

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI DETERJANLARIN *Vicia faba* L. ÜZERİNDEKİ
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

AYLİN HOROZAL

KOCAELİ 2018

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

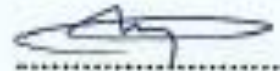
BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI DETERJANLARIN *Vicia faba* L. ÜZERİNDEKİ
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

AYLİN HOROZAL

Doç. Dr. Özlem AKSOY
Danışman, Kocaeli Üniv.
Doç. Dr. Canan SEVİMLİ GÜR
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.
Dr. Öğr. Üyesi Nermin SARIGÜL
Jüri Üyesi, Mehmet Akif Ersoy Üniv.



Canan Sevimli Gür



Tezin Savunulduğu Tarih: 12.06.2018

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Hızla ilerleyen nüfus artışı ile birlikte daha fazla ürün ihtiyacının doğması sonucunda hayatımızda büyük yer kaplayan kimyasal maddelerin üretimi de artmaktadır. Bu kimyasal maddelerin bilinçsiz ve denetimsiz kullanımı sonucu doğaya ve besin zincirine karışması büyük çevre ve sağlık problemlerine yol açmaktadır.

Yüksek bitkiler çevresel kirleticilerin canlılar üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin incelenmesinde biyoindikatör olarak kullanılmaktadır. 6 çift büyük kromozoma sahip olan *Vicia faba* bitkisi kromozom anormalliklerinin rahat bir şekilde incelenbilmesine olanak tanıdığı için test bitkisi olarak sıkça tercih edilmektedir.

Çevresel kirleticilerin meydana getirdiği genotoksik etkilerin belirlenmesinde tek hücre jel elektroforezi (comet assay) son yıllarda giderek önem kazanan bir yöntem olmuştur. Çeşitli tipte DNA hasarlarının tespiti için hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntem olması nedeniyle yaygın kullanım görmektedir. Günümüzde yaşlanma, genetik toksikoloji ve moleküler epidemiyoloji gibi pek çok alanda uygulamaları vardır.

Tüm bu etmenler göz önüne alındığında yapılan yüksek lisans tez çalışmasının bundan sonraki yıllarda yapılacak olan araştırmalara yön vermesi hedeflenerek doğada sıkça rastlanan deterjan artıklarının *Vicia faba* üzerindeki genotoksik etkileri kök inhibisyon testi, mitotik indeks testi, kromozom anormalliği testi ve comet assay testi yöntemleri ile incelenip söz konusu bitkideki genetik hasarlar gözlemlenmiştir.

Lisansüstü eğitim ve öğretimimde ve tüm tez çalışma sürecimde desteklerini ve ilgisini benden esirgemeyen, çok değerli bilgi, deneyim ve görüşlerinden her daim faydalandığım danışman hocam Sn. Doç. Dr. Özlem AKSOY' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Biyoloji bölüm başkanımız Sn. Prof. Dr. Fazıl ÖZEN' e ilgileri ve desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca ihtiyaç duyduğum her an desteğini benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden her daim yararlandığım Sn. Arş. Gör. Rabia ÖZBEK' e katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Lisansüstü eğitimim süresinde tanıdığım ve manevi desteklerini hep hissettiğim tüm bölüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında üzerimden ilgi ve desteklerini esirgemeyen ve evlatları olmaktan her an gurur duyacağım sevgili annem Mediye HOROZAL ve sevgili babam Mehmet Emin HOROZAL' a sonsuz minnet duygularımı sunarım. Ayrıca her zaman benimle olan ve desteğini her an hissettiğim canım kardeşim Pelin HOROZAL' a da yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Haziran – 2018

Aylin HOROZAL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	5
1.1. Deterjanların Genel Özellikleri.....	5
1.1.1. Yüzey aktif maddeler.....	5
1.1.1.1. Anyonik yüzey aktif maddeler	5
1.1.1.2. Katyonik yüzey aktif maddeler	6
1.1.1.3. Noniyonik yüzey aktif maddeler	6
1.1.1.4. Amfoterik yüzey aktif maddeler.....	6
1.1.2. Yapısal maddeler	6
1.2. <i>Vicia faba</i> L. Bitkisinin Genel Özellikleri	7
1.3. Kök İnhibisyon Testi	8
1.4. Mitotik Aktivite Testleri	8
1.5. Comet Assay Tekniği (Tek Hücre Jel Elektrofrezisi)	9
2. LİTERATÜR ÇALIŞMASI.....	12
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	18
3.1. Bitki Materyali	18
3.2. Kullanılan Deterjanlar Hakkında Bilgiler.....	19
3.3. Test Materyalinin ve Kimyasalların Hazırlanması	20
3.3.1. <i>Vicia faba</i> L. tohumlarının hazırlanması	21
3.3.2. Tohumların çimlendirilmesi	21
3.3.3. Deterjan çözeltilerinin hazırlanması	23
3.3.4. Mitoz testinde kullanılan çözeltilerin ve boyanın hazırlanması	24
3.3.5. Comet testinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması	24
3.4. Sitolojik İncelemeler	25
3.4.1. Kök inhibisyon testinin uygulanması ve EC ₅₀ değerinin belirlenmesi.....	25
3.4.2. Kromozom anormalliği testi	26
3.4.2.1. Fiksasyon, hidroliz, boyama ve preparatların hazırlanması işlemleri.....	27
3.4.2.2. Mikroskopik incelemeler.....	27
3.5. Genotoksik İncelemeler	28
3.5.1. Kökten nükleus izolasyonu	28
3.5.2. Slaytların hazırlanması	29
3.5.3. DNA zincirinin çözülmesi	31

3.5.4. Elektroforez	31
3.5.5. Nötralizasyon	31
3.5.6. Boyama	32
3.5.7. Slaytların incelenmesi	32
3.5.8. Verilerin istatistiksel analizi	33
3.5.8.1. ANOVA tek yönlü varyans analizi	33
3.6. Kullanılan Cihazlar	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	35
4.1. Fizyolojik Bulgular	35
4.1.1. Deterjanların kök büyümesi üzerine etkileri	35
4.2. Sitolojik Bulgular	39
4.2.1. Deterjanların mitotik indeks üzerine etkileri	39
4.3. Sitotoksikolojik Bulgular	41
4.3.1. Deterjanların kromozom anormalliklerine etkileri	41
4.4. DNA Hasarının Comet Testi ile Belirlenmesi	49
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	65
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	73
ÖZGEÇMİŞ	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3. 1.	<i>Vicia faba</i> L. tohumları	18
Şekil 3. 2.	Yüzey sterilizasyonu	21
Şekil 3. 3.	Steril kabin içerisinde UV ışınları altında kurutulması	22
Şekil 3. 4.	Deterjanla muamele edilmiş Whatman kağıtları ile kaplı petrilere yerleştirilen tohumlar	22
Şekil 3. 5.	Etüvde çimlenmeye bırakılan tohumlar	23
Şekil 3. 6.	Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan deterjanlar	23
Şekil 3. 7.	Mikroalg fırında çözdürülen NMP ve LMP agarozlar	25
Şekil 3. 8.	Carnoy fiksatifinde bekletilen <i>V. faba</i> kökleri	27
Şekil 3. 9.	Buz tüplük içerisinde çökmesi beklenen hücreler	29
Şekil 3. 10.	Kurşun kalemle etiketlenen bir ucu buzlu lamalar	29
Şekil 3. 11.	Nükleus + LMP agaroz karışımı içeren NMP kaplı lamalar	30
Şekil 3. 12.	Buz kaseti üzerinde bekletilen agaroz yüklü lamalar	30
Şekil 3. 13.	+4 derecede bekletilen agaroz yüklü lamalar	30
Şekil 3. 14.	Soğuk SCGE tamponu ile muamele edilmiş lamalar	31
Şekil 3. 15.	Soğuk Tris-HCl tamponuyla dolu şaleler	32
Şekil 3. 16.	Red Safe ile boyanan lameller	32
Şekil 3. 17.	Hücrelerin floresan mikroskop ve bilgisayar programı yardımı ile incelenmesi	33
Şekil 4. 1.	A1 deterjanı için kontrole göre kök uzunluğu yüzdesini yarıya düşüren değer (EC ₅₀)	35
Şekil 4. 2.	A2 deterjanı için kontrole göre kök uzunluğu yüzdesini yarıya düşüren değer (EC ₅₀)	36
Şekil 4. 3.	B1 deterjanı için kontrole göre kök uzunluğu yüzdesini yarıya düşüren değer (EC ₅₀)	37
Şekil 4. 4.	B2 deterjanı için kontrole göre kök uzunluğu yüzdesini yarıya düşüren değer (EC ₅₀)	37
Şekil 4. 5.	A1 deterjanının farklı konsantrasyonlarının mitoz bölünmenin farklı evrelerine etkisi	42
Şekil 4. 6.	A2 deterjanının farklı konsantrasyonlarının mitoz bölünmenin farklı evrelerine etkisi	44
Şekil 4. 7.	B1 deterjanının farklı konsantrasyonlarının mitoz bölünmenin farklı evrelerine etkisi	45
Şekil 4. 8.	B2 deterjanının farklı konsantrasyonlarının mitoz bölünmenin farklı evrelerine etkisi	47
Şekil 4. 9.	<i>V. faba</i> kök hücrelerinde meydana gelen kromozom anormallikleri	48
Şekil 4. 10.	Comet testinde hasar derecelerine göre çekirdeklerin sınıflandırılması	50
Şekil 4. 11.	A1 deterjanının <i>V. faba</i> üzerindeki kuyruk DNA yüzdesi	52
Şekil 4. 12.	A2 deterjanının <i>V. faba</i> üzerindeki kuyruk DNA yüzdesi	53
Şekil 4. 13.	B1 deterjanının <i>V. faba</i> üzerindeki kuyruk DNA yüzdesi	54

Şekil 4. 14.	B2 deterjanının <i>V. faba</i> üzerindeki kuyruk DNA yüzdesi.....	55
Şekil 4. 15.	A1 deterjanının <i>V. faba</i> üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi	56
Şekil 4. 16.	A2 deterjanının <i>V. faba</i> üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi	57
Şekil 4. 17.	B1 deterjanının <i>V. faba</i> üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi	58
Şekil 4. 18.	B2 deterjanının <i>V. faba</i> üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi	59



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3. 1.	Çalışmada kullanılan deterjanların içeriği.....	20
Tablo 4. 1.	Deterjanların <i>Vicia faba</i> kök büyümesine etkisi	38
Tablo 4. 2.	Deterjanların 24, 48 ve 72 saatlik mitotik indeks değerleri	40
Tablo 4. 3.	A1 deterjanının zamana bağlı kromozom anormalliği yüzdesi.....	43
Tablo 4. 4.	A2 deterjanının zamana bağlı kromozom anormalliği yüzdesi.....	44
Tablo 4. 5.	B1 deterjanının zamana bağlı kromozom anormalliği yüzdesi	46
Tablo 4. 6.	B2 deterjanının zamana bağlı kromozom anormalliği yüzdesi	47
Tablo 4. 7.	A1 deterjanının <i>V. faba</i> üzerindeki kuyruk DNA yüzdesi	51
Tablo 4. 8.	A2 deterjanının <i>V. faba</i> üzerindeki kuyruk DNA yüzdesi	52
Tablo 4. 9.	B1 deterjanının <i>V. faba</i> üzerindeki kuyruk DNA yüzdesi.....	53
Tablo 4. 10.	B2 deterjanının <i>V. faba</i> üzerindeki kuyruk DNA yüzdesi.....	54
Tablo 4. 11.	A1 deterjanının <i>V. faba</i> üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi	55
Tablo 4. 12.	A2 deterjanının <i>V. faba</i> üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi	56
Tablo 4. 13.	B1 deterjanının <i>V. faba</i> üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi	57
Tablo 4. 14.	B2 deterjanının <i>V. faba</i> üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

g	: Gram
g/m ³	: Gram / metreküp
g/m ² -yıl	: Gram / metrekare-yıl
m ²	: Metrekare
m ³	: Metreküp
mg/L	: Miligram / Litre
ml/L	: Mililitre / Litre
µm	: Mikrometre
°C	: Santigrat Derece

Kisaltmalar

BAC	: Benzalkonyum Klorür
CMC	: Karboksi Metil Selüloz
DAPI	: 4,6-Diamid-İno-2-Fenilindol
DDAB	: Dimetildioktadesil Amonyum Bromür
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EC ₅₀	: Etkin Konsantrasyon Değeri
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetikasit
KA	: Kromozom Anormallikleri
LAS	: Lineer Alkil Sülfonat
M	: Molar
NTA	: Nitrioloasetik Asit
OTM	: Olive Tail Moment (Olive Kuyruk Momenti)
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
SCGE	: Single Cell Gel Electrophoresis (Tek Hücre Jel Elektroforezi)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDBS	: Sodyum Dodesil Benzen Sülfonat
SO ₂	: Sülfür Dioksit
TL	: Tail Length (Kuyruk Uzunluğu)
TM	: Tail Moment (Kuyruk Momenti)
YOYO-1	: Benzoxazolium-4-Quinolinum Oxazole Yellow Homodimer
%H-DNA	: Baş Kısımdaki DNA Yüzdesi
2xEC ₅₀	: Etkin Konsantrasyon Değerinin İki Katı
%T-DNA	: Kuyruktaki DNA Yüzdesi

BAZI DETERJANLARIN *Vicia faba* L. ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Hızlı nüfus artışı ve plansız sanayileşmenin sonucu olarak artan deterjan kullanımı çevre kirliliğine yol açan nedenler arasında büyük paya sahiptir. Bu nedenle bu çalışmada bazı deterjanların *Vicia faba* L. üzerindeki genotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Kök inhibisyon testi sonucunda A1 deterjanı için EC₅₀ değeri 20ml/L, 2xEC₅₀ değeri 40ml/L, A2 deterjanı için EC₅₀ değeri 50ml/L, 2xEC₅₀ değeri 100ml/L, B1 deterjanı için EC₅₀ değeri 40ml/L, 2xEC₅₀ değeri 80ml/L, B2 deterjanı için EC₅₀ değeri 60ml/L, 2xEC₅₀ değeri 120ml/L olarak belirlendi. EC₅₀ ve 2xEC₅₀ değerleri kullanılarak 24, 48 ve 72 saat süreyle deterjanlarla muamele edilen *Vicia faba* tohumlarına mitotik indeks (MI) ve comet testi uygulandı. Sonuçlar kontrol grupları ile kıyaslandı. Mitotik indeks değerindeki en düşük azalma B2 deterjanında gözlemlendi. Ayrıca mitotik bölünmenin farklı safhalarında çeşitli anormallikler tespit edildi. Tek hücre jel elektroforezi (SCGE) ile belirlenen hücreler DNA hasar derecelerine göre Tip 0, Tip 1, Tip 2, Tip 3 ve Tip 4 olmak üzere sınıflandırıldı. Çevre ve deniz dostu deterjanlarda en çok Tip 3 derecesinde DNA hasarlı hücre bulunurken, standart deterjanlarda en çok Tip 4 dereceli DNA hasarlı hücre gözlemlendi. Comet testi ile elde edilen deneysel verilerin incelenmesi için OTM (Olive kuyruk momenti), kuyruk DNA % (kuyruk DNA yüzdesi), AU (rastgele seçilmiş birimler) parametreleri kullanıldı. Tüm deneylerde standart deterjanların çevre ve deniz dostu deterjanlara kıyasla daha fazla genotoksik hasara neden olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Comet Assay, DNA Hasarı, Kromozom Anormallikleri, Mitotik İndeks, *Vicia faba*.

DETERMINATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF SOME DETERGENTS ON *Vicia faba* L.

ABSTRACT

Increasing of using detergents as a result of rapid increase of population and irregular industrialization has a big partion in the environmental pollution. Determination of genotoxic effects of some detergents on *Vicia faba* was aimed in this study. According to the results of root inhibition test, EC₅₀ value for detergent A1 was 20ml/L, 2xEC₅₀ value was 40ml/L and EC₅₀ value for detergent A2 was 50ml/L, 2xEC₅₀ value was 100ml/L. Also, EC₅₀ value for detergent B1 was 40ml/L, 2xEC₅₀ value was 80ml/L and EC₅₀ value for detergent B2 was 60ml/L, 2xEC₅₀ value was 120ml/L. *Vicia faba* beans were treated with detergents for 24, 48 and 72h by using EC₅₀ and 2xEC₅₀ values and analysed by mitotic index (MI) and comet assay. Results were compared to the control groups. The least decreasing in the mitotic index was found in detergent B2. Lots of abnormalities were determined in different phases of mitosis. The examined cells by the single cell gel electrophoresis were classified as Type0, Type1, Type2, Type3 and Type4 by damage rates. Type3 was the most identified cell damage degree for eco-friendly detergents whereas Type4 was the most for standard detergents. Parameters such as Olive tail moment, tail DNA percentage, Arbitrary units were used for examination of the experimental values by comet assay. All the test results showed that standard detergents cause more genotoxic effects than eco-friendly ones.

Keywords: Comet Assay, DNA Damage, Chromosome Aberations, Mitotic Index, *Vicia faba*.

GİRİŞ

Çevre, insan ve diğer canlıların hayatı süresince ilişki içerisinde olduğu dış ortamdır. Bu ortamın fiziksel unsurlarını hava, su ve toprak oluştururken, biyolojik unsurlarını ise insan, hayvan, bitki ve diğer mikroorganizmalar oluşturmaktadır.

Tabiatın ana fiziksel unsurları olan hava, su ve toprak üzerinde negatif etkilerin oluşması sonucunda ortaya çıkan ve canlıların yaşamsal faaliyetlerini olumsuz yönde etkileyen çevre sorunları "Çevre Kirliliği" olarak tanımlanmaktadır.

Hızlı nüfus artışı ve plansız sanayileşmeye bağlı olarak her geçen gün daha da önemli bir sorun haline gelen çevre kirliliği; hava, su ve toprakta doğal işleyişin insan faaliyetleri neticesinde meydana çıkan kirletici madde ve enerji artıkları nedeni ile olumsuz yönde ilerlemesi şeklinde tanımlanabilir (Özek, 1994).

Ülkemizde her ne kadar bu konudaki olumsuz gidişi azaltmaya yönelik çalışmalar yıllardır sürdürülse de çevre kirliliği günümüzde çözülmesi gereken en büyük problem olma niteliğini hâlâ korumaktadır (Briggs, 2003). Son zamanlarda evsel ve endüstriyel atıklardan kaynaklanan kirliliğin önemi de giderek artmakta ve deterjanlar etkili kirleticiler arasında büyük bir yüzde ile yerini almaktadır (Minareci ve diğ., 2008).

Deterjanların yaygın kullanımı evsel atıklar yoluyla gelen fosfor yükünün artmasında en önemli faktörlerden biridir. Fosfat bazlı deterjanlar ağırlıkça %5-12 oranında fosfor içermektedir. Bu nedenle OECD ülkelerinin çoğunda fosfat bazlı deterjan kullanımı yasaklanmış, birçok ülkede ise fosfat oranının düşürülmesi zorunlu hale getirilmiştir (Ertürk, 2005).

Çevre kirliliği açısından deterjanlar değerlendirildiğinde en önemli konu deterjanların suda ayrışma veya ayrışmama durumlarıdır. Ayrışma özelliği düşük olan sert yapıdaki deterjanlar yüzey sularından toprağa, kuyu ve kaynak sularına hatta içme suyu yolu ile insan vücuduna da geçmektedirler. Bu geçiş düşük oranlarda bile olsa suyun koku ve tadını değiştirebilir (Demir, 2009).

Ev temizliğinde kullanılmak üzere üretilen sentetik deterjanların oldukça fazlası, maliyeti düşük dolgu malzemesi ve kireç bağlayıcı olarak yüksek oranda polifosfat içerirler. Bu deterjanların çoğu, yapılarında yaklaşık %12-13 fosfor ya da %50'nin üzerinde polifosfat ihtiva ederler. Bu gibi deterjanların sabun yerine kullanımının artışı, evsel atık sularındaki fosfor miktarının büyük oranda artması ile sonuçlanmıştır. Sentetik deterjanların kullanımının daha çok tercih edilmeye başlanmasının ardından sucul ortamlardaki fosfor konsantrasyonunun 2 ile 3 kat arttığı gözlemlenmiştir (Demir, 2009).

Deniz suyunda deterjan oranının $0,1 \text{ g/m}^3$ 'ten fazla olması halinde organizmalara toksik etkiler yapacağı belirtilmektedir. Deterjan içeren atık suları, ulaştığı sularda ötrofikasyona neden olur. Deterjanlardaki fosfor nedeniyle oluşan ötrofikasyon da alg artışına neden olur. Sudaki oksijenin azalmasının sonucu bulanıklık, tabanda yoğun birikim, kokuşma, canlı türünde azalma ve ortamın verimsiz duruma gelmesi şeklinde kendini belli eder. Sulardaki $0,1 \text{ mg/L}$ fosfor veya $0,1 \text{ g/m}^2\text{-yıl}$ fosfor oranı ötrofikasyonun tehlike ifade etmesi konusundaki sınır değerleridir. Bu oranlar su kalitesi ölçütü olarak kabul görür. Sulardaki fosfor oranının %15-20'si deterjan kaynaklı olduğu için ABD tributilfosfat kullanımını yasaklamıştır (Done ve Hutchins, 2009).

Doğada biriken kimyasallar besin zinciri yoluyla en son aşamada insanlara kadar ulaşmaktadır. Çeşitli çalışmalar sonucu kimyasal maddelerin insanlarda doğrudan zehirlenmenin yanı sıra hücre bölünmesi ve kromozomlarda anormallikler oluşturarak başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklar, düşükler, prematüre doğumlar gibi ciddi sağlık sorunlarına yol açtıkları gösterilmiştir (Kovalchuk ve diğ., 1998).

Kromozom hasarlarının saptanması için en etkin test organizmaları olarak hacim, yapı ve sayı bakımından analizi kolay olan kromozomlara sahip bitki ve hayvanlar seçilmektedir. Çevresel mutajenite çalışmalarında *Vicia faba*, *Allium cepa* ve *Tradescantia palludosa* gibi bitkiler kullanılarak su ve toprakta genotoksisite belirlenmeye çalışılmaktadır (Rank ve Nielsen, 1998; Grover ve Kaur, 1999; Kong ve Ma, 1999; Moraes ve Jordão, 2001).

Türkoğlu ve Koca (1999), yaptıkları çalışmada bir pestisit olan Paraquat'ın *V. faba*'da kromozomlar, DNA ve mitoz bölünmeye olan etkilerini incelemişlerdir. *V. faba*'nın hem köklerine hem de tohumlarına yapılan farklı konsantrasyonlardaki uygulamada her iki durumda da mitotik indeksin kontrole göre azaldığı ve kromozom hasarlarının arttığı saptanmıştır.

Metal ve boya endüstrisi katı atık sızıntılarının genotoksik etkilerinin araştırılmasında *A. cepa* kromozom aberasyon testi kullanılmıştır. Sonuç olarak metal ve boya atık sızıntılarında yüksek konsantrasyonda krom, nikel ve demirin varlığı önemli derecede sitogenetik değişimi tetiklediği belirlenmiştir. Tüm gruplarda mitotik indeksin önemli derecede azaldığı, kromozomal ve mitotik aberasyonların ve mikronükleus oluşumlarının başladığı görülmüştür. Gözlenen bu etki konsantrasyona bağlıdır ve metal atık sızıntılarının kromozom aberasyon frekansları boya atık sızıntılarından daha yüksektir (Chandra ve diğ., 2005).

Genotoksisite ve mutajenite testleri ve kimyasal metodolojilerin birleşimleri topraktaki potansiyel genotoksik kontaminasyonun belirlenmesinde faydalı olmaktadır. Yapılan bir çalışmada ağır metal ve sülfür dioksit (SO₂) ile kontamine olmuş Slovenya'daki altı farklı noktadan toprak örnekleri alınmıştır. Çalışmada ames testi, comet assay ve *Tradescantia* mikronükleus testlerini kullanılmıştır. Altı bölgedeki toprak örneklerindeki genotoksik etki insan hücrelerinde Comet assay ile ispatlanmıştır. *Tradescantia* mikronükleus testi üç örnekte mikronükleus oluşumlarında artış olduğunu göstermiştir (Lah ve diğ., 2008).

Comet assay yöntemi çoğu araştırmacı tarafından tercih edilen kromozom hasarını karşılaştırılmalı olarak inceleyebilmeyi sağlayan önemli genotoksisite testidir (Liman, 2013; Türkoğlu, 2012).

Comet testi funguslar, algler, bütün yüksek bitkiler, deniz canlıları, böcekler, omurgalı hayvanlar ve insanlar üzerinde oldukça rahat uygulanabilen bir yöntemdir. Canlıların hem çevre düzeni bakımından izlenmesinde hem de hedef canlıların savunma potansiyelleri ve sonraki sağlık durumları konusunda bilgi alınmasında sıkça tercih edilen mühim bir metottur (Gichner ve Plewa 1998; Angelis ve diğ., 2000; Menke ve diğ. 2001; Dhawan ve diğ., 2009).

DNA hasarının derecesini tanımlamada ise Tip0, Tip1, Tip2, Tip3 ve Tip4 olarak adlandırılan sınıflandırmalar kullanıldı. Arbitrary Units (AU) comet görüntülerinin gözle incelenip 0 ile 4 arasında değerler verilmesiyle DNA hasarının ölçülmesine imkan sağlayan bir yöntemdir (Türkoğlu, 2012). AU ile yapılan incelemeler sonucu varılan veriler ile kuyruk DNA yüzdesi yöntemiyle elde edilen veriler birbirine benzerlik gösterir (Lovell ve Omori, 2008).

Son yıllarda genotoksik ajanların bitki kökü ve yapraklarındaki etkilerinin takibiyle yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Neredeyse bütün bitkiler comet testinde kullanılabilir niteliktedir. Ancak hem kolay temin edilmesi hem de yetiştirme ve hücre izolasyonunun kolay olması bakımından, patates (*Solanum tuberosum*), tütün (*Nicotiana tabacum*), bakla (*Vicia faba*), soğan (*Allium cepa*) ve *Arabidopsis thaliana* ile yapılan çalışmalar literatürde diğer bitki türlerine nazaran daha fazla bulunmaktadır (Gichner ve diğ., 2006; Mancini ve diğ., 2006; Lin ve diğ., 2008).

Bu çalışmada farklı formülasyon ve farklı konsantrasyondaki dört adet deterjanın *Vicia faba* kök hücreleri üzerindeki genotoksik etkilerinin değerlendirilmesine yer verilmiştir. Genetik hasarın belirlenmesinde mitotik indeks testi, kromozom anormallikleri testi ve comet assay testi uygulanmıştır. Bu sayede, en önemli çevresel kirletici faktörlerden biri olan deterjanların genotoksik etkileri comet assay tekniği ile ortaya koyularak literatüre yenilikler sunulması ve arıtma sistemlerinin kuvvetlendirilip daha da önem kazanması konusunda bilincin artırılması amaçlanmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Deterjanların Genel Özellikleri

Deterjanlar, temizlik amacıyla tercih edilen ve içinde esas temizleyici olarak anyonik yüzey aktif maddeler ve temizlemeye yardımcı diğer maddeleri içeren toz, granül, yumuşak kıvamlı veya sıvı formdaki karışımlardır (Egemen, 2000). Deterjan kompozisyonunu oluşturan maddeler, yüzey aktif maddeler, yapısal maddeler, ağartıcılar (beyazlatıcılar) ve diğer yardımcı maddeler olarak dört bölümde incelenir.

1.1.1. Yüzey aktif maddeler

Suyun molekülleri arasında kohezyon kuvvetleri vardır. Bu kuvvetler arasındaki grift elektrik kuvvetlerinden oluşur. Su yüzeyindeki molekül kuvvetle sıvı içine doğru çekilir ve bu moleküller su yüzeyinde birbirine yaklaşarak bir film oluştururlar. Bu film içeriye ve dışarıya karşı büyük bir dirence sahiptir. Buna “yüzey gerilim” denir (Marchesi ve diğ., 1994).

Suyun gerilimi yüksek olduğundan yabancı madde su yüzeyinde yayılmaz ve toplu halde (örneğin yağ/su) damla halinde kalır veya mono moleküler bir tabaka halinde su yüzeyinde yayılır. Deterjanlar ise yüzey gerilimi düşürmesi ile bu maddenin su ile karışmasını, yüzeyden su içine çekilmesi sağlar. Bu şekilde herhangi bir materyalden temizlenmesi sağlanmış olur. Bir deterjan içeriğindeki temizleme işlemini sağlayan en etkin bileşenler yüzey aktif maddelerdir. (F. Redigueri ve diğ., 2011).

1.1.1.1. Anyonik yüzey aktif maddeler

Anyonik yüzey aktif maddeler baş gruplarında anyonik iyon bulundurulur. Anyonik yüzey aktif maddeler teknoloji ve araştırma alanlarında ilk çalışılan ve hâlâ en yaygın kullanılan maddelerdendir (Cirelli ve diğ., 2009).

Doğal deri yağını gidererek deride tahriş, kızarıklık ve populer dermatitis yaparlar. Hassas insanların derisinde deride açılma ve kanama yapar. Ağız yolu ile alınmasında mide barsak bozuklukları, diyare, kusma yapar (Marchesi ve diğ., 1994).

Bu maddelere sodyum dodesil sülfat (SDS), lineer alkil sülfonat (LAS), sodyum dodesil benzen sülfonat (SDBS) bileşenleri örnek olarak verilebilir (Masakorala ve diğ., 2011; Wu ve diğ., 2010).

1.1.1.2. Katyonik yüzey aktif maddeler

Katyonik deterjanların antiseptik özellikleri vardır. Deride bakteriyi parçalayabildikleri için cerrahide kullanılırlar. Öldürücü konsantrasyon 1 g -3 g'dır. Konsantre çözelti absorbe olur ve hücre fonksiyonuna müdahale eder. Isıya dayanıksızdırlar, parçalanırlar. Katyonik deterjanlar, anyonik deterjanlardan daha zehirlidir (Marchesi ve diğ., 1994).

Benzalkonyum klorür (BAC), dimetildioktadesil amonyum bromür (DDAB), katyonik yüzey aktif maddelere örnek olarak verilebilir (Ferk ve diğ., 2007).

1.1.1.3. Noniyonik yüzey aktif maddeler

Yüksüz ve zayıf elektriksel özellikteki maddelerdir. Islatıcı madde, emülgatör ve polimer dengeleyici olarak görev yaptıklarından genelde anyonik yüzey aktif maddelerle birlikte kullanılırlar (Masakorala ve diğ., 2011; Cirelli ve diğ., 2008). Alkilfenol etoksilatlar örnek verilebilir (Gheorge ve diğ., 2013).

1.1.1.4. Amfoterik yüzey aktif maddeler

Üzerinde aynı anda hem anyonik hem de katyonik yüklü iyon bulunduran kimyasallara amfoterik yüzey aktif madde ismi verilir. Alkil betainler örnek olarak verilebilir (Gheorge ve diğ., 2013).

1.1.2. Yapısal maddeler

Yapısal maddelerin en önemli fonksiyonları, yıkamada kullanılan suyun içindeki kalsiyum ve magnezyum iyonlarını, diğer bir deyişle suyun sertliğini gidermeleri ve yıkama işlemini kolaylaştırmalarıdır.

Sodyum tripolifosfat, suyun pH'sını 9-10 arasında tutarak temizleme işlemini kolaylaştırması, kirin su içinde kalmasını sağlaması, çamaşır makinelerinin yıpranmasını önlemesi, ekonomik olması, toksik özelliğinin olmaması, cilde alerjik etkisinin bulunmaması nedenleriyle önemli fonksiyonlara sahip yapısal maddedir (Egemen, 2000).

1.2. *Vicia faba* L. Bitkisinin Genel Özellikleri

Ilıman iklim bitkilerinden olan bakla (*Vicia faba* L.) aynı familyadan olan nohut ve bezelyeye göre soğuk ortamlara daha fazla dayanabilmektedir. Vejetasyon süresi uzun, sıcaklık isteği düşüktür. Yağışlı ve rutubetli iklimlerde yüksek verim sağlayan bakla deniz havasına da uyum sağlayabilmektedir. Tropik iklim kuşağının serin kış dönemlerinde yüksek verim alınan bakla, uzun süreli olmayan ve şiddeti düşük don olaylarına da dayanabilmektedir (Özdemir, 2002).

Bakla kuvvetli bir kazık köke sahiptir, otsu bir gövdesi bulunmaktadır. Yapraklar gövde nodyumlarından bileşik yapraklar şeklinde çıkarlar. Çiçekler ise yaprak koltuklarında meydana gelir ve salkım şeklindedir. Bitki üzerindeki çiçekler döllendikten sonra meyve oluşmaya başlar. Bakla tohumları renk, şekil ve büyüklükleri bakımından ve danelerinin küçük ve iri olmasına göre farklılıklar gösterir. Bakla tohumlarının çimlenebilmesi için optimum sıcaklık 20-25 °C'dir. Tohumlar toprağın sıcaklık değeri 8 °C'ye ulaştığında çimlenmeye başlar. Tohumların çimlenebilmesi için gereken süre 10-12 gündür. Vejetasyon süresi 120-200 gündür ve bu süre boyunca yeterli miktarda yağış alabilen ya da sulanabilen yerlerde iyi bir şekilde yetişmektedir. Derin, geçirgen, organik maddece zengin, su tutma kapasitesi yüksek, tınlı killi topraklarda, toprak hafif alkali veya nötr olduğunda en iyi verimi vermektedir. Asitli topraklarda baklanın büyümesi yavaş, verimi az olur. *Vicia faba* sadece sitolojik değil, fizyolojik ve radyobiyojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir materyaldir. Materyal bütün yıl boyunca kolaylıkla elde edilebilir, gelişimi ve saklanması kolay ve ucuzdur. Metotta, pahalı materyal, gereçler ve steril şartlar gerekli değildir. Kromozom sayısı düşüktür ($2n=12$) ve kromozomları büyük ve kalındır (Kihlman, 1975).

Test materyali olarak kullanılan *Vicia* kök uçlarının hem avantajları hem de dezavantajları vardır.

Materyalin (*Vicia* kök uçlarının) bütün bir yıl içerisinde kolaylıkla elde edilebilir olması, gelişimi ve saklanması kolay ve ucuz olması, metotta pahalı materyal, gereçler ve şartların gerekli olmaması gibi avantajlara sahip olduğu görülmüştür. Kök meristemi, mitoz bölünme geçiren hücrelerin yüksek bir oranını içermektedir. Kromozom sayısının düşük ($2n=12$) ve kromozomların çok kalın olması doğru ve tam sayım yapma olanağı sağlamıştır. Kardeş kromatid değişimlerinin frekansı üzerine kimyasal maddelerin etkilerinin çalışılması için uygun bir materyal olduğu bulunmuştur. Bu avantajların yanında kullanılan materyalin hücre duvarı, bitki kök uçları üzerinde biyokimyasal ve sitolojik çalışmaların her ikisinde de engel oluşturduğu için dezavantaj olarak görülmektedir. Bu yüzden, preparatlar ezilerek, köklerde hücrelerin iyi bir şekilde ayrılması sağlanmış, hücre duvarının orta lamelinde bulunan pektik maddeler, asitler ve enzimlerle hidroliz yoluyla eritilmiştir. Bu prosedür, kromozomların morfolojisini ve kimyasal bileşenlerinin bileşimini değiştirebilir. O sebeple sitolojik analizlerin belirli tiplerini yapmak zordur ancak imkânsız değildir (Kihlman, 1975).

1.3. Kök İnhibisyon Testi

Kök büyüme inhibisyon testinde en önemli nokta, çevresel kirleticilerin kromozomlar ve hücre bölünmesi üzerinde toksik ve genotoksik etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla kontrol grubuna kıyasla kök uzunluğunu %50 oranında düşüren muamele konsantrasyonunun (EC_{50}) belirlenmesi işlemidir (Fiskesjö, 1985). Çevresel kirleticilerin etki konsantrasyonlarının belirlenmesi için birçok çalışmada EC_{50} değeri hesaplanmıştır (Nielsen ve Rank, 1994; Rank ve Nielsen, 1998; Chauhan ve diğ., 1999, Yüzbaşıoğlu, 2001; Ateeq ve diğ., 2002; Saxena ve diğ., 2005; Yıldız ve diğ., 2006; Arıkan, 2006).

1.4. Mitotik Aktivite Testleri

Meristematik hücrelerin mitotik evrelerinin sitolojik olarak incelenmesiyle mitotik aktivite (indeks) hesaplanabilmektedir. Mitotik aktivite, bölünen hücrelerin bölünmeyen meristematik hücrelere oranıdır. Mitotik aktivite testleri kromozom sayımı ve toksikolojik araştırmalarda sıkça kullanılmaktadır. Bu testin uygulanması ile muamele edilen kimyasal maddenin hücre bölünme oranına ne derece etki ettiği hakkında bilgi sağlanabilmektedir (Akı ve Karabay, 2004).

1.5. Comet Assay Tekniği (Tek Hücre Jel Elektroforezi)

Tek hücre jel elektroforez yöntemi ilk kez 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından tek hücre DNA hasarını görüntülemek amacıyla geliştirilmiştir. Geliştirilen bu tekniğe göre hücreler mikroskopik lamalar üzerindeki agaroz jelle gömülmekte, tuz ve deterjan içeren zltilemlerle muamele edilip lizize uğratılmakta ve nötral şartlarda elektroforez yapılarak, DNA serbestleştirilmektedir. Elektrik akımı uygulanması, kırılmış ve hafiflemiş DNA fragmanlarının, çekirdekten hızla gn sağlamaktadır.

Comet tekniği, hasar görmüş DNA'nın elektroforez ile nukleustan salınması prensibine dayanır. Eğer DNA kırık içeriyorsa, hasarlı DNA, nukleustan anoda doğru g etmekte ve etidyum bromid gibi floresans bir boya ile boyandıklarında görünüşleri itibariyle kuyruklu yıldıza benzediklerinden comet adıyla adlandırılmaktaydı (Tice ve diğ., 2000).

DNA hasarlarının tespitinde YOYO-1 (benzoxazolium-4-quinolinum oxazole yellow homodimer) ve DAPI (4,6-diamid-ino-2-phenylindole) gibi hassas fakat oldukça pahalı olan boyalar kullanılmasına rağmen daha ucuz olan etidyum bromürün etkinliğinin bahsedilen diğer boyalardan farklı olmadığı rapor edilmiştir (Gichner ve diğ., 2006).

Sitogenetik yöntemler, mutajenik ve karsinojenik bileşiklere maruz kalan toplulukların biyolojik izlenmesinde geniş lde kullanılmaktadır. Bugüne dek DNA zerindeki hasarların belirlenebilmesi için çok fazla yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerin biroğununun pahalı olması, uzun çalışma süresine ihtiyaç duyulması, birçok laboratuvar veya niversitenin bünyesinde bulunmayan radyoaktif çalışmaları içermesi, araştırma neticesinde arzu edilen başarının sağlanamaması bu alanda çalışma yapılmasını zorlaştırmıştır (Tice ve diğ., 2000). Son yıllarda gelişen comet analizi çeşitli tipte DNA hasarlarının tespiti için hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntem olması nedeniyle yaygın kullanım görmektedir (Bilgici, 2005).

DNA ift sarmal kırılmalarının tespitine olanak sağlayan nötral ortamlar, tek sarmal kırılmalarının belirlenmesine ise imkan sağlamamaktadır. DNA üzerinde hasar oluşturan birçok ajan, DNA ift sarmalından çok, DNA tek sarmalında hasar

oluşturmaktadır. Ayrıca nötral ortamlarda proteinler tam anlamıyla uzaklaştırılmamaktadır. Bu nedenle daha sonraki yıllarda da modifiye protokoller geliştirilmiştir (Bilgici, 2005).

Böylelikle comet tekniğinin yeni dizaynı, insan hücrelerinin hemen hepsinde DNA hasarı büyüklüğünün direkt olarak tespitini sağlamaktadır (Tice ve diğ., 2000; Olive ve diğ., 1990; Collins ve diğ., 1997; Lee ve Steinert, 2003).

Comet tekniği ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle değerlendirmenin yanı sıra Comet görüntü analiz programlarını kullanmak suretiyle kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi ile ilgili parametreler belirlenebilir (Collins, 2002).

Comet görüntü analiz programı kullanılarak kuyrukta mevcut olan DNA oranının saptanması veya neticelerin gözle değerlendirilmesi, diğer parametrelere kıyasla konsantrasyon-yanıt ilişkisini daha güzel yansıtması nedeniyle tercih edilmektedir (Moller, 2006a,b; Olive, 1999).

Gözle değerlendirmede hücreler hasarlı ve hasarsız olarak ayrılırlar. Hasarlı hücreler hasar seviyelerine göre farklı kategorilere ayrılabilir. Bazı çalışmalarda hücreler hasarsız, az hasarlı ve çok hasarlı olarak 3 sınıfa ayrılabilirdiği gibi bazı çalışmalarda ise bu sınıflandırma genişletilerek 5 kategoriye ayrılmışlardır. Gözle değerlendirme, hızlı (5 dakikadan az bir sürede 1000 hücre sayılabilmektedir) ve bilgisayar programı gerektirmediğinden ucuz ve kolay bir yöntemdir (Baltacı ve diğ., 1998; Sardeş ve diğ., 1995; Sardeş ve diğ., 1997).

Gözle skorlama, 0 (kuyruk yok)'dan 4 (nerdeyse bütün DNA kuyrukta)'e kadar 5 kategoride incelenir (Collins, 2004).

Baş kısmındaki DNA yüzdesi (% H-DNA) ve kuyrukta bulunan DNA yüzdesi (% T-DNA), kuyruk uzunluğu (TL, μm), kuyruk momenti (TM, μm , kuyruk kısmındaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu çarpımının 100'e bölünmesiyle elde edilir), Olive kuyruk momenti (OTM, DNA kuyruk uzunluğu ve göç eden DNA parçacıklarının kafaya uzaklığını ölçer) bilgisayar yazılımlarıyla elde edilerek comet analizlerinde kullanılan parametrelerdir. Özellikle kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu daha sık

kullanılmasına rağmen kullanımı artan ve kırık DNA frekansı ile doğru orantılı olan parametre hücre çekirdeğinden ayrılan kuyruk DNA yüzdesidir. (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010; Bozdağ, 2009; Kumaravel ve diğ., 2009).

Comet tekniği tek bir hücrede DNA hasarının direk tayininin yanı sıra, bir popülasyondaki tüm hücrelerin aynı oranda hasara uğrayıp uğramadığının tespitine, dolayısıyla da bir tedavi sırasında hücrelerin cevabının saptanmasına yardımcı olabilmekte, dirençli hücre popülasyonunun tanımlanmasını sağlamaktadır. Comet tekniği; değişik deneysel şartlarda DNA hasar ve onarımını incelediğinden, son yıllarda genotoksisite ve DNA onarım mekanizmalarının incelemesinde kullanımı artan bir yöntemdir (Collins ve diğ., 1997a; Lee ve Steinert, 2003).

Comet tekniği insan popülasyonlarından alınan lenfosit örneklerinde oksidatif hasar, UV ve iyonizan radyasyona duyarlılıkların incelenmesi yönünden başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Özellikle biyoizleme (human biomonitoring) çalışmalarında, meslekleri nedeniyle ya da kazayla çeşitli kimyasal maddelere maruz kalan kişilerde, DNA hasarının incelemesinde son yıllarda rağbet gören bir tekniktir (Collins ve diğ., 1997-b; Faust ve diğ., 2004).

İn vivo modellerde herhangi bir dokuya da uyarlanabildiğinden, sadece hızlı çoğalan hücrelerde uygulanabilir olan diğer genotoksisite testlerinden daha üstündür. Aynı zamanda tek bir doku hasarını belirlemek de mümkündür (Hartman ve diğ., 2003). Günümüzde yaşlanma, genetik toksikoloji ve moleküler epidemiyoloji gibi pek çok alanda uygulamaları vardır (Martin ve diğ., 1993).

2. LİTERATÜR ÇALIŞMASI

Bu çalışmada, farklı konsantrasyondaki dört farklı deterjanın *Vicia faba* üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri kromozom anormallikleri testi ve comet assay yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışma öncesinde, deterjanlar ve uygulanacak testlerin ve bitki materyalinin karakteristikleri hakkında çeşitli literatür taramaları yapılmıştır. Bu bölümde çalışmaya referans olabilecek bir takım bilimsel araştırmalara yer verilmiştir.

Deterjan kirliliği, sudaki biyolojik aktiviteyi büyük ölçüde etkilemektedir. Örneğin deniz suyundaki deterjan miktarı 0,1 gr/m³'ten fazla olduğunda organizmalara yeterli oksijen taşınmaz ve bu miktar birçok canlı türü için lethal konsantrasyon değerindedir (Egemen, 2000).

Gediz Nehri'nde evsel ve endüstriyel atıkların neden olduğu anyonik yüzey aktif madde kirliliğinin incelendiği bir çalışmada, Gediz Nehri'nin bir yılda İzmir Körfezi'ne getirdiği anyonik deterjan yüklemesinin 41,2 ton olduğu tespit edilmiştir (Tuğrul, 1992).

Akdeniz için önemli ana kirlilik kaynaklarının açıklandığı bir çalışmada, Akdeniz havzasına yılda yaklaşık 60.000 ton deterjan ulaştığı belirtilmiştir (Danovaro, 2003).

İndiyum kalay oksit'in *A. cepa* kök ucu hücrelerindeki genotoksik etkisinin incelendiği bir çalışmada 12,5, 25, 50, 75, ve 100 ppm olmak üzere 5 farklı konsantrasyon 4 saat boyunca uygulanmıştır. Neticede İndiyum kalay oksit uygulamasının kromozom aberasyonlarını arttırdığı görülmüştür. Geri kalmış kromozom, kromozomlarda yapışma, anafaz köprüleri, düzensiz anafaz ve telofaz evreleri gözlemlenmiştir. Comet assay ile uygulamanın her döneminde *A. cepa* kök hücrelerinde genetik hasara rastlandığı belirtilmiştir (Ciğerci, 2013).

Bitki büyüme düzenleyicilerinin *V. faba*'ya uygulanması sonucunda mitotik indeksin kontrole göre azaldığı gözlenmiştir (Koca, 2008).

DNA üzerinde meydana gelen hasarlardaki artışın nedeni olarak yüksek toksik etki gösterilebilir. Bazı bitkilerde kirleticilerin genotoksik etkileri üzerine yapılan çalışmada konsantrasyon ve DNA hasarı arasında ilişki olduğu ortaya konmuştur (Gichner ve diğ., 2006).

Ticari ürünlerin içinde bulunan gümüş nanopartiküllerin (AgNPs), *V. faba* üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada dört farklı konsantrasyon kullanılmıştır. Sonuçta gümüş nanopartikül uygulamasının kromozom aberasyonları ve mikronükleus oranında artışa, mitotik indekste ise azalmaya neden olduğu bulunmuştur (Patlolla ve diğ., 2012).

V. faba kök ucu hücrelerinde glifosat ve metribuzin herbisitlerinin dört farklı süre boyunca düşük ve yüksek konsantrasyonları kullanılarak sitolojik etkileri çalışılmıştır. Bu iki pestisit mitotik indeks ve kök uzunluğunda azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Mitozda meydana gelen kromozomal varyasyonların sayısında artış gözlenmiştir. Konsantrasyon ve zamana bağlı mitotik bozukluklar meydana gelmiştir. Mikronükleuslu hücreler, çok kutuplu hücreler, kalgın kromozom köprü oluşumu ve yapışkanlık gibi kromozomal anomali tipleri görülmüştür. Konsantrasyon artışıyla oluşan kromozom kırıkları pestisitlerin klastojenik etkilerini desteklemektedir (Shehata ve Al-Harbi, 2003).

V. faba kök meristem hücrelerinde Dichlorvos (DDVP) insektisitinin klastojenik ve mitodepresif etkilerinin belirlediği bir çalışmada bitki kökleri insektisit konsantrasyonlarına 2 saat süresince maruz bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak maleik hidrazid, negatif kontrol olarak saf su kullanılmıştır. DDVP'nin tüm konsantrasyonlarında mitotik indeks değerleri pozitif kontrolden yüksek, kontrol grubuyla karşılaştırılığında ise iki kat düşük bulunmuştur. Kromatit kırıkları, kromatit değişiklikleri gibi kromozomal bozukluklar gözlenmiştir. Mikronükleusun sayısında 10µM'den itibaren artış gözlenmiştir (Kontek ve diğ., 2007).

V. faba köklerinde krom trioksit (CrO₃)'in mutajenik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada mikronükleus ve kromozom aberasyon testi kullanılarak bitkinin kök tiplerinde mikronükleus, kromozomal aberasyonların sayısında artışa bakılmış, mitotik indeks hesaplanmıştır. *V. faba* tohumları kimyasalın konsantrasyonlarına 4 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Kimyasalın en yüksek konsantrasyonu mitotik

indekste ciddi bir düşüşe sebep olmuştur. Artan konsantrasyona paralel olarak ise mikronukleus sayısında ve kromozom anormalliklerinin sayısında artış meydana gelmiştir. Profazda mikronukleus, fragment oluşumu, çok kutupluluk, metafazda düzensiz kromozom dağılımı, ekvatorial tabla üzerinde kromozomların iki parçaya ayrılması, anafazda kalgın kromozom, köprü oluşumları, telofazda mikronukleus, kromozom fragmenti, kalgın, köprü gibi hasarlar meydana gelmiştir (Qian, 2004).

A. cepa ve *V. faba* bitkilerinin somatik hücrelerinde Atrazine herbisitinin sitogenetik etkisine bakıldığı bir araştırmada test organizmalarının EC₅₀ değerleri belirlenmiştir. *A. cepa* ve *V. faba* bitkileri atrazine kimyasalının farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Atrazine'in konsantrasyona bağımlı artışına paralel olarak mitotik indeksi önemli ölçüde inhibe etmiş aynı zamanda mitotik ve kromozomal aberasyonlara sebep olmuştur. En çok gözlenen kromozomal aberasyonlar kırık ve fragment oluşumu; mitotik aberasyonlar ise cmetafaz, kromozom yapışması, köprü oluşumu, kalgın kromozom, poliploidi, eşit olmayan ayrılmadır. Mitotik aberasyonların sayısı kromozomal aberasyonlardan çok daha yüksek çıkmıştır. Deneyin sonuçları atrazine'nin bitkilerde genotoksik etkilerine işaret etmektedir. Diğer test sistemleri ile karşılaştırıldığında her iki bitki test sisteminde çok daha duyarlı olduğu bulunmuştur (Mishra ve Srivastava, 2009).

Farklı sürelerde ve ölümcül olmayan konsantrasyonlarda 2,4-D'nin teşvik ettiği DNA hasarı, *Clarias batrachus* eritrositlerinde alkalın comet assayle çalışılmıştır. Araştırma bulgularına göre, 2,4-D konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak eritrositlerdeki DNA hasar seviyesinin arttığı belirlenmiştir (Ateeq ve diğ., 2005).

Maluszynska ve Juchimiuk (2005) *Crepis capillaris*'e mutajen uygulamasıyla DNA'da hasar meydana getirerek bunları tespit etmek için Comet analizi, kardeş kromatid değişimi ve FISH yöntemlerini kullanmışlardır.

V. faba'nın kök ucu nükleusları N-Metil-N-nitrosoüre (MNU) genotoksik etkili ajan kullanarak, üç farklı comet tekniği protokolü (nötr/nötr, alkali/nötr, alkali/alkali) ile karşılaştırmalı olarak incelemiş ve bu protokollerden farklı konsantrasyon-cevap eğrileri elde edilmiştir (Menke ve diğ., 2000).

Benzer bir başka çalışmada, 2,4-D tuzu ve ticari formunun genotoksik etkileri Çin hamster yumurta (Chinese Hamster Ovary, CHO) hücrelerinde kardeş kromatid değişimi (SCE) ve tek hücre jel elektroforezi assayleri (SCGE) ile araştırılmıştır. 2,4-D'nin her iki formu uygulama konsantrasyonuna bağlı olarak SCE frekansında artışa neden olmuştur. 2,4-D'nin hücre çoğalma indeksini etkilemediği; fakat yüksek konsantrasyonlarının mitotik indekste azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, kullanılan her iki 2,4-D formu konsantrasyona bağımlı olarak SCGE (comet assay) ile belirlenen DNA iplik kırıklarının artışına neden olmuştur. Araştırmacılar 2,4-D'nin memeli hücrelerinde SCE ve DNA hasarını teşvik ettiğini ve bu nedenle 2,4-D'nin insan için tehlikeli olarak değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (Gonzales ve diğ., 2005).

Allium sativum ve *Vicia faba*'da sülfür dioksit'in kök ucu hücreleri üzerinde genotoksitesinin belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmada, sodyum bisülfid ve sodyum sülfid (1:3) karışımı $1 \times 10^{-4}M$ ile $2 \times 10^{-3}M$ aralığında değişen konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Genotoksitesinin belirlenmesinde *V. faba*'da anafaz aberasyon (AA) frekansları ve mikronükleus (MCN) testleri, *A. sativum*'da ise sadece mikronükleus testleri gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak negatif kontrol ile karşılaştırıldığında *V. faba* kök ucunda anafaz aberasyon (AA) frekansları 1,7-3,9 ve mikronükleus frekansları ise 3,5-4,5 kat artmıştır. Benzer sonuçlara *Allium* MCN testlerinde de rastlanmıştır (Yi ve Meng, 2003).

Vicia faba kök uçlarında krom trioksit'in (CrO_3) farklı konsantrasyonlarındaki mutajenik etkilerini belirlemek için yapılan bir çalışmada; *V. faba* kök ucu hücrelerindeki kromozom aberasyon oranını, mitotik indeksler ve mikronükleus oranını belirlemek için mikronükleus analizi ve kromozom aberasyon analizi kullanılmıştır. Krom oksit'in *V. faba* kök ucu hücrelerinin mikronükleus oranını artırdığı ortaya çıkmıştır. Fakat aşırı artan chromium trioksit konsantrasyonu mikronükleus konsantrasyonunu azaltmıştır. Ayrıca artmış chromium trioksit konsantrasyonu ile kromozom aberasyonlarının değişik tiplerinin oluşumu gözlenmiştir. Elde edilen veriler neticesinde chromium trioksit'in *V. faba* kök ucu hücrelerinde önemli mutajenik etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Xiao-wei, 2004).

Önemli çevre kirleticilerinden biri olan cıva ($HgCl_2$)'nin sarımsak (*Allium sativum*) kök ucu hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada cıvanın farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Düşük konsantrasyon ile muamele edilen sarımsakların çimlenmesinde kontrole göre belirgin bir fark görülmediği, ancak yüksek konsantrasyonlarda çimlenmenin azaldığı ve hatta kök gelişiminin neredeyse tamamen durduğu gözlenmiştir. Cıva konsantrasyonunun artışına paralel olarak, hücre bölünmesinin azaldığı, kalgın kromozom, multipolar anafaz ve anafazda gibi birçok kromozom anormalliği tespit edilmiştir (Gedik ve diğ., 2013).

Ağır metallerin algisel biyotaşınımı in vitro bir yaklaşım kullanılarak araştırılmıştır. Bitki genotoksisite testleri algisel biyofiltrelerin farklı çeşitlerinin kullanımından önce ve sonra endüstriyel atıkların genotoksisitesini değerlendirmek amacıyla *A. cepa* ve *V. faba* bitkileri ile yürütülmüştür. Veri istatistiksel analizi; algisel biyofiltreler ile yeniden düzenleme işlemlerinden sonra ağır metal konsantrasyonlarında dikkat çekici boyutta bir azalma ve ilgili genotoksisite durumunda da önemli bir azalma olduğunu göstermiştir. *Allium* ve *Vicia* genotoksisite yaklaşımı toksisite için yeniden düzenlenmiş atık maddenin görüntülenmesinde etkileyici olmuştur (Migid ve diğ., 2005).

V. faba ile yapılan başka bir araştırmada; bitkileri hasta ve zararlılardan koruyan pestisitler ile besleyici nitelik taşıyan kimyasalların (Captan, hezudin, tetrafin, bolikel) bu bitki üzerinde oluşturabileceği etkiler karşılaştırmalı olarak ortaya konmuştur (Acar, 2000).

Arsenik çevrede sıkça bulunan karsinogen bir maddedir. Arsenik'in genotoksik etkilerinin belirlenmesi üzerine yapılan bir çalışmada test bitkisi olarak *Allium cepa* ve *Vicia faba* seçilmiştir. Test sonuçlarında Arsenik'in her iki bitkide de mikronükleus oranını arttırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca anormalliklerin belirlenmesinde *V. faba* kök ucu mitotik hücrelerinin *A. cepa* kök ucu mitotik hücrelerine göre daha hassas olduğu gözlemlenmiştir (Wu ve diğ., 2010).

Fenol'ün farklı konsantrasyonlarının *Vicia faba* L. kök ucu hücrelerine sitotoksik etkilerinin incelendiği bir çalışmada test materyali olarak seçilmiştir. Bakla tohumlarında belirlenen çimlenme oranı, kök uzunluğu ve mikronükleus (MN) sıklığı sitotoksisitenin saptanmasında kullanılmış ve alınan sonuçlar istatistiksel

olarak incelenmiştir. Aynı zamanda sitogenetik analizlere ilaveten, fenol ile uygulama yapılan bakla tohumlarının kök ucu meristem hücrelerinde DNA analizleri yapılmıştır. Tohumlar kontrol ve fenol uygulanmış gruplar olarak ikiye ayrılmış ve 7 gün boyunca fenol'ün üç farklı konsantrasyonu ile muamele edilmiştir. Neticede, fenol'ün tüm muamele gruplarında konsantrasyona bağlı olarak çimlenme yüzdesi ve kök uzunluğunu azalttığı, MN oranını ise attırdığı bulunmuştur. Edinilen veriler fenol'ün bakla kök ucu hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu ispat eder niteliktedir (Yalçın ve diğ., 2008).



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada araştırma materyali olarak ticari olarak temin edilmiş *Vicia faba* L. (bakla) ($2n=12$) tohumları kullanıldı (Şekil 3.1.). *V. faba* Kök ucu kromozom aberasyon testi basit, hızlı, ucuz ve etkili olması sebebiyle International Programme on Chemical Safety (IPCS, WHO) ve United Nations Environment Programme (UNEP) tarafından çevre kirliliğinin biyolojik tehlikelerinin in-situ değerlendirmesinde kullanılacak bitki biyotestlerinden biri olarak belirlenmiştir (Patlolla ve diğ., 2012).



Şekil 3. 1. *Vicia faba* L. tohumları

Araştırmada kullanılan *Vicia faba* L. sistematik olarak řu şekilde sınıflandırılmaktadır (URL-1):

Kingdom: *Plantae*-Bitkiler

Subkingdom: *Viridiplantae*-Yeşil Bitkiler

Infrakingdom: *Streptophyta*-Kara bitkileri

Superdivision: *Embryophyta*

Division: *Tracheophyta*-Vasküler bitkiler

Subdivision: *Spermatophytina*-Tohumlu bitkiler

Class: *Magnoliopsida*-Çiçekli Bitkiler

Superorder: *Rosanae*

Order: *Fabales*

Family: *Fabaceae*

Genus: *Vicia* L.

Species: *Vicia faba* L.

3.2. Kullanılan Deterjanlar Hakkında Bilgiler

Araştırmada A1, B1, A2 ve B2 şeklinde adlandırılan ikisi standart ikisi çevre ve deniz dostu olmak üzere dört farklı deterjan kullanıldı. Deterjanlar ile ilgili kimyasal içerik bilgileri Tablo 3.1'de gösterildi.

Çalışmamızda dört farklı deterjanın *Vicia faba* L. üzerindeki toksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma ile elde edilecek sonuçlar, kabul görmüş bitki biyotestlerinden olan *V. faba* Kök ucu kromozom aberasyon testi ile sitolojik olarak ve tek hücre jel elektroforezi (SCGE-comet assay) ile DNA düzeyindeki değişimlerin belirlenmesini sağlayacaktır. Böylece çevreye ve dolaylı olarak besin zinciri yolu ile insana verilen zararın ortaya konmasını sağlayacaktır.

Tablo 3. 1. Çalışmada kullanılan deterjanların içeriği

Deterjanlar	Kimyasal İçerik
A1	%15-30 Anyonik aktif madde, Polikarboksilat, Fosfonat, Enzim (Amilaz, Proteaz), Parfüm, Boya, Koruyucu (Methylchloroisothiazolinone, Methylisothiazolinone, 2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol).
A2	<%5 Sabun, <5-15 Anyonik Madde, <%5 Noniyonik Madde, Parfüm, Methylisothiazolinone, Su, Hindistan Cevizi, Palmiye, Buğday ve Patatesten elde edilen hammaddeler.
B1	%5-15 Anyonik aktif madde, Noniyonik aktif madde, <%5 Fosfonat, Sabun, Enzim, Parfüm (Alpha-Isomethyl Ionone, Amyl Cinnamal, Benzyl Salicylate, Butylphenyl Methylpropional, Hexyl Cinnamal, Limonene, Linalool), Koruyucu (Benzisothiazolinone, Methylisothiazolinone).
B2	<%5 Sabun, <5-15 Anyonik Madde, <%5 Noniyonik Madde, Parfüm, Methylchloroisothiazolinone, Su, Hindistan Cevizi, Palmiye, Buğday ve Patatesten elde edilen hammaddeler.

*A1 ve B1 standart, A2 ve B2 çevre ve deniz dostu (biyoçözümlü) deterjanlar sınıfına girmektedir.

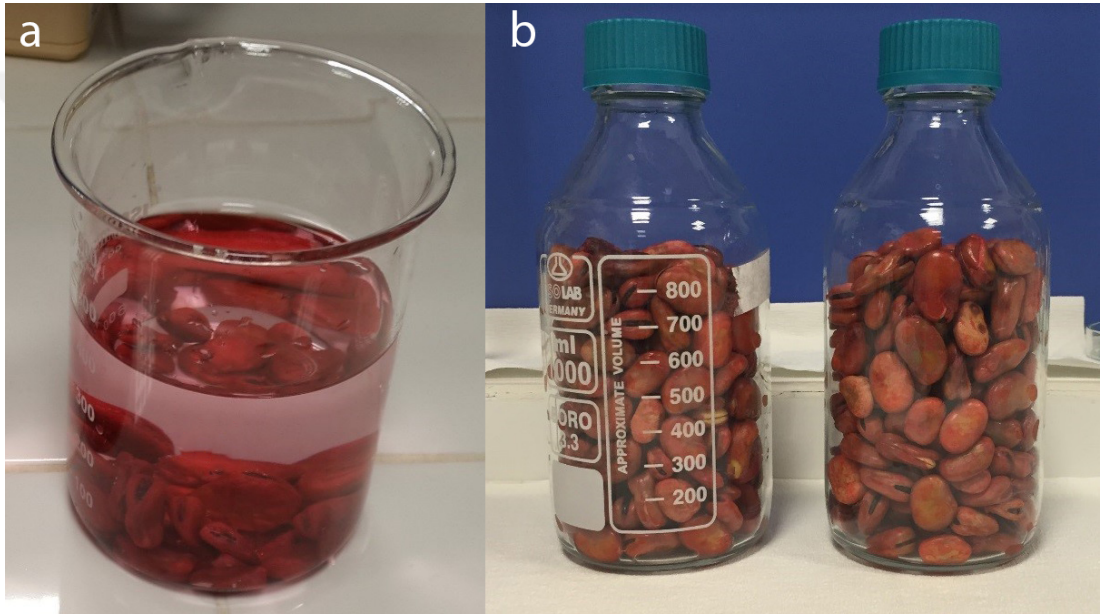
Yapılan bir çalışmada Avrupa Birliği'nin verdiği Eko-etikete (Eco-label) sahip bir deterjanın *A. cepa* kök ucu hücrelerindeki mikronükleus frekansında artışa neden olduğu gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada değerlendirilen deterjanlardan çoğunun insan lökosit hücrelerinde de DNA hasarını indüklediği gösterilmiştir (Pedrazzani ve diğ., 2012).

3.3. Test Materyalinin ve Kimyasalların Hazırlanması

Bu tez kapsamında kullanılan test materyali ve kimyasalların hazırlanışları ile ilgili bilgiler aşağıda verilmektedir.

3.3.1. *Vicia faba* L. tohumlarının hazırlanması

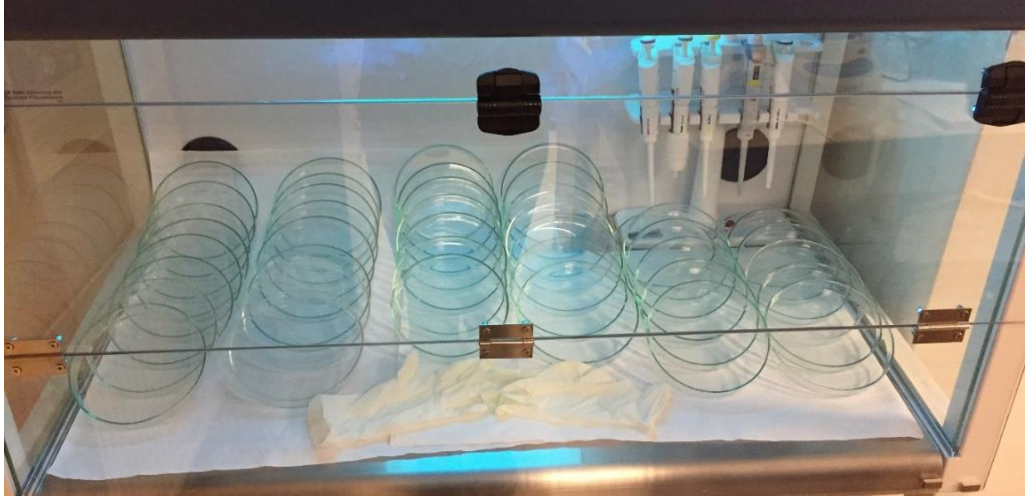
Çalışmada kullanılmak üzere birbirlerine yakın boyutlarda ve morfolojik olarak düzgün tohumlar seçilerek yüzey sterilizasyonları gerçekleştirildi. Sterilizasyon için tohumlar %70'lik alkol içerisinde 1 dakika çalkalandıktan sonra her 200 mL için 2 damla Tween-20 içeren %3'lük ticari çamaşır suyunda (sodyum hipoklorit) 15 dakika bekletildikten sonra 4 kez steril distile su ile yıkandı (Şekil 3.2.a). Sterilizasyonu tamamlanan tohumlar (Şekil 3.2.b) çimlendirme aşamasına geçmeden önce şişmesi için 12 saat steril distile su içinde bekletildi (Hamdy ve Hattori, 2006).



Şekil 3. 2. Yüzey sterilizasyonu a) Yüzey sterilizasyonu için bekletilen *V. faba* tohumları b) Sterilizasyonu tamamlanan şişmiş *V. faba* tohumları

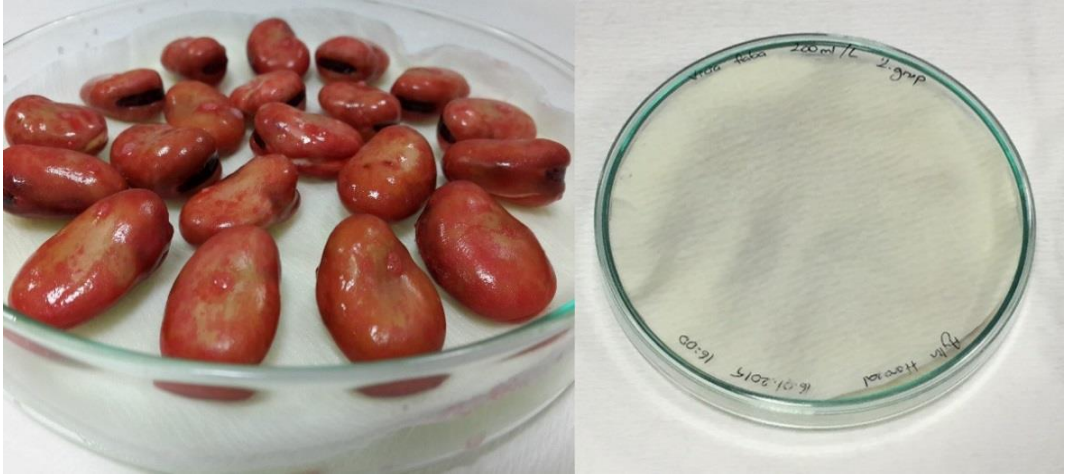
3.3.2. Tohumların çimlendirilmesi

Tohumları çimlendirmek üzere kullanılacak petri kapları önce otoklavda sterilize edildi ardından 15dk boyunca steril kabin içerisinde UV ışınına maruz bırakıldı (Şekil 3.3.). Tohumlar, içine deterjan konsantrasyonları ile muamele edilmiş steril Whatman kağıtları yerleştirilen steril petrilerin içerisine belli aralıklarla yerleştirildi.



Şekil 3. 3. Steril kabin içerisinde UV ışınları altında kurutulması

Her bir petriye 20 adet tohum yerleştirildi ve üzeri tekrar deterjan konsantrasyonları ile muamele edilmiş Whatman kağıtları ile kapatıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3. 4. Deterjanla muamele edilmiş Whatman kağıtları ile kaplı petrilere yerleştirilen tohumlar

Karanlık çimlenme ortamının sağlanması için petrilere 24 °C etüv içerisinde alındı. Bu aşamadaki tüm uygulamalar steril kabin içerisinde gerçekleştirildi (Şekil 3.5.).



Şekil 3. 5. Etüvde çimlenmeye bırakılan tohumlar

3.3.3. Deterjan çözeltilerinin hazırlanması

Her bir deterjan için 1 ml/L, 10 ml/L, 50 ml/L, 100 ml/L, 200 ml/L ve 400 ml/L şeklinde konsantrasyonlar belirlendi (Şekil 3.6.).



Şekil 3. 6. Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan deterjanlar

Gerekli olan deterjan miktarları stoklanacakları şişelerde manyetik karıştırıcı yardımıyla ilk olarak bir miktar steril distile su içerisinde çözüldü ve daha sonra hacimleri yine steril distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

3.3.4. Mitoz testinde kullanılan çözeltilerin ve boyanın hazırlanması

Kaynatılmış 45 mL asetik asitin içine 2 g toz orsein eklenerek manyetik karıştırıcı yardımı ile eritildi ve karışım soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra 55 mL distile su eklenip süzüldü (Özban ve Özmutlu, 1994).

1 N HCl (Hidroklorik asit) hazırlanırken, %37'lik HCl'den 82,5 mL alınıp distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

3.3.5. Comet testinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Comet assay testinde kullanılan kimyasallar fosfat tamponu (PBS), düşük kaynama dereceli agar (LMP), normal kaynama dereceli agar (NMP), sodyum hidroksit (NaOH), sodyum klorür (NaCl), etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), trizma base, tris HCl ve Red safe'dir.

Çekirdek izolasyonu ve nötralizasyon işlemlerinde kullanılan 0,4 M Tris tampon çözeltisi hazırlamak için 9,7 g Tris (Sigma USA T-1503) hassas terazide tartılarak 180 mL distile su içinde çözdürüldü. Konsantre HCl yardımıyla pH 7,5'a ayarlandıktan sonra çözelti distile su ile 200 mL'ye tamamlandı.

NMP (normal erime noktalı) agaroz hazırlamak için 1 g NMP (ROTH Germany 2267, Sigma, A9539) hassas terazide tartılıp, 100 mL su ilave edilerek mikrodalga fırında çözdürüldü (Şekil 3.7.). Yapılan her deney için taze hazırlandı.

LMP (düşük erime noktalı) agarozu hazırlamak için 0,65 g LMP (ROTH Germany, 6351, Sigma, A9414) hassas terazide tartılarak üzerine 100 mL PBS (Biochrom Cat.No. L1825) eklendi. Karışım mikrodalga fırınında çözdürüldü (Şekil 3.7.). Yapılan her deney için taze hazırlandı.



Şekil 3. 7. Mikrodalga fırında çözdürülen NMP ve LMP agarozlar

DNA' nın çözülmesi ve DNA elektroforezinde kullanılan SCGE tampon çözeltisi (1mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH, pH>13) hazırlamak için 0,372 g EDTA hassas terazide tartıldı ve 700 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldü. 12 g NaOH hassas terazide tartılarak çözeltiliye eklendi. Tüm içerik tamamen çözüldükten sonra distile su ile son hacim 1 L' ye tamamlandı. Yapılan her elektroforez için taze hazırlandı.

Floresan mikroskopta çekirdekleri görüntülemek için kullanılan RedSafe 20.000x' ten (1 mL, Cat. No.21141) 1 µL alınarak 999 µL distile su ile karıştırıldı. Antikanserojen özellikteki boya kullanılıncaya kadar 1,5 mL'lik ependorflar içerisinde karanlık ve serin ortamda saklandı.

3.4. Sitolojik İncelemeler

3.4.1. Kök inhibisyon testinin uygulanması ve EC₅₀ değerinin belirlenmesi

Kök inhibisyon testi için etüvde çimlendirilen tohumların toplamda 7 gün olmak üzere her gün kök uzunlukları ölçüldü. Bir haftanın sonunda kök uzunluğu ortalamaları, kontrol grubuna göre kök uzunluğu ve kontrol grubuna göre kök uzunluğundaki azalış yüzde değerleri hesaplandı. EC₅₀ ve 2xEC₅₀ değerleri hesaplandı. Kök inhibisyon testinde kullanılmak üzere başlangıç konsantrasyonları olarak her bir deterjan için belirlenen (1 ml/L, 10 ml/L, 50 ml/L, 100 ml/L, 200 ml/L, 400 ml/L) konsantrasyonlar ile EC₅₀ değerleri her deterjan için tam olarak

hesaplanamadı. Bu nedenle A2 isimli deterjan hariç diğer tüm deterjanlar için uygulamalara ara konsantrasyonlar eklendi (Tablo 3.2.). Yapılan birçok denemeden sonra tüm deterjanlar için EC₅₀ değerleri hesaplandı. EC₅₀ değerini hesaplamak için kurulan deney düzenekleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Tablo 3. 2. EC₅₀ değeri hesaplamasında kullanılan deterjan konsantrasyonları

Deterjan	Konsantrasyon (ml/L)	Deterjan	Konsantrasyon (ml/L)
A1	1	B1	1
	10		10
	20		20
	30		30
	40		40
	50		50
	100		100
	200		200
	400		400
A2	1	B2	1
	10		10
	50		50
	100		60
	200		70
	400		80
			90
			100
			200
			400

EC₅₀ ve 2xEC₅₀ değerleri hesaplandıktan sonra yapılan tüm deneyler bu değerler üzerinden yürütüldü.

3.4.2. Kromozom anormalliği testi

Sterilizasyon işleminden geçirildikten sonra 12 saat steril distile su içinde bekletilip şişirilen *V. faba* tohumlarından kontrol, EC₅₀ ve 2xEC₅₀ muamele grupları için 20'şer adet alınıp steril petrilere yerleştirildi ve çimlenmesi için 24 °C 'ye ayarlanan steril etüve alındı. Kromozom anormalliği testinde kullanılacak kökleri elde etmek için yapılan bu çimlendirme de 3 tekrarlı yapıldı.

3.4.2.1. Fiksasyon, hidroliz, boyama ve preperatların hazırlanması işlemleri

24, 48 ve 72 saatlik sürelerin sonunda yaklaşık 1-2 cm uzunluğuna ulaşan kökler steril bistüri yardımıyla kesildi ve fiksasyon sıvısına aktarıldı. Kesilen kökler Carnoy fiksatif (3 kısım %95'lik etil alkol:1 kısım glasiyal asetik asit) içinde +4 °C'de 24 saat bekletildikten sonra %70'lik alkole aktarıldı ve kullanılacağı zamana kadar +4 °C'de derecede muhafaza edildi (Şekil 3.8.).



Şekil 3. 8. Carnoy fiksatifinde bekletilen *V. faba* kökleri

Hücrelerinin tek tek ayrılıp kolay görüntülenebilmesi için hidroliz işlemi uygulandı. %70'lik etil alkol içerisinde alınan kök uçları içerisinde 1 mL 1 N HCl ve 1 damla aseto orsein damlatılan saat camında, bek alevi yardımı ile hidroliz edildi. Saat camı içerisinde boyanmış ve hidroliz edilmiş olan kökler lam üzerine alınarak 1-2 damla aseto orsein ile tekrar boyandı. Yaklaşık 1 dakika bekledikten sonra boyanmanın daha yoğun olduğu 1-2 mm uzunluğundaki kök ucu kısmı lam üzerinde bırakılıp, geri kalan kısım bistüri ile kesilerek atıldı. Lam üzerinde bırakılan boyanmış kök ucunun üzerine lamel kapatılarak ezme-yayma preperat tekniği uygulandı.

3.4.2.2. Mikroskobik incelemeler

Çalışmamızda bilgisayara görüntü aktarma ve floresan ataçmanına sahip olan Olympus BX51 marka araştırma mikroskobu kullanıldı. Kromozom anormalliklerini belirlemek için 40x ve 100x' lik objektifler ile hücrelerin fotoğrafları çekildi. Mitotik indeks yüzdesinin hesaplamasında her konsantrasyon ve her saat için hazırlanan 10 preperatın her birinde 500 hücre sayılarak toplamda her biri için 5000 hücre sayıldı.

Daha sonra her uygulama konsantrasyonu ve süresinde ve bunların kontrol grupları için bölünen hücre sayısının toplam hücre sayısına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla mitotik indeks yüzdesi belirlendi (Souza ve diğ., 2013).

Mitotik indeks hesaplamalarından sonra her preparattaki anormal hücreler incelendi ve en çok gözlemlenen kromozom hasarları tespit edildi. Gözlenen hasarların 100x objektif altında görüntüleri alındı. Bölünen hücrelerdeki kromozom köprüsü, kromozom yapışması, kutup kayması ve kalgın kromozom oluşumu gibi kromozomal hasarlarının oranları hesaplandı.

3.5. Genotoksik İncelemeler

Genetik hasarın belirlenmesinde kullanılan tek hücre jel elektroforezi yönteminin basamakları kökten nükleus izolasyonu, slaytların hazırlanması, DNA zincirinin çözülmesi, elektroforez, nötralizasyon, boyama ve slaytların incelenmesi olarak sıralanabilir.

3.5.1. Kökten nükleus izolasyonu

Carnoy fiksatif ile sabitlendikten sonra %70'lik alkol içerisinde +4 derecede muhafaza edilen kökler alınıp soğuk distile su içerisinde 2 dakika bekletildi. Her bir konsantrasyon ve saat için belirlenmiş 6 mm'lik ayrı ayrı petriyer buz kaseti üzerinde soğumaları için bekletildi. İçine 400 µL soğuk Tris tampon çözeltisi ve 5-6 adet kök ucu koyuldu. Petriyer buz kasetlerinin üzerinden alınmadan kökler tampon çözeltisinin rengi bulanıklaşana kadar bistüri yardımı ile nazikçe kesildi. Elde edilen süspansiyon ependorf tüpüne aktarıldı ve buz tüplük içerisinde 15 dakika bekletilerek çekirdeklerin çökmesi sağlandı (Şekil 3.9).

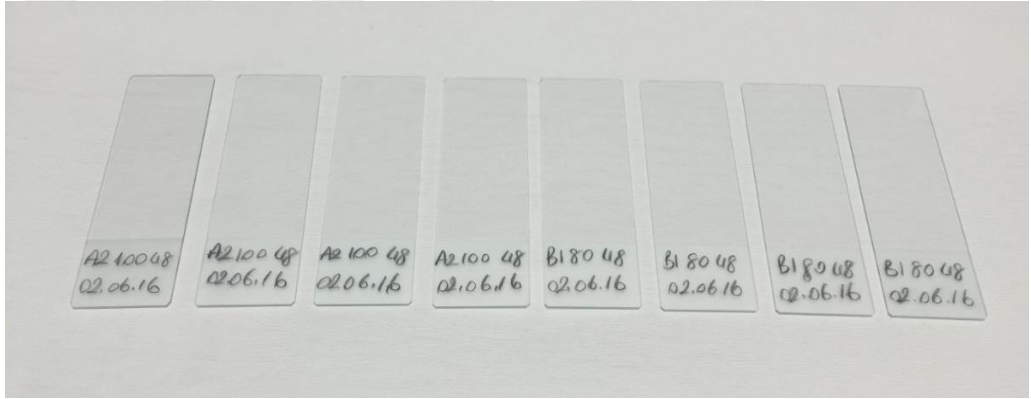
Hücreleri mikroskop altında incelerken net ve temiz görüntü elde edebilmek için bu aşamada kök uçlarını ezmeden nazikçe kesmek ve soğuk tampon ile kök uçlarının temasını kesmemek önemli bir ayrıntıdır.



Şekil 3. 9. Buz tüplük içerisinde çökmesi beklenen hücreler

3.5.2. Slaytların hazırlanması

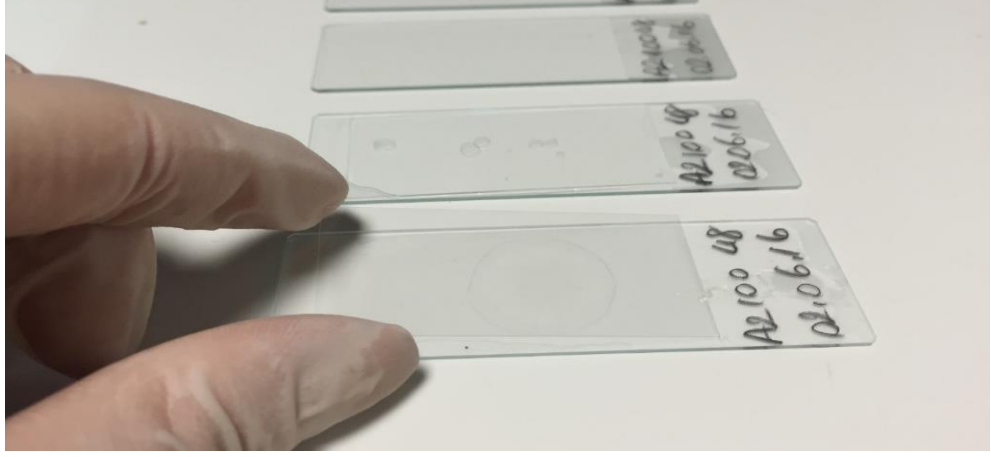
Bir ucu buzlu lamlar kullanım öncesi kurşun kalemle tarih, konsantrasyon ve saat bilgileri ile etiketlendi (Şekil 3.10.).



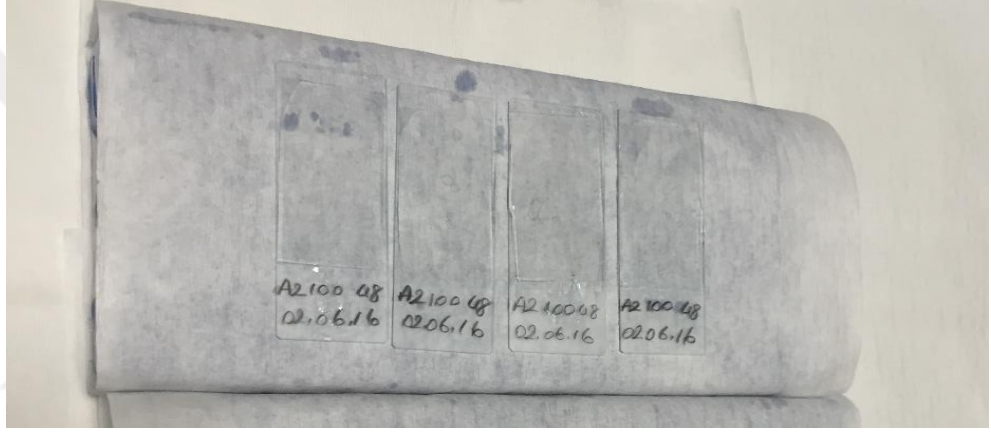
Şekil 3. 10. Kurşun kalemle etiketlenen bir ucu buzlu lamlar

Lamlar %1'lik NMP agaroz ile kaplandı. Ependorfun dip kısmına yakın olacak şekilde 100 μ L nükleus çözeltisi alındı ve 100 μ L LMP agaroz ile ependorf içerisinde pipetleme yaparak karıştırıldı ve nükleusların LMP agarozla tutunması sağlandı. Nükleus + LMP agaroz karışımı NMP kaplı lamlar üzerine döküldü ve hemen lamelle kapatıldı (Şekil 3.11.).

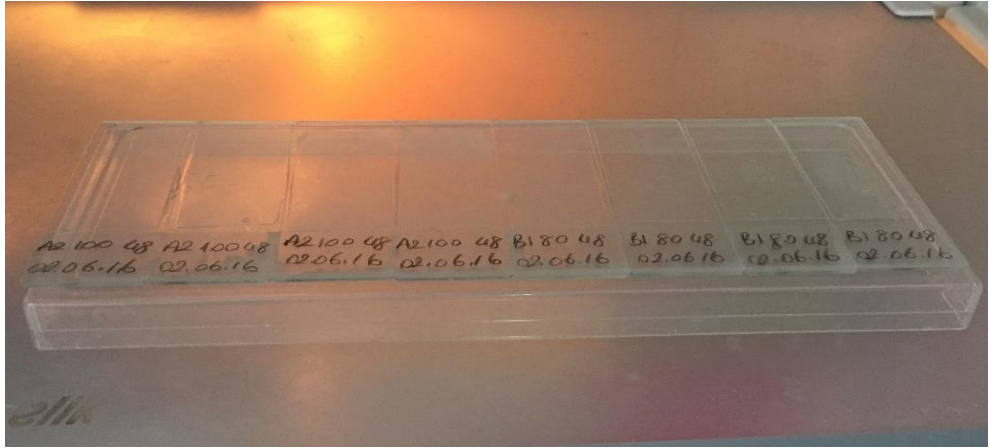
Hazırlanan preparat agarozların sabitlenmesi için 5 dakika buz kaseti üzerinde (Şekil 3.12.) ve 5 dakika da +4 derecede buzdolabında bekletildi (Şekil 3.13.).



Şekil 3. 11. Nükleus + LMP agaroz karışımı içeren NMP kaplı lamlar



Şekil 3. 12. Buz kaseti üzerinde bekletilen agaroz yüklü lamlar



Şekil 3. 13. +4 derecede bekletilen agaroz yüklü lamlar

3.5.3. DNA zincirinin çözülmesi

Buzdolabından çıkarılan preparatların üzerindeki lamlar nazikçe kaldırıldı. Lamlar, bağlı olduğu soğuk su banyosu ile önceden +4 dereceye getirilmiş yatay elektroforez tankına aynı yönde ve birbirlerine bitişik olacak şekilde yerleştirildi.



Şekil 3. 14. Soğuk SCGE tamponu ile muamele edilmiş lamlar

Üzerine tankın kenarlarından başlayarak yavaşça soğuk SCGE tamponu döküldü (Şekil 3.14.) ve tankın kapağı kapatıldı. Slaytlar DNA zincirinin çözülmesi için bu şekilde 20 dakika tankın içerisinde bekletildi.

3.5.4. Elektroforez

Elektroforez tankı güç kaynağına bağlandı. DNA' daki kırılma vb. hasarlara bağlı olarak farklı moleküler ağırlıktaki DNA parçalarının farklı hızda yürümesi sonucunda oluşacak kuyruklu yıldızları gözlemleyebilmek için 25 dakika boyunca 27V, 300mA elektroforez yapıldı.

3.5.5. Nötralizasyon

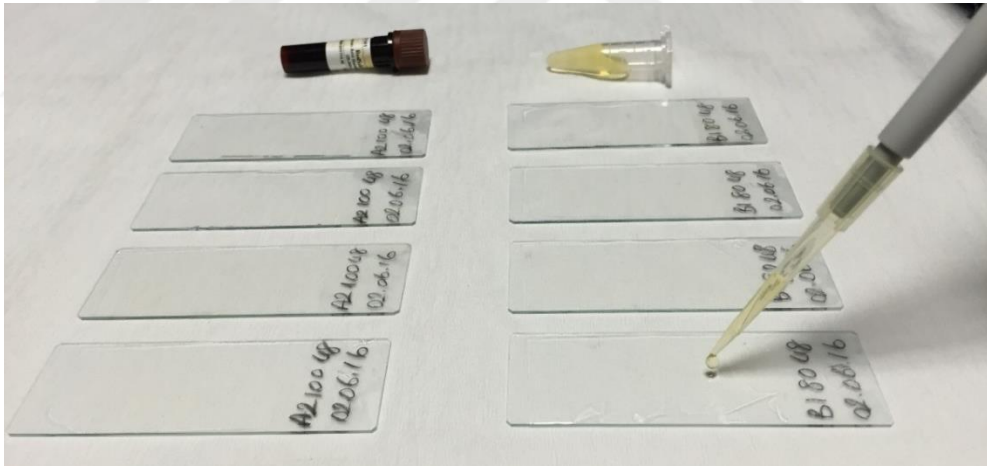
Elektroforez süresi dolduktan sonra tanktan çıkarılan lamlar şaleler içerisine yerleştirildi ve soğuk Tris-HCl içerisinde 3 kez 5' er dakika bekletildi (Şekil 3.15.).



Şekil 3. 15. Soğuk Tris-HCl tamponuyla dolu şaleler

3.5.6. Boyama

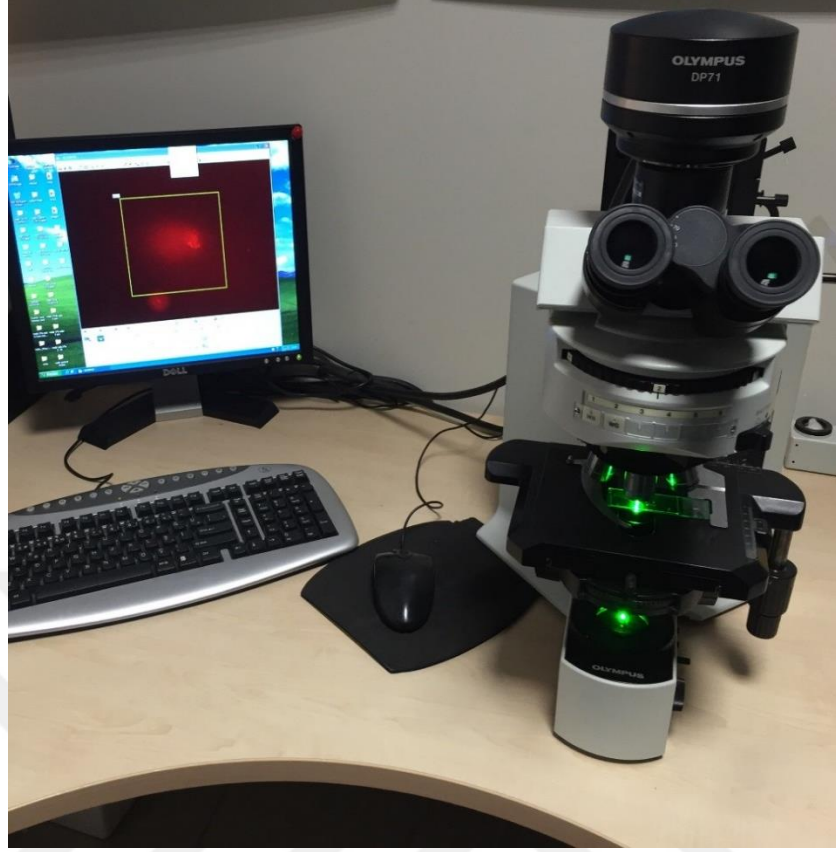
Nötralizasyon işleminin tamamlanmasının ardından lamalar dik bir şekilde kurutma kağıdının üzerine dizildi ve fazla tamponun lamaların üzerinden uzaklaşması sağlandı. Lamalar kurumadan her biri 100 μ L Red Safe ile boyandı (Şekil 3.16.) ve 5 dakika bekletildi. Süre dolunca hemen lamelle kapatıldı.



Şekil 3. 16. Red Safe ile boyanan lameller

3.5.7. Slaytların incelenmesi

Comet assay analizleri için hazırlanan preparatlar floresan mikroskop ile incelendi. Her konsantrasyon ve saat için 25 çekirdek 2 tekrarlı olacak şekilde sayıldı (Türkoğlu, 2012). Kameram comet assay analiz programı kullanılarak kuyruk DNA yüzdesi (% kuyruk DNA) ve Olive kuyruk momenti (OTM) değerleri ölçüldü (Şekil 3.17).



Şekil 3. 17. Hücrelerin floresan mikroskop ve bilgisayar programı yardımı ile incelenmesi

3.5.8. Verilerin istatistiksel analizi

Çalışmalar sonucunda elde edilen verilere IBM SPSS Statistics 21 programı kullanılarak ANOVA tek yönlü varyans analizi uygulandı.

3.5.8.1. ANOVA tek yönlü varyans analizi

ANOVA (Analysis of Variance) testi grup ortalamaları, grup içi ve gruplar arası varyasyonlara bağlı olan işlemleri analiz etmek için kullanılmıştır (Ferguson ve Takane, 2005).

3.6. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Radwag PS 510/C/1 model hassas terazi ile tartıldı. Heidolph, MR-Hei standart model manyetik karıştırıcı (ısıtma tablalı), comet testinde agarozların donmasını önlemek için ısıtmalı tabla olarak, tamponların hazırlanmasında ise manyetik karıştırıcı olarak kullanıldı. Comet testi için LMP ve

NMP agarozlar Arçelik MD554 model mikrodalga fırınında eritildi. OHAUS STARTER 3000 pH metre ile comet testinde kullanılan nötralizasyon ve elektroforez tamponlarının pH ayarlamaları yapıldı. Cleaver CS-300V güç kaynağı ve CSL-COM 20 (1000 mL) elektroforez tankı, comet testinde çekirdek hasarını belirlemede kullanıldı. Mikroskopik incelemelerde floresan ataçmanlı Olympus marka ışık mikroskobu hücre görüntüsü almak için kullanıldı.



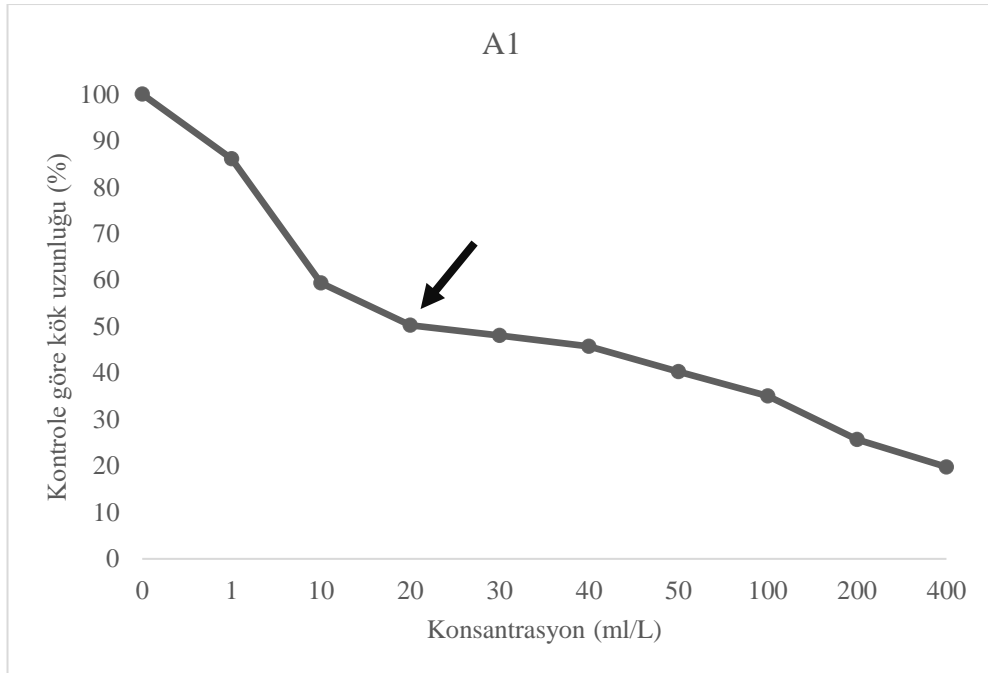
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Fizyolojik Bulgular

4.1.1. Deterjanların kök büyümesi üzerine etkileri

4 farklı deterjanın çeşitli konsantrasyonlarıyla 7 gün boyunca muamele edilen *V. faba* tohumları ile her gün yapılan kök ucu ölçümleri sonucunda kontrole göre kök uzunluğu (%), kontrole göre kök uzunluğundaki azalış (%) ve kontrole göre kök uzunluğunu yarıya düşüren değerler (EC_{50}) belirlendi.

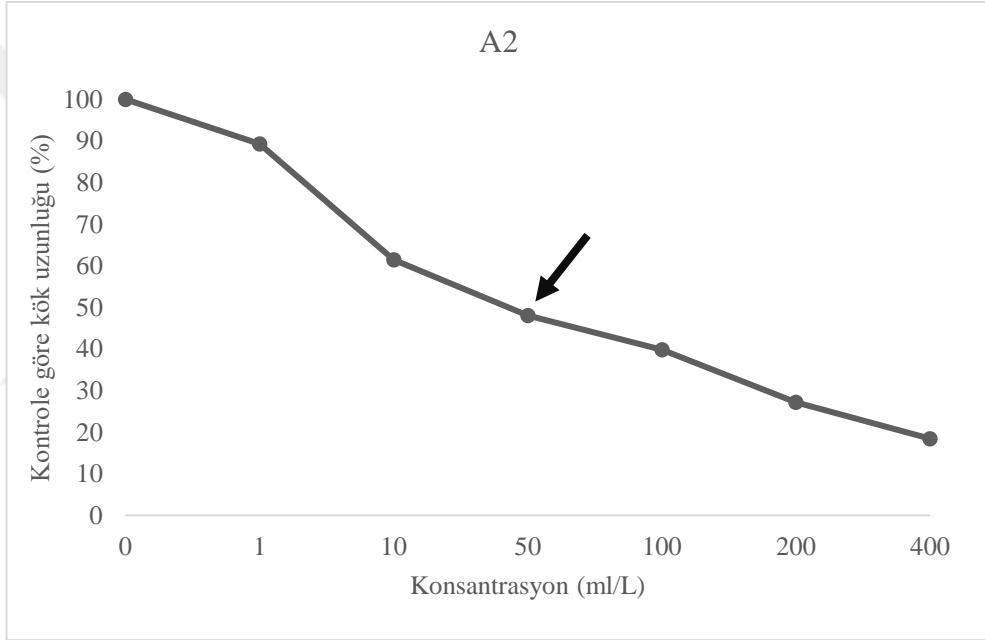
A1 deterjanı için 1 ml/L, 10 ml/L, 20 ml/L, 30 ml/L, 40 ml/L, 50 ml/L, 100 ml/L, 200 ml/L ve 400 ml/L konsantrasyonları ile çalışıldı. Yapılan hesaplamalar sonucunda 20 ml/L, A1 deterjanı için kök uzunluğunu kontrole göre yarıya düşüren değer oldu ve Şekil 4.1.'de grafik ile gösterildi. Sonraki genetik hasar çalışmalarında kullanılmak üzere A1 için EC_{50} değeri 20 ml/L ve $2xEC_{50}$ değeri 40 ml/L olarak belirlendi.



Şekil 4. 1. A1 deterjanı için kontrole göre kök uzunluğu yüzdesini yarıya düşüren değer (EC_{50})

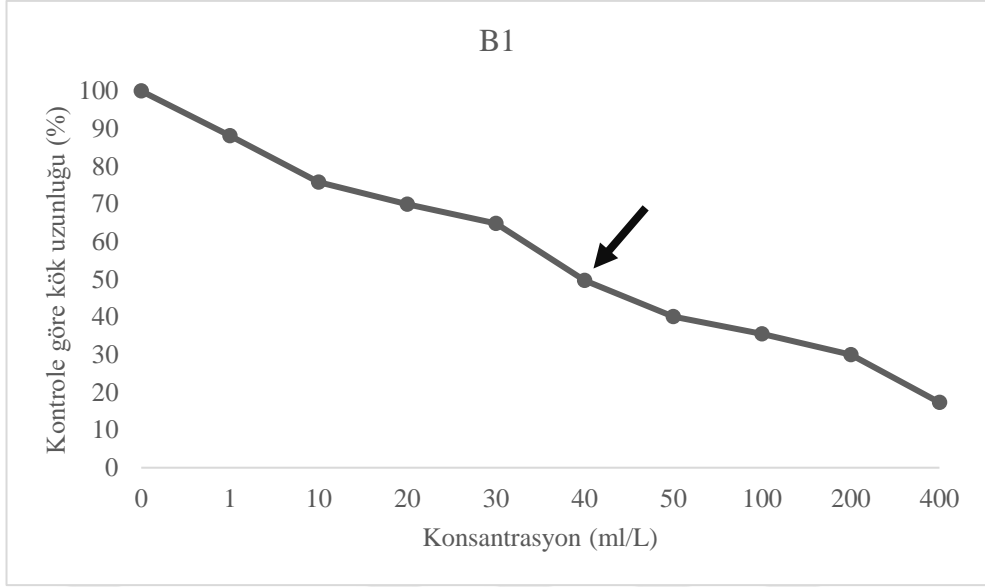
Çalışmamıza benzer birçok araştırmada, genotoksik çalışmalarda kullanılmak üzere çevresel kirleticilerin test konsantrasyonlarının belirlenmesi için EC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Yüzbaşıoğlu, 2001; Ateeq ve diğ., 2002; Saxena ve diğ., 2005; Yıldız ve diğ., 2006).

A2 deterjanı için 1 ml/L, 10 ml/L, 50 ml/L, 100 ml/L, 200 ml/L, 400 ml/L konsantrasyonları ile çalışıldı. Yapılan hesaplamalar sonucunda 50 ml/L, A2 için kök uzunluğunu kontrole göre yarıya düşüren değer oldu ve Şekil 4.2'de grafik ile gösterildi. Sonraki genetik hasar çalışmalarında kullanılmak üzere A2 için EC_{50} 50 ml/L ve $2xEC_{50}$ 100 ml/L olarak belirlendi.



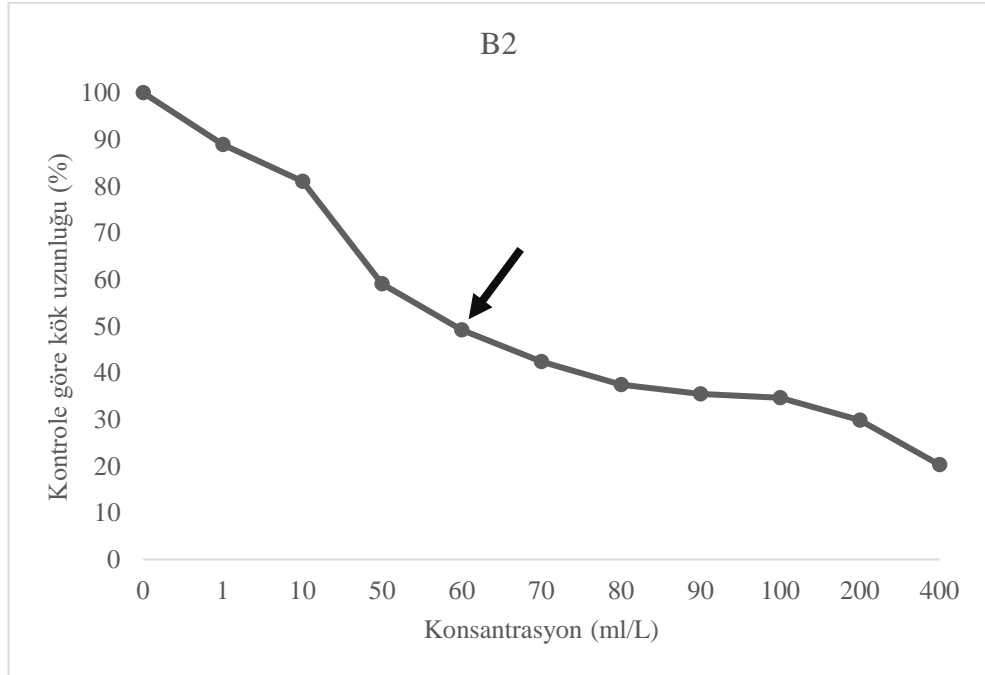
Şekil 4. 2. A2 deterjanı için kontrole göre kök uzunluğu yüzdesini yarıya düşüren değer (EC_{50})

B1 deterjanı için 1 ml/L, 10 ml/L, 20 ml/L, 30 ml/L, 40 ml/L, 50 ml/L, 100 ml/L, 200 ml/L ve 400 ml/L konsantrasyonları ile çalışıldı. Yapılan hesaplamalar sonucunda 40 ml/L, B1 için kök uzunluğunu kontrole göre yarıya düşüren değer oldu ve Şekil 4.3'te grafik ile gösterildi. Sonraki genetik hasar çalışmalarında kullanılmak üzere B1 için EC_{50} 40 ml/L ve $2xEC_{50}$ 80 ml/L olarak belirlendi.



Şekil 4. 3. B1 deterjanı için kontrolle göre kök uzunluğu yüzdesini yarıya düşüren değer (EC₅₀)

B2 deterjanı için 1ml/L, 10 ml/L, 50 ml/L, 60 ml/L, 70 ml/L, 80 ml/L, 90 ml/L, 100 ml/L, 200 ml/L ve 400 ml/L konsantrasyonları ile çalışıldı. 60 ml/L, B2 için kök uzunluğunu kontrolle göre yarıya düşüren değer oldu ve Şekil 4.4'te grafik ile gösterildi. B2 için 2xEC₅₀ değeri ise 120 ml/L olarak belirlendi.



Şekil 4. 4. B2 deterjanı için kontrolle göre kök uzunluğu yüzdesini yarıya düşüren değer (EC₅₀)

Tablo 4. 1. Deterjanların *Vicia faba* kök büyümesine etkisi

Kullanılan deterjan	Konsantrasyon (ml/L)	Kök uzunluğu ortalamaları (cm) X±SH*	Kontrolle göre kök uzunluğu (%)	Kontrolle göre kök uzunluğundaki azalış (%)
A1	0	6,82±0,15	100	-
	1	5,87±0,19	86,07	13,93
	10	4,05±0,12	59,38	40,62
	20	3,43±0,08	50,29	49,71
	30	3,28±0,09	48,09	51,91
	40	3,12±0,08	45,74	54,26
	50	2,75±0,04	40,32	59,68
	100	2,39±0,08	35,04	64,96
	200	1,75±0,04	25,65	74,35
	400	1,35±0,05	19,79	80,21
A2	0	7,54±0,13	100	-
	1	6,73±0,09	89,25	10,75
	10	4,63±0,09	61,40	38,6
	50	3,62±0,08	48,01	51,99
	100	3,00±0,08	39,78	60,22
	200	2,05±0,08	27,18	72,82
	400	1,39±0,07	18,43	81,57
B1	0	5,83±0,11	100	-
	1	5,14±0,13	88,16	11,84
	10	4,42±0,10	75,81	24,19
	20	4,08±0,12	69,92	30,08
	30	3,78±0,12	64,83	35,17
	40	2,90±0,07	49,74	50,26
	50	2,34±0,10	40,13	59,87
	100	2,07±0,08	35,50	64,50
	200	1,75±0,10	30,01	69,99
	400	1,01±0,07	17,32	82,68
B2	0	6,06±0,09	100	-
	1	5,39±0,06	88,94	11,06
	10	4,91±0,12	81,02	18,98
	50	3,58±0,13	59,07	40,93
	60	2,98±0,10	49,17	50,83
	70	2,57±0,08	42,40	57,60
	80	2,27±0,08	37,45	62,55
	90	2,15±0,09	35,47	64,53
	100	2,10±0,08	34,65	65,35
	200	1,81±0,06	29,86	70,14
	400	1,23±0,05	20,29	79,71

*X±SH A. cepa kök uzunluğu ortalaması ± Standart hata

Kök uzunlukları yüzdesinin, artan deterjan konsantrasyonlarında kontrole göre giderek düştüğü gözlemlendi. Çevre ve deniz dostu (biyoçözünür) sınıfına giren deterjanların EC₅₀ değerlerinin standart deterjanlardan daha yüksek ve kök uzunluğu üzerindeki olumsuz etkisinin daha düşük olduğu gözlemlendi (Tablo 4.1.).

4.2. Sitolojik Bulgular

4.2.1. Deterjanların mitotik indeks üzerine etkileri

Belirlenmiş olan konsantrasyonların [(A1 (20 ml/L, 40 ml/L), A2 (50 ml/L, 100 ml/L), B1 (40 ml/L, 80 ml/L) ve B2 (60 ml/L, 1200 ml/L)] 24, 48 ve 72. saatlerde kontrol grubu (dH₂O) ile karşılaştırılmalı olarak *V. faba* kök ucu meristem hücrelerindeki mitotik indeks üzerine etkileri incelendi ve sonuçlar Tablo 4.2'de gösterildi.

Daha önce yapılan birçok genotoksisite çalışmasında, test edilen çevresel kirleticilerin negatif etkilerini belirlemek için farklı konsantrasyonların yanı sıra farklı süreler (4, 6, 8, 12, 24, 48 ve/veya 72 saat) de değerlendirilmiştir (Chandra ve diğ., 2005).

A1 deterjanı için kontrol gruplarında 24 saatte %17,06, 48 saatte %18,53 ve 72 saatte %19,29 olan mitotik indeks değerinin, 20 ml/L muamele konsantrasyonu incelendiğinde 24 saatte %13,98' e, 48 saatte ise %11,23' e ve 72 saatte %9,93' e düştüğü görüldü. 40 ml/L muamele konsantrasyonu incelendiğinde ise 24 saatte %9,62' ye, 48 saatte ise %8,31' e ve 72 saatte %7,18' e düştüğü görüldü.

A2 deterjanı için kontrol gruplarında 24 saatte %17,20, 48 saatte %17,72 ve 72 saatte %18,35 olan mitotik indeks değerinin, 50 ml/L muamele konsantrasyonu incelendiğinde 24 saatte %15,09' a, 48 saatte ise %13,43' e ve 72 saatte %14,36' ya düştüğü görüldü. 100 ml/L muamele konsantrasyonu incelendiğinde ise 24 saatte %12,23' e, 48 saatte ise %11,04' e ve 72 saatte %11,01' e düştüğü görüldü.

B1 deterjanı için kontrol gruplarında 24 saatte %16,30, 48 saatte %16,15 ve 72 saatte %17,23 olan mitotik indeks değerinin, 40 ml/L muamele konsantrasyonu incelendiğinde 24 saatte %12' ye, 48 saatte ise %11,50' ye ve 72 saatte %11,15' e düştüğü görüldü. 80 ml/L muamele konsantrasyonu incelendiğinde ise 24 saatte %11,24' e, 48 saatte ise %9,54' e ve 72 saatte %8,30' a düştüğü görüldü.

Tablo 4. 2. Deterjanların 24, 48 ve 72 saatlik mitotik indeks değerleri

Deterjan	Süre (Saat)	Konsantasyon (ml/L)	Sayılan hücre sayısı	Bölünen hücre sayısı	Mitotik indeks (%)
A1	24	0	5390	920	17,06
		20	5470	765	13,98
		40	5300	510	9,62
	48	0	5125	950	18,53
		20	5030	565	11,23
		40	5050	420	8,31
	72	0	5285	204	19,29
		20	5085	505	9,93
		40	5500	395	7,18
A2	24	0	5230	900	17,20
		50	5365	810	15,09
		100	5025	615	12,23
	48	0	5275	935	17,72
		50	5320	715	13,43
		100	5250	580	11,04
	72	0	5285	970	18,35
		50	5220	750	14,36
		100	5175	570	11,01
B1	24	0	5335	870	16,30
		40	5500	660	12,00
		80	5290	595	11,24
	48	0	5170	835	16,15
		40	5300	610	11,50
		80	5185	495	9,54
	72	0	5020	865	17,23
		40	5560	620	11,15
		80	5300	440	8,30
B2	24	0	5170	930	17,98
		60	5140	825	16,05
		120	5350	790	14,76
	48	0	5115	975	19,06
		60	5200	805	15,48
		120	5545	675	12,17
	72	0	5040	965	19,14
		60	5375	705	13,11
		120	5550	585	10,54

B2 deterjanı için kontrol gruplarında 24 saatte %17,98, 48 saatte %19,06 ve 72 saatte %19,14 olan mitotik indeks değerinin, 60 ml/L muamele konsantrasyonu incelendiğinde 24 saatte %16,05' e, 48 saatte ise %15,48' e ve 72 saatte %13,11' e düştüğü görüldü. 120 ml/L muamele konsantrasyonu incelendiğinde ise 24 saatte %14,76' ya, 48 saatte ise %12,17' ye ve 72 saatte %10,54' e düştüğü görüldü.

Genel olarak 72 saatin sonunda mitotik indeks değerinin başlangıca göre kontrol gruplarında artış gösterirken muamele gruplarında azalış gösterdiği tespit edildi. Mitotik indeksin tüm deterjanlar için artan süre ve konsantrasyona bağlı olarak düşüş gösterdiği görüldü. Deniz ve çevre dostu deterjanların mitotik indeks değerlerinin standart deterjanlara göre daha yüksek seyrettiği gözlemlendi.

Çalışmamıza benzer olarak Anilofos pestisitinin 25, 50 ve 100 ppm konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlerdeki mitotik indekste meydana getirdiği değişimlerin incelendiği bir çalışmada en çok düşüşün 100 ppm konsantrasyonunda 72 saatte % 18,78 olarak görüldüğü belirtilmiştir. Konsantrasyonlar ve süreler arttıkça mitotik indekste azalma olduğu görülmüştür (Özkara ve diğ., 2015).

4.3. Sitotoksikolojik Bulgular

4.3.1. Deterjanların kromozom anormalliklerine etkileri

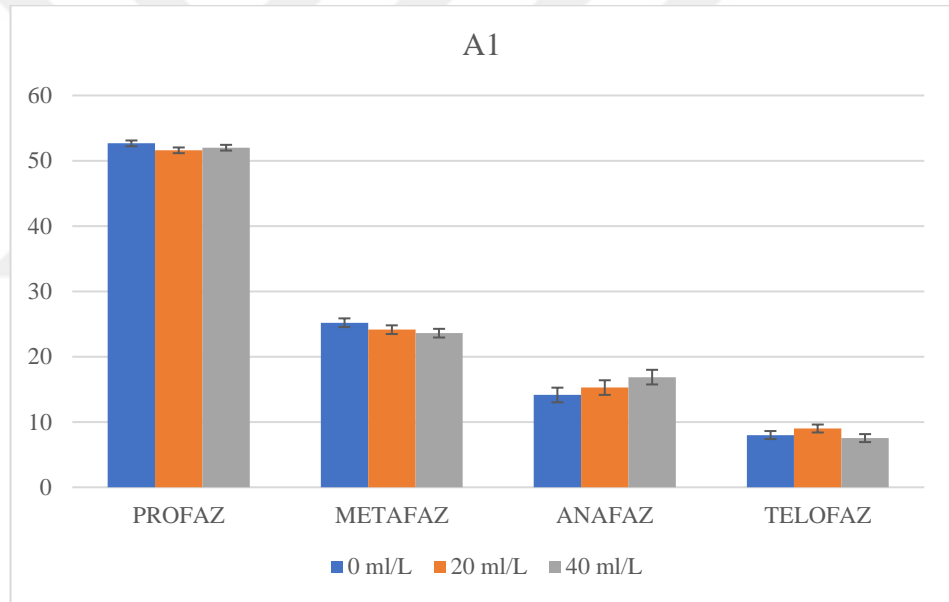
Dört farklı deterjanın farklı konsantrasyonlarıyla 72 saat boyunca muamele edilen *Vicia faba* kök hücrelerindeki mitoz bölünmenin farklı evrelerindeki (profaz, metafaz, anafaz, telofaz) toplam bölünen hücre sayısı yüzdeleri incelendi.

Ayrıca *V. faba* kök meristem hücrelerinde deterjanların neden olduğu bazı anormallikler tespit edildi. Anormalliklerin tespitinde her konsantrasyon için kontrol, 24h, 48h ve 72h'lik sürelerin sonunda alınan kök ucu örneklerinden yayma preparat yöntemi ile 500 hücre sayılıp, bölünme evrelerinde meydana gelen mitotik anormallikler incelendi.

A1 deterjanı için kontrol grubunda en fazla yüzdeye Profaz evresinin ardından sırasıyla Metafaz, Anafaz ve Telofaz evrelerinin sahip olduğu gözlemlendi. 20 ml/L ve 40 ml/L konsantrasyonunda da kontrole göre anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi.

Tüm mitoz evrelerinin kendi içindeki yüzdelerinin değişen konsantrasyonlarda farklılık gösterdiği gözlemlendi. Kontrol grubunda %52,6'larda seyreden Profaz safhasının, 20 ml/L konsantrasyonunda %51,6'ya düştüğü ve 40 ml/L konsantrasyonunda ise %52 oranında seyrettiği gözlemlendi (Şekil 4.5.).

Metafaz safhasının kontrol grubunda %25,2 olan değerinin 20 ml/L konsantrasyonunda %24,1'e düştüğü, 40 ml/L konsantrasyonunda %23,6'da kaldığı gözlemlendi. Anafaz safhasının kontrol grubunda %14,1 olan değerinin 20 ml/L konsantrasyonunda %15,2'ye çıktığı, 40 ml/L konsantrasyonunda ise %16,8'e yükseldiği gözlemlendi. Telofaz safhasının kontrol grubunda %8 olan değerinin 20 ml/L konsantrasyonunda %9'a çıktığı, 40 ml/L konsantrasyonunda ise %7'ye düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.5.).



Şekil 4. 5. A1 deterjanının farklı konsantrasyonlarının mitoz bölünmenin farklı evrelerine etkisi

Deterjanların aynı zamanda kontrol gruplarına göre EC_{50} ve $2xEC_{50}$ konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saat süresince kromozom anormallik yüzdesindeki (% KA) değişimleri inceledi.

A1 deterjanı için % KA değerinin kontrol gruplarında 24 saatte %0,4, 48 saatte %1,6 ve 72 saatte %2,8 olduğu görüldü. 20 ml/L konsantrasyonunda 24 saatte %8 olan KA değerinin 48 saatte %11'e çıktığı ve 72 saatte %14'e ulaştığı gözlemlendi. 40 ml/L konsantrasyonunda ise değerlerin 24 saatte %23,2 iken 48 saatte %26,2'ye yükseldiği ve 72 saat sonunda %30,4'e ulaştığı gözlemlendi (Tablo 4.3.).

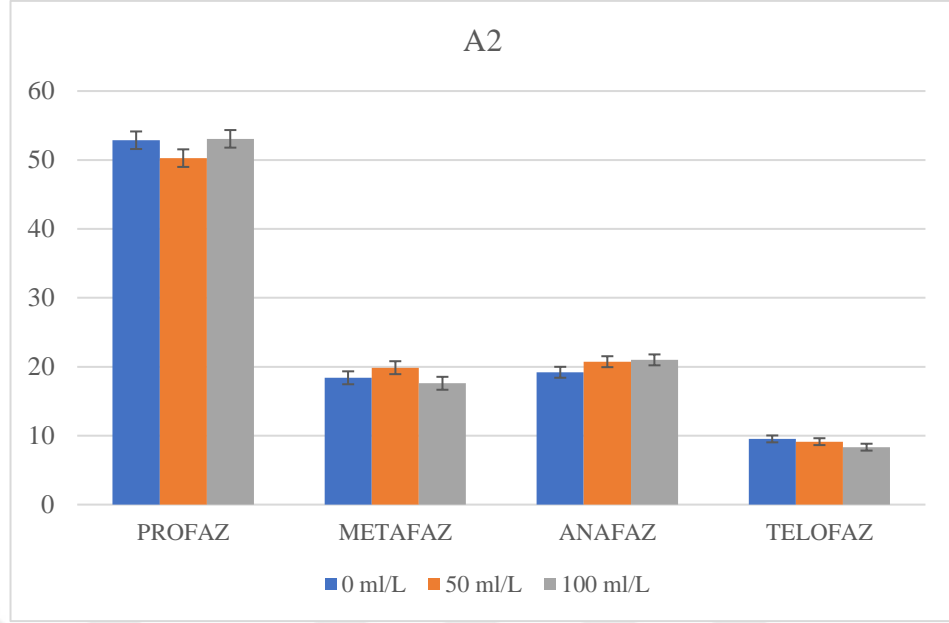
Tablo 4. 3. A1 deterjanının zamana bağlı kromozom anormalliği yüzdesi

Konsantrasyon (mg/L)	Süre (saat)	(%) KA±SH*
0	24	0,4±0,27
	48	1,6±0,48
	72	2,8±0,66
20	24	8±0,05
	48	11±0,07
	72	14±0,07
40	24	23,2±0,06
	48	26,2±0,07
	72	30,4±0,07

*Üç farklı süredeki kromozom anormallikleri yüzdesi ve standart hata

A2 deterjanı için kontrol grubunda en fazla yüzdeye A1 deterjanında da olduğu gibi Profaz evresinin sahip olduğu gözlemlendi. Ancak sıralamada Profaz evresinden sonra Anafaz, Metafaz ve Telofaz evrelerinin geldiği görüldü. 50 ml/L ve 100 ml/L konsantrasyonunda da yüzdelerdeki pay dağılımında kontrole göre anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi (Şekil 4.6.).

Tüm mitoz evre yüzdeleri değişen konsantrasyonlarda farklılık gösterdi. Kontrol grubunda %52,8 oranında yer alan Profaz evresinin, 50ml/L konsantrasyonunda %50,2 değerine düşerken 100 ml/L konsantrasyonunda yeniden yükselerek %53 değerine ulaştığı görüldü. Metafaz evresinin kontrol grubundaki değerinin %18,4 olduğu görülürken, 50ml/L konsantrasyonundaki değerinin %19,8 olduğu ve bu değer 100ml/L konsantrasyonunda ise %17,6'ya gerilediği görüldü. Kontrol grubunda %19,2 değerinde seyreden Anafaz evresinin, 50ml/L konsantrasyonunda %20,7'ye ulaştığı, 100ml/L konsantrasyonunda ise %21 olduğu görüldü. Telofaz evresinin ise kontrol grubunda %9,5 iken, 50ml/L konsantrasyonunda %9,1 değerine ve 100ml/L konsantrasyonunda ise %8,3 değerine gerilediği görüldü (Şekil 4.6.).



Şekil 4. 6. A2 deterjanının farklı konsantrasyonlarının mitoz bölünmenin farklı evrelerine etkisi

Tablo 4. 4. A2 deterjanının zamana bağlı kromozom anormalliği yüzdesi

Konsantrasyon (mg/L)	Süre (saat)	(%) KA±SH*
0	24	0,3±0,05
	48	1,9±0,06
	72	3,3±0,06
50	24	7,7±0,07
	48	9,2±0,05
	72	8,9±0,54
100	24	11,8±0,06
	48	13,7±0,49
	72	14,1±0,07

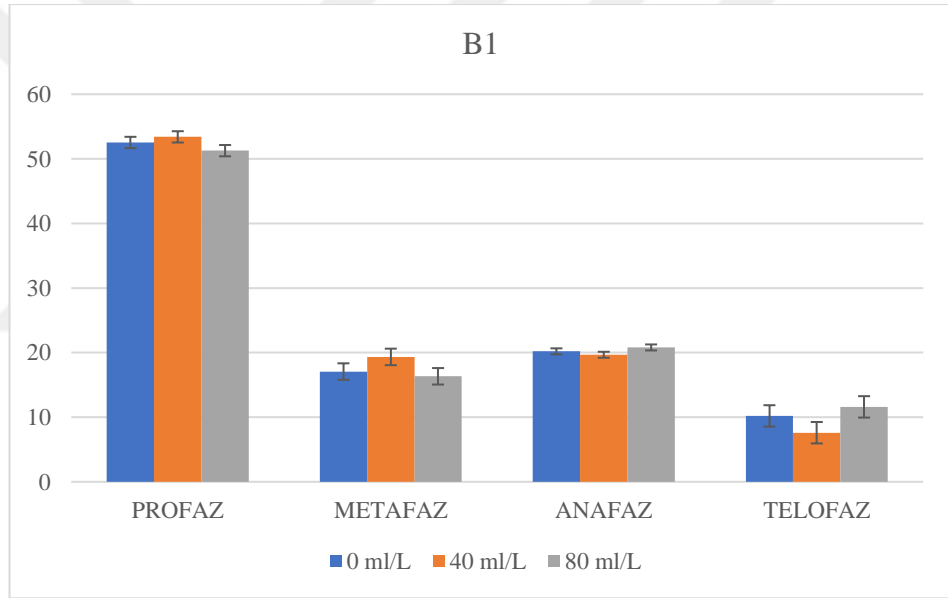
*Üç farklı süredeki kromozom anormallikleri yüzdesi ve standart hata

A2 deterjanı için % KA değerinin kontrol gruplarında 24 saatte %0,3 iken, 48 saatte %1,9 ve 72 saatte %3,3 olduğu görüldü. 50 ml/L konsantrasyonunda 24 saatte %7,7 olan KA değerinin 48 saatte %9,2'ye çıktığı ve 72 saatte %8,9'a gerilediği gözlemlendi. 100 ml/L konsantrasyonunda ise değerlerin 24 saatte %11,8 iken 48 saatte %13,7'ye yükseldiği ve 72 saat sonunda %14,1'e ulaştığı gözlemlendi (Tablo 4.4.).

B1 deterjanı için kontrol grubunda en fazla yüzdeye yine Profaz evresinin sahip olduğu gözlemlendi. Profaz evresinden sonra sırasıyla A2 deterjanında olduğu gibi

Anafaz, Metafaz ve Telofaz evrelerinin geldiği görüldü. 40 ml/L ve 80 ml/L konsantrasyonunda da yüzdelik dilimdeki pay dağılımında kontrole göre anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi (Şekil 4.7.).

Diğer deterjanlarda olduğu gibi B1 deterjanında da tüm mitoz evre yüzdeleri değişen konsantrasyonlarda farklılık gösterdi. Kontrol grubunda %52,5 oranında paya sahip olan Profaz evresinin, 40 ml/L konsantrasyonunda %53,4 değerine yükselirken, 80 ml/L konsantrasyonunda yeniden azalarak %51,2 değerine gerilediği görüldü. Metafaz evresinin kontrol grubundaki değerinin %17 olduğu görülürken, 40 ml/L konsantrasyonundaki değerinin %19,3 olduğu ve bu değer 80 ml/L konsantrasyonunda ise %16,3'e gerilediği görüldü.



Şekil 4. 7. B1 deterjanının farklı konsantrasyonlarının mitoz bölünmenin farklı evrelerine etkisi

Kontrol grubunda %20,2 değerinde seyreden Anafaz evresinin, 40 ml/L konsantrasyonunda %19,6 olduğu, 80 ml/L konsantrasyonunda ise %20,8'e ulaştığı görüldü.

Telofaz evresinin ise kontrol grubunda %10,2 iken, 40 ml/L konsantrasyonunda %7,6 değerine düştüğü ve 80 ml/L konsantrasyonunda ise %11,6 değerine yükseldiği görüldü (Şekil 4.7.).

B1 deterjanı için % KA değerinin kontrol gruplarında 24 saatte 0,2 iken, 48 saatte %1,9 ve 72 saatte %2,5 olduğu görüldü. 40 ml/L konsantrasyonunda 24 saatte %9,6 olan KA değerinin 48 saatte %12,2'ye çıktığı ve 72 saatte ise daha da yükselerek %15,6'ya ulaştığı gözlemlendi. 80 ml/L konsantrasyonunda ise değerlerin 24 saatte %21,1 iken 48 saatte %32,7'ye yükseldiği ve 72 saat sonunda ise %28,3'e gerilediği gözlemlendi (Tablo 4.5.).

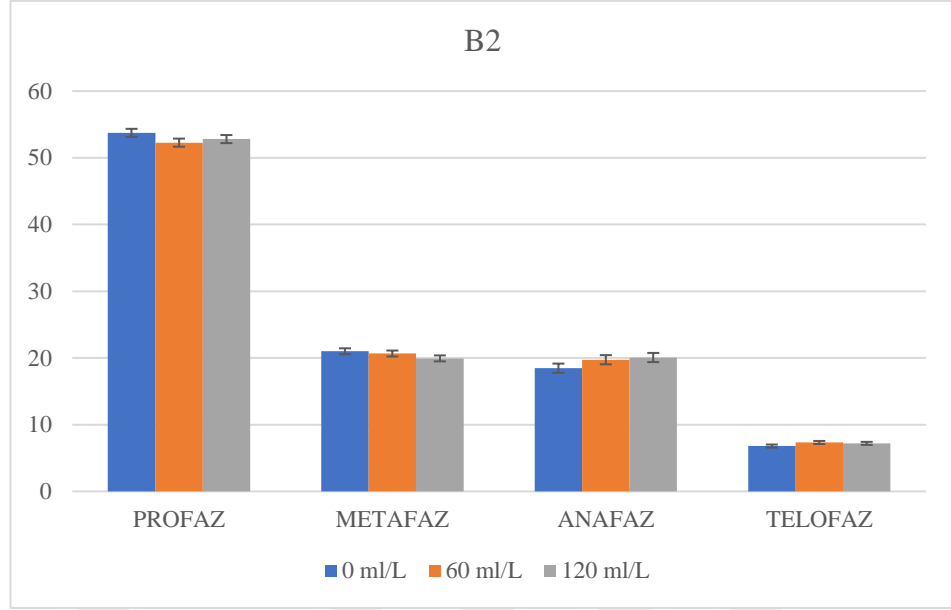
Tablo 4. 5. B1 deterjanının zamana bağlı kromozom anormalliği yüzdesi

Konsantrasyon (mg/L)	Süre (saat)	(%) KA±SH*
0	24	0,2±0,06
	48	1,9±0,05
	72	2,5±0,07
40	24	9,6±0,07
	48	12,2±0,54
	72	15,6±0,06
80	24	21,1±0,07
	48	32,7±0,05
	72	28,3±0,06

*Üç farklı süredeki kromozom anormallikleri yüzdesi ve standart hata

B2 deterjanı için kontrol grubunda en fazla paya sahip mitoz evresi aynı şekilde Profaz evresi olarak gözlemlendi. Profaz evresinden sonra sırasıyla A1 deterjanında olduğu gibi Metafaz Anafaz ve Telofaz evrelerinin geldiği görüldü. 60 ml/L konsantrasyonunda yüzdelerdeki pay dağılımında kontrole göre anlamlı bir farklılık gözlemlenmezken, 120 ml/L konsantrasyonunda sıralama Profaz evresinden sonra Anafaz, Metafaz ve Telofaz olarak değişti (Şekil 4.8.).

Diğer deterjanlarda olduğu gibi tüm mitoz evre yüzdeleri değişen konsantrasyonlarda farklılık gösteren B2 deterjanında kontrol grubunda %53,7 oranında paya sahip olan Profaz evresinin, 60 ml/L konsantrasyonunda %52,2 değerine düştüğü, 120 ml/L konsantrasyonunda %52,8'e ulaştığı görüldü. Metafaz evresinin kontrol grubundaki değerinin %21 olduğu görülürken, 60 ml/L konsantrasyonundaki değerinin %20,6 olduğu ve bu değer 120 ml/L konsantrasyonunda ise %19,9'a gerilediği görüldü. Kontrol grubunda %18,4 değerinde seyreden Anafaz evresinin, 60 ml/L konsantrasyonunda %19,7 olduğu, 120 ml/L konsantrasyonunda ise %20'ye ulaştığı görüldü. Telofaz evresinin ise kontrol grubunda %6,8 iken, 60 ml/L konsantrasyonunda %7,3 değerine yükseldiği ve 120 ml/L konsantrasyonunda ise %7,2 değerinde olduğu görüldü (Şekil 4.8.).



Şekil 4. 8. B2 deterjanının farklı konsantrasyonlarının mitoz bölünmenin farklı evrelerine etkisi

Tablo 4. 6. B2 deterjanının zamana bağlı kromozom anormalliği yüzdesi

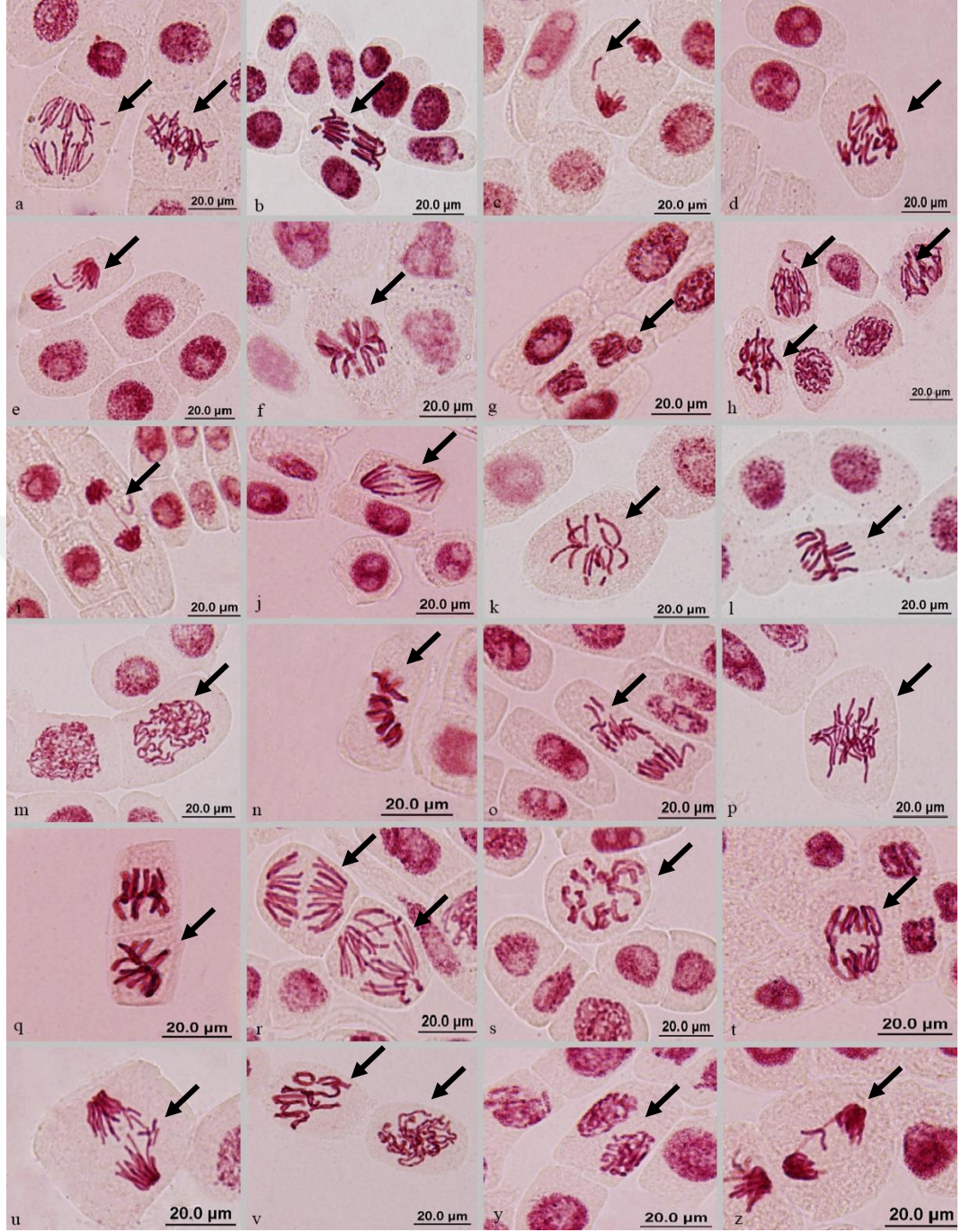
Konsantrasyon (mg/L)	Süre (saat)	(%) KA±SH*
0	24	0,1±0,07
	48	1,4±0,05
	72	2,2±0,06
60	24	6,6±0,06
	48	8,3±0,05
	72	9,9±0,06
120	24	10,8±0,05
	48	12,7±0,07
	72	16,5±0,07

*Üç farklı süredeki kromozom anormallikleri yüzdesi ve standart hata

B2 deterjanı için % KA değerinin kontrol gruplarında 24 saatte %0,1 iken, 48 saatte %1,4 ve 72 saatte %2,2 olduğu görüldü. 60 ml/L konsantrasyonunda 24 saatte %6,6 olan KA değerinin 48 saatte %8,3'e çıktığı ve 72 saatte ise daha da yükselerek %9,9'a ulaştığı gözlemlendi.

120 ml/L konsantrasyonunda ise değerlerin 24 saatte %10,8 iken 48 saatte %12,7'ye yükseldiği ve 72 saat sonunda ise yükselmeye devam ederek %16,5'e ulaştığı gözlemlendi (Tablo 4.6.).

Tüm deterjanlarla yapılan muamelelerde tüm süre ve konsantrasyonlar dahilinde en sık rastlanan kromozom anormallikleri Şekil 4.9.'da gösterildi.



Şekil 4. 9. *V. faba* kök hücrelerinde meydana gelen kromozom anormallikleri a) Anafazda kalgın kromozom ve metafazda kromozom yapışması b) Anafazda kalgın kromozom c) Telofazda kalgın kromozom d) Düzensiz anafaz e) Anafazda köprü oluşumu ve kalgın kromozom f) Metafazda kromozom şişmesi g) Mikronükleus h) Düzensiz metafaz, anafazda kalgın kromozom ve anafazda kromozom yapışması i) Telofazda köprü oluşumu ve kalgın kromozom j) Anafazda kutup kayması ve köprü oluşumu k) C-mitoz l) Metafazda kalgın kromozom m) Düzensiz profaz n) Düzensiz metafaz o) Anafazda kalgın kromozom p) C-mitoz q) Metafazda kutup kayması r) Anafazda kutup kayması ve düzensiz anafaz s) C-mitoz ve kromozom uçlarında yapışma t) Anafazda köprü oluşumu u) Anafazda kalgın kromozom v) C-mitoz, düzensiz profaz y) Telofazda kutup kayması z) Telofazda köprü oluşumu ve kalgın kromozom

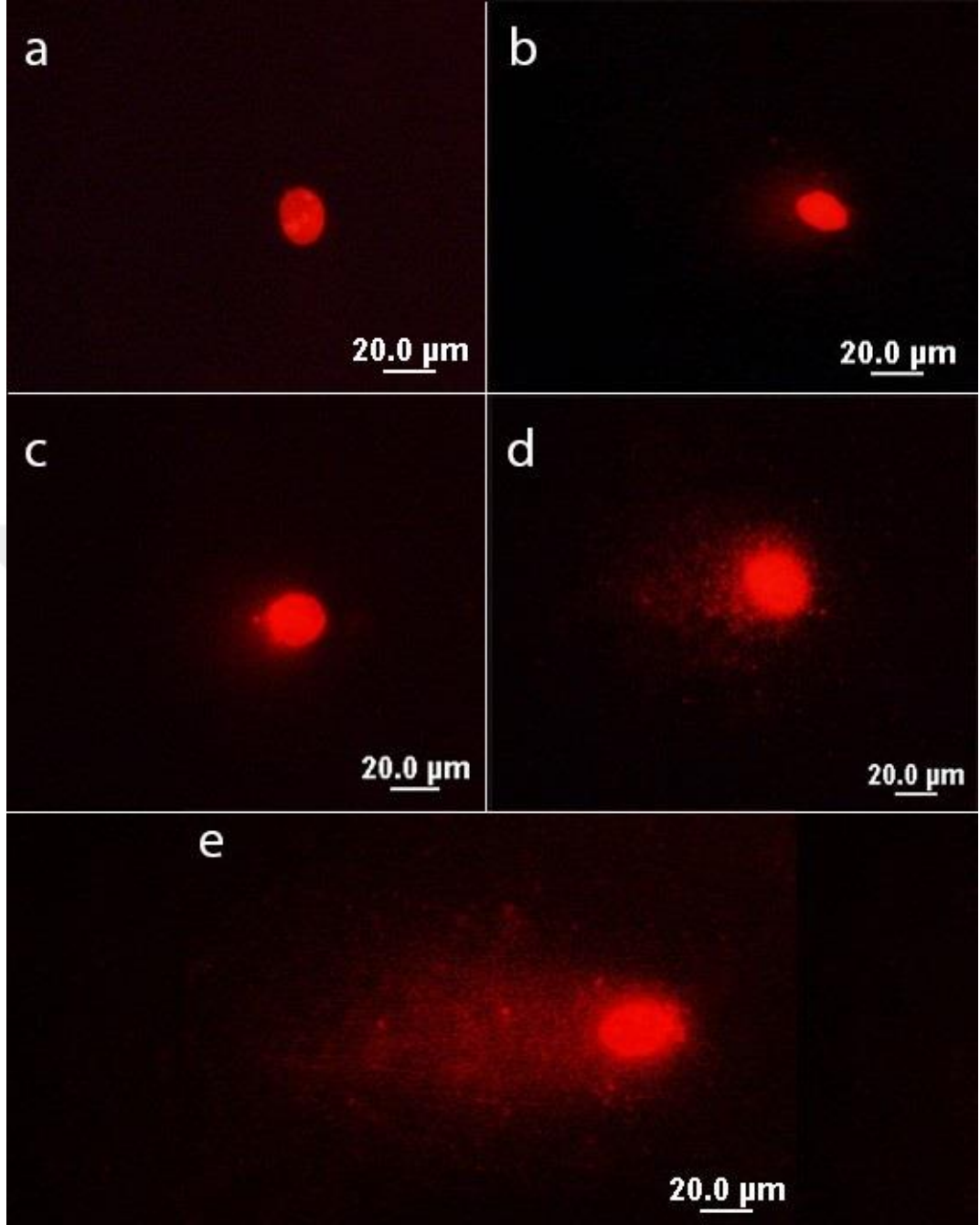
4.4. DNA Hasarının Comet Testi ile Belirlenmesi

Deterjanların neden olduğu genetik hasarın tespitinde alkali tek hücre jel elektroforezi (SCGE) yöntemi kullanıldı.

A1 deterjanında, kontrol gruplarında Tip 0 ve Tip 1 olarak adlandırılan az DNA hasarlı çekirdekler gözlemlendi. 20ml/L konsantrasyonunda 24 ve 48 saat süresinde daha çok Tip 1 ve Tip 2 dereceli DNA hasarları gözlenirken, 72 saatlik sürenin ardından Tip 3 dereceli DNA hasarının Tip 2'ye oranla daha fazla oluştuğu gözlemlendi. 40ml/L konsantrasyonunda 24 saat süresinde Tip 2 dereceli DNA hasarları çoğunlukta görülürken, 48 saat süresinde Tip 2 ve Tip 3 dereceli hasarlar görüldü. 72 saat süresinde ise Tip 3 ve Tip 4 dereceli hasarlar çoğunluk olarak gözlemlendi.

A2 deterjanında, kontrol gruplarında Tip 0 dereceli çekirdekler görüldü. 50ml/L konsantrasyonunda 24 saatlik sürede Tip 0 ve Tip 1 dereceli DNA hasarları saptandı. 48 saatlik süre sonunda Tip 1 ve Tip 2 dereceli DNA hasarları bulunurken 72 saatlik süre tamamlandığında ise Tip 2 daha çoğunlukta olmak üzere Tip 3 dereceli DNA hasarlarına da rastlandı. 100ml/L konsantrasyonunda 24 saat süresinde Tip 0 ve Tip 1 dereceli DNA hasarları tespit edildi. 48 saat süresinde Tip 2 dereceli DNA hasarları sıkça gözlenirken, 72 saatlik süre bitiminde Tip 2 ve Tip 3 derecesindeki DNA hasarlarına sahip çekirdekler gözlemlendi.

B1 deterjanında, kontrol gruplarında Tip 0 ve Tip 1 olarak adlandırılan az DNA hasarlı çekirdeklerin varlığı gözlemlendi. 40ml/L konsantrasyonunda 24 saat süresinde Tip 1 ve Tip 2 dereceli DNA hasarları gözlenirken, 48 saat süresinde Tip 2 dereceli DNA hasarına sahip çekirdekler gözlemlendi. 72 saatlik süre sonunda ise Tip 3 dereceli DNA hasarı görüldü. 80ml/L konsantrasyonunda 24 saat süresinde Tip 2 dereceli DNA hasarı bulunurken 48 saat süresinde Tip 2 ve Tip 3 dereceli hasarlar bulundu. 72 saat sonunda ise Tip 3 daha fazla olmak üzere Tip 4 dereceli DNA hasarına sahip çekirdekler de gözlemlendi.



Şekil 4. 10. Comet testinde hasar derecelerine göre çekirdeklerin sınıflandırılması
a) Tip 0: Hasarsız, b) Tip 1: kuyruk<0,5 c) Tip 2: kuyruk>0,5 veya kuyruk başa eşit, d) Tip 3: kuyruk baş çapından büyük, e) Tip 4: kuyruk başın neredeyse 3 katı

B2 kontrol gruplarında Tip 0 dereceli çekirdekler görüldü. 60ml/L konsantrasyonunda 24 saatlik sürede Tip 0 ve Tip 1 dereceli DNA hasarları belirlendi. 48 saat süresinde Tip 2 dereceli DNA hasarları gözlemlenirken 72 saat tamamlandığında DNA hasar derecesi Tip 3 olarak değişti. 120ml/L konsantrasyonunda 24 saat süresinde Tip 1 ve Tip 2 dereceli DNA hasarları

gözlenirken, 48 saat süresinde Tip 2 dereceli DNA hasarları gözlemlendi. 72 saat sonunda ise Tip 3 dereceli DNA hasarları belirlendi.

Konsantrasyon ve süre ile doğru orantılı olarak DNA hasar derecelerinin arttığı ve çevreye duyarlı deterjanlardaki DNA hasar derecesinin standart deterjanlara göre daha düşük seviyede seyrettiği görüldü.

26 adet çamaşır deterjanı ve 5 adet yumuşatıcının *Daphnia magna* üzerindeki toksik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, çalışmamıza benzer olarak deterjan konsantrasyonu ile genotoksik etkinin korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (Pettersson ve diğ., 2000).

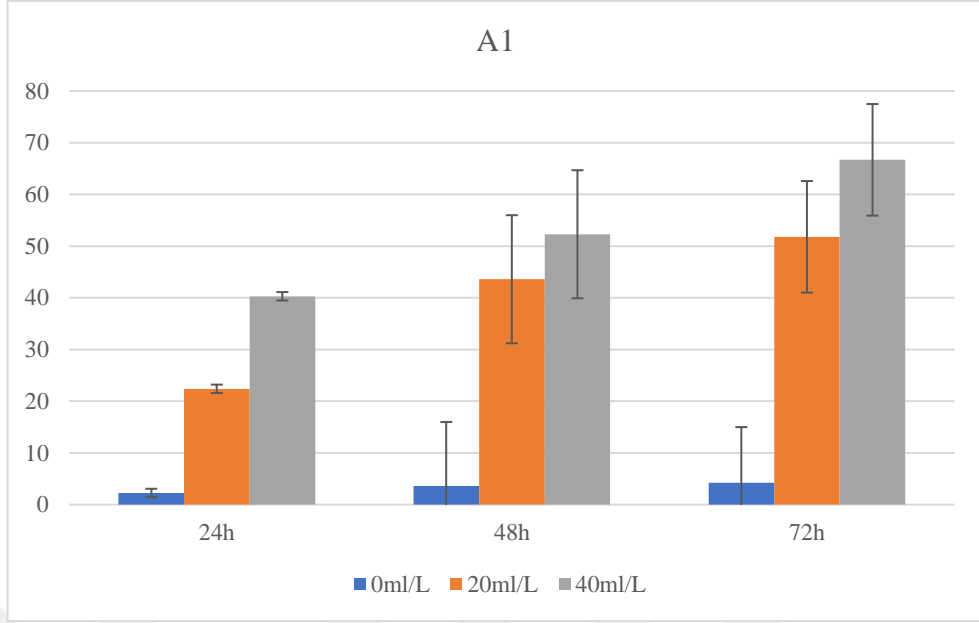
Tatlı ve tuzlu su karidesleri (*Desmoscaris trispinosa* ve *Palaemonetes africanus*) üzerinde yüksek anyonik sürfaktan içeren deterjanların genotoksitesinin incelendiği bir çalışmada, kontrol grubuna kıyasla artan deterjan konsantrasyonlarının ölüm oranını arttırdığı gösterilmiştir (Ezemonye ve diğ., 2009).

Deterjanların farklı konsantrasyonlarının DNA yüzdesine (kuyruk DNA %) etkileri de incelendi.

A1 deterjanı için kuyruk DNA yüzdeleri Tablo 4.7 ve Şekil 4.11’de gösterildiği üzere kontrol grubunda 24 saatte %2,25 olan kuyruk DNA, 48 saatte %3,6 ve 72 saatte %4,2 olarak değişti. 20ml/L konsantrasyonunda 24 saatte %22,4 olan değer 48 saatte %43,6’ya yükselirken 72 saatin sonunda %51,8’e ulaştı. 40ml/L konsantrasyonunda 24 saatte %40,3 olarak bulunan kuyruk DNA hasarı, 48 saatte %52,3 ve 72 saatte %66,7’ye ulaştı.

Tablo 4. 7. A1 deterjanının *V. faba* üzerindeki kuyruk DNA yüzdesi

Konsantrasyon/Süre	24 saat	48 saat	72 saat
0 ml/L	2,25	3,6	4,2
20 ml/L	22,4	43,6	51,8
40 ml/L	40,3	52,3	66,7

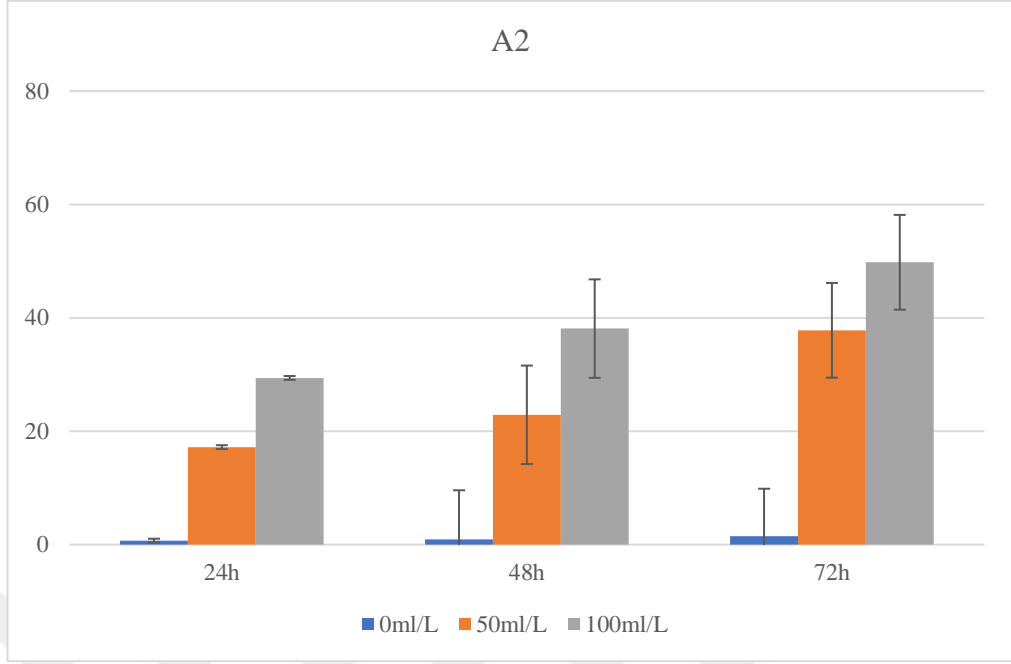


Şekil 4. 11. A1 deterjanının *V. faba* üzerindeki kuyruk DNA yüzdesi

A2 deterjanı için kuyruk DNA yüzdeleri Tablo 4.8. ve Şekil 4.12.'de gösterildiği üzere kontrol grubunda 24 saatte %0,7 olarak görülen kuyruk DNA, 48 saatte %0,9'a ve 72 saatte %1,5 değerine ulaştı. 50ml/L konsantrasyonunda 24 saatte %17,2 olan değer 48 saatte %22,9'a yükselirken 72 saat tamamlandığında kuyruk DNA değeri %37,8 olarak belirlendi. 100ml/L konsantrasyonunda 24 saatte %29,4 olan değer, 48 saatte %38,1 ve 72 saatte %49,2'ye ulaştığı gözlemlendi.

Tablo 4. 8. A2 deterjanının *V. faba* üzerindeki kuyruk DNA yüzdesi

Konsantrasyon/Süre	24 saat	48 saat	72 saat
0 ml/L	0,9	0,7	1,5
50 ml/L	17,2	22,9	37,8
100 ml/L	29,4	38,1	49,8

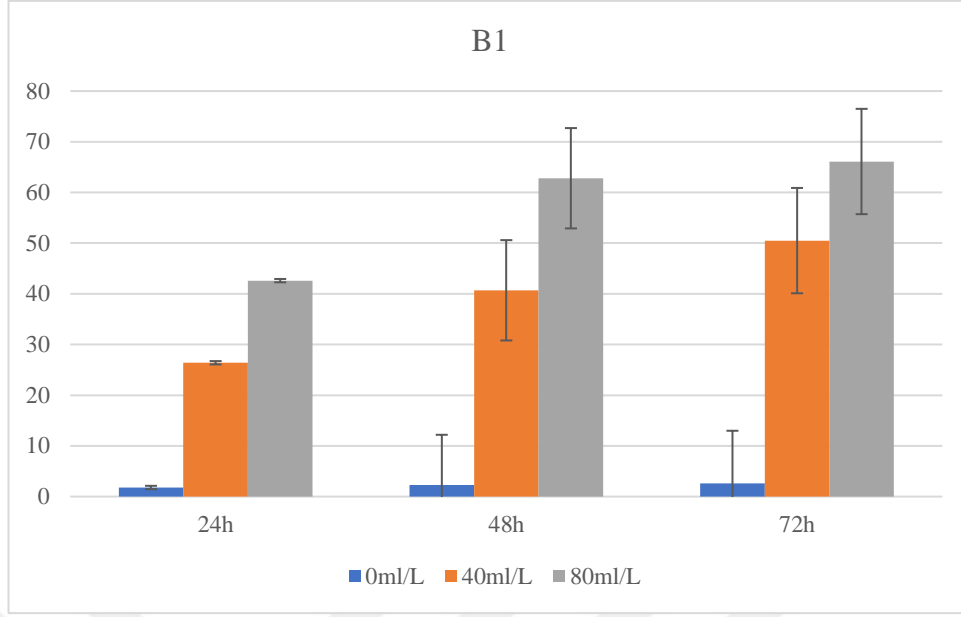


Şekil 4. 12. A2 deterjanının *V. faba* üzerindeki kuyruk DNA yüzdesi

B1 deterjanı için kuyruk DNA yüzdeleri Tablo 4.9. ve Şekil 4.13'te gösterildiği üzere kontrol grubunda 24 saatte %1,8 olan kuyruk DNA, 48 saatte %2,3'e ve 72 saatte %2,6'ya ulaştı. 40ml/L konsantrasyonunda 24 saatte %26,4 olan değer 48 saatte %40,7 değerine ulaşırken 72 saat tamamlandığında kuyruk DNA değeri %50,5 olarak belirlendi. 80ml/L konsantrasyonunda 24 saatte %42,6 olan değerin, 48 saatte %62,8 ve 72 saatte %66,1'e ulaştığı gözlemlendi.

Tablo 4. 9. B1 deterjanının *V. faba* üzerindeki kuyruk DNA yüzdesi

Konsantrasyon/Süre	24 saat	48 saat	72 saat
0 ml/L	1,8	2,3	2,6
40 ml/L	26,4	40,7	50,5
80 ml/L	42,6	62,8	66,1

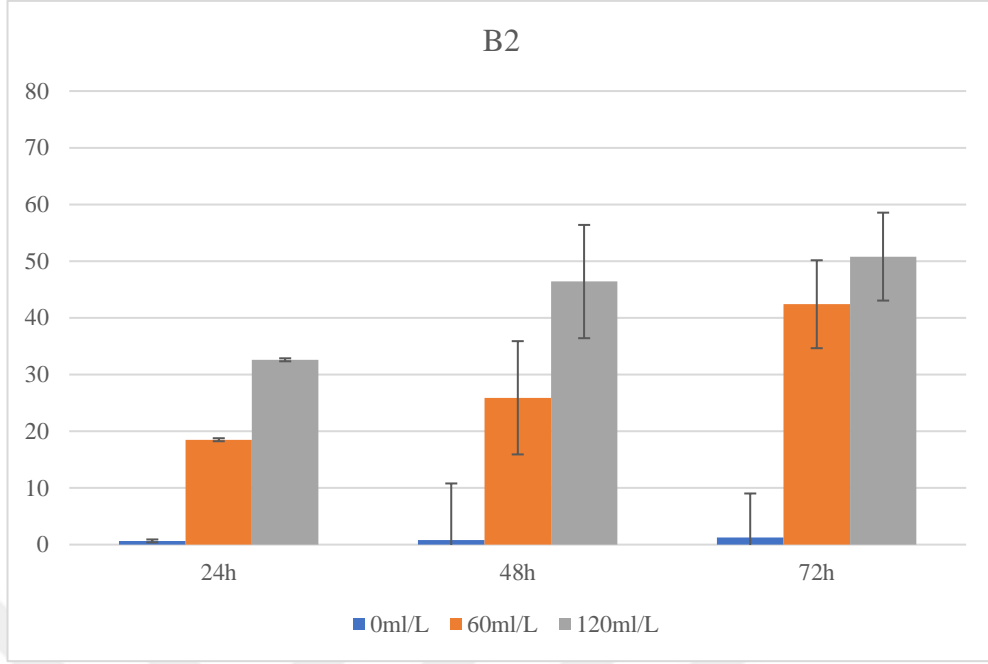


Şekil 4. 13. B1 deterjanının *V. faba* üzerindeki kuyruk DNA yüzdesi

B2 deterjanı için kuyruk DNA yüzdeleri Şekil 4.14. ve Tablo 4.10.'da gösterildiği üzere kontrol grubunda 24 saatte %0,65 olan kuyruk DNA değeri, 48 saatte %0,8'e ve 72 saatte %1,27'ye ulaştı. 60 ml/L konsantrasyonunda 24 saatte %18,5 olan değer 48 saatte %25,9 değerine ulaşırken 72 saat tamamlandığında kuyruk DNA değeri %42,4 olarak belirlendi. 120 ml/L konsantrasyonunda 24 saatte %32,6 olan değer, 48 saatte %46,4 ve 72 saatte %50,8'e ulaştığı gözlemlendi.

Tablo 4. 10. B2 deterjanının *V. faba* üzerindeki kuyruk DNA yüzdesi

Konsantrasyon/Süre	24 saat	48 saat	72 saat
0 ml/L	0,65	0,8	1,27
60 ml/L	18,5	25,9	42,4
120 ml/L	32,6	46,4	50,8



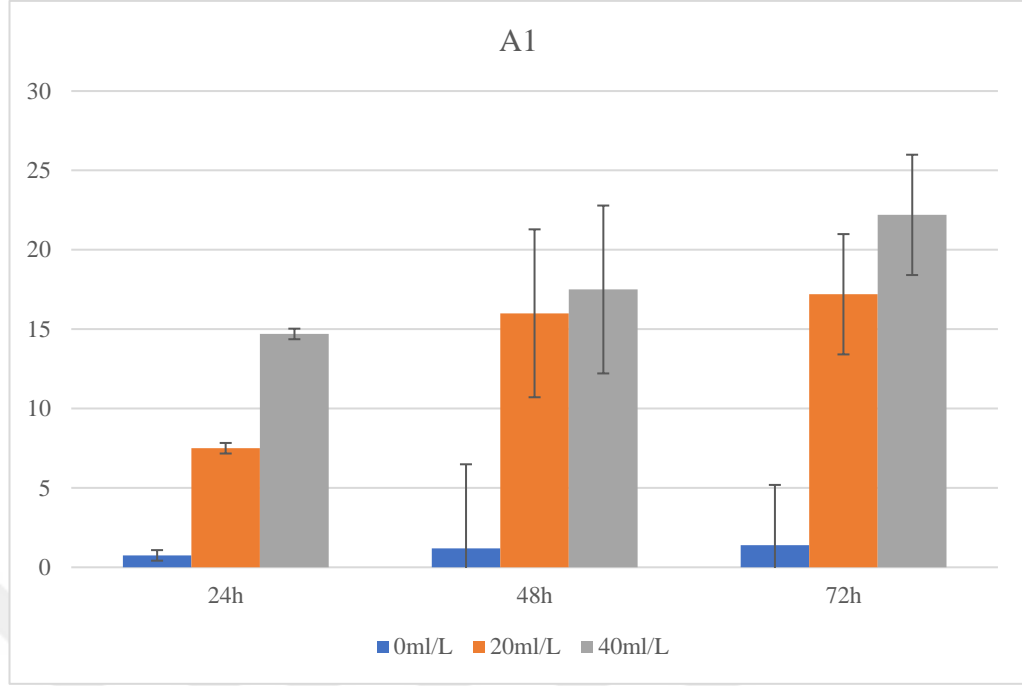
Şekil 4. 14. B2 deterjanının *V. faba* üzerindeki kuyruk DNA yüzdesi

V. faba üzerinde tüm deterjanlar için konsantrasyon ve süre ile doğru orantılı olarak artan kuyruk DNA yüzdesi değerleri belirlenmesinin yanı sıra Olive kuyruk momenti değerleri de hesaplandı.

Tüm deterjanların değişen konsantrasyonlarında OTM değeri üzerindeki etkilerinin, A1 deterjanı için Tablo 4.11. ve Şekil 4.15., A2 deterjanı için Tablo 4.12. ve Şekil 4.16., B1 deterjanı için Tablo 4.13. ve Şekil 4.17. ve B2 deterjanı için Tablo 4.14. ve Şekil 4.18. ile gösterildiği üzere artan süre ve konsantrasyonlarla doğru orantılı bir şekilde artan yönde ilerlediği gözlemlendi.

Tablo 4. 11. A1 deterjanının *V. faba* üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi

Konsantrasyon/Süre	24 saat	48 saat	72 saat
0 ml/L	0,75	1,2	1,4
20 ml/L	7,5	16	17,2
40 ml/L	14,7	17,5	22,2



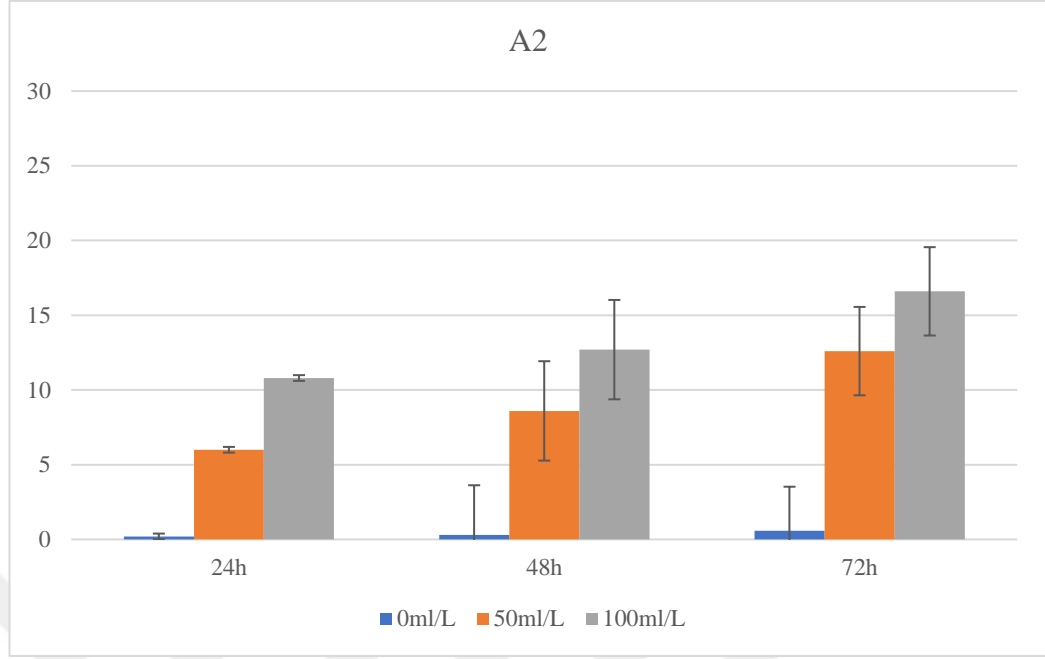
Şekil 4. 15. A1 deterjanının *V. faba* üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi

A1 deterjanı için kontrol grubunda 24 saatte 0,75 μm olan OTM değeri, 48 saatte 1,2 μm ve 72 saatte 1,2 μm değerine ulaştı. OTM değeri 20 ml/L konsantrasyonunda ise 24 saatte 7,5 μm , 48 saatte 16 μm ve 72 saat sonunda 17,2 μm olarak belirlendi. 40 ml/L konsantrasyonunda ise 14,7 μm ile başlayan OTM değeri 48 saatte 17,5 μm 'ye yükseldi ve 72 saatlik süre tamamlandığında 22,2 μm 'ye ulaştı.

A2 deterjanı için hesaplanan OTM değeri kontrol grubunda 24 saatte 0,2 μm olarak bulunurken, bu değer 48 saatte 0,3 μm ve 72 saatte 0,57 μm olarak değişti. 50 ml/L konsantrasyonunda 24 saatte 6 μm olarak bulunan OTM değeri 48 saatte 8,6 μm ve 72 saatte 12,6 μm olarak belirlendi. 100 ml/L konsantrasyonunda 24 saatte 10,8 μm olan OTM değeri, 48 saatte 12,7 μm 'ye ve 72 saatin sonunda 16,6 μm 'ye yükseldi.

Tablo 4. 12. A2 deterjanının *V. faba* üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi

Konsantrasyon/Süre	24 saat	48 saat	72 saat
0 ml/L	0,2	0,3	0,57
50 ml/L	6	8,6	12,6
100 ml/L	10,8	12,7	16,6

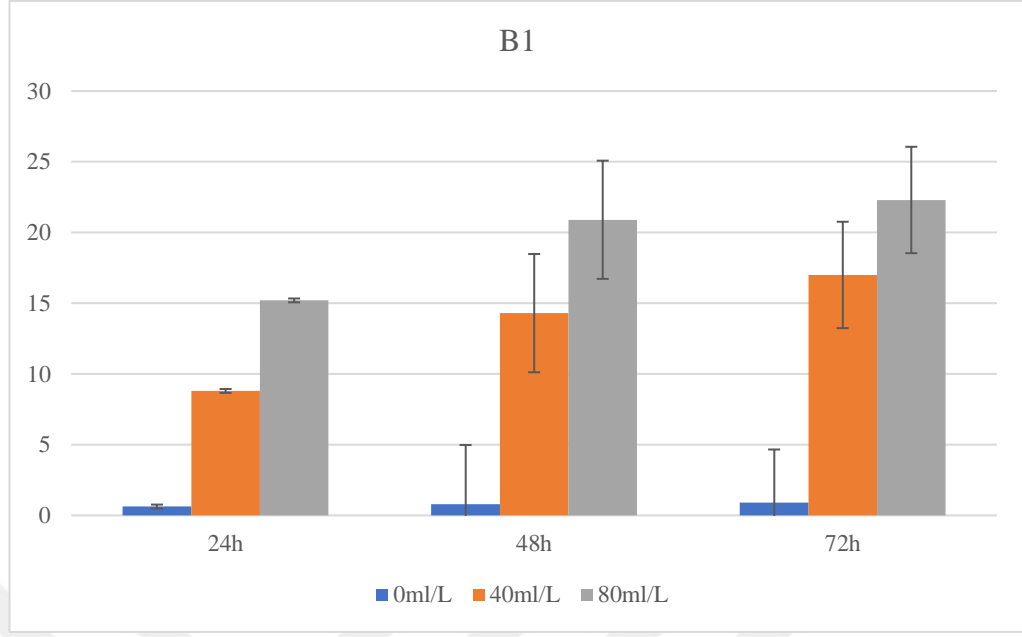


Şekil 4. 16. A2 deterjanının *V. faba* üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi

B1 deterjanı için kontrol grubunda 24 saatte 0,63 μm olan OTM değeri, 48 saatte 0,8 μm ve 72 saatte 0,9 μm değerine ulaştı. OTM değeri 40 ml/L konsantrasyonunda ise 24 saatte 8,8 μm , 48 saatte 14,3 μm ve 72 saat sonunda 17 μm olarak belirlendi. 80 ml/L konsantrasyonunda ise 15,2 μm ile başlayan OTM değeri 48 saatte 20,9 μm 'ye yükseldi ve 72 saatlik süre tamamlandığında 22,3 μm 'ye ulaştı.

Tablo 4. 13. B1 deterjanının *V. faba* üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi

Konsantrasyon/Süre	24 saat	48 saat	72 saat
0 ml/L	0,63	0,8	0,9
40 ml/L	8,8	14,3	17
80 ml/L	15,2	20,9	22,3

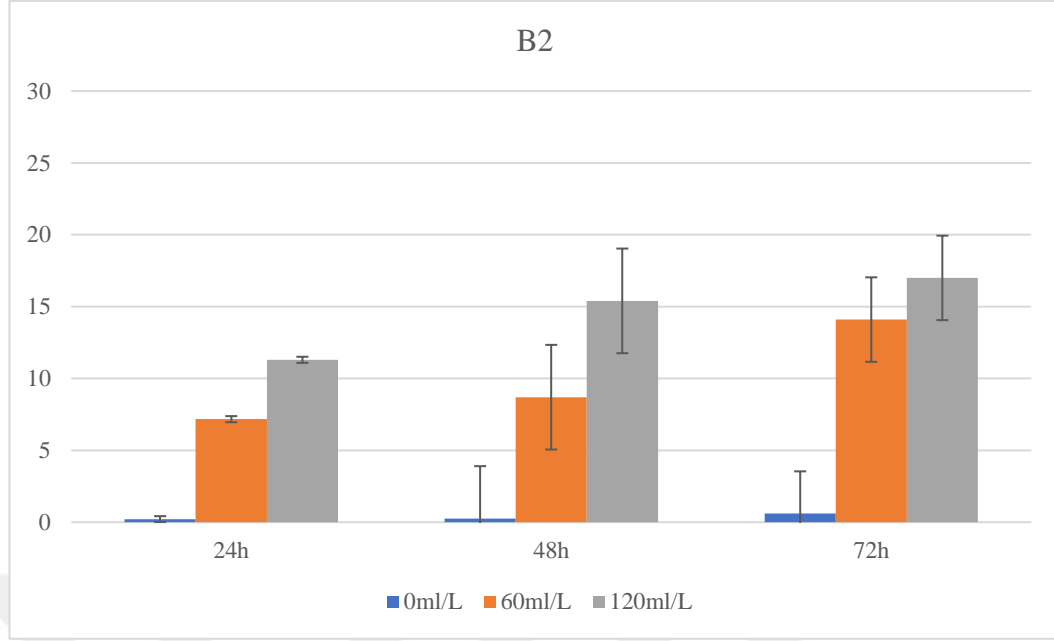


Şekil 4. 17. B1 deterjanının *V. faba* üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi

B2 deterjanı için hesaplanan OTM değeri kontrol grubunda 24 saatte 0,21 μm olarak bulunurken, bu değer 48 saatte 0,26 μm ve 72 saatte 0,6 μm olarak değişti. 60 ml/L konsantrasyonunda 24 saatte 7,17 μm olarak bulunan OTM değeri 48 saatte 8,7 μm ve 72 saatte 14,1 μm olarak belirlendi. 120 ml/L konsantrasyonunda 24 saatte 11,3 μm olan OTM değeri, 48 saatte 15,4 μm 'ye ve 72 saatin sonunda 17 μm 'ye yükseldi.

Tablo 4. 14. B2 deterjanının *V. faba* üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi

Konsantrasyon/Süre	24 saat	48 saat	72 saat
0 ml/L	0,21	0,26	0,6
60 ml/L	7,17	8,7	14,1
120 ml/L	11,3	15,4	17



Şekil 4. 18. B2 deterjanının *V. faba* üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi

Tüm deterjanların değişen tüm konsantrasyonlarındaki OTM değerleri artan süre ve artan konsantrasyonlara bağlı olarak anlamlı bir artış gösterdi.

Çalışmamıza benzer olarak kömür külünün %5-100 konsantrasyonları ile muamele edilen soğan kök uçlarındaki genetik hasarın belirlenmesi üzerine yapılan bir çalışmada DNA kuyruk yüzdesi, Olive kuyruk momenti parametreleri ile çalışılmıştır (Chakraborty ve diğ., 2009).

Olive kuyruk momenti (OTM) ve kuyruk DNA yüzdesi, genotoksik etkiye sahip kimyasal maddelerin konsantrasyonları ile iyi korelasyon gösterir ve comet assay değerlendirmelerinde güven veren parametrelerdir (Kumaravel ve diğ., 2009).

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yüzlerce kimyasal hayatlarımızı kolaylaştırmak için üretilmeye devam ediyor. Yaşam standardımızı yükseltme konusunda her ne kadar yararlı olsalar da bu kimyasalların olumsuz etkilerini canlılar üzerinde araştırma yapmadan bilemeyiz. Bitki biyotestleri çevresel kirlenici maddelerin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesinde, kromozom hasarı ve gen mutasyonlarının ortaya konmasında önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmalar dünyanın çeşitli bölgelerindeki çevresel koşullar hakkında veri tabanı oluşturmaya katkı sağlayabilmektedir. Biyotestlerin ortaya koyduğu basit ve net sonuçlar aynı zamanda çevre kirliliğinin genotoksik etkileri hakkında halkı bilinçlendirme eğitimlerinde de kullanılabilir niteliktedir (Aksoy, 2017).

Bu çalışma kapsamında ikisi standart ikisi çevre ve denize duyarlı olmak üzere seçilen dört farklı deterjanın *V. faba* bitkisi üzerindeki etkileri incelendi. Deterjanlarla muamele edilen *V. faba* tohumları büyümeye bırakıldı ve kök inhibisyon testi ile yedi gün sonunda kontrol grubuna göre kök uzunluğunu yarıya indiren değerler (EC_{50}) her bir deterjan için ayrı ayrı belirlendi. Genel bakışta standart deterjanlarda EC_{50} değerinin daha düşük olduğu belirlendi. Diğer bir deyişle standart deterjanların çevre ve denize duyarlı deterjanlara göre daha düşük konsantrasyonlarda kök uzunluğunu yarıya indirebildiği tespit edildi.

En düşük EC_{50} değeri 20ml/L ile A1 deterjanında saptandı. Bu durumda *V. faba* bitkisinde mitotik kök hücrelerine en çok zararı A1 deterjanının verdiği belirlendi. En yüksek EC_{50} değeri ise 60ml/L ile B2 deterjanında belirlendi. Dolayısıyla *V. faba* bitkisinde mitotik kök hücrelerine en az zararı B2 deterjanının verdiği tespit edildi. Neticede standart deterjanların içerdiği kimyasal maddelerin *V. faba* bitkisinde kök büyümesi üzerine, çevre ve denize duyarlı deterjanların içerdiği kimyasal maddelere kıyasla daha olumsuz etkilerinin olduğu sonucuna varıldı.

Mitotik indeks testi ile dört farklı deterjanın *V. faba* kök ucu mitotik hücrelerinin bölünme kapasiteleri üzerindeki etkileri incelendi. Mitotik indeks testi uygulanarak ulaşılan sonuçlarda tüm deterjanlarda artan süre ve konsantrasyonlar ile birlikte mitotik indeks yüzdesinin azaldığı belirlendi.

Mitotik indeks değerindeki azalma, kimyasal maddelerin mitodepresif etkileri neticesinde normal hücre döngüsünde hatalara sebep olup hücre bölünmesini sınırlandırması ile açıklanabilir (Özkara ve diğ., 2015).

A1 deterjanı kontrole göre %10,9 azalma ile mitotik indeks yüzdesini en fazla düşüren deterjan olurken B2 deterjanı kontrole göre %2,4 azalma ile mitotik indeksi en az düşüren deterjan oldu. Genel anlamda mitotik indeks yüzde değerinin kontrol gruplarına göre çevre ve denize duyarlı deterjanlarda daha az düştüğü belirlendi. Standart deterjanların hücre bölünmesi üzerindeki olumsuz etkilerinin çevre ve denize duyarlı deterjanlara göre daha fazla olduğu sonucuna varıldı.

Kromozom anormalliği testi ile deterjanlarla muamele edilen *Vicia faba* tohumlarının verdiği köklerden alınan örnekler incelendi. Deterjanların kök ucu mitotik hücrelerinde neden olduğu kromozom anormallikleri belirlendi. Kromozom anormallikleri DNA çift zincirinde kırıkların onarılamaması veya onarımının iyi derecede yapılamaması neticesinde oluşmaktadır (Maluszynska ve Juchimiuk, 2005).

Çalışmamızda artan konsantrasyon ve süreye bağlı olarak tüm deterjanlarda kromozom anormallik oluşum oranının belirgin şekilde arttığı tespit edildi. En sık rastlanan anormalliklerin kutup kayması, tabla kayması, düzensiz profaz, düzensiz metafaz, kalgın kromozom ve köprü oluşumu olduğu belirlendi.

Hücre çekirdeğindeki bu tip hasarları önleyebilmek için çok çeşitli DNA tamir mekanizmaları mevcuttur. Bu tamir mekanizmaları etkisiz kaldığında ya da çok ağır DNA hasarı meydana geldiğinde replikasyon, transkripsiyon ve protein sentesi inhibisyonu görülebilir. Bununla birlikte uzun vadede kromozom anormallikleri ve mutasyonlar görülebilir (Aksoy, 2017).

Uygulama yapılan dört farklı deterjan arasında 72 saatlik süre sonunda en yüksek kromozom anormalliği %30,4 ile A1 deterjanında gözlemlenirken, en düşük kromozom anormalliği yüzdesi %14,1 değeri ile A2 deterjanında gözlemlendi. Genel anlamda standart deterjanlarda çevre ve denize duyarlı deterjanlara göre daha fazla oranda kromozom anormalliğine rastlandı.

Comet assay testi ile deterjanların genotoksik etkileri sonucu DNA üzerinde oluşturduğu hasarlar incelendi. Hasarlar derecelerine göre Tip 0, Tip 1, Tip 2, Tip 3 ve Tip 4 olmak üzere beş grupta sınıflandırıldı. Standart deterjanlarda en yüksek konsantrasyon ve sürelerde Tip 4 DNA hasarına yaygın olarak rastlanırken, çevre ve denize duyarlı deterjanlarda en yüksek konsantrasyon ve sürelerde DNA hasarlarının maksimum Tip 3 seviyesine ulaştığı görüldü.

A1 ve B1 deterjanlarında comet kuyruğunun baş kısmının neredeyse üç katına ulaştığı DNA hasarları dikkat çeken oranlarda görülürken çevre ve deniz dostu A2 ve B2 deterjanlarında kuyruğun baş kısmından en fazla iki kat büyüklüğünde DNA hasarları görüldü. Sonuç olarak standart deterjanların içerisindeki kimyasalların *V. faba* DNA'sı üzerinde çevre ve denize duyarlı deterjanlara göre çok daha ileri boyutta hasara yol açtığı belirlendi.

Tek hücre jel elektroforezi testi sonucu boyanıp floresan mikroskopu ile saptanan comet hücrelerinin kuyruğundaki mevcut DNA yüzdesi Kameram adlı bilgisayar programı ile ölçüldü.

Standart deterjanlardan biri olan A1 deterjanı en yüksek konsantrasyon ve sürede %66,7 değeri ile en yoğun kuyruk DNA yüzdesine ulaştıran deterjan olurken, çevre ve deniz dostu deterjanlardan biri olan A2 deterjanı yine en yüksek konsantrasyon ve sürede %49,8 değeri ile en düşük yoğunlukta kuyruk DNA yüzdesine ulaştıran deterjan oldu.

Sonuç olarak artan konsantrasyon ve sürelerde kuyruk DNA yüzdesinin standart deterjanlarda çevre ve denize duyarlı deterjanlara oranla daha yüksek olduğu belirlendi. Standart deterjanlar daha fazla genetik hasara neden olduğu için daha yoğun DNA içeren kuyruklar oluşturdu.

Deterjanlarla muamale edilen *V. faba* biktisinde meydana gelen DNA hasarlarının tespitinde geçerli bir diğer parametre olan Olive kuyruk momenti (OTM) değerleri de incelendi. Kuyruk DNA yüzdesinde olduğu gibi Olive kuyruk momenti değerleri de artan konsantrasyon ve süre bazında paralel ilerleyiş gösterdi.

Yapılan bir çalışmada muamele konsantrasyonu arttıkça OTM verilerinde de artış olduğu görülmüştür (Chakraborty ve diğ., 2009).

Çalışmamızda standart deterjanlar grubunda yer alan B1 deterjanı 22,3µ ile en yüksek Olive kuyruk momenti değerine sahip olurken, çevre ve denize duyarlı deterjanlar grubunda yer alan A2 deterjanı 16,6µ ile en düşük Olive kuyruk momenti değerine sahip deterjan oldu. Sonuç olarak çevre ve denize duyarlı deterjanların Olive kuyruk momenti değerinin standart deterjanlara göre daha düşük kaldığı belirlendi.

Çalışmada elde edilen bütün sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde çevre ve deniz dostu deterjanların standart deterjanlara kıyasla canlılar üzerinde belirgin ölçüde daha az genotoksik etki oluşturduğu gözlemlendi. Bunun nedeni olarak çalışmada kullanılmak üzere seçtiğimiz deniz ve çevre dostu deterjanların üretiminde standart deterjanlara göre daha düşük oranda anyonik madde ve noniyonik madde kullanılmış olması gösterilebilir. Ayrıca içeriğindeki kimyasal madde oranını düşürmek adına üretimde Hindistan cevizi, palmye, buğday ve patatesten elde edilen hammaddelerin kullanılması da canlılar üzerinde daha az genotoksik hasar yaratmaları konusunda destekleyici unsur olmuştur.

Çalışmada elde edilen sonuçlar canlılara besin zinciri yolu ile ulaşan deterjan atıklarının DNA üzerinde ciddi anlamda hasar oluşturduğunun bir göstergesi olmuştur. Tüm bu bulgular ışığında deterjan üretimi ve kullanımı aşamasında alınması gereken ciddi önlemler olduğu apaçık görülmektedir.

Deterjanların besin zincirine karışarak canlıların yaşamı, gelişimi ve genetiği üzerinde olumsuz etkileri olması nedeniyle üretiminde daha hassas davranılmalı, doğada parçalanabilir nitelikte olan uygun ham maddeler seçilmelidir. Biodegradasyonu düşük maddeler içeren deterjanlar parçalanmadan uzun süre doğada kalabilen ve bizlere en fazla zararı veren deterjan gruplarıdır.

Gerektiğinden fazla miktarda deterjan kullanımı nedeniyle yeterince durulanamayan deterjanların, bulaşıklarda ve çamaşırlarda kalan kalıntılarının direkt olarak insanlara geçmesi önemli sağlık sorunlarını tetikleyen başlıca sebepler arasında yer almaktadır. Sadece hoş koku veya yumuşaklık sağladığı için temizliğin haricinde ek olarak kullanılan deterjanların tüketiminde de daha duyarlı olunmalıdır. Çevreye bırakılacak olan atık deterjan miktarı çok da gerekli olmayan bu gibi sebeplerle arttırılmamalıdır. Tüketimde bilinçli davranabilmek ve çevreyi koruma bilincine sahip olmak gelecek nesillere daha temiz bir çevre bırakabilmemiz için son derece önemlidir.

Tüketicilerin kendince alabileceği önlemlerin yanında üreticilerin de dikkate alması gereken noktalar mevcuttur. Ürünlerin satışa sunulmadan önce üretiminin her aşamasında konusunda uzman ekiplerce gerekli testlere tabi tutulmalıdır. Deterjanların canlılara ve çevreye verdiği zararların belirlendiği ve bu zararların azaltılmasına yönelik yapılan çalışmalar üretimde baz alınarak gerekli ham madde seçimleri yapılmalıdır. Özellikle deterjanlarda fazlaca kullanılan fosfat miktarı sınırlandırılmalı ve sulara karışan miktarlar ise fosfat arıtma tesislerinde giderilmelidir. Daha sağlıklı arıtma yapabilmek adına arıtma tesislerinin kapasiteleri arttırılmalıdır. Doğayı korumaya yönelik önlemler almadan yapılacak her türlü sanayileşmenin önüne geçilmelidir. İçme ve kullanma suları mutlaka periyodik kontrollerden geçmelidir. Su kalitesi parametreleri yetkili kurumlarca düzenli olarak denetlenmelidir.

Bu çalışma evsel ve endüstriyel deterjan atıklarının duyarsızca ve bilinçsizce doğaya bırakılmasının önüne geçebilmek adına konuya dikkat çekmiş ve ileride yapılacak çalışmalara örnek olmuştur. Kocaeli Üniversitesi Biyoloji ABD’de hazırlanan bu tez çalışması ile deterjanların genotoksik etkileri ortaya konmaya çalışılarak ilgili literatüre de katkılar sunulmuştur.

KAYNAKLAR

Acar T., *Vicia faba* L.'nin Meristematik Hücreleri Üzerine Çeşitli Kimyasalların Etkileri, Doktora Tezi, İzmir Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2000, 96520.

Akı C. ve Karabay N., *Genetik Laboratuvarı Uygulama Kitabı*, 38. baskı, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Rektörlük Basımevi, Çanakkale, 2004.

Aksoy Ö., Detection of Environmental Mutagens Through Plant Bioassays, Editor: Yousaf Z., *Plant Ecology*, 1st ed, InTech - Open Science, Rijeka, 10-23, 2017.

Angelis K.J., McGuffie M., Menke M., Schubert I., Adaptation to Alkylation Damage in DNA Measured by the Comet Assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 2000, **36**(2), 146-50.

Arıkan E.S., Quizalofop-P-Ethyl Herbisitinin *Allium cepa* Kök Meristem Hücreleri Üzerine Sitogenetik Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, 2006, 181417.

Ateeq B., Farah M.A., Ali M.N., Ahmad W., Clastogenicity of Pentachlorophenol, 2,4-D and Butachlor Evaluated by *Allium* root Tip Test, *Mut. Res.*, 2002, **514**(1-2), 105-113.

Ateeq B., Farah M. A., Ahmad W., Detection of DNA Damage by Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis in 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Butachlor Exposed Erythrocytes of *Clarias batrachus*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, **62**(3), 348-354.

Baltacı V., Aygun N., Akyol D., Karakaya A. E., Sardaş S., Chromosomal Aberrations and Alkaline Comet Assay in Families With Habitual Abortion, *Mutat Res.*, 1998, **417**(1), 47-55.

Bilgici B., Behçet Hastalığında Genotoksisite, Tıpta Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Samsun, 2005, 163508.

Briggs D., Environmental Pollution and the Global Burden of Disease, *British Medical Bulletin*, 2003, **68**(1), 1-24.

Bozdağ A., 2,4-D ve Dikamba Herbisitlerinin Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Köklerindeki Genotoksik Etkilerinin RAPD ve Comet Assaylerle Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, 2009, 244385.

Chakraborty R., Mukherjee A., Mukherjee A. K., Evaluation of Genotoxicity of Coal Fly Ash In *Allium cepa* Root Cells by Combining Comet Assay with the *Allium* Test, *Environ. Monit. Assess.*, 2009, **153**(1-4), 351–357.

Chandra S., Chauhan L.K.S., Murthy R.C., Saxena P.N., Pande P.N., Gupta S.K., Comparative Biomonitoring of Leachates From Hazardous Solid Waste of Two Industries Using *Allium* Test, *Science of the Total Environment*, 2005, **347**(1-3), 46-52.

Chauhan L.K.S., Saxena P.N., Gupta S.K., Cytogenetic Effects of Cypermethrin and Fenvalerate on the Root Meristem Cells of *Allium cepa*, *Environ. Exp. Bot.*, 1999, **42**(3), 181-189.

Ciğerci İ.H., Liman R., Özgül E., Konuk M., Genotoxicity of Indium Tin Oxide by *Allium* and Comet tests, *Cytotechnology*, 2015, **67**(1), 157–163.

Cirelli A.F., Ojeda C., Castro M.J.L., Salgot M., Surfactants in sludge-amended agricultural soils: a review, *Environ. Chem. Lett.*, 2008, **6**(3), 135-148.

Collins A.R., Dobson V.L., Dusinka M., Kennedy G., Stetina R., The Comet Assay: What Can It Really Tell Us?, *Mutation Research*, 1997a, **375**(2), 183-193.

Collins A.R., Dusinska M., Franklin M., Somorovska M., Petrovska H., Duthie S., Fillion L., Panayiotidis M., Raslova K., Vaughan N., Comet Assay in Human Biomonitoring Studies: Reliability, Validation and Applications, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 1997-b, **30**(2), 139-146.

Collins A.R., The Comet Assay: Principles, Applications, and Limitations, *Methods Mol. Biol.*, 2002, **203**(1), 163-177.

Collins A.R., The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations, *Mol. Biotechnol.*, 2004, **26**(3), 249-261.

Danovaro R., Pollution Threats in the Mediterranean Sea, *Chemistry and Ecology*, 2003, **19**(1), 15-32.

Demir H., Sarısu Deresi ve Karadenize Birleşme Noktasında Mikrobiyolojik ve Kimyasal Kirlilik Seviyesinin Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2009, 256721.

Dhawan A., Bajpayee M., Parmar D., Comet Assay: A Reliable Tool for the Assessment of DNA Damage in Different Models, *Cell Biol. Toxicol.*, 2009, **25**(1), 5-32.

Dikilitaş M., Koçyiğit A., Canlılarda Tek Hücre Jel Elektrophorez Yöntemi ile DNA Hasar Analizi, *HR.Ü.Z.F. Dergisi*, 2010, **14**(2), 77-89.

Done R., Hutchins I., Teaching Strategy Relationship Structure-Biodegradability of Agro-Ecosystems Specific Pollutants, Ars Docendi Publishing House, 2008, **1**(1), 51-56.

Egemen Ö., *Çevre ve Su Kirliliği*, 3. Baskı, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, İzmir, 2000.

Ertürk M.D., Acarlar Gölünde Mikrobiyolojik ve Kimyasal Kirlenme Olaylarının Tespiti, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2005, 198365.

Ezemonye L.I.N., Ogeleka D.F., Okieimen F.E., Lethal Toxicity of Industrial Detergent on Bottom Dwelling Sentinels, *International Journal of Sediment Research*, 2009, **24**(4), 479-483.

Faust F., Kassie F., Knasmuller S., Boedecker R.H., Mann M., Sundermann V.M., The Use of the Alkaline Comet Assay with Lymphocytes in Human Biomonitoring Studies, *Mutation Research*, 2004, **566**(3), 209-229.

Ferguson G. A., Takane Y., *Statistical Analysis in Psychology and Education*, 6th ed., McGraw-Hill Ryerson Ltd., Montréal, Quebec, 2005.

Ferk F., Misik M., Hoelzl C., Uhl M., Fuerhacker M., Grillitsch B., Parzefall W., Nersesyan A., Micieta K., Grummt T., Ehrlich V., Knasmüller S., Benzalkonium Chloride (BAC) and Dimethyldioctadecyl-Ammonium Bromide (DDAB), Two Common Quaternary Ammonium Compounds, Cause Genotoxic Effects in Mammalian and Plant Cells at Environmentally Relevant Concentrations, *Mutagenesis*, 2007, **22**(6), 363-370.

Fiskesjö G., The *Allium* Test As a Standard in Environmental Monitoring, *Hereditas*, 1985, **102**(1), 99-112.

F. Rediguieri C., Porta V., S.G. Nunes D., M. Nunes T., E. Junginger H., Kopp S., K. Midha K., P. Shah V., Stavchansky S., B. Dressman J., M. Barends D., Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Metronidazole, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, **100**(5), 1618–1627.

Gedik O., Taşar N., Kiran Y., Cıva'nın *Allium sativum*' un Kök Ucu Hücreleri Üzerindeki Mitotik Etkileri, *BEU Journal of Science*, 2013, **2**(2), 135-140.

Gheorghe S., Lucaciu I., Paun I., Stoica C., Stanescu E., Ecotoxicological Behavior of some Cationic and Amphoteric Surfactants (Biodegradation, Toxicity and Risk Assessment), Editors: Chamy R., Rosenkranz F., *Biodegradation-Life of Science*, 1st ed, InTech, Rijeka, 83-114, 2013.

Gichner T., Plewa M.J., Induction of Somatic DNA Damage as Measured by Single Cell Gel Electrophoresis and Point Mutation in Leaves of Tobacco Plants, *Mutation Research*, 1998, **401**(1-2), 143-152.

Gichner T., Mukherjee A., Veleminsky J., DNA Staining with the Fluorochromes EtBr, DAPI and YOYO-1 in the Comet Assay with Tobacco Plants After Treatment with Ethyl Methanesulphonate, Hyperthermia and Dnase-I, *Mutation Research*, 2006, **605**(1-2), 17-21.

Gonzales N.V., Soloneski S., Reigosa M.A., Larramendy M.L., Genotoxicity of the Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic and a Commercial Formulation, 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Dimethylamine Salt I. Evaluation of DNA Damage and Cytogenetic Endpoints in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells, *Toxicology In Vitro*, 2005, **19**(2), 289-297.

Grover I.S., Kaur S., Genotoxicity of Wastewater Samples From Sewage and Industrial Effluent Detected by the *Allium cepa* Root Aberration and Micronucleus Assays, *Mutation Research*, 1999, **426**(2), 183-188.

Hamdy M.A.A., Hattori K., In Vitro Micropropagation of (*Vicia faba* L.) Cultivars 'Waza Soramame and Cairo 241' by Nodal Explants Proliferation and Somatic Embryogenesis, *Biotechnology*, 2006, **5**(1), 32-37.

Hartmann A., Agurell A., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A.R., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice R.R., Recommendations for Conducting the In Vivo Alkaline Comet Assay, *Mutagenesis*, 2003, **18**(1), 45-51.

Kihlman B.A., Root tips of *Vicia faba* for the Study of Induction of Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.*, 1975, **31**(6), 401-412.

Koca S., The Cytogenetic Effects of Sheffer A, A Liquid Fertilizer and Growth Regulator in Root Tip Cells of *Vicia faba* L., *C.B.U. Journal of Science*, 2008, **4**(1), 121-126.

Kong M.S., Ma T.H., Genotoxicity of Contaminated Soil and Shallow Well Water Detected by Plant Bioassays, *Mutation Research*, 1999, **426**(2), 221-228.

Kontek R., Kontek B., Osiecka R., Clastogenic and Mitodepressive Effects of the Insecticide Dichlorvos on Root Meristems of *Vicia faba*, *J. Appl. Genet.*, 2007, **48**(4), 359-361.

Kovalchuk O., Kovalchuk I., Arkhipov A., Telyuk P., Hohn B., Kovalchuk L., The *Allium cepa* Chromosome Aberration Test Reliably Measures Genotoxicity of Soils of Inhabited Areas in the Ukraine Contaminated by the Chernobyl Accident, *Mutation Research*, 1998, **415**(1-2), 47-57.

Kumaravel T.S., Vilhar B., Faux S.P., Jha A.N., Comet Assay Measurements: A Perspective, *Cell Biol. Toxicol.*, 2009, **25**(1), 53-64.

Lah B., Vidic T., Glasencnik E., Cepeljnik T., Genotoxicity Evaluation of Water Soil Leachates by Ames Test, Comet Assay and Preliminary *Tradescantia* Micronucleus Assay, *Environ. Monit. Assess.*, 2008, **139**(1-3), 107-118.

Lee R.F., Steinert S., Use of the Single Cell Gel Electrophoresis/Comet Assay for Detecting DNA Damage in Aquatic (Marine and Freshwater) Animals, *Mutation Research*, 2003, **544**(1), 43-64.

Liman R., Genotoxic Effects of Bismuth (III) Oxide Nanoparticles by *Allium* and Comet Assay, *Chemosphere*, 2013, **93**(2), 269-273.

Lin A., Zhang X., Zhu Y.G., Zhao F.J., Arsenate-Induced Toxicity: Effects on Antioxidative Enzymes and DNA Damage in *Vicia faba*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, **27**(2), 413-419.

Lovell D.P., Omori T., Statistical Issues in the Use of the Comet Assay, *Mutagenesis*, 2008, **23**(3), 171-182.

Maluszynska J., Juchimiu J., Plant Genotoxicity: A Molecular Cytogenetic Approach in Plant Bioassays, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 2005, **56**(2), 177-184.

Mancini A., Buschini A., Restivo F.M., Rossi C., Poli P., Oxidative Stress As DNA Damage in Different Transgenic Tobacco Plants, *Plant Science*, 2006, **170**(4), 845-852.

Marchesi J.R., Owen S.A., White G.F., House W.A., Russell N.J., SDS-Degrading Bacteria Attach to Riverine Sediment in Response to the Surfactant or Its Primary Biodegradation Product Dodecan-1-ol, *Microbiology*, 1994, **140**(11), 2999-3006.

Martin V.J., Green M.H.L., Schmezer P., Zobel B.L., De Meo M.P., Collins A., The Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay), A European Review, *Mutation Research*, 1993, **288**(1), 47-63.

Masakorala K., Turner A., Brown M.T., Toxicity of Synthetic Surfactants to the Marine Macroalga, *Ulva lactuca*, *Water Air Soil Pollut.*, 2011, **218**(1-4), 283-291.

Menke M., Meister A., Schubert I., N-Methyl-N-Nitrosourea-Induced DNA Damage Detected by the Comet Assay in *Vicia faba* Nuclei During All Interphase Stages Is Not Restricted to Chromatid Aberration Hot Spots, *Mutagenesis*, 2000, **15**(6), 503-506.

Menke M., Chen I.P., Angelis K.J., Schubert I., DNA Damage and Repair in *Arabidopsis thaliana* as Measured by the Comet Assay After Treatment with Different Classes of Genotoxins, *Mutat. Res.*, 2001, **493**(1-2), 87-93.

Migid H.M.A., Azab Y.A., Ibrahim W.M., Use of Plant Genotoxicity Bioassay for the Evaluation of Efficiency of Algal Biofilters in Bioremediation of Toxic Industrial Effluent, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, **66**(1), 57-64.

Minareci O., Öztürk M., Egemen Ö., Minareci E., Manisa Organize Sanayi Arıtım Tesisinin, Gediz Nehrinde Deterjan Kirliliğine Olan Etkilerinin Belirlenmesi, *C.B.U. Journal of Science*, 2008, **4**(1), 65-72.

Mishra K.K., Srivastava K., Cytogenetic Effects of Commercially Formulated Atrazine on the Somatic Cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2009, **93**(1), 8-12.

Moller P., Assessment of Reference Values for DNA Damage Detected by the Comet Assay in Human Blood Cell DNA, *Mutat. Res.*, 2006a, **612**(2), 84-104.

Moller P., The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2006b, **98**(4), 336-345.

Moraes D.S.L., Jordão B.Q., Evaluation of the Genotoxic Potential of Municipal Wastewater Discharged into the Paraguay River during Periods of Flood and Drought, *Environmental Toxicology*, 2001, **16**(2), 113-116.

Nielsen M.H., Rank J., Screening of Toxicity and Genotoxicity in Wastewater by the Use of the *Allium* test, *Hereditas*, 1994, **121**(3), 249-254.

Olive P.L., Banath J.P., Durand R.E., Heterogeneity in Radiation Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Using the Comet Assay, *Radiation Research*, 1990, **122**(1), 86-94.

Olive P.L., DNA Damage and Repair in Individual Cells: Applications of the Comet Assay Inradiobiology, *Int J Radiat Biol*, 1999, **75**(4), 395-405.

Özban N., Özmutlu Ö., *Mikropreparasyon Yöntemleri*, 3. Baskı, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basım Evi, İstanbul, 1994.

Özdemir S., *Yemeklik Baklagiller*, 1. Baskı, Hasad Yayıncılık, Adana, 2002.

Özek E., Tarımdan Kaynaklanan Çevre Kirlenmesi ve Simülasyon Çalışmaları, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1994, 34919.

Özkara A., Akyıl D., Eren Y., Erdoğan S.F., Potential Cytotoxic Effect of Anilofos by Using *Allium cepa* Assay, *Cytotechnology*, 2015, **67**(5), 783-791.

Patlolla A.K., Berry A., May L., Tchounwou P.B., Genotoxicity of Silver Nanoparticles in *Vicia faba*: A Pilot Study on the Environmental Monitoring of Nanoparticles, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2012, **9**(5), 1649-1662.

Pedrazzani R., Ceretti E., Zerbini I., Casale R., Gozio E., Bertanza G., Gelatti U., Donato F., Feretti D., Biodegradability, Toxicity and Mutagenicity of Detergents: Integrated Experimental Evaluations, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, **84**, 274-281.

Pettersson A., Adamsson M., Dave G., Toxicity and Detoxification of Swedish Detergents and Softener Products, *Chemosphere*, 2000, **41**(10), 1611-1620.

Qian Xiao-wei., Mutagenic Effects of Chromium Trioxide on Root Tip Cells of *Vicia faba*, *J Zhejiang Univ SCI*, 2004, **5**(12), 1570-1576.

Rank J., Nielsen M.H., Genotoxicity Testing of Wastewater Sludge Using the *Allium cepa* Anaphase-Telophase Chromosome Aberration Assay, *Mutation Research*, 1998, **418**(2-3), 113-119.

Sardaş S., Walker D., Akyol D., Karakaya A.E. Assessment of Smoking-Induced DNA Damage in Lymphocytes of Smoking Mothers of Newborn Infants Using the Alkaline Single-Cell Gel Electrophoresis Technique, *Mutat. Res.*, 1995, **335**(3), 213-217.

Sardaş S., Aygun N., Karakaya A.E., Genotoxicity Studies on Professional Hair Colorists Exposed to Oxidation Hair Dyes. *Mutat. Res.*, 1997, **394**(1-3), 153-161.

Saxena P.N., Chauhan L.K.S., Gupta S.K., Cytogenetic Effects of Commercial Formulation of Cypermethrin in Root Meristem Cells of *Allium sativum*: Spectroscopic Basis of Chromosome Damage, *Toxicology*, 2005, **216**(2-3), 244-252.

Shehata I.A., Al-Harbi H.F., Genotoxic Effect of Two Herbicides Glyphosate and Metribuzin on Mitosis in *Vicia faba L.*, *Saudia. J. Biol. Sci.*, 2003, **10**(2), 138-158.

Souza P.M.S., Corroque N.A., Morales A.R., Marin-Morales M.A., Mei L.H.I., PLA and Organoclays Nanocomposites: Degradation Process and Evaluation of Ecotoxicity Using *Allium cepa* as Test Organism, *J. Polym. Environ.*, 2013, **21**(4), 1052-1063.

Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F., Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2000, **35**(3), 206-221.

Tuğrul G., Gediz Nehir Sisteminde Anyonik Deterjan Kirliliğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 1992, 24290.

Türkoğlu Ş., Koca S., The Effects of Paraquat (Gramoxone) on Mitotic Division, Chromosomes and DNA Amount in *Vicia faba L.*, *C.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 1999, **21**, 49-56.

Türkoğlu Ş., Determination of Genotoxic Effects of Chlorfenvinphos and Fenbuconazole in *Allium cepa* Root Cells by Mitotic Activity, Chromosome Aberration, DNA Content, and Comet Assay, *Pestic. Biochem. Phys.*, 2012, **103**(3), 224-230.

URL-1: <https://www.itis.gov/>, (Ziyaret tarihi: 27.05.2018).

Wu Z., Yu D., Li J., Wu G., Niu X., Growth and Antioxidant Response in *Hydrocharis dubis* (Bl.) Backer Exposed to Linear Alkylbenzene Sulfonate, *Ecotoxicology*, 2010, **19**(4), 761-769.

Yalçın E., Çavuşoğlu K., Dönmez S., Kaymaz K., Özdemir G., Özgörür Z., Balcı D., Aslan B., Çakır M., *Vicia faba L.* (Fabaceae) Kök Ucu Hücrelerinde Fenol Tarafından Teşvik Edilen Sitotoksitenin Belirlenmesi. *Sdü Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 2008, **3**(2) 139-148.

Yıldız M., Arıkan E.S., Terzi H., Farklı Kimyasal Maddelerin Etkili Konsantrasyonlarının *Allium* Kök İnhibisyon Testi ile Belirlenmesi, *18. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Aydın, Türkiye, 26-30 Haziran 2006.

Yi H., Meng Z., Genotoxicity of Hydrated Sulfur Dioxide on Root Tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*, *Mutat. Res.*, 2003, **537**(1), 109-114.

Yüzbaşıoğlu D., Illoxan ve Racer Herbisitlerinin *Allium cepa* L. Kök Ucu Hücrelerinde Mitoz Bölünmeye ve Kromozomlara Etkileri, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2001, 114707.



KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Horozal A., Aksoy Ö., Bazı Deterjanların *Vicia faba* Üzerindeki Sitotoksik Etkileri, *1. Ulusal Bitki Biyolojisi Kongresi*, Bolu, Türkiye, 2-4 Eylül 2015.



ÖZGEÇMİŞ

26/04/1988 yılında İzmit'te doğmuştur. 2006 yılında İzmit Gazi Lisesi Yabancı Dil Ağırlıklı Fen Bilimleri Bölümünü tamamlamıştır. 2012 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü bitirmiştir. 2016 yılında Açık Öğretim Fakültesi İşletme Bölümünü tamamlamıştır. Halen Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD'de yüksek lisans eğitimini sürdürmektedir. Bilimsel çalışma olarak bir adet bildirisi mevcuttur.

