkama atıksuların japon balıklarında geliştirdiği DNA hasarı değerlendirildi. Yarı statik şartlarda ve kısa süre ile (96 saat boyunca) TAS'ın öldürücü olmayan farklı konsantrasyonlarına (% 0.5, 5 ve 10 TAS v/v) maruz bırakılan balıkların, negatif kontrol grubundakilere göre alyuvar hücrelerinde önemli ölçüde ($p < 0.05$) yüksek DNA hasarı sergilediği tespit edildi. TAS'ın balıklar üzerindeki genotoksik etkileri yapılan bilimsel çalışmalar ile desteklenmektedir. Elde edilen sonuçlar, TAS'ın çeşitli organizmalar üzerindeki etkileri konusunda çalışan diğer araştırmacıların elde ettiği sonuçlar ile uyum içindedir. TAS ile yapılan diğer çalışmalarda, bu atıksuların birçok organizma üzerinde pek çok etkiye sahip olduğu görülmüştür. Öyle ki TAS'ın birçok canlı üzerinde yarattığı genetik, genotoksik, sitolojik, histolojik, fizyolojik (büyüme, gelişme, üreme), biyokimyasal (enzim, hormon), oksidatif ve davranışsal etkiler yapılan bilimsel deneylerde açıkça gösterilmiştir.

Organik besinlerin O_2 ile parçalanması sonucu oluşan oksidan moleküller (ROS) organik yapılu bileşenlere (karbonhidrat, yağ, protein, DNA) zarar vererek oksidatif strese

neden olur. Kanser araştırmalarında biyomarker olarak kullanılan antioksidanlar, bu oksidanları ortadan kaldırarak hücreyi oksidanların zararlı etkilerine karşı korur. Balıkların solungaç ve karaciğerinde, kurbağalarda, yengeçte, sıçan kanında, hatta mantarda TAS'ın oksidatif etkilerine karşı antioksidan moleküllerinin uyarıldığı görülmüştür. Benzer etkiler ağır metaller ile de ortaya çıkmaktadır. Antioksidan enzim aktivitelerine bakıldığında; SOD (süperoksit dismutaz), CAT (katalaz), GST (glutatyon S transferaz), GSH (glutatyon), GR (glutatyon redüktaz), AST (aspartat transaminaz), LDH (laktat dehidrogenaz) enzimlerin miktarında önemli oranda artış (genelde) ya da azalışlar; TBARS (tiyobarbitürik asit reaktif madde), MDA (malondialdehit), ALT (alanin transaminaz), T-AOC (toplam antioksidant kapasitesi), LPO (lipid peroksidasyon) gibi enzimlerde artış; ALAD (amino levülinik asit dehidrogenaz) enziminde azalış tespit edilmiştir. Esansiyel besinlerden folik asit (B vitamini), askorbik asit (C vitamini) ve lizin (aminoasit) miktarında azalış olduğu görülmüştür. C vitamini eksikliğinin balıklarda; böbrek, karaciğer, cilt ve göz lezyonları, cilt ve solungaç kanamaları, kuyruk yüzgecinde aşınma, düzensiz ve çırpınarak yüzme, bitkinlik, uyuşukluk, iştahsızlık, hemotokrit azalması, Hb düşüklüğu, karında su toplanması, kıkırdakta anormallik, omurga kayması gibi hastalık belirtilerine neden olduğu bildirilmiştir.

TAS balıkların davranışları üzerinde çeşitli olumsuz etkiler yaratmakta ve bu durum balıkların ani ölümüne sebep olmaktadır. Bu etkilerden bazıları; halsizlik, sükûnet, uyuşukluk, tankın altına yerleşme, dipte sakinlik, denge kaybı, düzensiz hareket ve yüzme, solunum bozukluğu, yüzey hareketinde artış, yiyecek tüketiminde azalma (iştahsızlık), vücut ağırlığında azalma (zayıflama) şekinde sayılabilir.

TAS balıkların morfolojisinde deride aşırı mukus salgısı, deri rengine parlama ve kayganlık, solungaçlarda kanama (hemoroid) gibi birtakım olumsuz etkiler meydana getirmiştir.

TAS balıkların ve sıçanların kanında çok sayıda hematolojik parametrelerin değişmesine yol açmaktadır. Eritrosit geçirgenliğinde tahribat meydana gelmesi ve eritrosit sentezinin (eritropoietin) azalması sonucu eritrosit (RBC) sayısında azalma ve bu azalmaya bağlı olarak anemi oluşumu; RBC boyutunda azalma, RBC morfolojisinde anormallik (anizositoz: boyut, büyüklük, en-boy-çap değişimi; poikilositoz: şekil değişimi); MCV (ortalama eritrosit hacmi), Hb (hemoglobinin), MCH (eritrositte bulunan ortalama Hb miktarı), ve MCHC (eritrositte bulunan ortalama Hb konsantrasyonu)'de azalmalar; WBC'de (lökosit sayısı) artış (genelde) ya da azalış, WBC boyutunda artış, PCV'de (paketlenmiş hücre hacmi)

azalma; glikoz, toplam protein, albumin, globulin, kolesterol, trigliserid düzeylerinde azalmalar; üre, kreatinin ve bilirubinde ise artışlar saptanmıştır.

Detoksifikasyon ve biyotransformasyon ile ilişki olan ve bol damarlı olan karaciğer, sudaki kirleticilerden en fazla etkilenen organdır. TAS balık ve sıçanların karaciğer dokularında histopatolojik etkiler yaratmaktadır. Bu dokularda toplam glikojen, toplam protein, sialik asit miktarlarında azalmalar; toplam lipid ve toplam kolesterol miktarlarında ise artışlar elde edilmiştir. Kolesterol miktarındaki artışlar kolesterolün eşey steroidlerine ve safra asitlerine dönüşümünün engellenmesi sonucu gerçekleşmiştir. Söz konusu dokuların protein bantlarında gerilmeler ve yapısal kayıplar yaşanmıştır. Ayrıca bu dokularda dejenerasyon, nekroz, Periportal inflamasyon, hepatik bağların bozulması, safra kanalı proliferasyonu (yayılma, çoğalma), nükleer karyoliziz artışı olduğu gözlenmiş, merkezi vende (toplardamarda) tıkanıklık, ödem, trombozis, kan damarında intravasküler tıkanıklık, kan dolaşımının engellenmesi, hemoliz, vasküler genişleme, hiperemi (dokuların normalden fazla kanlanması), kan sinüs ve sinüzoidlerin tıkanması ve genişlemesi belirlenmiştir.

TAS balık, fare ve sıçanların hepatositlerinde sitopatolojik olarak olumsuz etkiler meydana getirmiştir. Hücrelerde; inflamasyon (iltihaplanma), ödem, şişme (mikrositoz), hacim artışı nedeniyle doku ve organlarda büyüklük artışı (hipertrofi), dejenerasyon, sitoplazmik vakuol oluşumu, organellerde (vakuolde) dejenerasyon, boyut artışı (makrositoz), infiltrasyon (hücrelerin yada hücrel maddelerin normalde bulunmaması gereken bir dokuya göç ederek burada patolojik düzeyde birikmesi durumu), dejeneratif çekirdek, 2 çekirdekli durum, pinotik çekirdek, fibrozis olduğu görülmüştür. Sitoplazmadaki proteinlerin pıhtılaşp denatüre olması nedeniyle proteinlerde yer alan spektrum bantlarının yapısal değişime uğraması ve koagülasyon nekrozu (fizyolojik olmayan hücre ölümü); pankreas asinüs hücrelerinde atrofi ve dejenerasyon; organel, hücre ve dokuda dejenerasyon (doğal yapının bozulması sonucu işlevlerde azalma meydana gelmesi) tespit edilmiştir.

TAS balıkların hemositlerinde, hepatositlerinde ve solungaç hücrelerinde genotoksik etkiler göstermektedir. Diğer yandan doz grupları kontrol gruplarına taşındığında iyileşme belirtileri gözlenmiştir. Kuyruk % DNA, olive kuyruk momenti, kuyruk momenti, ölü (apoptotik/nekrotik) hücre %'si, mikronükleus sıklığı, DNA boy/en oranı gibi genotoksik parametrelerde artış; EC₅₀ (efektif konsantrasyon % 50) ve LC₅₀ (letal konsantrasyon % 50)'de azalış, Tua (akut toksik birimi) ve TF (toksisite faktörü)'de artış olmuştur.

TAS balıkların karaciğer, kas ve böbrek gibi dokularında ozmoregülatif etkilere neden olmuştur. Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^{+1} kanyonlarında artış ya da azalışlar, Na^{+1} Cl^{-1} iyonlarında azalışlar tespit edilmiştir.

TAS sıçanların üremeleri üzerinde inhibitör etki göstermiştir. Seminifer tübüllerde dejeneratif değişimler; testis, epididimis ve seminal vezikül ağırlığında azalma; testiste toplam glikojen ve protein miktarında azalma; toplam lipid ve toplam kolesterolde artma; testiste spermatogonya, spermatid, birincil ve ikincil spermatozoid (sperm-atozoa) sayısında azalma görülmüştür. TAS oksidatif fosforilasyonda rol alan enzimatik reaksiyonları etkilemiş, ATP azalmasına bağlı olarak akrozom reaksiyonları ve sperm hareketliliği azalmıştır. İkincil spermatozoid seviyesinde spermatogenezin önlenmesi, fertilité (üreme) oranında azalma, sertoli hücrelerinin sayısında ve yüzey alanında azalma; leydig hücrelerinin sayısı, hacmi ve çapında azalma, kolesterol kullanan leydig hücrelerinin sayısının azalmasına bağlı olarak bu hücreler tarafından kullanılmayan kolesterolde artma ve prostat iltihabı görülmüştür.

Tekstil boyalarına uzun süre maruz kalan işçilerde birtakım semptomik etkiler görülmüştür. Bu etkiler; dermatit (deri iltihabı), şiddetli cilt tahrişi, deri ülseri, başağrısı, mide bulantısı, rinitis, akciğer tahrişi, astım, konjenital malformasyon, beyin, üreme sistemi ve merkezi sinir sistemi hastalıkları, böbrek hasarı, böbrek-karaciğer-mesane (idrar kesesi) kanserleri şeklinde sıralanabilir. Kot ağartılmasında kullanılan $KMnO_4$ 'i oral yoldan alan insanlarda koagülopati (sıvı kanın pıhtılaşarak katı hale gelmesi) meydana gelmiştir.

TAS; bitkilerin büyüme, gelişme ve üremesi üzerinde olumsuz fizyolojik etkiler göstermiştir. TAS içindeki TÇKM artışına bağlı olarak ozmotik basınç artmış, tohum tarafından emilen su miktarı azalmıştır. Tohum çimlenmesinde gecikme, tohum çimlenme oranı ve tohum sayısında azalma, tohumdaki radikula ve plumula uzunluğunda azalma görülmüştür. Çiçeklenmede ve meyve vermede gecikme, köklerde kararma meydana gelmiştir. Fide ağırlığı ve uzunluğu, kök ve sürgünlerin (yaprak, dal) boy uzunluğunda azalma, toplam biyokütle ve toplam kuru ağırlıkta azalma görülmüştür. Yapraklarda toplam klorofil azalması, genç yapraklarda klorozis (klorofil parçalanması), erken yaprak yaşlanması görülmüş, fotosentez azalmış, fide başına düşen yaprak sayısı azalmıştır. Bitkide ağır metal emilimi, alımı ve birikimi artmış (en fazla yapraklarda), inorganik besin (N, P, K, S) alımı ve birikimi azalmış, karbonhidrat ve protein içeriği azalmıştır. Topraktaki mikrobiyal biyokütle, serbest yaşayan azotobacter sayısı ve toprak solucanı sayısı azalmış, bitki ölümünde artış görülmüştür.

Görüldüğü üzere, endüstriyel TAS'ın sucul organizmalar üzerindeki olumsuz etkisini bilimsel anlamda kanıtlayan bu araştırmanın sonuçları, TAS ile yapılmış başka akademik çalışmaların sonuçları ile uyum içindedir. Tüm bu çalışmaların bulunduğu ortak nokta ise, TAS'ın organizmalarda yaratmış olduğu yıkıcı etkilerdir ve ortaya çıkan biyolojik sonuçların tümü mevcut çalışmayı destekler niteliktedir.

TAS'ın farklı canlılar üzerinde yarattığı tüm bu olumsuz etkilerin ve hastalık semptomlarının temelde genetik hasardan kaynaklandığı düşünülmektedir.



4. SONUÇLAR

TAS'ın balıktaki genotoksisitesinin anlaşılması ve genetik madde üzerinde görülen yapısal varyasyonlar; sucul yaşamdaki kirleticilerin balıklar üzerindeki etkilerinin izlenmesi, tanımlanması ve çevresel risk değerlendirmesi için önemli bir değer taşımaktadır. Bu amaçla bu çalışmada; endüstriyel TAS'ın hedef olmayan organizmalardan balıklar üzerinde yapacağı genotoksik etkiler *in vivo* koşullarda genotoksisite belirleme yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Tekstil (kot) yıkama atıksularının, balık eritrositleri üzerinde yapacağı genotoksik hasarın tespiti için, japon balıkları (*Carassius auratus*) ölümcül olmayan konsantrasyonlarda (% 0.5, 5 ve 10 v/v) hazırlanmış atık su örneklerine akut süreler (24, 48, 72, 96 saat) ile maruz bırakılmıştır.

Apoptoz veya nekroz ile ilişkili olan ölü hücrelerin DNA'ları aşırı hasar nedeniyle elektroforez sırasında agaroz matrikste kaybolabilecek ve görüntülenemeyecek kadar çok sayıda küçük molekül ağırlıklı fragmentler içermektedir. Bu nedenle ölü (aşırı hasarlı) hücrelerin Comet testinde görülebilme şansı yoktur. Bu durum Comet sonuçlarının tam manasıyla genotoksisiteyi yansıtamadığını düşündürmektedir. İşte bundan dolayı, Comet testinin DNA difüzyon testi ile beraber gerçekleştirilmesi ve her iki testten alınan verilerin birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir.

Difüzyon testi ile ortaya çıkan ölü hücrelerin sayıca yüzdesi negatif kontrol grubunda % 77'lerde iken, bu yüzde tripan yöntemiyle hücelere uygulanan canlılık testinde % 90 olarak belirlenmiştir. Bu da sözkonusu canlılık testinin, DNA difüzyon testi ile karşılaştırıldığında duyarsız ve yetersiz kaldığını göstermektedir.

DNA difüzyon analizinin, apoptoz ya da nekrozun morfolojik özelliklerini gösteremeyen, hücre canlılık testinde negatif sonuç veren ve ışık mikroskopunda tespit edilemeyen ölü hücelere son derece duyarlı bir teknik olduğu, dolayısıyla ölü hücrelerin ortaya çıkarılmasında kullanılabilecek yararlı ve kullanışlı bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla bu deneyde japon balıklarının periferik kan eritrositlerindeki DNA zincir kırıklarını ölçmek için Comet ve DNA difüzyon deneylerinin birleştirilerek kombinasyon halinde kullanılması kararlaştırılmıştır. Comet ve DNA difüzyon teknikleri kullanılarak yapılan genotoksisite çalışması sırasında, deney ve kontrol grupları oluşturulmuş ve kullanılan her balık için kan numunesi başına iki lam analiz edilmiştir. Negatif ve pozitif kontrol gruplarına göre doz gruplarında Comet ve DNA difüzyon skorları yapılmış ve Cometten elde edilen parametrik ölçümlerdeki değişimler kıyaslanarak bu değişimlerin rastlantısal olup olmadığı araştırılmıştır. Comet testinde, eritrositlerin doğal genetik yapısında

meydana gelen bozulmalar, DNA fragmentlerinin görüntülenmesi ile açığa çıkarılmıştır. DNA difüzyon testinde; DNA'lar görsel olarak sayılmış ve hasarsız-ölü olmak üzere iki derecede kategorize edilmiştir. Kontrol ve atıksu ile muamele edilmiş deney gruplarındaki ölü hücrelerin yüzdece sayısı hesaplanmış ve hasar derecelerinin sıklık dağılımları karşılaştırılmıştır. Her iki genotoksisite testi için, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, uygulama süresinin artışına bağlı olarak, TAS'ın farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan balıkların genetik yapısında önemli değişimler meydana geldiği görülmüştür.

Edinilen bulgulara göre; değişen çevresel koşullara karşı balıklarda dengesiz yüzme ve fiziksel aktivelerde herhangi bir anomali görülmemiş veya balıkların büyük bir kısmında ölüm yaşanmamıştır. Buna karşın, balığın kan dokusunda yapılan Comet ölçümleri, artan atıksu konsantrasyonlarına maruz kalan organizmada genotoksik yanıtın teşvik edildiğini ortaya koymuştur. Öyle ki Kuyruk % DNA ve Olive Kuyruk Momenti parametreleri ile ifade edilen DNA hasar düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) düzeyde bulunduğu belirlenmiştir. Bunun yanında tüm atıksu ile muamele edilmiş gruplardaki DNA hasar dağılımları negatif kontrolden farklılık göstermiş, azalan atıksu konsantrasyonunda DNA zincir kırıklarında önemli ölçüde ($p<0.05$) bir azalma eğilimi olduğu saptanmıştır. Genotoksisite bakımından test edilmesi için, farklı sürelerde ve değişken subletal konsantrasyonlarda, balıklara uygulanan TAS numunesinin, balık eritrositlerinde DNA hasarını uyarıcı genotoksik ajanlar içerdiği tespit edilmiştir. TAS içindeki genotoksik maddelerin, canlı hücrelerdeki genetik materyal ile etkileşime girerek DNA zincirinde kırıklar meydana getirdiği sonucuna varılmıştır. Genotoksinler ile DNA onarım sistemi bozulan eritrositlerdeki DNA kırıkları tamir edilemediği için hücre apoptoza yönlendirilmiştir. Bu çalışmada tespit edilen DNA hasar profilinin, atık su etkileşiminden kaynaklanan DNA tek-çift zincir kırılmaları, DNA eklentileri oluşumu ve DNA-DNA, DNA-protein çapraz bağlantılar nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir. Ayrıca genetik yapıları izlenen balıkların artan doza karşı toksik yanıt verdiği görüldüğünden, japon balıklarının genotoksinlere karşı oldukça hassas bireyler olduğu farkedilmiştir. Atıksudaki kimyasal faktörlerin suçlu organizmalardan balıklar üzerindeki toksik etkisinin anlaşılmasının, bu ve buna benzer araştırmaların çoğalmasına zemin hazırlayacağı umut edilmektedir. Bu çalışmada kullanılan balıkların suçlu ortamda meydana gelen çevresel değişikliklere hassas olması ve kirletici maddeleri bünyesinde biriktirmesi nedeniyle, biyomonitöring amacıyla kullanılması gerektiği düşünülmektedir. TAS'ın deşarj edildiği sularda yaşamlarını sürdüren balık ve diğer canlı organizmaların biyoanalizinin gerçekleştirilerek, toksik etkilerinin izlenmesi gerektiği önerilmektedir. TAS ile genotoksik hasara uğratılan balıkların hasarlı DNA'larının kalıtım

yoluyla bir sonraki kuşağa aktarıldığı tahmin edilmektedir. Bu açıdan söz konusu balıkların nesillerinin uzun vadede izlenmesi tavsiye edilmektedir. Deneyin kronik sürede gerçekleştirilmesi, incelenen parametrelerin artış veya azalmasındaki oransal değişimlerin daha iyi yorumlanmasına yardımcı olacaktır. Ayrıca atık su bir defada alındığı için farklı proseslerde yani farklı işlemlerde de benzer çalışmaların karşılaştırılmalı yapılabileceği önerilmektedir. Bu çalışma aynı zamanda insan sağlığı üzerindeki olası risk değerlendirmesine de olanak sağlamaktadır.

Bu çalışmadan, balık biyodenevi ile önemli sayıda balık ölümünün saptanmadığı ve ağır metaller yönünden standart deşarj limitlerini aşmadığı görülen arıtılmış (fiziksel ve kimyasal) TAS'ın genotoksik ajanlar içerdiği sonucuna ulaşılmaktadır. Tekstil boyama ve yıkama işlemleri sonucu oluşan ve TAS içinde bulunan kimyasal maddelerin balıkların genetik yapılarını toksik hasara uğrattığı kanısına varılmıştır. Genotoksisite deneyinde kullanılan TAS'ın balıklar için toksik konsantrasyonu % 0.5 bulunmuştur. Bu nedenle balıklar tarafından kabul edilebilir toksik olmayan güvenli deşarj konsantrasyonu % 0.5'ten az olacak şekilde ayarlanmalıdır. Atıksu kalitesinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan fizyolojik (renk), kimyasal (pH, KOİ, AKM, TKN, yağ ve gres, sülfat, siyanür, fosfor, florür, krom, bakır, civa, çinko, demir, kadmiyum, krom, kurşun) ve biyolojik (balık biyodenevi) analizler kirliliğin sucul ekosistemde yaşayan organizmalardan balıklar üzerindeki etkilerin ölçümünde tek başına yetersiz kalmaktadır. Tekstil ve diğer endüstriyel atıksu arıtımlarının, Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği'nde belirlenen deşarj limitleri ile uyum sağlanması ve genotoksisite izlenmesinin bir arada kullanılması gerektiğini önemle vurgulamaktadır. Bu açıdan TAS'ın arıtım etkinliğinin onaylanması ve alıcı ortama deşarjı için genotoksik parametrelerin kullanılmasına duyulan ihtiyaç, ek kanuni düzenlemelerin yapılmasını zorunda kılmaktadır.

Tekstil ürünlerinin boyanması ve yıkanması sırasında kullanılan çeşitli kimyasal maddelerden bazılarının balıklar için genotoksik özellikte olduğu bilinmektedir. Tekstil üretiminde kullanılan sentetik boyaların ve kimyasal maddelerin mutajenite ve karsinojenite ile ilişkili olması, sağlık açısından ciddi riskler taşımaktadır. Bu maddelerin gelişigüzel kullanımı ve uygun şekilde arıtılmamaları sonucu sucul sistemlerin geleceği tehlike altına girmektedir. Bu çalışma sucul ekosisteme deşarj edilen arıtılmış TAS'ın, özellikle deşarj noktasında akuatik biyota için zararlı olduğunu ve su kaynaklarının fiziksel ve kimyasal parametrelerini olumsuz etkileme potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymuştur. Elde edilen tüm sonuçlar; belli sürelerde ve farklı dozlarda hazırlanan atıksu örneklerine maruz bırakılan balıkların, bu riske maruz kalmayan balıklara göre genotoksisite ve kanserojenlik bakımından

potansiyel risk taşıdıklarını düşündürmekte ve bu durum yapılan ekotoksikolojik çalışmalar ile desteklenmektedir. Bu nedenle, atıksuların su ekosistemine verilmeden önce, daha etkili yöntemler kullanılarak arıtılmasına duyulan ihtiyaç önemle vurgulanmaktadır. Gerek sucul alanları gerekse bu ortamlar ile ilişkide bulunan akuatik organizmaları ve karasal alanları korumak için genotoksik boya ve kimyasalların geniş kullanımı sınırlandırılmalıdır ve bu boyaların alternatif olarak çevre dostu doğal boyalar ile yer değiştirilmesi sağlanmalıdır.

TAS'ın bertarafı konusunda ileri tasfiye prosesleri önem kazanmalı ve gelişmiş teknolojiler küresel çapta hayata geçirilmelidir. Gelişmiş arıtma proseslerinden biri olan farklı oksidanların (O₃, UV, TiO₂, fenton, foto-fenton ve H₂O₂) farklı kombinasyonlar altında kullanılması esasına dayanan oksidasyon yöntemiyle arıtılan TAS'ın, biyotoksisiteyi azaltmada nispeten etkili olacağı ve balıklar üzerinde genotoksik etkiler yaratmayacağı düşünülmektedir. Bu sayede ileri oksidasyon sisteminin, TAS tasfiyesinde sıklıkla kullanılması tavsiye edilmektedir.

TAS'ın ekonomik öneme sahip bazı tarım bitkilerinin büyümesi üzerinde olumsuz etkiye sahip ağır metaller içerdiği desteklenmiştir. Ancak ileri arıtma işlemlerinden geçirilen TAS'ın bitki büyümesindeki olumlu etkileri düşünüldüğünde, bitkilerin endüstriyel amaçlı yetiştirilmesinde kullanılabileceği önerilmektedir. Türkiye'deki su kullanımından en fazla payı % 76 ile tarım alanları almaktadır. Ülkemizde var olan su potansiyelinin büyük bir kısmının tarımsal sulamada kullanıldığı dikkate alındığında, ileri düzeyde arıtılmış TAS'ın, sadece tarımsal alanlarda değil aynı zamanda başka endüstriyel alanlarda da kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu durumun her geçen gün etkisini sürdüren su kıtlığına ve kuraklığa bir çözüm oluşturulabileceği umut edilmektedir.

Deneyde kullanılan biyolojik tayinlerin, TAS'ın toksisitesini belirlemek için hassas ve güvenilir araçlar olduğu kanıtlanmıştır. Deney için seçilen parametrelerin, endüstriyel kirleticilerden TAS'ın çevresel faktörler ve balıklardaki etkisini değerlendirmek için biyolojik izleme çalışmalarında uygun olduğu görülmektedir. Yapılan incelemeler doğrultusunda erişilen bulgular eritrositlerde incelenen her üç parametrenin de, endüstriyel kirleticilerle karışmış sulara maruz kalmanın duyarlı göstergeler olabileceğini doğrulamaktadır. Seçilen parametreler erken uyarı göstergeleri olarak, *Carassius auratus* yavrularında TAS'ın toksik mekanizmaların anlaşılmasında fayda sağlamaktadır. Atıksuların potansiyel etkilerini tahmin etmek ve sucul canlıların hayatta kalması için akuatik çevreye deşarj edilecek atıksu hacmini belirlemek için, kullanılan bu parametrelerin atık su deşarj parametrelerinden 'balık biyodeneği (mortalitesi)' yanında toksisite izlenmesi için daha iyi endeksler olacağı kanısına

varılmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada uygulanan Comet ve DNA difüzyon testlerinin genotoksinlerin etkisini değerlendirmek için ekotoksikolojik çalışmalarda kullanılabilir uygun ve kullanışlı yöntemler olduğu düşünülmektedir. Öte yandan ölü hücreler arasında apoptoz ya da nekroz ayırımı yapmada yetersiz kalması nedeniyle DNA difüzyon analizinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.



KAYNAKLAR

- [1] Abdel Moneim, A.M., Abou Shabana, N.M., Khadre, S.E.M., Abdel Kader, H.H. (2008) Physiological and histopathological effects in catfish exposed to dyestuff and chemical waste water. *International Journal of Zoological Research*, 4, 189-202.
- [2] Adewoye, S.O., Lateef, A. (2004) Evaluation of the microbiological characteristics of Oyun river-A polluted river in north-central Nigeria. *Pollution Research*, 23, 587-591.
- [3] Adewoye, S.O., Fawole, O.O., Owolabi, O.D. (2005) Toxicity of cassava a waste water effluents to African catfish: *Clarias gariepinus*. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, 28, 189-194.
- [4] Agbon, A.O., Arowolo, T., Bakare, W. (2014) Local textile industry wastewater effect on freshwater fish species. *Journal of Aquatic Sciences*, 29, 2.
- [5] Aggarwal, S., Gupta, S. (1998) Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: Altered expression of fas (CD95), fas ligand, Bcl-2 and Bax. *Journal of Immunology*, 160, 1627-1637.
- [6] Agrawal, V.K., Bansal, A., Kumar, R., Kumawat, B.L., Mahajan, P. (2014) Potassium permanganate toxicity: A rare case with difficult airway management and hepatic damage. *Indian Society of Critical Care Medicine*, 12, 819-21.
- [7] Aguila, M.B., Mandarim de Lacerda, C.A., Apfel, M.I. (1998) Stereology of the myocardium in young and aged rats. *Arquivos Brasileiros Cardiologia*, 70, 105-109.
- [8] Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M. (2000) Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1523, 37-48.
- [9] Ahmad, M., Saleem, S., Ahmad, A.S., Ansari, M.A., Yousuf, S., Hoda, M.N., Islam, F. (2005) Neuroprotective effects of *Withania somnifera* on 6-hydroxy dopamine induced parkinsonism in rats. *Human and Experimental Toxicology*, 24, 137-147.
- [10] Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A. (2006) *Anguilla anguilla* L. Oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere*, 65, 952-962.
- [11] Akın, M., Galip, A. (2007) Suyun önemi, Türkiye’de su potansiyeli, su havzaları ve su kirliliği. *Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi Dergisi*, 42, 2, 105-118.
- [12] Alapetite, C., Benoit, A., Moustacchi, E., Sarasin, A. (1997) The comet assay as a repair test for prenatal diagnosis of *Xeroderma pigmentosum* and trichothiodystrophy. *Journal of Investigative Dermatology*, 108(2), 154-9.

- [13] Alaton, I.A., Balcioglu, I.A., Bahnemann, D.W. (2002) Advanced oxidation of a reactive dye bath effluent: Comparison of O₃, H₂O₂/UV-C and TiO₂/UV-A processes. *Water Research*, 36, 1143-1154.
- [14] Albino, W.J., Murugan, M. (2010) Effect of textile mill effluent on growth and germination of black. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1(1), 1.
- [15] Ali, S., Nadeem, R., Bhatti, H.N., Hayat, S., Chatha, S.A.S., Muneer, M. (2006) Analyses and treatment of textile effluents. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8, 641-644.
- [16] Almeida, J.A., Novelli, E.L.B., Dal P.S.M., Alves, J.R. (2001) Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the *Nile tilapia, Oreochromis niloticus*. *Environmental Pollution*, 114, 169-175.
- [17] Alnemri, E.S., Litwack, G. (1990) Activation of internucleosomal DNA cleavage in human CEM lymphocytes by glucocorticoid and novobiocin, Evidence for a non-Ca²⁺-requiring mechanism(s). *Journal of Biological Chemistry*, 265, 17323-17333.
- [18] Al-Sabti, K. (1991) Handbook of genotoxic effects and fish chromosomes. Kristoff, Ljubljana, Slovenia, pp. 221.
- [19] Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D. (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water., *Mutation Research*, 343, 121-135.
- [20] Ames, B.N., Shigenara, M.K. (1992) DNA damage by endogenous oxidants and mitogenesis as causes of aging and cancer, *Molecular Biology of free radical scavenging systems*. ed: Scandalios J.G., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, p:1-21.
- [21] Anderson, D., Yu, T.W., Wright, J., Ioannides, C. (1998) An examination of DNA strand breakage in the comet assay and antioxidant capacity in diabetic patients. *Mutation Research*, 398 (1-2), 151-61.
- [22] Andican, G., Burçak, G. (2004) Oksidatif DNA hasarı ve HPLC ile analizi, II. Ulusal HPLC ve diğer seperasyon teknikleri sempozyumu özet kitabı, Ankara.
- [23] Ando, M. (1981) Effects of ouabain on chloride movements across the seawater eel intestine. *Journal of Comparative Physiology*, 145, 73-79.
- [24] Antonious, G.F., Dennis, S.O., Unrine, J.M., Snyder, J.C. (2011) Heavy metals uptake in plant parts of sweet potato grown in soil fertilized with municipal sewage sludge. *International Journal of Geology, Earth and Environmental Sciences*, 1, 14-20.
- [25] Arık, B., Ekmekçi, Körlü, A., Duran, K. (2008) Lakkaz enzimlerinin tekstilde kullanım alanları. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2, 17-22.

- [26] Arslan, I., Balcioglu, A., Tuhkanen, T. (1999) Oxidative treatment of simulated dyehouse effluent by UV and near-UV light assisted fenton's reagent. *Chemosphere*, 39, 2767-2783.
- [27] Atamanalp, M., Sisman, T., Geyikoglu, F., Topal, A. (2008) The histopathological effects of copper sulphate on rainbow trout liver (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 3, 291-297.
- [28] Athar, R., Ahmad, M. (2002) Heavy metal toxicity: Effect on plant growth and metal uptake by wheat, and on free living azotobacter. *Water, Air and Soil Pollution*, 138, 165-180.
- [29] Atif, S. (2002) Impact of environmental regulations on the textile sector of Pakistan, Geneva.
- [30] Atli, G., Alptekin, O., Tukul, S., Canli, M. (2006) Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology and Pharmacology*, 143, 218-224.
- [31] Authman, M.M., Abbas, H.H. (2007) Accumulation and distribution of copper and zinc in both water and some vital tissues of two fish species (*Tilapia zillii* and *Mugil cephalus*) of Lake Qarun, Fayoum Province, Egypt. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10, 2106-2122.
- [32] Ayar, A., Uysal, H. (2013) Examination of the genotoxic effects of various parabens used as food additives with the *Drosophila* wing spot test (SMART). *Journal of Applied Biological Sciences*, 7(2), 83-88.
- [33] Babu, R., Parande, A., Raghu, S., Kumar, T. (2007) Textile technology-cotton textile processing: Waste generation and effluent treatment. *The Journal of Cotton Science*, 11, 141-153.
- [34] Bae, J.S., Freeman, H.S. (2007) Aquatic toxicity evaluation of copper-complex direct dyes to the *Daphnia magna*. *Dyes and Pigments*, 73, 126-132.
- [35] Bainy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M., Jungueria, V.B.C. (1996) Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus*) from polluted site. *Aquatic Toxicology*, 34, 151-156.
- [36] Balter, M. (2009) Clothes make the (Hu)man. *Science*, 325, 5946.
- [37] Banerjee, P., Sarkar, S., Dey, T.K. Bakshi, M., Swarnakar, S., Mukhopadhyay, A., Ghosh, S. (2014) Application of isolated bacterial consortium in UMBR for detoxification of textile effluent: Comparative analysis of resultant oxidative stress

- and genotoxicity in catfish (*Heteropneustes fossilis*) exposed to raw and treated effluents. *Ecotoxicology*, 23(6), 1073-1085.
- [38] Basha, P.S., Rani, A.U. (2003) Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 218-221.
- [39] Begum, R.A., Zaman, M.W., Mondol, A.T.M.A.I., Islam, M.S., Hossain, K.M.F. (2011) Effects of textile industrial waste water and uptake of nutrients on the yield of rice. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 36(2), 319-331.
- [40] Behera, B., Reddy, V. (2002) Environment and accountability: Impact of industrial pollution on rural communities. *Economic and Political Weekly*, 36(3), 19-25.
- [41] Betti, C., Davini, T., Giannessi, L., Loprieno, N., Barale, R. (1994) Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutation Research*, 307(1), 323-33.
- [42] Bishoni, N.R. (1993) Effect of chromium on seed germination, seedling growth and yield of peas. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 47, 47-57.
- [43] Blomqvist, A. (1996) Food and fashion-water management and collective action among irrigation farmers and textile industrialists in South India. Linköping University, *Studies in Art and Science*, 148, 0282-9800.
- [44] Breckle, S.W., Kahle, H. (1992) Effect of toxic heavy metals (Cd, Pb) on the growth and mineral nutrition of bean (*Fagus sylvatica*). *Vegetatio*, 101, 43-53.
- [45] Bruce, J., Richardson, M.E., Sharo, B., Luca-Abbott, D., Martin, M., McClellan, K., Paul, K.S.L. (2008) Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels integrate biomarker responses?. *Marine Pollution Bulletin*, 57, 503-514.
- [46] Brun, L.A., Corff, J.L., Maillet, J. (2003) Effects of elevated copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. *Environmental Pollution*, 122, 361-368.
- [47] Buechler, S., Mekala, G.D. (2005) Local responses to water resource degradation in India: Farmer innovations and the reversal of knowledge flows. *Journal of Environment and Development*, 14, 410-438.
- [48] Camargo, M.M., Martinez, C.B. (2007) Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish cages in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5, 327-336.
- [49] Cambra, K., Martínez, T., Urzelai, A., Alonso, E. (1999) Risk analysis of a farm area near a lead and cadmium contaminated industrial site. *Soil and Sediment*

- Contamination, 8, 527-540.
- [50] Cavas, T., Konen, S. (2007) Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22(4), 263-268.
- [51] Chen, X., Shen, Z., Zhu, X., Fan, Y., Wang, W. (2005) Advanced treatment of textile wastewater for reuse using electrochemical oxidation and membrane filtration. *Water SA*, 31, 127-132.
- [52] Chowdhury, M.J., Pane, E.F., Wood, C.M. (2004) Physiological effects of dietary cadmium acclimation and waterborne cadmium challenge in rainbow trout: Respiratory, ionoregulatory and stress parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology and Pharmacology*, 139, 163-173.
- [53] Collins, A.R., Raslová, K., Somorovská, M., Petrovská, H., Ondrusová, A., Vohnout, B. (1998) DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(3), 373-377.
- [54] Cordova, R.E.V., Simionatto, E.L., de Souza, S.M.M., Bertoli, S.L., Radetski, C.M. (2001) Toxicity-based criteria for the evaluation of textile wastewater treatment efficiency. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(4), 839-845.
- [55] Correia, V.M., Stephenson, T., Judd, S.J. (1994) Characterization of textile wastewaters-a review. *Environmental Technology*, 15, 917-919.
- [56] Cotellet, S., Ferard, J.F. (1999) Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34, 246-255.
- [57] Çetinaslan, K., Mezarcıöz, S., Çetiner, S. (2013) Yıkama işleminin denim kumaşların kopma ve yırtılma mukavemetine etkisi. *KSU Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 38-42.
- [58] Dai, W., Fu, L., Du, H., Jin, C., Xu, Z. (2009) Changes in growth performance, metabolic enzyme activities and content of Fe, Cu and Zn in liver and kidney of *Tilapia (Oreochromis niloticus)* exposed to dietary Pb. *Biological Trace Element Research*, 128, 176-183.
- [59] Damek, P.M., Sawicka, K.K. (2003) Damage to liver, kidney, and testis with reference to burden of heavy metals in yellow-necked mice from areas around steelworks and zinc smelters in Poland. *Toxicology*, 186, 1-10.
- [60] Das, M.K. (2003) Fish health management in inland fisheries-A comprehensive study. *Environmental Ecology*, 21, 72-78.
- [61] Deepa, V., Sathya, T.N., Balakrishna, M.P., Neelakanta, R.P. (2011) Genotoxicity

- evaluation of commercially available acid red dye by comet assay in fish (*Cyprinus carpio*). Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, 6, 1.
- [62] Del Barga, I., Frenzilli, G., Scarcelli, V., Nigro, M., Malmvärn, A., Asplund, L., Förlin, L., Sturve, J. (2006) Effects of algal extracts (*Polysiphonia fucooides*) on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A biomarker approach. Marine Environmental Research, 62, 283-286.
- [63] Demirci, O., Hamamcı, D.A. (2013) Antioxidant responses in *Phanerochaete chrysosporium* exposed to astrazone red FBL textile dye. Cell Biochemistry and Function, 31(1), 86-90.
- [64] Dhanam, S. (2009) Effect of dairy effluent on seed germination, seedling growth and biochemical parameter in paddy. Botany Research International, 2(2), 61-63.
- [65] Díaz, A., Carro, S., Santiago, L., Estévez, J., Guevara, C., Blanco, M., Sánchez, L., Sánchez, L., López, N., Cruz, D., López, R., Cuetara, E.B., Fuentes, J.L. (2009) Estimates of DNA strand breakage in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) leukocytes measured with the comet and DNA diffusion assays. Genetics and Molecular Biology, 32(2), 367-372.
- [66] Dimitrova, M.S.T., Tsinova, V., Velcheva, V. (1994) Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 108, 43-46.
- [67] Dinçer, Y., Akçay, T. (2000) DNA Hasarı. Türk Biyokimya Dergisi, 25(2), 73-79.
- [68] Dinçer, Y., Akçay, T., Alademir, Z., Ilkova, H. (2002) Assessment of DNA base oxidation and glutathione level in patients with type 2 diabetes. Mutation Research, 505(1-2), 75-81.
- [69] Dinçer, Y., Saygılı, E.I., Akçay, T. (2003) Influence of smoking on DNA damage and blood glutathione level. Turkish Journal of Medical Sciences, 23(2), 108-111.
- [70] Dinçer, Y., Akçay, T., Erdem, T., Ilker Saygili, E., Gündoğdu, S. (2005) DNA damage, DNA susceptibility to oxidation and glutathione level in women with polycystic ovary syndrome. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 65(8), 721-728.
- [71] DTÖ (Dünya Ticaret Örgütü) 2011 verileri.
- [72] Dudka, S., Miller, W.P. (1999) Permissible concentrations of arsenic and lead in soils based on risk assessment. Water Air and Soil Pollution, 113, 127-132.
- [73] Ebel, H., Günther, T. (1980) Magnesium metabolism: A review. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry (Zeitschrift für Klinische Chemie und klinische

- Biochemie), 18, 257-270.
- [74] El-Zein, R.A., Hastings, S.D.A., Ammenheuser, M.M., Trinen, M.M., Gulland, F.M., Ward, Jr.J.B. (2006) Evaluation of two different biomarkers for use in the assessment of toxic chemical exposure in California sea lions (*Zalophus californianus*). Marine Pollution Bulletin, 52, 104-120.
- [75] EPA (Environmental Protection Agency) (2003) Wastewater technology fact sheet: Screening and grit removal.
- [76] Eswaramoorthi, S., Dhanapal, K., Chauhan, D. (2008) Advanced in textile waste water treatment: The case for UV-ozonation and membrane bioreactor for common effluent treatment plants in Tirupur, Tamil Nadu, India, Environment with People's Involvement and Co-ordination in India. Coimbatore, India.
- [77] Fairbairn, D., Meyers, D., O'Neill, K.L. (1994) Detection of DNA damaging agents in environmental water samples. The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 52, 687-690.
- [78] Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L. (1995) The comet assay: A comprehensive review. Mutation Research, 339, 37-59.
- [79] Farombi, E.O., Adelowo, O.A., Ajmoko, Y.R. (2007) Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria, Ogun River. International Journal of Environmental Health Research, 42, 158-165.
- [80] Ferreira, M., Ferreira, P. M., Henriques, M.A.R. (2005) Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary. Portugal Aquatic Toxicology, 71(1), 39-48.
- [81] Fidan, A.F. (2007) Deneysel diyabet oluşturulmuş ratlarda diyet katılan farklı yapılarıdaki saponin içerikli bitkilerin DNA hasarı, protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu ile bazı biyokimyasal parametrelere etkilerinin araştırılması (Doktora Tezi). Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.
- [82] Flora, S.J.S., Mittal, M., Mehta, A. (2008) Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. Indian Journal of Medical Research, 128, 501-523.
- [83] Forchhammer, L., Bräuner, E.V., Folkmann, J.K., Danielsen, P.H., Nielsen, C., Jensen, A. (2008) Variation in assessment of oxidatively damaged DNA in mononuclear blood cells by the comet assay with visual scoring. Mutagenesis, 23(3), 223-231.

- [84] Frenzilli, G., Scarcelli, V., Del Barga, I., Nigro, M., Förlin, L., Bolognesi, C., Sturve, J. (2004) DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparous*) from Göteborg harbour. *Mutation Research*, 552, 187-195.
- [85] Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P. (2009) The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*, 681, 80-92.
- [86] Frenzilli, G., Lyons, B.P. (2013) The comet assay in marine animals. Springer Science Business Media, New York, 363-372.
- [87] Garg, V.K., Kaushik, P. (2007) Influence of textile mill wastewater irrigation on the growth of sorghum cultivars. *Applied Ecological Environmental Research*, 6, 1-12.
- [88] Georgiou, D., Aivazidis, A., Hatiras, J., Gimouhopoulos, K. (2003) Treatment of cotton textile wastewater using lime and ferrous sulfate. *Water Research*, 37, 2248-2250.
- [89] Gereffi, G. (2002) Outsourcing and changing patterns of international competition in the apparel commodity chain, paper presented at 'responding to globalization conference', Boulder, Colorado, April 4-7.
- [90] Ghaly, A.E., Ananthashankar, R., Alhattab, M., Ramakrishnan, V.V. (2014) Production, characterization and treatment of textile effluents: A critical review. *Chemical Engineering and Process Technology*, 5, 1.
- [91] Gichner, T., Mukherjee, A., Wagner, E.D., Plewa, M.J. (2005) Evaluation of the nuclear DNA diffusion assay to detect apoptosis and necrosis. *Mutation Research*, 586, 38-46.
- [92] Goi, A. (2005) Advanced oxidation processes for water purification and soil remediation, Thesis on chemistry and chemical engineering, Faculty of chemical and materials technology department of chemical engineering, Tallinn University of Technology.
- [93] Gorczyca, W., Bigman, K., Mittelman, A., Ahmed, T., Gong, J., Melamed, M.R., Darzynkiewicz, Z. (1993) Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias. *Leukemia*, 7, 659-670.
- [94] Gorman, A.M., McGowan, A., O'Neill, C., Cotter, T. (1996) Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences*, 139 (Suppl.), 45-52.
- [95] Goyal, R.K., Ojha, K., Sharma, S., Sharma, K.P. (2014) Risk assessment of groundwater of Sanganer industrial area (Jaipur) on hematology of swiss albino mice. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8(5), 13-17.

- [96] Göknül, H., Toröz, İ. Çimşit, Y. (1984) Endüstriyel atıksuların kontrol ve kısıtlama esasları projesi-Tekstil endüstrisi, İ.T.Ü. Çevre ve Şehircilik Uygulama ve Araştırma Merkezi, s.45, İstanbul.
- [97] Grinevicius, V.M.A.S, Geremias, R., Laus, R., Bettega, K.F. (2009) Textile effluents induce biomarkers of acute toxicity, oxidative stress, and genotoxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 57, 307-314.
- [98] Guchelaar, H.J., Vermes, A., Vermes, I., Haanen, C. (1997) Apoptosis: Molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy. *Pharmacy World and Science*, 19, 119-125.
- [99] Gupta, S., Dalela, R.C., Saxena, P.K. (1983) Effect of phenolic compounds on in vivo activity of transaminases in certain tissues of the fish *Notopterus notopterus*. *Environmental Research*, 32, 8-13.
- [100] Güner, U., Gökalp M.F.D. (2013) Balıklarda tek hücre jel elektroforezi (Comet assay). *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 3(9), 103-114.
- [101] Gül, Ş., Belge Karatas, E., Yıldız, E., Şahan, A., Doran, F. (2004) Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environmental International*, 30, 605-609.
- [102] Güngördü, A., Birhanli, A., Ozmen, M. (2013) Biochemical response to exposure to six textile dyes in early developmental stages of *Xenopus laevis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 1, 452-460.
- [103] Haley, T.J. (1975) Benzidine revisited: A review of the literature and its congeners. *Clinical toxicology*, 8, 13.
- [104] Halliwell, B., Dizdaroglu, M. (1992) The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. *Free Radical Research Communications*, 16, 75-87.
- [105] Hawley, J.K. (1985) Assessment of health risk from exposure to contaminated soil. *Risk Analysis*, 5, 289-302.
- [106] Hellowell, J.M. (1986) Biological indicators of fresh water pollution and environmental management. Elsevier Applied Science Publisher, London.
- [107] Hoar, W.S. (1989) General and comparative physiology. 3rd Edn. Prentice Hall of India, 85-88.
- [108] Holme, I. (2000) Coloration of technical textiles, Handbook of technical textiles, In: Horrocks A.R., Anand S.C. (eds), The textile Institute, Woodhead Publishing Limited, CRC Press, New York, USA.
- [109] Horoz, M., Bolukbas, C., Bolukbas, F., Kocyigit, A., Aslan, M., Koylu, A.O., Gumus,

- M., Celik, H., Koksak, M. (2006) Assessment of peripheral DNA damage by alkaline comet assay in maintenance hemodialysis subjects with hepatitis C infection. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 596(1-2), 137-142.
- [110] Houshmandfar, A., Moraghebi, F. (2011) Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc on seed germination and seedling growth of safflower. *African Journal of Agricultural Research*, 6, 1182-1187.
- [111] Işıldak, E.S. (2011) Seyreltilmiş pamuklu tekstil atıksularının arıtımında yukarı akışlı havasız çamur yataklı reaktör (YAHÇYR) sisteminden elde edilen KOİ giderim verimi ve biyogaz üretiminin fuzzy logic (bulanık mantık) tekniği ile modellenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- [112] Jain, R., Bhargava, M., Sharma, N. (2003) Electrochemical studies on a pharmaceutical azo dye: tetrazine. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 42, 243-247.
- [113] Kabeer, A.S.I. (1979) Studies on some aspects of protein metabolism and associated enzyme in the fresh water Teleost Tilapia subjected to malathion exposure. Ph.D Thesis Sri Venkateswara University, Tirupathi.
- [114] Kadioglu, E., Sardas, S., Aslan, S., Isik, E., Karakaya, E.A. (2004) Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with alzheimer's disease. *Biomarkers*, 9(2), 203-9. 59.
- [115] Kalaiselvi, P., Shenbagavalli, S., Mahimairaja, S., Srimathi, P. (2009) Impact of post biomethanated distillery spentwash on seed germination and seedling growth of dryland crops. *Madras Agricultural Journal*, 96, 331-334.
- [116] Kant, R. (2012) Textile dyeing industry and environmental hazard. *Natural Science*, 4, 22-26.
- [117] Kanthariya, B.V., Tank, S.K. (2015) Toxicity study of textile effluent of Udhna, Surat Region (Gujarat) on wistar albino rat. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, 5, 1, 31-40.
- [118] Karthikeyan, S., Jambulingam, M., Sivakumar, P., Shekhar, A.P., Krithika, J. (2006) Impact of textile effluents on fresh water fish *Mastacembelus armatus*. *E-Journal of Chemistry*, 3(4), 303-306.
- [119] Kdasi, A., Idris, A., Saed, K., Guan, C. (2004) Treatment of textile wastewater by advanced oxidation processes-A review. *Global Nest International Journal*, 6, 222-230.

- [120] Keane, J., Velde, D.W. (2008) The role of textile and clothing industries in growth and development strategies. Investment and Growth Programme, Overseas Development Institute.
- [121] Kestioglu, K., Yonar, T., Azbar, N. (2005) Feasibility of physico-chemical treatment and Advanced Oxidation Processes (AOPs) as a means of pretreatment of Olive Mill Effluent (OME). *Process Biochemistry*, 40, 2409-2416.
- [122] Khan, T.I., Marwari, R. (2002) Arsenic, environment and human health, In: *Heavy metals in the environment* (Ed.: Saxena A.K.), Avishkar Publishers, Jaipur, pp:147-165.
- [123] Khan, T.I., Marwari, R. (2003) Impact of heavy metal (lead) on environment and human beings, In: *Environmental conservation, depleting resources and sustainable development* (Eds.: Khan T.I. and Sharma H.S.), Avishkar Publishers, Jaipur. pp.157-177.
- [124] Khan, T.I., Marwari, R., Singh, N. (2003a) Impact of textile waste water on *Solanum melongena* var F1-hybrid kanhayia in pot experiments with special emphasis on analysis of heavy metals. *Dimensions of Pollution*, 2, 108-116.
- [125] Khan, T.I., Marwari, R., Singh, N. (2003b) Impact of textile waste water on *Solanum melongena* var F1-hybrid kanhaiya in agricultural fields with special emphasis on analysis of heavy metals. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, 1, 13-21.
- [126] Khehra, M.S., Saini, H.S., Sharma, D.K., Chadha, B.S., Chimni, S.S. (2006) Biodegradation of azo dye C.I. acid red 88 by an anoxic-aerobic sequential bioreactor. *Dyes and Pigments*, 70, 1-7.
- [127] Kılınç, K., Kılınç, A. (2002) Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 33(2), 110-118.
- [128] Kiriakidou, F., Kondarides, D., Verykios, X. (1999) The effect of operational parameters and TiO₂-Doping on the photocatalytic degradation of azo-dyes. *Catalysis Today*, 54, 119-130.
- [129] Kleiman, N.J., Spector, A. (1993) DNA single strand breaks in human lens epithelial cells from patients with cataract. *Current Eye Research*, 12(5), 423-31.
- [130] Klumpp, A., Hintemann, T., Lima, J.S., Kandeler, E. (2003) Bioindication of air pollution effects near a copper smelter in Brazil using mango trees and soil microbiological properties. *Environmental Pollution*, 126, 313-321.
- [131] Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuny, T. (1995) A

- comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. Medication Management System (MMS) Commun, 3, 103-115.
- [132] Koçyiğit, A., Keles, H., Selek, S., Güzel, S., Celik, H., Erel, O. (2005) Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. Mutation, Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 585, (1-2), 71-78.
- [133] Kruman, I.I., Kumaravel, T.S., Lohani, A., Pedersen, W.A., Cutler, R.G., Kruman, Y. (2002) Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of alzheimer's disease. Journal of Neuroscience, 22(5), 1752-1762.
- [134] Kumar, N.J.I., Soni, H., Kumar, R.N., Bhatt, I. (2009) Hyperaccumulation and mobility of heavy metals in vegetable crops in India. Journal of Agriculture and Environmental Sciences, 10, 29-38.
- [135] Kurde, S., Singh, R. (1995) Effect of two samples of textile effluents and dyes on total erythrocyte counts and related parameters of wistar rats. Proceedings of Academy of Environmental Biology, 4, 177-181.
- [136] Larsson, A., Bengtsson, B.E., Haux, C. (1981) Disturbed ion balance in flounder *Platichthys flesus* L., exposed to sublethal levels of cadmium. Aquatic Toxicology, 1, 19-35.
- [137] Laxman, M.S. (2009) Pollution and its control in textile industry. Fibre 2 fashion: Dyes and Chemicals.
- [138] Lee, R.F., Steinert, S. (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutation Research, 544, 43-64.
- [139] Lewis, S.D., Lewis, W.M. (1971) The effects of zinc, copper on the osmolarity of blood serum of the channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque and golden shiner, *Notemigonus crysoleucas* Mitchell. Transactions of the American Fisheries Society, 100, 639-643.
- [140] Li, Y., Shi, J.Q., Qu, R.J., Feng, M.B., Liu, F., Wang, M., Wang, Z.Y. (2012) Toxicity assessment on three direct dyes (D-BLL, D-GLN, D-3RNL) using oxidative stress bioassay and quantum parameter calculation. Ecotoxicology and Environmental Safety Volume, 86(1), 132-140.
- [141] Lima, R., Bazo, A., Salvadori, D., Rech, C., Oliveira, D. (2007) Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a

- drinking water source. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 626, 53-60.
- [142] Lokeshwari, H., Chandrappa, G.T. (2006) Impact of heavy metal contamination of Bellandur Lake on soil and cultivated vegetation. Current Science, 91, 622-627.
- [143] Long, X.X., Yang, X.E., Ni, W.Z., Ye, Z.Q., He, Z.L., Calvert, D.V., Stoffella, J.P. (2003) Assessing zinc thresholds for phytotoxicity and potential dietary toxicity in selected vegetable crops. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 34, 1421-1434.
- [144] Lorimer, J., Mason, T., Plattes, M., Phull, S., Walton, D. (2001) Degradation of dye effluent. Pure and Applied Chemistry, 73, 1957-1968.
- [145] Malaviya, P., Sharma, A. (2011) Impact of distillery effluent on germination behaviour of *Brassica napus* L. Journal of Environmental Biology, 32 (1), 91-94.
- [146] Mall, I.D., Upadhyay, S.N. (1998) Studies on treatment of basic dyes bearing waste water by adsorptive treatment using fly ash. Indian Journal of Environment Health, 40(2), 177-188.
- [147] Manu, B. (2003) Decolourization of indigo and azo dye in semicontinuous reactors with long hydraulic retention time, Ph.D theses submitted to IIT Bombay, India.
- [148] Martins, A., Canalli, V., Azevedo, C., Pires, M. (2006) Degradation of pararosaniline (C.I. basic red 9 monohydrochloride) dye by ozonation and sonolysis. Dyes and Pigments, 68, 227-234.
- [149] Marwari, R., Khan, T.I. (2012) Effect of textile waste water on tomato plant, *Lycopersicon esculentum*. Journal of Environmental Biology, 33, 849-854.
- [150] Mather, M.E., Digiulio, R.T. (1991) Oxidant, mixedfunction oxidase and peroxisomal responses in channel catfishsh exposed to bleached kraft mill effluent. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 20, 391-397.
- [151] Mathur, N., Krishnatrey, R., Sharma, S., Pathak, S., Sharma, K.P. (2003a) Certain haematological responses in Swiss albino mice following exposure to textile dye wastewater. Journal of Environmental Biology, 24(2), 161-164.
- [152] Mathur, N., Krishnatrey, R., Sharma, S., Sharma, K.P. (2003b) Toxic effects of textile printing industry effluents on liver and testes of albino rats. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 71, 453-457.
- [153] Mathur, N., Bhatnagar, P., Bakre, P. (2005a) Assessing mutagenicity of textile dyes from Pali (Rajasthan) using AMES bioassay, Environmental Toxicology Unit, Department of Zoology, University of Rajasthan, Jaipur, India.

- [154] Mathur, N., Bhatnagar, P., Nagar, P., Bijarnia, M.K. (2005b) Mutagenicity assessment of effluents from textile dyes industries of Sangane, Jaipur (India): A case study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61, 105-113.
- [155] Mathur, N., Bhatnagar, P. (2007) Mutagenicity assessment of textile dyes form Sanganer (Rajasthan). *Journal of Environmental Biology*, 28, 123-126.
- [156] Mayer, F.L., Versteeg, D.J., McKee, M.J., Folmar, L.C., Graney, R.L., McCume, D.C., Rattner, B.A. (1992) Physiological and nonspecific biomarkers. In: Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle PM Jr & Bergeman HL (Eds.), *Biomarkers. Biochemical, Physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publ., MI, USA, pp 5-86.
- [157] McClain, D.E., Kalinich, J.F., Ramakrishnan, N. (1995) Trolox inhibits apoptosis in irradiated MOLT-4 lymphocytes. *Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB)*, 9, 1345-1354.
- [158] McKelvey, M.V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool, Z.B.L., Meo, M.P.D., Collins, A. (1993) The single cell gel electrophoresis (Comet assay): A European review. *Mutation Research*, 288, 47-63.
- [159] Meric, S., Kaptan, D., Olmez, T. (2004) Color and COD removal from wastewater containing reactive black 5 using fenton's oxidation process. *Chemosphere*, 54, 435-441.
- [160] Migliore, L., Fontana, I., Trippi, F., Colognato, R., Coppedè, F., Tognoni, G. (2005) Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients. *Neurobiology of Aging*, 26(5), 567-73.
- [161] Milligan, C.L. (1997) The role of cortisol in amino acid mobilization and metabolism following exhaustive exercise in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Fish Physiology and Biochemistry*, 16(2), 119-128.
- [162] Minowada, J., Ohnuma, T., Moore, G. E. (1972) Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *Journal of the National Cancer Institute*, 49, 891-895.
- [163] Mishra, S., Sharma, D., Malkania, U. (1990) Fish mortality as affected by liquid effluents from Raja Textile Ltd., Rampur, U.P. *International Journal of Ecology and Environmental Sciences*, 16, 119-122.
- [164] Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K. (1998) DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*, 399, 135-147.

- [165] Mohamed, F.A.S., (2008) Bioaccumulation of selected metals and histopathological alterations in tissues of *Oreochromis niloticus* and *Lates niloticus* from Lake Nasser, Egypt. *Global Veterinaria*, 2(4), 205-218.
- [166] Mohamed, F.A.S. (2009) Histopathological studies on *Tilapia zilli* and *Solea vulgaris* from Lake Qaran, Egypt. *World Journal Fish Marine Science*, 1, 29-39.
- [167] Mohanty, B.K., Mishra, B.N. (1983) Effect of mercurial ayurvedic drug (Kajyoli) on albino rat blood. *Journal of Environmental Biology*, 4(4), 201-206.
- [168] Mona, M., Hegazi, Zeinab, I.A., Omeyma, A.A. (2010) Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of *Nile tilapia* juveniles in chronic ammonia exposure. *Aquatic Toxicology*, In press.
- [169] Montano, J. (2007) Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for commercial reactive azo dyes removal, PhD Thesis, University of Barcelona.
- [170] Monteiro, D.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L. (2010) Inorganic mercury exposure: Toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon camazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). *Ecotoxicology*, 19, 105-123.
- [171] Moretti, M., Villarini, M., Scassellati, S., Forzolini, G., Santroni, A.M., Fedeli, D., Falcioni, G. (1998) Extent of DNA damage in density separated trout erythrocytes assessed by the comet assay. *Mutation Research*, 397, 353-360.
- [172] Morikawa, Y., Shiomi, K., Ishihara, Y., Matsuura, N. (1997) Triple primary cancers involving kidney, urinary bladder, and liver in a dye worker. *American Journal of Industrial Medicine*, 31, 44-49.
- [173] Munter, R. (2001) Advanced oxidation processes: Current status and prospects. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences Chemistry*, 50, 59-80.
- [174] Naidu, K.A., Ramamurthi, R. (1984) Acute effect of mercury toxicity on some enzymes in liver of teleost *Sarotherodon mossambicus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 8, 215-218.
- [175] Nakano, H., Kurihara, K., Okamoto, M., Tone, S., Shinohara, K. (1997) Heat-induced apoptosis and p53 in cultured mammalian cells. *International Journal of Radiation Biology*, 71, 519-529.
- [176] Nakano, H., Shinohara, K. (1999) Correlation between unirradiated cells T-P53 protein levels and radiosensitivity in MOLT-4 cells. *Radiation Research*, 115, 686-693.

- [177] Nassr-Allah, H., Abdel-Hameid, A. (2009) Protective effect of calcium carbonate against arsenic toxicity of the *Nile catfish*, *Clarias gariepinus*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 9, 191-200.
- [178] Nath, K., Singh, D., Sharma, Y.K. (2007) Combinatorial effects of distillery and sugar factory effluents in crop plants. Journal of Environmental Biology, 28, 3, 577-582.
- [179] Nese, T., Sivri, N., Toroz, I. (2007) Pollutants of textile industry wastewater and assessment of its discharge limits by water quality standards. Turkish Journal, 7, 97-103.
- [180] Neumann, S., Fatula, P. (2009) Principles of ion exchange in water treatment. Asian Water, 14-19.
- [181] Nigam, P., Banat, I.M., Singh, D., Marchant, R. (1996) Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. Process Biochemistry, 31, 5, 435-442.
- [182] Nigro, M., Frenzilli, G., Scarcelli, V., Gorbi, S., Regoli, F. (2002) Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. Marine Environmental Research, 54, 517-520.
- [183] Nilsson, R., Nordlinder, R., Wass, U., Meding, B., Belin, L. (1993) Asthma, rhinitis, and dermatitis in workers exposed to reactive dyes. British Journal of Industrial Medicine, 50, 65-70.
- [184] Ntuli, F., Omoregbe, I., Kuipa, P., Muzenda, E., Belaid, M. (2009) Characterization of effluent from textile wet finishing operations. WCECS, 1, 20-22.
- [185] Oakes, K.D., McMaster, M.E, Van Der Kraak, G.J. (2004) Oxidative stress responses in longnose sucker (*Catostomus catostomus*) exposed to pulp and paper mill and municipal sewage effluents. Aquatic Toxicology, 67, 255-271.
- [186] Ogundiran, M.A., Fawole, O.O., Adewoye, S.O., Ayandiran, T.A. (2010) Toxicological impact of detergent effluent on juvenile of African catfish (*Clarias gariepinus*) (Buchell 1822). Agriculture and Biology Journal of North America, 1(3), 330-342.
- [187] Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K. (2004) Mutagens in surface waters: A review. Mutation Research, 567, 109-149.
- [188] Oikari, A., Holmbom, B., Anas, E., Miilunpalo, M., Kruzynski, G., Castern, M. (1985) Ecotoxicological aspect of pulp and paper mill effluent discharged to an inland water system. Distribution in water and toxicant residues and physiological effects in caged fish (*Salmo gairdneri*). Aquatic Toxicology, 6, 219-239.

- [189] Olive, P.L., Banath, J.P., Durand, R.E. (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the comet assay. *Radiation Research*, 122, 86-94.
- [190] Oner, M., Atli, G., Canli, M. (2009) Effects of metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures on some enzymatic and non-enzymatic indicators in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82, 317-321.
- [191] Orrenius, S. (1995) Apoptosis: Molecular mechanisms and implications for human disease. *Journal of Internal Medicine*, 237, 529-536.
- [192] Ostling, O., Johanson, K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291-298.
- [193] Padmaparna, G. (2005) Drug abuse: Ranbaxy, dutch pharma put paid to groundwater. *Down To Earth*, 14(17), 7-8.
- [194] Palaniappan, P.L., Vijayasundaram, V. (2008) FTIR study of arsenic induced biochemical changes on the liver tissues of freshwater fingerlings of *Labeo rohita*. *Romanian Journal of Biophysics*, 18, 135-144.
- [195] Pandey, S.N. (2004) Industrial effluent on seed germination and seedling growth of *Zea mays* Linn. and *Oryza sativa* Linn. *Biological Memories*, 30, 104-107.
- [196] Pandrangi, R., Petras, M., Ralph, S., Vrzoc, M. (1995) Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bull heads and carp. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 26, 345-356.
- [197] Paula, A.L., Teresa, P., Santos, M.C., da Luz Mathias, M., Collares, M.J., Ana, P. Crespo, M.V. (2001) Response of antioxidant enzymes in freshwater fish population (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. *Science of the Total Environment*, 280, 153-163.
- [198] Peitsch, M.C., Polzar, B., Stephan, H., Crompton, T., Mac-Donald, H.R., Mannherz, H.G., Tschopp, J. (1993) Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO Journal*, 12, 371-377.
- [199] Pelgrom, S.M.G.J., Lock, R.A.C., Balm, P.H.M., Wendelaar, B.S.E. (1995) Effects of combined waterborne cadmium and copper exposures on ionic composition and plasma cortisol in tilapia. *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 111, 227-235.

- [200] Perez-Estrada, L.A., Maldonado, M.I., Gernjak, W., Aguera, A., Fernandez-Alb, A.R., Ballesteros, M.M., Malato, S. (2005) Decomposition of diclofenac by solar driven photocatalysis at pilot plant scale. *Catalysis Today*, 101, 219-226.
- [201] Perkowski J., Kos L. (2002) Treatment of textile dyeing wastewater by hydrogen peroxide and ferrous ions. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*.
- [202] Pia, A., Roca, M., Alcover, L., Clar, A., Clar, M. (2002) Comparison between nanofiltration and ozonation of biologically treated textile wastewater for its reuse in the industry. *Desalination*, 157, 81-86.
- [203] Pic, P. (1978) A comparative study of the mechanism of Na⁺ and Cl⁻ excretion by the gill of *Mugil capito* and *Fundulus heteroditus*: Effect of stress. *Journal of Comparative Physiology*, 123, 155-162.
- [204] Priyadarshani, N., Kumara, V., Varma, M.C (2013) Toxicity assessment of silk dye effluent on blood profile and total cholesterol of swiss albino mice *Mus musculus*. *American International Journal of Research in Formal, Applied and Natural Sciences*, 2(1), 27-32.
- [205] Puvaneswari, N., Muthukrishnan, J., Gunasekaran, P. (2006) Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44, 618-626.
- [206] Rajaguru, P., Fairbairn, L.J., Ashby, J., Willington, M.A., Turner, S., Woolford, L.A., Chinnasamy, N., Rafferty, J.A. (1999) Genotoxicity studies on the azo dye direct red 2 using the invivo mouse bone marrow micronucleus test. *Mutation Research*, 444, 175-180.
- [207] Rajaguru, P., Suba, S., Palanivel, M., Kalaiselvi, K. (2003) Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 85-91.
- [208] Ralph, S., Petras, M. (1996) Genotoxicity monitoring of small bodies of water using two species of tadpoles and the alkaline single cell gel (comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29, 418-430.
- [209] Ramana, S., Biswas, A.K., Kundu, S., Saha, J.K., Yadava, R.B.R. (2002) Effect of distillery effluent on seed germination in some vegetable crops. *Bioresource Technology*, 82, 273-275.
- [210] Ravi, D., Parthasarathy, R., Vijayabharathi, V., Suresh, S. (2014) Effect of textile dye effluent on soybean crop. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 2(2), 111-117.

- [211] Ray, D., Banerjee, S.K., Chatterjee, M. (1990) Bioaccumulation of nickel and vanadium in tissues of the catfish *Clarias batrachus*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 38(3), 169-73.
- [212] Ray, S., Ponnathpur, V., Huang, Y., Tang, C., Mahoney, M.E., Ibrado, A.M., Bullock, G., Bhalla, K. (1994) 1-beta-D- arabinofuranosylcytosine-, mitoxantrone-, and paclitaxel-in- duced apoptosis in HL-60 cells: Improved method for detection of internucleosomal DNA fragmentation. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 34, 365-371.
- [213] Raymond, M.L., Shelby, D.G., Jezierska, B. (1983) Electrolyte balance and energy mobilization in acid-stressed rainbow trout, *Salmo gairdneri* and their relation to reproductive success. *Environmental Biology of Fishes*, 8, 115-123.
- [214] Robens, J.F., Dill, G.S., Ward, J.M., Joiner, J.R., Griesemer, R.A., Douglas, J.F. (1980) Thirteen-week subchronic toxicity studies of direct blue 6, direct black 38 and direct brown 95 dyes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 54, 431-442.
- [215] Robert, L., Alexander, A. (2008) Fisher's contact dermatitis in: Textiles and shoes. BC Decker Inc, Ontario, Canada, 339-401.
- [216] Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P. (2001) Remediation of dyes in textile effluent: A critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77, 247-255.
- [217] Rodriguez, M. (2003) Fenton and UV-vis based advanced oxidation processes in wastewater treatment: Degradation, mineralization and biodegradability enhancement. University of Barcelona.
- [218] Rojas, E., Lopez, M.C., Valverde, M. (1999) Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 277(1-2), 225-254.
- [219] Roopadevi, H., Somashekar, R.K. (2012) Assessment of the toxicity of waste water from a textile industry to *Cyprinus carpio*. *Journal of Environmental Biology*, 33(2), 167-71.
- [220] Sabbah, H.N., Sharov, V.G. (1998) Apoptosis in heart failure. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 40, 549-562.
- [221] Sahai, R., Labeen, S., Saxena, P.K. (1993) Effect of distillery waste on seed germination, seedling growth and pigment content of rice. *Indian Journal of Ecology*, 10, 7-10.
- [222] Salas, V.M., Burchiel, S.W. (1998) Apoptosis in daudi human B cell in response to

- benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 151, 367-376.
- [223] Saleemi, M.A. (1993) Environmental assessment and management of irrigation and drainage scheme for sustainable agriculture growth. EPA, Lahore, Pakistan.
- [224] Sampaio, F.G., Bojink, C.L., Oba, E.T., Romagueira, L., Santos, B., Kalinin, A.L., Rautin, F.T. (2008) Antioxidant defenses and biochemical changes in Pavu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C, Toxicology and Pharmacology*, 147, 43-51.
- [225] Saravanamoorthy, M.D., Ranjitha Kumari, B.D. (2007) Effect of textile waste water on morphophysiology and yield on two varieties of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 3(2), 335-343.
- [226] Sardas, S., Karabiyik, L., Aygün, N., Karakaya, A.E. (1998) DNA damage evaluated by the alkaline comet assay in lymphocytes of humans anaesthetized with isoflurane. *Mutation Research*, 418, 1-6.
- [227] Sastry, K.V., Shukla, V. (1994) Acute and chronic toxic effects of cadmium on some hematological, biochemical and enzymological parameters in the fresh water teleost fish, *Channa punctatus*. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 22(4), 171-176.
- [228] Saxena, P., Sharma, S., Sharma, S., Suryavathi, V., Grover, R., Soni, P., Kumar, S., Sharma, K.P. (2005) Effect of an acute and chronic toxicity of four commercial detergents on the freshwater fish *Gambusia affinis* (Baird and Gerard). *Journal of Environmental Science and Engineering (JESE)*, 47(2), 119-24.
- [229] Searle, J., Kerr, J.F.R., Bishop, C.J. (1982) Necrosis and apoptosis: Distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Annals of Diagnostic Pathology*, 17, 229-259.
- [230] Shaanmugam, A. (1993) Enzymes and carbohydrates metabolism, in "Fundamentals of biochemistry for medical students" 7 th Edn. (ED) Karthik printers, Madras India, 358, 145-146.
- [231] Shahid, M., Mohammad, F., Chen G., Tanga, R.C., Xinga, T. (2016) Enzymatic processing of natural fibres: White biotechnology for sustainable development. *Green Chemistry*, 18, 2256-2281.
- [232] Sharma, K.P., Sharma, S., Sharma, S., Kumar, S., Singh, P.K., Grover, R., Sharma, P.K. (2007a) A comparative study on characterization of textile wastewaters (untreated and treated) toxicity by chemical and biological tests. *Chemosphere*, 69(1),

48-54.

- [233] Sharma, S., Sharma, S., Singh, P. K., Swami, R.C., Sharma, K.P. (2009) Exploring fish bioassay of textile dye wastewaters and their selected constituents in terms of mortality and erythrocyte disorders. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(1), 29-34.
- [234] Shenker, B.J., Guo, T.L., Shapiro, I.M. (2000) Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: Evidence that apoptosis pathway is mercurial species dependent. *Environmental Research*, 84, 89-99.
- [235] Shin, K.J., Bae, S.S., Hwang, Y.A., Seo, J.K., Ryu, S.H., Suh, P.G. (2000) 2,2',4,6,6'-pentachlorobiphenyl induces apoptosis in human monocytes cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 169, 1-7.
- [236] Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.
- [237] Singh, N.P., Danner, D.E. Tice, R.R., Brant, L., Schneider, E.L. (1990) Single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): Its importance in human biology. *Mutation Research*, 37, 123.
- [238] Singh, N.P. (2000a) A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Experimental Cell Research*, 256, 328-337.
- [239] Singh, N.P. (2000b) Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research*, 455, 111-127.
- [240] Singh, G., Bala, N., Rathod, T.R., Singh, B. (2001) Effect of textile industrial effluent on tree plantation and soil chemistry. *Journal of Environmental Biology*, 22(1), 59-66.
- [241] Singh, K.P., Mohan, D., Sinha, S., Dalwani, R. (2004) Impact assessment of treated/untreated wastewater toxicants discharged by sewage treatment plants on health, agricultural, and environmental quality in the wastewater disposal area. *Chemosphere*, 55(2), 227- 255.
- [242] Singh, N.P. (2005) Apoptosis assessment by DNA diffusion assay. *Methods in Molecular Medicine*, 111, 55-67.
- [243] Singh, S., Aggarwal, P.K. (2006) Effect of heavy metal on biomass and yield of different crop species. *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, 76, 688-691.
- [244] Sinha, S., Saxena, R., Singh, S. (2002) Comparative studies on accumulation of Cr from metal solution and tannery effluent under repeated metal exposure by aquatic plants: Its toxic effects. *Environmental Monitoring and Assessment*, 80, 17-31.

- [245] Singhal, P.C., Reddy, K., Franki, N., Sanwal, V., Kapasi, A., Gibbons, N., Mattana, J., Valderrama, E. (1997) Age and sex modulate renal expression of SGP-2 and transglutaminase and apoptosis of splenocytes, thymocytes and macrophages. *Journal of Investigative Medicine*, 45, 567-575.
- [246] Sivaramakrishna, B., Radhakrishnaiah, K. (2000) Mercury induced alterations in the energetics of hepatopancreas of two freshwater mollusks, *Pila globosa* and *Lamellidens marginalis*. *Trace metals in the Environment*, 4, 389-409.
- [247] Soliman, A.K., Jauncey, K., Roberts, R.J. (2008) Water soluble vitamin requirements of Tilapia: ascorbic acid (vitamin C) requirement of *Nile tilapia*, *Oreochromis niloticus* (L.). *International Aquatic Research*, 25, 269-278.
- [248] Soni, P., Sharma, S., Sharma, S., Kumar, S., Sharma, K.P. (2006) A comparative study on the toxic effects of textile dye wastewaters (untreated and treated) on mortality and RBC of a freshwater fish *Gambusia affinis* (Baird and Gerard). *Journal of Environmental Biology*, 27(4), 623-8.
- [249] Soufy, H., Soliman, M., El-Manakhly, E., Gaafa, A. (2007) Some biochemical and pathological investigations on monosex Tilapia following chronic exposure to carbofuran pesticides. *Global Veterinaria*, 1, 45-52.
- [250] Soundararajan, M., Veeraiyan, G., Sankar, S.S. (2009) Arsenic induced oxidative stress in freshwater catfish *Tilapia mossambica*. *Journal of Phytology Section: General Science*, 1, 267-276.
- [251] Sreenivasula, R.P., Bhagyalakshmi, A. (1994) Changes in oxidative metabolism in selected tissues of the crab (*Scylla serrata*) in response to cadmium toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 29, 255-264.
- [252] Sripriya, L., Vijayalakshmi, M., Sumathy, R., Sharmila, J. (2014) The impact of textile dyes on the biochemistry and histology of liver, a freshwater fish, Tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5(3), 271-298.
- [253] Stanic, B., Andric, N., Zoric, S., Grubor-Lajsic, G., Kovacevic, R. (2005) Assessing pollution in the Danube River near Novi Sad (Serbia) using several biomarkers in starlet (*Acipenser ruthenus* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 26, 554-557.
- [254] Stasinakis, A. (2008) Use of selected advanced oxidation processes (AOPs) for wastewater treatment-A mini review. *Global NEST*, 10, 376-385.
- [255] Steinhagen D., Helmus T., Maurer S., Michael R.D., Leibold W., Scharsack J.P.

- (2004) Effect of hexavalent carcinogenic chromium on carp *Cyprinus carpio* immune cells. *Diseases of Aquatic Organism*, 62(1-2), 155-61.
- [256] Steinert, S.A. (1996) Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. *Marine Environmental Research*, 42, 253-259.
- [257] Stocco, D. (2001) StAR Protein and regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annual Review of Physiology*, 63, 193-213.
- [258] Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği, Resmi Gazete Tarihi: 31.12.2004 Resmi Gazete Sayısı: 25687.
- [259] Sumathi, M., Kalaiselvi, K., Palanivel, M., Rajaguru, P. (2001) Genotoxicity of textile dye effluent on fish (*Cyprinus carpio*) measured using the comet assay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66, 407-414.
- [260] Sun, Y., Yu, H., Zhang, J., Yin, Y., Shen, H., Liu, H., Wang, X. (2006) Bioaccumulation and antioxidant responses in goldfish *Carassius auratus* under HC Orange No.1 exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63, 430-437.
- [261] Suntio, L.R., Shiu, W.Y., Mackay, D. (1988) A review of the nature and properties of chemicals present in pulp mill effluent. *Chemosphere*, 17, 1249-1290.
- [262] Suwalsky, M., Norris, B., Villena, F., Sotomayor, P. Zatta, P. (2004) Aluminium fluoride affects the structure and function of cell membranes. *Food and Chemical Toxicology*, 42(6), 925-933.
- [263] Suzuki, T., Tinolei, S., Kurunczi, L., Dietze, U., Schuuirmann, G. (2001) Correlation of aerobic biodegradability of sulfonated azo dye with the chemical structure. *Chemosphere*, 45, 1-9.
- [264] Şen, S., Demirer, G.N. (2003) Anaerobic treatment of real textile wastewater with a fluidized bed reactor. *Water Research*, 37, 1868-1878.
- [265] Temlett, J.A. (1996) Parkinson's disease: Biology and aetiology. *Current Opinion in Neurology*, 9, 303-307.
- [266] Tholoana, M. (2007) Water Management at a Textile Industry: A Case Study in Lesotho. University of Pretoria.
- [267] Thomas, P.C., Murthy, T.L. (1976) Studies on the impact of a few organic pesticides on certain fish enzymes. *Indian Journal of Animal Sciences*, 46, 619-629.
- [268] Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Pokethitiyook, P., Sahaphon, S., Jaritkhuang, S. (2003) Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer* in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution*, 121, 307-320.
- [269] Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H.,

- Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
- [270] Tiwari, M., Mahapatra, R. (1999) Analysis: What goes up must come down. *Down to Earth*, August 31, pp. 30-41.
- [271] Toksöz, M., Mezarciöz, S. (2013) Denim kumaşlara uygulanan özel yıkama uygulamaları. *Çukurova Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 28(2), 141-147.
- [272] Tomei, L.D., Umansky, S.R. (1998) Aging and apoptosis control. *Neurologic Clinics*, 16, 735-745.
- [273] Tozan-Beceren A., Omurtag G.Z., Yeğen C., Şardaş S. (2011) Kolorektal kanser tanısı konmuş olgularda ve birinci derece yakınlarında DNA hasarının araştırılması *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi (MÜSBED)*, 1(3), 155-161.
- [274] Tripathy, T., De, B. (2006) Flocculation: A new way to treat the waste water. *Journal of Physical Science*, 10, 93-127.
- [275] Türkdogan, M.K., Kilicel, F., Kara, K., Tuncer, I., Uygan, I. (2003). Heavy metals in soil, vegetables and fruit in the endemic upper gastrointestinal cancer region of Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 175-179.
- [276] Udden, M.M. (2000) Rat erythrocyte morphological changes after gavage dosing with 2-butoxyethanol: A comparison with the in vitro effects of butoxyacetic acid on rat and human erythrocytes. *Journal of Applied Toxicology*, 20(5), 381-387.
- [277] Ünal, Y. (1998) Radyoterapi gören kanserli hastalara ait kan lenfositlerinde DNA hasarının comet assay tekniği ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü.
- [278] Valh, J.V., Le Marechal, A.M. (2009) Decoloration of textile wastewaters. In: Lang AR (ed) *Dyes and pigments: New research*, Nova Science Publishers Inc, New York, USA 175-200.
- [279] Varma, L., Sharma, J. (2012) Effect of dairy and textile waste water on growth of plant wheat. *Rasayan Journal of Chemistry*, 5(3), 351-355.
- [280] Vasquez, M., Tice, RR. (1997) Detecting genotoxic activity against high molecular weight DNA using the single cell gel (SCG) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29(53).
- [281] Velma V., Vutukuru S.S., Tchounwou P.B. (2009) Ecotoxicology of Hexavalent Chromium in Freshwater Fish: A Critical Review. *Reviews on Environmental Health*,

- 24(2), 129-145.
- [282] Vial, J.P., Belloc, F., Dumain, P., Besnard, S., Lacombe, F., Boisseau, M.R., Reiffers, J., Bernard, P. (1997) Study of the apoptosis induced in vitro by antitumoral drugs on leukemic cells. *Leukemia Research*, 21, 163-172.
- [283] Vijayakumari, B. (2003) Impact of textile dyeing effluent on growth of soybean (*Glycine max* L.). *Ecotoxicology Environmental Monitoring*, 13, 59-64.
- [284] Vijayraghavan, N.S. (1999) Environmental unit in textile industry. *Science and Technology Entrepreneur Magazine*, 7, 3-9.
- [285] Vinodhini, R., Narayanan, M. (2009) The impact of toxic heavy metals on the hematological parameters in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Iran. Journal of Environmental Health Science and Engineering (JEHSE)*, 6, 23-28.
- [286] Von Wangenheim, K.H., Peterson, H.P. (1998) Control of cell proliferation by progress in differentiation: Clues to mechanisms of aging, cancer causation and therapy. *Journal of Theoretical Biology*, 193, 663-678.
- [287] Waagbo, R., Hosfeld, C.D., Fivelstad, S., Olsvik, P.A., Breck, O. (2008) The impact of different water gas levels on cataract formation, muscle and lens free amino acids and lens antioxidant enzymes and heat shock protein mRNA abundance in smolting Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A*, 149, 396-404.
- [288] Waalkes, M.P., Fox, D.A., States, J.C., Patierno, S.R., McCabe, M.J. (2000) Metals and disorders of cell accumulation: Modulation of apoptosis and cell proliferation. *Toxicological Sciences*, 56, 255-261.
- [289] Wang, X., Zeng, G., Zhu, J. (2008) Treatment of jean-wash wastewater by combined coagulation, hydrolysis/acidification and fenton oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, 153, 810-816.
- [290] Warner, H.R., Hodes, R.J., Pocinki, K. (1997) What does cell death have to do with aging?. *Journal of the American Geriatrics Society*, 45, 1140-1146.
- [291] Wasif, A.I., Kone, C.D. (1996) Textile processing and environmental consequences. *Textile and Engineering Institute*, 4, 1-15.
- [292] Weinstein, S.J. (2003) Null association between prostate cancer and serum folate, vitamin B₆, vitamin B₁₂ and homocysteine. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 12, 1271-1272.
- [293] Wendelaar, B.S.E. (1997) The stress response in the fish. *Physiological Reviews*, 77, 591- 625.

- [294] Wu, S.M., Jong, K.J., Kuo, S.Y. (2003) Effects of copper sulfate on ion balance and growth in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 45, 357-363.
- [295] Wu, J.P., Chen, H.C., Huang, D.J. (2008) Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium and zinc in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Chemosphere, 73, 1019-1026.
- [296] Xing, M., Deng, C., Bukuru, G., Yang, J. (2006) Treatment of pharmaceutical wastewater containing recalcitrant compounds in a fenton-coagulation process. Journal of Environmental Sciences, 18(3), 459-463.
- [297] Xu, X.R., Li, H.B., Wang, W.H., Gu, J.D. (2004) Degradation of dyes in aqueous solutions by the fenton process. Chemosphere, 57, 595-600.
- [298] Yadav, A., Gopesh, A., Pandey, S., Rai, D.K., Sharma, B. (2007) Fertilizer industry effluent induced biochemical changes in freshwater teleost, *Channa striatus* (Bloch.). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 79, 588-595.
- [299] Yanagisawa, S.F., Sakagami, H., Kuribayashi, N., Iida, M., Sakagami, T., Takeda, M. (1995) Endonuclease activity and induction of DNA fragmentation in human myelogenous leukemic cell lines. Anticancer Research, 15, 259-265.
- [300] Yang, J., Wu, M., Li, D. (2004) Treatment of anthraquinone dye wastewater by hydrolytica acidification aerobic process. Journal of Environmental Sciences, 16(6), 991-993.
- [301] Yeni, D., Fidan, A.F. Gündoğan, M. (2010) Spermatozoon'da tek hücre jel elektroforezi (SCGE) ile DNA hasarı tespiti. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 24(3), 167-173.
- [302] Yusuff, R., Sonibare, J. (2004) Characterization of textile industries effluents in Kaduna, Nigeria and pollution implications. Global Nest Journal, 6, 212-221.
- [303] Zagal, A., Mazmanci, B. (2011) Oxidative stress response in *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus*) exposed to textile mill effluent. Toxicology and Industrial Health, 27(1), 81-85.
- [304] Zhang, F., Yediler, A., Liang, X. (2007) Decomposition pathways and reaction intermediate formation of the purified, hydrolyzed azo reactive dye C.I. reactive red 120 during ozonation. Chemosphere, 67, 712-717.
- [305] Zhang, W., Liu, W., Zhang, J., Zhao, H., Zhang, Y., Quan, X., Jin, Y. (2012) Characterisation of acute toxicity, genotoxicity and oxidative stress posed by textile effluent on zebrafish. Journal of Environmental Sciences, 24(11), 2019-2027.

- [306] Zhao, Q.L., Kondo, T., Noda, A., Fujiwara, Y. (1999) Mitochondrial and intracellular free-calcium regulation of radiation-induced apoptosis in human leukemic cells. *International Journal of Radiation Biology*, 75, 493-504.
- [307] Zwieten, L.V., Rust, J., Kingston, T., Merrington, G., Morris, S. (2004) Influence of copper fungicide residues on occurrence of earthworms in avocado orchard soil. *Science of the Total Environment*, 329, 29-41.

İnternet Kaynakları

- [1] Akbulut İplik (2016) (<http://www.akbulutiplik.com/sayfa/3333/%C3%BCr%C3%BCnler.html>) (13.08.2016)
- [2] Angel, M. (2016) (<http://yldwater.en.made-in-china.com/product/AvfmCnwyCVhH/China-Open-Channel-Type-UV-Sterilizer-for-Waste-Water-and-Sewage-Water-Treatment.html>) (13.08.2016)
- [3] Arya, D., Kohli, P. (2009) Environmental impact of textile wet processing. India. Dyes and Chemicals. (<http://www.fibre2fashion.com/industry-article/4287/environmental-impact-of-textile?page=1>) (13.08.2016)
- [4] Aydın Ticaret Borsası (2016) (<http://aydinticaretborsasi.org.tr/pamuk>) (13.08.2016)
- [5] Burch, P. (2013) Dyeing. (www.pburch.net/dyeing/aboutdyes.shtml) (13.08.2016)
- [6] Bregman, R. (2013) (<http://www.pcconstruction.com/blog/unique-practices-selected-for-digester-tank-construction/>) (12.08.2016)
- [7] Cardiner B. (2012) (<http://www.highsnobiety.com/2012/11/27/a-beginners-guide-to-raw-denim/>) (13.08.2016)
- [8] Crom (2016) (<http://www.cromcorp.com/resources/photo-gallery/>) (12.08.2016)
- [9] Das, S. (2000) Textile effluent treatment-A solution to the environmental pollution. (www.fibre2fashion.com/industry-article/pdffiles/Textile-Effluent-Treatment.pdf) (18.01.2016)
- [10] DSİ (2004) Devlet Su İşleri Genel Müdürlüğü (www.dsi.gov.tr/toprak-ve-su-kaynaklari) (13.08.2016)
- [11] Dyes and Pigments (2010) Textile dyes. (www.dyes-pigments.com/textile-dyes.html) (13.08.2016)
- [12] Eckhardt, G. (2016) (<http://www.edwardsaquifer.net/waterrecycling.html>) (12.08.2016)

- [13] Hanu (2010) Naphthols and bases. (dyeingworld1.blogspot.com.tr/2010/01/naphthols-and-bases.html) (13.08.2016)
- [14] Heddels (2016) (<http://www.heddels.com/2011/09/the-essential-raw-denim-breakdown-our-100th-article/>) (13.08.2016)
- [15] IGEM (2016) International Genetically Engineered Machine (<http://2014.igem.org/Team:UCL/Project/About>) (11.08.2016)
- [16] İşkur Denim (2016) (<http://www.iskurdenim.com/uretim.html>) (13.08.2016)
- [17] Karos, A. (2013) Process water treatment by electrolytic processes, Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology. (www.igb.fraunhofer.de/en/competences/physical-process-technology/process-and-wastewater-purification/electrolytic-water-treatment.html) (18.01.2016)
- [18] Kaser, A. (2013) (<http://potpourriapproach.blogspot.com.tr/2013/01/bleached-denim.html?view=classic>) (12.08.2016)
- [19] Kiron, M.I. (2012) Introduction to mordant dye/Properties of mordant dyes/Mechanism of mordant dyeing/Application of mordant dyes. (textilelearner.blogspot.com.tr/2011/03/defination-properties-working-procedure_4365.html) (12.08.2016)
- [20] MEB (Milli Eğitim Bakanlığı) (2011), Giyim Üretim Teknolojisi, Tekstil Lifleri, Ankara(http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Tekstil%20Lifleri.pdf) (12.08.2016)
- [21] Mert Pazar (2010) (<https://www.mertpazar.com/productDetail.aspx?lngProductID=2085>) (13.08.2016)
- [22] Moustafa, S.M. (2008) Process analysis and environmental impacts of textile manufacturing. (www.fibre2fashion.com/industry-article/16/1523/process-analysis-environmental-impacts-of-textile-manufacturing1.asp) (12.08.2016)
- [23] Periyasamy, P. (2014) (<http://textiletutors.blogspot.com.tr/2014/05/denim-finishing.html>) (12.08.2016)
- [24] RizeSu Yap-İş (2015) (<http://www.rizesuyapis.gov.tr/Sayfa/HIZLI-KUM-FILTRELERI-234.html>) (13.08.2016)
- [25] SASKİ (2011) (<http://www.sakarya-saski.gov.tr/Sayfalar/Tesisler/Atiksu-Tesis-Hendek.aspx>) (12.08.2016)
- [26] Sri (2008) CHE Product Review Abstract. (<https://chemical.ihs.com/nl/Public/2008Mar.pdf>) (10.08.2016)
- [27] Sunny, H. (2003) Manufacturer and exporter of acid dye, solvent dye, vat dye, direct

- dye, polymer additive, UV absorber, light stabilizer, antioxidant, optical brightener agent, pigments and fine chemicals disperse dye. (<http://www.sunnychemical.com/products.htm>) (11.08.2016)
- [28] Vaidya, S. (2016) (<http://www.esuppliersindia.com/akar-impex-pvt-ltd-/equalization-tank-pr1056874-sCATALOG-swf.html>) (12.08.2016)
- [29] Wikipedia, 2016 (<https://en.wikipedia.org/wiki/Goldfish>) (19.10.2016)
- [30] Wright (2013) Anaerobic Sludge Digestion, Part II. (<http://www.wrights-trainingsite.com/anaerslud2onb.html>) (10.08.2016)
- [31] Oram, B. (2014) Water Research Center (<http://www.water-research.net/index.php/ammonia-in-groundwater-runoff-and-streams>) (11.08.2016)



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad - Soyad: Huriye DOĞAN

Doğum Yeri - Tarihi: İstanbul - 18.07.1986

Yabancı Dili: İngilizce

e-posta: huriyedogan1986@hotmail.com

Eğitim Durumu

-Yüksek lisans: Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilimdalı, 2016, İSTANBUL

-Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2012, ANKARA.

-Önlisans: Akdeniz Üniversitesi, TBMYO, Çevre Kirlenmesi ve Kontrolü Programı, 2008, ANTALYA.

-Lise: Ensar Koleji, 2004, İSTANBUL.

Staj Bilgileri

-Hacettepe Üniversitesi, Erişkin Hastanesi, Histopatoloji Anabilimdalı, 2011, ANKARA.

-Antalya Bölge Hıfzısıhha Müdürlüğü, Halk Sağlığı Laboratuvarları, 2007, ANTALYA.

-Bakırköy Belediyesi, Çevre Koruma Müdürlüğü, 2006, İSTANBUL.

İş Gecmişi

-İstanbul Ticaret Odası Esenler Anadolu İmam Hatip Lisesi, 2016, İSTANBUL (Biyoloji Öğretmenliği)

-İstanbul Kız Anadolu İmam Hatip Lisesi, 2016, İSTANBUL (Biyoloji Öğretmenliği)

-Fatih Ortaokulu, 2015, İSTANBUL (Destekleme ve Yetiştirme Kursu, Fen Bilgisi Öğretmenliği)

-İbrahim Turhan Kız Teknik ve Meslek Lisesi, 2014, İSTANBUL (Biyoloji Öğretmenliği)

-Akşemsettin İmam Hatip Lisesi, 2013, İSTANBUL (Biyoloji Öğretmenliği)

Katıldığı Sempozyum

‘Tekstil Atıksularının Japon Balığı (*Carassius auratus* L. 1758) Üzerindeki Genotoksik Etkilerinin Comet ve Difüzyon Analiz Yöntemleriyle Belirlenmesi’ İsimli Poster Sunumu, 15. Tekstil Teknolojisi ve Kimyasındaki Son Gelişmeler Sempozyumu, 14-15-16 Mayıs 2015, BURSA.