

**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNCİ BALIĞI'NDA (*Acanthalburnus microlepis*, De Filippi 1863)
SODYUM HIPOKLORİT'İN (NaOCI) GENOTOKSİK ETKİSİ VE
LC₅₀ DEĞERİ**

Pınar AKSU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç.Dr. Süleyman GÜL

2007

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans öğrencisi Pınar AKSU' nun yüksek lisans tezi olarak hazırladığı
“İNCİ BALIĞI'NDA (*Acanthalburnus microlepis*, De Filippi 1863) SODYUM
HIPOKLORİT'İN (NaOCl) GENOTOKSİK ETKİSİ VE LC₅₀ DEĞERİ” adlı
bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim
Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy.....ile kabul edilmiştir.

...../...../2007

	Adı Soyadı	İmza
Başkan	:Doç. Dr. Kadir ÖZCAN
Üye	:Yrd. Doç. Dr. Hüseyin GEY
Üye	:Yrd. Doç. Dr. Süleyman GÜL

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../2007.
gün ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Vahit ALIŞOĞLU
Enstitü Müdürü V.

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmanın tez konusu olarak seçiminde, projelendirilmesinde ve yürütülmesinde, bana gerekli laboratuvar ve burs olanakları sunan, yol gösteren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam, Yrd. Doç.Dr. Süleyman GÜL'e, Biyoloji Bölümü laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan, Fen-Edebiyat Fakültesi Dekanı ve Biyoloji Bölümü Başkanı sayın hocam, Prof. Dr. Arif BAYSAL'a çalışmalarımda elde ettiğim sonuçların istatiksel olarak yorumlanmasında yardımcı olan sayın hocam, Dr. Oktay ÖZKAN' a, tezimin yazımında ve yorumlanmasında emeği geçen Arş. Gör. Gökhan NUR' a ve yardımlarından dolayı arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Taylan Özgür KAYA' ya teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmamı maddi yönden destekleyen TÜBİTAK (104T283 no'lu proje)'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
RESİMLERİN LİSTESİ	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	vii
HARİTALARIN LİSTESİ	viii
GRAFİKLERİN LİSTESİ	ix
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	7
2.1. Dezenfektanlar	7
2.1.1. Dezenfeksiyonu etkileyen faktörler	8
2.1.2. Yüksek seviyeli dezenfektanlar	9
2.1.3.Orta seviyeli dezenfektanlar	9
2.1.4. Düşük seviyeli dezenfektanlar	10
2.2. Hipokloritler	10
2.2.1 Sodyum hipoklorit	10
2.3.Su ortamlarının kirlilik göstergesi olarak balıklarda sitogenetik analizler	11
2.3.1. Analiz yöntemleri	18
2.3.1.1. Kromozom tipi hataların belirlenmesi	18
2.3.1.2. Kromatid tipi hataların belirlenmesi	34
2.3.1.3. Anafaz hatası çalışmaları	38
2.3.1.4. Mikronükleus (M) çalışmaları	39
2.4. Araştırma örneklerinin alındığı alanın özellikleri	44
2.5. <i>Acanthalburnus microlepis</i> hakkında genel bilgiler	47
2.5.1.Familya: Cyprinidae	48
2.5.2. Cins: <i>Acanthalburnus</i>	48
2.5.3. Tür: <i>Acanthalburnus microlepis</i>	48

3. MATERYAL ve METOT	52
3.2. Deney materyali	52
3.3. Kimyasal maddeler ve çözeltiler	53
3.4. Mikronükleus testi	54
3.5. Letal dozun hesaplanması	55
3.6. İstatiksel analiz	55
4- BULGULAR	57
4.1. MN ile ilgili bulgular	57
4.2. LC ₅₀ ile ilgili bulgular	60
5- SONUÇ ve TARTIŞMA	65
6.KAYNAKLAR	72
7. ÖZ GEÇMİŞ	79

ÖZET

Balık eritrositlerindeki mikronükleus oluşumu kromozomal hasarların indikatörü olup çevresel kirlenmenin genotoksik potansiyelinin belirlenmesinde gittikçe daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Sodyum hipoklorit solüsyonu suda beyazlatıcı olarak bilinmektedir. Hipoklorit iyonları sıvı solüsyonlarda çok kararlı ve güçlü kimyasal oksidanttır. *Acanthalburnus microlepis* suyun her litresinde sodyum hipokloritin 0.05, 0.10, 0.25, 0.37, 0.50, 0.75 ve 1 mg/lt bulunan konsantrasyonlarına akvaryumda 6 gün maruz bırakıldı. Her bir konsantrasyonun bulunduğu denemelerde 10 balık kullanıldı. Etkileşime bırakılan her bir konsantrasyon düzeyinde mikronükleus oluşum frekansı saptandı. Kan örnekleme işlemi 36 saat, 72 saat ve 6.gün sonunda uygulandı. Kontrol gruplarının, pozitif ve negatif grupla karşılaştırılmasıyla mikronükleus oluşum frekansının arttığı tespit edildi. Sodyum hipokloritin LC₅₀ değeri 0,6343 mg/lt olarak hesaplandı. Kontrol grubunda ölüm oranı sıfırdır. Sonuçlar, sodyum hipokloritin *Acanthalburnus microlepis* ' de genotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler:Sodyum hipoklorit, *Acanthalburnus microlepis*, LC₅₀ değeri, mikronükleus, genotoksik.

ABSTRACT

Micronucleus formation in fish erythrocytes, as an indicator of chromosomal damage, is increasingly used to detect the genotoxic potential of environmental contaminants. Solutions containing sodium hypochlorite in water are known as bleach, hypochlorous acid, or NaOCl. The hypochlorite ions in aqueous solution are very stable and is a strong chemical oxidant. *Acanthalburnus microlepis*, exposed to sodium hypochlorite at concentrations of 0.05, 0.10, 0.25, 0.37, 0.50, 0.75 and 1 mg/lt per liter of water, were kept in an aquarium for 6 days. Ten fish were used in the experiments at each concentration level. The frequency of micronucleus formation was studied at each level of exposure. Blood sampling was carried out after 36 hours, 72 hours and 6th days. It was found that the frequency of micronucleus formation increased in comparison with that of the negative (tap water) and positive (10 mg/lt Benzene) control groups. The LC₅₀ value of sodium hypochlorite was calculated as 0.6343 mg/l. The rate of control mortality was zero. The results indicated that sodium hypochlorite is genotoxic to *Acanthalburnus microlepis*.

Key words: Sodium hypochlorite, *Acanthalburnus microlepis*, LC₅₀ value, micronucleus, genotoxic.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

MN	Mikronükleus
SCE	Kardeş kromatid değişimi
AGT	Ortalama generasyon zamanı
KKD	Kardeş kromozomlarda kromatid değişimi
AA-AH	Anafaz hataları
Ns	Önemsiz
LC	Letal doz

RESİMLERİN LİSTESİ

Sayfa no

Resim 1. Lambda-cyhalothrin'e maruz bırakılan <i>Garra rufa</i> 'da mikronükleus oluşumu gözlenmiş eritrositler	5
Resim 2. Örn: SCE frekansı tespiti	36
Resim 3. Çıldır gölü	45
Resim 4. İnci balığı (<i>Acanthalburnus microlepis</i> , Filippi 1863)	51
Resim 5. <i>A. microlepis</i> eritrositleri	64
Resim 6. <i>A. microlepis</i> eritrositi	64

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Sayfa no

Çizelge 2.1. İdeal bir dezenfektana ait özellikler	8
Çizelge2.2. Yüksek seviyeli dezenfektanlar	9
Çizelge 2.3. Orta seviyeli dezenfektanlar	9
Çizelge 2.4. Düşük seviyeli dezenfektanlar	10
Çizelge 2.5. Laboratuvar ve/veya şartlarında balık hücrelerinde kromozom hataları, kardeş kromatid değiştirme (SCE) veya mikronüklei'ye sebep olduğu ispatlanmış bazı kirleticilerin (genotoksikantların) etkileri	15
Çizelge 2.6. Pozitif kontrol madde örnekleri	20
Çizelge 2.7. Pozitif kontrol maddeleri örnekleri için kimyasallar	30
Çizelge 2.8. Balık kromozomları üzerinde genotoksik etkiler	33
Çizelge 2.9. Balık kromozomlarında SCE' ye sebep olan genotoksik etkiler	33
Çizelge 3.10. Akvaryumlarda kullanılan suyun fizikokimyasal özellikleri	56
Çizelge 4.11. <i>Acanthalburnus microlepis</i> ' te sodyum hipokloritin 36.saat 72. saat ve 6. gün sonundaki MN değerleri	59
Çizelge 4.12. <i>Acanthalburnus microlepis</i> ' te sodyum hipokloritin 24-48-72-96.saat sonundaki akut toksisitesi	61

HARİTALARIN LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Harita 1. Çıldır gölü haritası	47

GRAFİKLERİN LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Grafik 1. Deneme grupları, 36.saat, 72.saat ve 6. gün MN frekansları	59
Grafik 2. Deneme gruplarının 24-48-72-96.saat sonundaki LC(10-20-30-40-50-60-70-80-90) Değerleri	61

1. GİRİŞ

İnsan ve canlı yaşamı için hayati öneme sahip olan su kullanılabilir olması için tehlikeli kimyasallardan ve bakterilerden temizlenmelidir. Ayrıca derelerden ırmaklardan ve göllerden alınarak yerleşim yerlerindeki insanların kullanımına sunulan su belirli standartlara uymak zorundadır. Aksi durumda kullanılması tehlikeli sonuçlar doğurabilmektedir. Günümüzde teknolojinin gelişmesi, nüfus artışı gibi etkenlerden dolayı su kaynakları olan dereler, göller ve yeraltı suları aşırı kirlenme ile yüz yüze kalmaktadır. Yerleşim yerlerinin (şehir, kasaba, vs.) ve fabrikaların atık suları derelere veya göllere bağlanmaktadır.[1]

Atık sulardaki kimyasal maddeler ve organik bileşikler suda çözülmüş olan oksijenin miktarının azalmasına sebep olur. Bu da suda yaşayan bitki ve hayvanların ölüm oranlarını artırmaktadır. Bu tür sular daha koyu renge ve pis kokuya sahiptir. Hatta bazı göller veya derelerde aşırı kirlenme sonucu canlı yaşamı sona ermiş ve içerisinde atıklardan meydana gelen adacıklar oluşmuştur. Çiftçiler tarafından daha verimli ürün elde edebilmek için kullanılan gübreler, yağmur gibi etkenlerle yeraltı ve yerüstü sularına karışmaktadır. Yüksek oranda nitrat (NO_3) ve fosfat (PO_4) içeren gübreler suya karıştığında suda yosunların daha fazla üremesini sağlar bu da yosunların diğer canlılardan daha fazla oksijen kullanmasına sebep olur ve diğer canlıları tehdit eder. Bu tür sular pis kokulu ve kötü tatlı olurlar. [1]

Benzer olarak deterjanlar ve tarım ilaçları da su kaynaklarını önemli ölçüde kirletmekte olup canlı hayatını tehdit etmektedir. Ancak, bu kullanılan maddeler bakteriler tarafından parçalanabilir hâle getirilebilirse, kirlenme oranı azaltılabilir. Radyoaktif atıklarda gün geçtikçe tehlike oluşturmaktadır. Bu atıklar belirli şartlarda saklanmaktadır. Fakat bazı durumlarda kaza ile veya bilinçsiz bir uygulama ile tabiata ve yeraltı sularına karışmaktadır. Radyoaktif atıklar tarafından yayılan radyasyon ise canlılarda kanser ve mutasyonlara sebep olmaktadır. Fabrikalar genellikle dere veya göl kenarlarına kurulurlar çünkü soğutma ve diğer işlemler için suya ihtiyaç vardır. Soğutma amaçlı kullanılan dere veya göl suyu kimyasal olarak

kirlenmeden tekrar göle veya dereye döner. Fakat bu su biraz ısınmış olur. Meselâ, yaz aylarında fabrikaya yakın suların sıcaklığı 25°C civarındadır. Sudaki sıcaklık artışının iki olumsuz sonucu vardır. Birincisi, ısınan su içerisinde, çözülen oksijen miktarı azalır. İkinci sonuç ise, sıcaklık artışı ile sudaki maddelerin çürüme ve bozunma hızları artar. Bunun sonucu olarak çürüme de sudaki oksijeni tükettiği için, sudaki oksijen miktarı daha fazla azalır. Suda çözünen oksijen miktarının azalması su altı hayatını tehdit eder. Yerleşim yerlerinin atık suları arıtma istasyonlarından geçirildikten sonra tabii su kaynaklarına verilmekte, fabrikalara filtre ve arıtma tesisleri konmakta, tabiata zarar vermeyecek yeni ürünler elde edilmektedir. Bütün bunların yanında insanlar çevreyi koruma adına bilinçlendirilmektedir. Çünkü insanlar artık farkına varmıştır. Dünya bir tanedir ve onu koruyacak yine insanlardır [1].

Kirleticilerin etkileri öncelikle biyokimyasal ve moleküler seviyelerde görülür. Daha sonra ise, balıklar ve molluskalar gibi iyi birer akümülatör olan organizmaların dokularında sitolojik olarak gözlenebilen genetik değişikliklere sebep olurlar. Mutasyonlar, kromozom sayısı ve yapısındaki değişiklikleri (yani kromozom değişiklikleri veya anormalliklerini) kapsayan kromozom mutasyonları ve kromozom seviyesinde gözlenemeyen, fakat bireysel organizmalardaki fenotipik değişikliklerden anlaşılabilen gen mutasyonları olarak gruplandırılır [1].

Canlı vücudunun başlıca yapı taşı hücredir. Bir balığın vücudunda milyonlarca hücre bulunmaktadır. Bu hücrelerin her birinin çekirdeğinin içinde bulunan DNA molekülü, kendi eksenini etrafında kıvrılarak yükselen bir çift spiral yapıdadır. Mesela, bir insan vücudundaki bütün DNA moleküllerini çözerek arka arkaya dizesek, dünya ile güneş arasında 400 defadan fazla gidip gelinebilmektedir. Bir organizmaya ait bütün bilgiler DNA moleküllerinde 4 özel nükleotidin (A,T,G ve C) diziliş sırasına göre kodlanmıştır. Bir insana ait DNA molekülünde yaklaşık 3,5 milyar nükleotid yani 3,5 milyar harf bulunmaktadır. Diğer bir deyişle 46 kromozomlu bir insan hücresindeki DNA molekülleri "her cildi 20 000 sayfalık 46 cilt dev bir ansiklopediye" benzemektedir. DNA üzerindeki bu bilgiler gen adı verilen özel bölümlerde yer alır. Bir organizmanın vücudunda ise on binlerce gen bulunur ve her

bir organ farklı sayıda gen tarafından kontrol edilir. Mesela, yine insan vücudunda 50 000 den fazla gen bulunur ve bunlardan 29 930 tanesi beyinde görev yapar [2].

Gen denilen parçacıklardan oluşan ve kuşaktan kuşağa aktarılan madde "genetik madde" adını almaktadır. Genetik maddenin iki esas görevi;

1. Kendisine tıpa tıp benzeyen ya da kopyası olan maddeleri oluşturmak için replikasyon olayını gerçekleştirmek,

2. Enzimler ve hücre metabolizması için gerekli olan diğer moleküllerin sentezi ile bilgi aktarım görevini yerine getirmektir. Ancak, bir sonraki nesile "yaşam sırasında kazanılmış olan özellikler değil, yalnızca genlerdeki bilgiler " aktarılmaktadır.

Genetik (kalıtım bilimi), canlılarda bir önceki bireyden bir sonraki bireye neyin nasıl geçtiğini araştıran bir bilim dalıdır. Sitogenetik ise, kromozomları, bunların ayrışım ilkelerini incelemenin yanında fenotiple olan ilişkilerini de araştıran genetik dalıdır [2].

Geçmiş yıllardaki en önde gelen hastalık ve ölüm nedenleri enfeksiyonlar ve yetersiz beslenme olduğu için genetik etkenlere yeterince dikkat edilmemişti. Fakat özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sosyo-ekonomik konulardaki ilerleme ve tıp bilimindeki çok hızlı gelişmeler enfeksiyonları kontrol altına alırken, genetik hastalıkların üzerine daha fazla önem verilmesine neden olmuştur [2].

Bugün için kromozomlar doğru olarak numaralandırılıp (karyotiplenip) yapısal ve sayısal değişiklikleri kolaylıkla saptanabilmektedir. Kromozom elde etme ve kromozomları birbirinden ayırma tekniklerinin gelişmesi, özellikle bantlama tekniklerinin ortaya çıkışı sitogenetikte büyük atılımlara neden olmuştur. Sitogenetiğe olan ilginin artmasının bir başka nedeni ise, bilhassa insanlarda kongenital (nedeni çevresel ya da kalıtsal da olsa doğuştan var olan) hastalıkların doğumdan önce tanınmasıdır. Yine sonraki kuşakta daha az zarar vermesini sağlamak bakımından yapılan çalışmalar, yani "genetik danışmanlık" artık ayrı bir ilgi ve uygulama alanı olmuştur [2].

Balıklardaki kromozom çalışmaları da son yıllarda aktif bir araştırma sahası olmuştur. Bu konu birçok bilim adamının (taksonomici, balık bilimci ve toksikolog gibi) ilgisini çekmiştir [2].

Yetiştiricilikte hızlı büyüme yeteneğine sahip, hastalıklara karşı dayanıklı ve ortam şartlarına iyi uyum sağlayabilen balıklar tercih edilmektedir. Bu amaçla yapılan ışlah çalışmaları ise dünyada hızla devam etmekte ve önemli gelişmeler kaydedilmektedir. Avrupa ve bilimsel açıdan ileri diğer ülkelerde uygulanan st düzey genetik çalışmalara (rneğin; kromozom seti manipülasyonu ve gen transferi gibi) nazaran, ülkemizde kamu sektörü bu konuya teknik, eleman ve maddi yetersizliklerden dolayı yeterince eğilememiş, özel sektör ise bu konuda eğitilememiştir. Özellikle balıkçılık alanında çiftlik stoklarının zaten bilinmeyen genetik yapıları da, çiftlikler arası nakiller yoluyla iyice içinden çıkılmaz bir hal almıştır. Bunun sebebi, herhangi bir çiftlik diğer bir çiftlikten genetik özellikleri bilinmeyen yumurta, yavru ya da damızlık balık almakta ve daha sonra bunları kendi iftliğindekiler ile bilinçsizce iftleştirmekte ve en önemlisi gerçekleştirdiği bu işlemleri kaydetmemektedir [2].

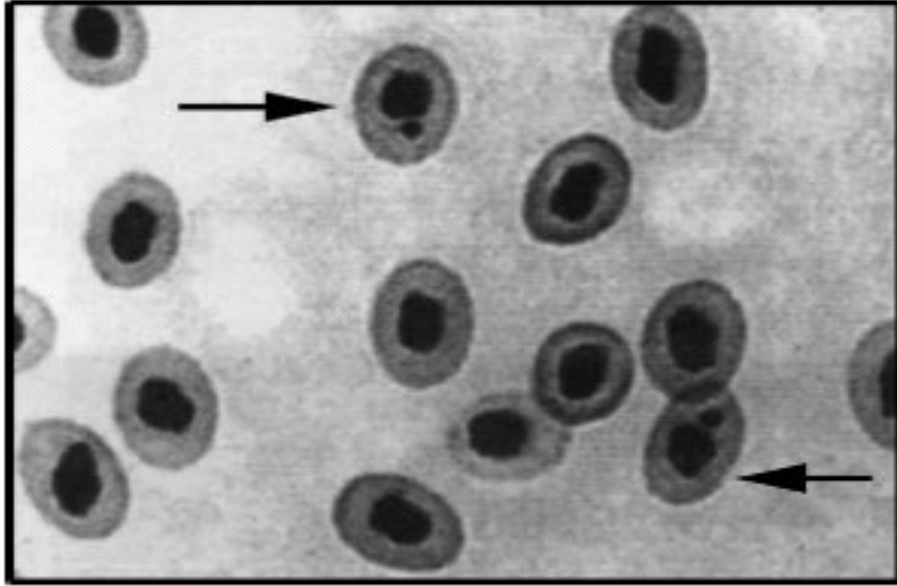
Hlbuki doğadaki ve çiftlik stoklarındaki genetik yapının bilinmesi; stok yönetimi çalışmalarında yeni stratejilerin geliştirilmesinde (gelecekte daha iyi stoklar elde edilebilmesi ve mevcut genetik kaynakların korunması çalışmalarında) ok yararlı olacaktır [2].

Kromozom analizleri yardımıyla balık popülasyonlarının genetik yapılarının belirlenmesi, popülasyonlar arası ve popülasyon içi (hatta bireysel) kromozom polimorfizminin tespiti hususunda yurt dışında yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur. Ne var ki, ülkemizde bu konuda yapılmış çalışma yok denebilecek kadar azdır. Oysa kromozom analizi;

-Balıkçılık yönetimi ve yetiştiricilikte (kromozom manipülasyonu teknikleri, poliploidliği teşvik etmek suretiyle veya Ginogenezis yardımıyla-kısırlaştırma,

yüksek popülasyonu önleme ve cinsi olgunluk yaşından sonra balıklarda büyüme ve hayatta kalma süresini artırmada),

- **Su kirliliği göstergesi olarak** balıklar su yoluyla taşınan kirleticileri metabolize edebilen, toplayabilen ve depolayabilen organizmalar olması nedeniyle ve endüstriyel atıklar(kanserojen ve mutajen kimyasallar) ve radyasyonun balık kromozomlarında hatalara sebep olmasından dolayı su kirliliğinin tespiti için balık analizleri kullanılabilir.



Resim 1 Lambda-cyhalothrin'e maruz bırakılan *Garra rufa*'da mikronükleus oluşumu gözlenmiş eritrositler (ok ile gösterilen) [3].

- **Kromozomal hastalıkların tespitinde**, örneğin insanlarda; Mongolizm (Down sendromu, Trizomi D13 sendromu, G21 trizomi sendromu), 13q eksiklik sendromu, Turner sendromu, Klinefelter veya XXY sendromlarının belirlenebilmesinden,

- **Filogenetik ilişki**, evrimsel ilişkileri ortaya koyabilmesinden dolayı kullanılabilir. Ancak balıklarda kromozomal incelemeler (özellikle kromozom bantlama çalışmaları) insanlardaki kadar ileri düzeye ulaşmadığından evrim konusundaki bilgiler tartışmalıdır.

Bu çalışmanın amacı, yaygın olarak kullanılan NaOCI (amaşır suyu)'nin Kars bölgesinde *A.microlepis* türünde akut LC₅₀ değerinin belirlenmesi ve oluşturduğu kromozomal hasarın genotoksik etkisinin *A.microlepis*'in periferal eritrositlerinde mikronükleus oluşumunun saptanması ile açığa çıkarılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dezenfektanlar

Mikroorganizmaların, tüm canlılar gibi uygun ortamlar bulduklarında beslenerek çoğaldıklarını, toprak, hava, insan vücudu ve tüm çevremizde yer aldıklarını biliyoruz. Tıbbi ve cerrahi girişimler sırasında mikroorganizmaları tanımlamak amacıyla üretmek istediğimizde, kullanacağımız araç-gereç, besiyeri gibi ortamların mikrop taşımamasını isteriz. Ayrıca içtiğimiz suyun, tükettiğimiz yiyeceklerin ve içeceklerin hastalık yapıcı mikroplardan uzak olması gerekir. Ameliyathane, diyaliz, yoğun bakım, transplantasyon ve yeni doğan bebek ünitelerinin de hava ve donanım malzemelerinin belirli standartlara uyması söz konusudur. Dirençli mutantlar oluşturabilen, çevre şartlarına uyan sporlu şekillere dönüşebilen mikroorganizmaların, istenmediği durumlarda tamamen veya kısmen yok edilmesinin gerekliliği ortaya çıkmaktadır [4].

Mikroorganizmaları etkisiz hale getirmek veya yok etmek için antiseptik, dezenfektan ve sterilanların doğru seçimi ve prosedürlerinin doğru bir biçimde uygulanabilmesi hastanelerde etkili bir infeksiyon kontrol programının en önemli parametrelerinden biridir. Nesnelere veya canlı dokulardan patojen mikroorganizmaların temizlik, dezenfeksiyon, sterilizasyon ve/veya antisepsi ile uzaklaştırılması işlemi dekontaminasyon olarak tanımlanır. Sterilizasyon, mikrobiyal yaşamın tüm formlarının fiziksel veya kimyasal yöntemler uygulanarak tamamen yok edilmesidir. Dezenfeksiyon ise cansız nesnelere üzerinde bulunan potansiyel olarak patojen mikroorganizmaları elemine eden, genellikle endosporları etkilemeyen, hastanelerde sıklıkla dezenfektan adı verilen kimyasal maddelerle, bazen de mekanik temizlik ve ısı uygulamaları ile gerçekleştirilen bir yöntemdir [4].

İngiliz Standartları Enstitüsü (BSI) dezenfeksiyonu açıklarken söz konusu cansız nesnelere üzerinde veya ortamdaki tüm mikroorganizmaların ölmesinin gerekmediği ancak kullanım amacına uygun olarak miktarların kabul edilebilir bir seviyeye düşürülmesinin gerekli olduğu bir işlem olarak ifade edilmiştir. Amaçlanan dezenfeksiyon seviyesi ise sağlığa ve nesnelere zararın olmadığı bir seviyedir. Dezenfektan, dezenfeksiyon işleminde kullanılan kimyasal maddelerdir. Bunların

belirli konsantrasyonlarıyla 30 dakikadan kısa süre temas, genellikle bakteri sporları hariç tüm mikroorganizmaları öldürebilmektedir. Bu ürünlerin benzer konsantrasyonları ile özellikle bakteriyel ve fungal sporlar dahil tüm mikrobiyolojik formları 6–10 saatlik uygulama sonrası tahrip eden kimyasal maddeler ise kimyasal sterilanlar olarak tanımlanır. Germisid ise, dezenfektan ile benzer bir anlam taşımaya rağmen, hem canlı dokuya, hem de cansız nesnelere uygulanabilen kimyasal ajanlar olarak ifade edilir. Sonuna sid eki ilavesi ile ön ekte belirtilen mikroorganizmayı yok eden bileşikler ifade eder: Örneğin, tüberkülosid, bakterisid, virusid, fungusid, sporosid [4].

2.1.1. Dezenfeksiyonu Etkileyen Faktörler

Sterilizasyon ve dezenfeksiyonu etkileyen faktörlerin iyi bilinmesi de, bu konudaki doğru seçim ve uygulamayı sonuçta infeksiyon riskini minimize etmeyi sağlar. Bunlar; dezenfektanın tipi, kullanım konsantrasyonu, temas süresi, ortamın pH'si, ısı, ortamda organik maddelerin varlığı ve miktarı, nesnenin yapısı, nispi nem ve suyun sertliği ile mikroorganizmanın yapısı, miktarı ve üreme periyodu gibi mikroorganizmaya bağlı faktörlerdir. Bunlardan mikroorganizmayı çevreleyen kan, mukus, serum, dışkı, doku artıkları ve benzeri organik artıklar dezenfeksiyonu olumsuz yönde etkileyen en önemli faktörleri oluşturur. Dezenfeksiyon veya sterilizasyona maruz kalan nesnenin düzgün, porsuz bir yapıya sahip olması etkiyi artırırken yüzeylerinde çatlak, por veya eklentinin varlığı uygulamayı olumsuz yönde etkiler [4].

Çizelge 2.1. İdeal bir dezenfektana ait özellikler

- Tüm mikroorganizmaları öldürebilmelidir.
- Stabil olmalıdır.
- Hızlı etki etmelidir.
- Toksik olmamalıdır.
- Nötral pH' de suda çözünebilmelidir.
- Renksiz ve kokusuz olmalıdır.
- Herhangi bir pH' de aktif olabilmelidir.
- Uygulanacağı eşyaya zarar vermemelidir.

- Sıradan temizlik araçları ile geçimsiz olmamalıdır.
- Çevreye zarar vermemelidir.
- Organik ajanlarla aktivitesi kaybolmamalıdır.,
- Ucuz ve kullanımı kolay olmalıdır.

2.1.2. Yüksek Seviyeli Dezenfektanlar

Genellikle bakteriyel endosporlar hariç mikroorganizmaların tümünü >20 dakikada öldüren dezenfektanlar bu gruba girer. Ayrıca kimyasal sterilanlar olarak bilinen az sayıdaki dezenfektanlar 6–10 saat gibi uzun uygulama süresi gerektirmekle birlikte uygulama sonrası bakteriyel endosporları da öldürebildiklerinden yüksek seviyeli dezenfektanlar olarak değerlendirilmektedir. Bunlar arasında glutaraldehid, formaldehid, sodyum hipoklorit, perasetik asid ve hidrojen peroksit yer alır [4].

Çizelge 2.2. Yüksek Seviyeli Dezenfektanlar

Dezenfektan	Kullanım Konsantrasyonu
Glutaraldehid	% 2
Formaldehid	% 3–8
Sodyum hipoklorit	1000 ppm serbest klor
Perasetik asid	≤%1,%0,001-0,2
Hidrojen peroksit	%3–6 veya %6–25

2.1.3. Orta Seviyeli Dezenfektanlar

Bu grup, bakteri endosporları hariç tüberküloz basili ve diğer mikroorganizmalara ≤10dakikada etkili dezenfektanları kapsar. Sıklıkla kullanılanlar ve kullanım konsantrasyonları çizelge 3’te gösterilmiştir [4].

Çizelge 2.3. Orta Seviyeli Dezenfektanlar

Dezenfektan	Kullanım Konsantrasyonu
Etil veya izopropil alkol	% 60–90
Fenol ve fenol bileşikleri	% 0,4–5
İyodoforlar	30–50 ppm serbest iyot

2.1.4. Düşük Seviyeli Dezenfektanlar

Bakteri endosporları ve tüberküloz basiline etkili olamayan, vejetatif bakterilerin çoğunu, bazı mantarları ve uygun bir sürede (≤ 10 dakika) bazı virüsleri öldürebilen dezenfektanlardır. Uygulamada sıklıkla kullanılan bu grup dezenfektanlar ve kullanım konsantrasyonları çizelge 4'te yer almaktadır [4].

Çizelge 2.4. Düşük Seviyeli Dezenfektanlar

Dezenfektan	Kullanım Konsantrasyonu
Etil veya izopropil alkol	<% 50
Fenol veya fenol bileşikleri	% 0,4-5
İyodoforlar	30-50 ppm serbest iyod
Sodyum hipoklorit	100 ppm serbest klor
Dört değerli amonyum bileşikleri	

2.2. Hipokloritler

Bunlar en önemli olanlardır; başlıca renk ağartma ("renk ağartıcı klorürler") işlerinde kullanılır. Bunlar, dayanıksız tuzlar olup, havada bozulurlar ve zayıf asitlerle temasta dahi hipoklorit asiti verirler. Hipoklorit asit, içerdiği kloru süratle bırakmasından ötürü, çok kuvvetli bir oksidasyon ve renk ağartma unsurudur [5].

2.2.1 Sodyum Hipoklorit

Sodyum hipoklorit, yaklaşık 100 yıldan fazla zamandır dezenfektan olarak kullanılmakta olup, birçok mikroorganizma üzerine hızlı etkili bir ajan özelliği taşımaktadır [6]. ($\text{NaClO} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$). Sulu solüsyonlar halinde hazırlanan bu ürün, bugün ticarete "Javel suyu" namıyla anılmaktadır. Sodyum hipoklorit, sulu solüsyon halindeki sodyum klorürün elektrolizi ile veya sodyum sülfat yahut sodyum karbonatın kalsiyum hipoklorit üzerine olan tesiri ile yahut sodyum hidroksitin (kostik sodanın) klorla muamele edilmesi suretiyle elde edilir. Bu tuz, suda çok iyi çözünür, susuz halde bulunmaz; nispeten dayanıksız ve ısı ve ışığa karşı hassastır. Sodyum hipokloritin sulu çözeltileri renksiz veya sarımtırak renkte olup, klor kokusundadır. Genellikle, içinde, az miktarda safsızlık olarak, sodyum klorür bulunur. Bitkisel liflerin ve kağıt hamurunun rengini ağartmada, herhangi bir yerin dezenfekte edilmesinde, suyun arıtılmasında ve hidralizinin hazırlanmasında

kullanılır. Ayrıca %12.5 - %25 oranında aktif klorin gazı içeren bir solüsyon olup; evsel, endüstriyel ve bilimsel araştırma alanlarında kullanımının yanı sıra biosit özellikleri ile ilgili olarak biyomedikal uygulamalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir [7]. Klorin ve klorin içeren ajanlar geniş ölçüde dezenfektan olarak kullanılır. Bunlardan başka, havuz dezenfektanı olarak, fotoğrafçılıkta antihalojen neviden olan camların süratle gelişmesinde ve antiseptik olarak tıpta da kullanılmaktadır (bunun borik asit ile olan karışımı "Dakin çözeltisi" olarak bilinir) [5]. Sodyum hipoklorit su ve atık sulara eklendiğinde, protein ve nükleotid bazlarında dâhil olduğu biyolojik materyalle kolayca reaksiyona girerek çeşitli organik bileşiklerin oluşumuna neden olur, ki bu bileşikler çoğunlukla lipofilik, dirençli ve akuatik çevre için toksik özelliklere sahiptir [7]. Sodyum hipoklorit medikal alanda ilk olarak 1826 yılında kullanılmaya başlamıştır. Bu günlerde sodyum hipokloritin biyomedikal kullanımı bakteri, virüs ve funguslara karşı yüksek biosit etkisinden dolayı özellikle lokal yüzey dezenfeksiyonu olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra hastanelerde medikal tanı, dezenfeksiyon, araştırmalarda, ilaç sanayinde de kullanılmaktadır. Ancak dikkat çeken yaygın bir kullanım alanı atık suların ve yüzey sularının dezenfeksiyonu amacıyla kullanımınıdır [7].

2.3. Su Ortamlarının Kirlilik Göstergesi Olarak Balıklarda Sitogenetik

Analizler

Balıkların içinde bulunduğu doğadaki bazı hayvanlardaki kromozom anormallikleri (hataları), petrokimyasal ürünler ile kirlenmiş olduğu bilinen bölgedeki klastojenik (balık kromozomlarında yapısal değişikliklere sebep olan) kimyasalların varlığının ve faaliyetlerinin iyi bir göstergesi olarak kullanılabilir. Polinükleer aromatik hidrokarbonlar (PAH), çok kanserojenik olan türevlerine metabolize edilebilirler. İyi bilinen bir örnek olarak, molekül üzerindeki özel mevkilerde oksijenin metabolik ilavesiyle bir kanserojene aktive edilebilen bir prokanserojen olan benzo(a)pyrene verilebilir. PAH, genellikle pişirme fırınlarına sahip çelik imalathanelerinde ve petrokimyasal endüstriler ve doğal orman yangınlarından dolayı doğaya girerler. PAH kirliliği, su biotasındaki tümörlerin artışıyla anlaşılabilir. Ayrıca, kanserojenik kimyasalların çoğu, metabolik olarak aktive edilmiş olmalıdır. Bu nedenle, her hangi

bir balığın bir kimyasalın aktif formda bir prokanserojen ve/veya promotajen dönüştürme yeteneği bilinmelidir.

DNA hasarının birçok tipi, kromozomlarda değişikliklere sebep olan sudaki mutajenler tarafından da etkilenmiş olabilir. Kimyasalların mutajenik etkileri, DNA sentezi için habercileri tedarik ederek nükleotid birleştirmedeki bir dengesizliğin başlaması sayesinde meydana gelebilir. Daha sonra genetik değişiklikler oluşabilir. Kromozom hatalarının belirlenmesi, sudaki mutajenik maddelerin görüntülenebilmesi için kabul edilebilir bir parametredir.

Ayrıca, balıkların genetik materyali, farklı yollarla iyonize radyasyon tarafından da etkilenmiş olabilir. Yüksek dozlardaki iyonize radyasyonun kromozom hasarına sebep olduğu bilinmektedir. Nükleer enerjisindeki artış, iyonize radyasyonların kanserojenik ve mutajenik etkilerinin artmasına neden olduğu görülmüştür. Çernobil benzeri radyasyon kazalarının sonuçlarının incelenmesi sadece fiziksel ölçümlerle sınırlandırılmamalıdır, zira biyolojik metotlarda kullanışlı olabilir.

Işınlama (İrridation, röntgen ışınlarına tabi tutma), eskiden beri jinogenesis ve androgenesis üretmek için balık embriyoları ve gametlerinde kullanılmaktadır [8–10]. Işınlamanın canlılar üzerine etkisini gözlemlemek için deneylerde balık kromozomlarının kullanılabilceğini önerilmektedir. Bu deney, uygun bir kromozom setine sahip bir balık türünde “Kromozom Hataları (AB Anafaz hataları), Kardeş Kromotit Değiştirme (SCE) ve Mikronükleus (M)” oluşuna bakılarak yapılabilir.

Memeli ve özellikle insan sitogenetiğindeki başarılı çalışmalar, benzer çalışmaların sitogenetik teknikler kullanılarak değişik genotoksik faktörlerin balıklar üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde de kullanılmasını düşündürmüştür.

Çevre ile ilgili olarak mutajenlik ve kanserojenlik konusunda çok az eserin neşredilmesi ve hükümetin yeterince ilgilenmemesinden dolayı, doğadaki ve çiftliklerdeki balıklar, daha şimdiden insan sağlığını etkileyebilen endüstriyel atık

ürünler gibi kontrol edilmemiş yüksek seviyede kanserojenik ve mutajenik kimyasallara maruz kalmaktadırlar.

İn vivo ve in vitro mutajenite testlerinin amacı, hücrelerde yapısal kromozom hatalarına sebep olan amillerin belirlenmesidir. Kromozom mutasyonları ve ilişkili olaylar, insanlarda birçok genetik hastalığın sebebidir. Ayrıca, onkogenlerde ve vücut hücrelerinde tümör supressör genlerinde değişmeler sonucu oluşan kromozom mutasyonlarının ve ilişkili olayların insanlar ve deney hayvanlarında kanser oluşumuna sebep olduğu hakkında birçok delil vardır. Şayet, genotoksik kimyasallara maruz kalınması sonucu oluşan kalıtsal hastalıklar ve kanser vakaları balık tüketimi sonucu oluşmuş ise, yenen balıkların genotoksinlere maruz bırakılmış olduğu düşünülebilir.

DNA molekülünün her canlıda benzer şekilde olması sebebiyle, canlı organizmaların bir grubu için genotoksik olan bir amil, diğer gruplar içinde genotoksiktir [11].

Balıklardan; besin zincirinin en üst seviyede olmaları, solunum için büyük miktarlarda suya ihtiyaç duymaları, su ile taşınan kirleticileri metabolize edebilen ve depolayabilen sucul omurgalı organizmalar olmalarından dolayı sulardaki mutajenik ve/veya kanserojenik potansiyelin tespiti için çok önemli indikatör organizmalar ve mükemmel bir materyal olarak faydalanılabilir. Hemen belirtmek gerekir ki, in vitro mutajenlerin hepsinin kanserojenik olmadığı kaydedilmeli, bir balık mutagenesis testinde, in vitro ve in vivo olarak incelenmiş etkiler arasında farklılıklar göz önüne alınmalıdır.

Balık hücreleri üzerinde bazı mutajenik ve/veya kanserojenik kimyasalların genotoksik etkilerinin belirlenmesi çalışmalarında; a) Çalışmalar doz-cevap tarzında yapılmalıdır. b) Aynı kimyasalın aynı dozuna aynı familyanın (*Cyprinidae*) farklı türleri arasında her zaman farklı tepkilerin olduğu dikkate alınmalıdır [12]. c) Önceden çalışılmış kimyasalların genotoksikliği hakkında güvenilir sonuçlar elde etmek istendiğinde, negatif ve pozitif kontroller de yapılmalıdır. d) Bazı kirleticilerin genotoksikliği hakkında çok daha güvenilir sonuçlar için, en az 3-5 farklı balık türü

üzerinde deneyler tekrarlanmalıdır. e) Söz konusu kirleticiler hakkında daha iyi bir bilgi sağlamak için, diğer hayvan, bitki ve insan hücrelerinden elde edilmiş sonuçlar ile karşılaştırılmalıdır [13–20].

Balıklar, sadece sitotoksikolojik ve farklı genetik çalışmalar için değil, biyokimyasal ve fizyolojik araştırmalar için de deneysel laboratuvar çalışmalarında önemli bir deney hayvanı olarak kullanılabilir. Ne var ki, genotoksik etkilerin çalışılması için balık hücrelerinin kullanılması ancak son yıllarda keşfedilmiştir. Bununla beraber, genotoksik araştırmalarda balık kromozomlarının kullanımı, balıkların omurgalıların en geniş birbirinden çok farklı bireylerden meydana gelmiş grubu oluşturmasına rağmen çok az çalışılmıştır.

Maalesef, oldukça küçük ve çok sayıda kromozomlara sahip olmaları, memelilere göre mitotik indeksin düşük olmasından dolayı az sayıda balık türü üzerinde sitogenetik çalışma yapılmıştır. Erken müdahale sistemi ile incelenen suyun genotoksik aktivitesi hakkında bize bilgi temin etmesi amacıyla; kromozomal hata çalışmaları için az sayıda büyük kromozomlara sahip ve karyotipleri belli balık türlerinin seçilmesi uygundur.

Ayrıca, ucuz olmaları, elde edilmeleri ve bakılmalarının kolay olmaları, küçük bir alan ve az sayıda ekipmana ihtiyaç duymaları ve güvenilirlik açısından çok sayıda balığın kullanılabilmesi gibi avantajlarından dolayı bazı balık türleri bu tip genotoksik çalışmalar için kullanılabilirler [21].

Çevre kirliliğinin çevreyi paylaşan canlılar üzerindeki olumsuz etkileri, bizleri su ortamı üzerinde endüstriyel ve diğer atıkların dolaylı veya dolaysız etkilerini araştırmaya zorlamaktadır. Biz bu bölümde, söz konusu alanda şimdiye kadar yapılmış çalışmaları değerlendirdik ve laboratuvar ve saha şartlarında su örneklerinin mutajenik ve/veya kanserojenik potansiyelinin çalışması için mükemmel bir materyal olarak balıkları önerdik. Aşağıdaki çizelgede (çizelge2.5.), şimdiye kadar laboratuvar ve/veya saha şartlarında balık hücrelerinde kromozom hataları, kardeş kromotit

değişirme (SCE) veya mikronüklei'ye sebep olduğu ispatlanmış bazı kirleticilerin (genotoksikantların) etkileri hakkında bilgi verilmektedir.

Çizelge 2.5. Laboratuvar ve/veya şartlarında balık hücrelerinde kromozom hataları, kardeş kromatid değişirme (SCE) veya mikronüklei'ye sebep olduğu ispatlanmış bazı kirleticilerin (genotoksikantların) etkileri [22].

Balık adı	Kirleticiler	Miktar	Uygulama	Hücr.Tipi	Genot.Etk	Kaynak
<i>Cyprinus Carpio</i>	Alfatoxin B1	80 mg /kg	i.p.	Eritrosit	M	Al-Sabti,1986
		300mg/kg	"	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1985
	Benzidine	80 mg/kg	"	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1985
	Benzo(a)pyrne	"	"	Eritrosit	M	" ,1986
	20Methylcholanthrene	"	"	Eritrosit	M	" ,1986
<i>C. idella</i>	Alfatoxin B1	80 mg/kg	i.p.	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1986
	Aroclour(1254)	300 mg/k	"	Eritrosit	M	" ,1985
		"	"	Böbrek	CA	" ,1986
	Benzidine	80 mg/kg	"	Eritrosit	M	" ,1986
	Benzo(a)pyrne	"	"	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1985
	20Methylcholanthrene	80 mg/kg	"	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1986
<i>Tinca tinca</i>	Alfatoxin B1	80 mg /kg	i.p.	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1985
	Aroclour(1254)	300mg/kg	"	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1985
	Benzidine	80 mg /kg	i.p.	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1985
	Benzo(a)pyrne	"	"	Eritrosit	M	" ,1986
		"	"	Böbrek	CA	" ,1986
	20-Methylcholanthren	80 mg/kg	"	Eritrosit	M	" ,1986

	e					
		"	"	Böbrek	CA	" ,1985
<i>O. mykiss</i>	9-Aminoacripe	1µg/ml	Maruz b.	Gonad	CA	Kocan c ark.1982
	Benzene	500mg/kg	İ.p.	Böbrek solung.	CA	AlSabti at all1984
	Crude Oil	0.6ml/l	"	Böbrek solung.	CA	Smith&Le moline
	Decamethrine	0.2ml/l	"	Böbrek solung.	CA	Al- Sabti,1985
	Detergent	10µg/ml	İ.p.	"	"	" ,1985
	Malathion	0.2mg/l	"	"	CA	AlSabti at all1984
	3- Methylcholanthren e	20µg/ml	"	Gonad	"	Al- Sabti,1985
	Neguvon	1 mg/l	"	Böbrek solung.	"	Kocan c ark.1982
	Phenol	0.6ml/l	"	"	"	Al- Sabti,1985
	Polyethylene glycol	1 ml	"	Yüzgeçler	Triploi	Ueda at all1986

<i>Umbra limi</i>	Benzo(a)pyrne	50µg/g	İ.p.	Eritrosit	M	Metcalf, 1988
	Ethyl methane sulphonate	100µg/g	"	Eritrosit	M	" ,1988
	Benzo(a)pyrne	0,1µg/l	"	"	"	Hoftman at all,1981
	Ethyl methane sulphonate	200mg/l	"	Eritrosit	M	Hoftman at all,1982
	Rhine ırnak suyu	3-11 gün	"	Solungaç lar	CA	Priene ark,1987
		"	"	Solung ve tes.	SCE	Alink at all1980
<i>Ameca splendens</i>	5-Bromodeoxyuridie	4.6g/ml	"	Embriyo	SCE	Barker ve Rackham
	MNNG	"	"	"	"	"
	Methyl methane sulphonate	0.26µg/ml	"	"	"	"
	Mitomycin-C	0.18µg/ml	"	"	"	"
<i>Esox lucius</i>	Caesium-137	Göller	"	Eritrosit	M	Al-Sabti,1991
<i>I. nebulosus</i>	Benzo(a)pyrne	50µg/g	İ.p.	"	"	Metcalf, 1988
	Ethyl methane sulphonate	100µg/g	"	"	"	"
<i>Parophrys vetulus</i>	Benzo(a)pyrne	5µg/g	"	Yüzgeç, d alak, böbr .lökost.	SCE	Stromberg ark.1981
<i>G. lineatus</i>	US coast	Saha	"	Eritrosit	M	Hose at all,1987, Carrasco at all,1990

2.3.1. Analiz Yöntemleri

2.3.1.1. Kromozom Tipi Hataların Belirlenmesi

Yapısal kromozom hatalarının iki tipini (kromozom tipi ve kromotit tipi) kapsamaktadır. Poliploidlikteki bir artış, kimyasal maddenin sayısal hatalarda oluşturma potansiyeline sahip olacağını gösterir. Kimyasal mutajenlerin çoğu, kromotit tip hatalar oluşturur. Ancak kromozom tipi hatalar meydana gelebilir.

Kromozom mutasyonları ve ilişkili olaylar birçok genetik hastalığın sebebini oluşturur. Ayrıca “onkogen” lerde ve tümör engelleyici genlerde değişikliklere yol açan kromozom mutasyonları ve ilgili olayların insanlarda deneysel hayvanlarda kanser oluşmasına sebep olduğu hususunda çok önemli deliller bulunmaktadır. Kromozom hatası testleri in vivo ve in vitro olarak iki tarzda gerçekleştirilebilir [23].

İn-vivo kromozom hatası testi

İn-vivo kromozom hatası testi, türler arasında ve dokular arasında değişiklik göstermekle birlikte, özellikle in vivo metabolizma, farmakinetik ve DNA eşleme işlemi ile ilgili faktörlerin önem kazandığı mutajenik riski tayin etmek için uygulanır. Ayrıca, bir in vitro test yardımıyla belirlenmiş mutajenik bir etkinin daha fazla araştırılması içinde kullanışlıdır. Ancak, ulaşamayacağı test maddesinin veya bir reaktif bir metabolitenin hedef (kullanılacak) dokuya uzanamayacağı hususunda delil varsa, bu testi kullanmak doğru değildir. Böyle bir teste kullanılacak doku, kolaylıkla izole edilebilen ve işleme tabi tutulabilen ve hızlı hücre döngüsüne sahip hücrelerden oluşması gerekir.

Bu metot hayvanların uygun bir yol ve süre ile test maddesine maruz bırakılmasına ve bu sürenin sonunda öldürülerek hücrelerinin kromozomal hasar yönünden incelenmesi prensibine dayanır. Ancak, öldürmeden önce hayvanlar metafazda durdurma amili (örneğin; kolşisin ve kolsemid) ile muamele edilirler. Daha sonra kromozom preparasyonları yapılır, boyanır ve kromozom hatası olup olmadığını belirlemek amacıyla metafaz hücreleri analiz edilir [23].

Metot:

Preparasyon

Hayvan Seçimi;

Genellikle genç ve sağlıklı hayvanlar kullanılır. Çalışmanın başlangıcında, deney hayvanlarının ağırlık değişimi minimal olmalıdır ve her bir cinsiyet için kendi ağırlığının \pm %20'sini geçmemelidir.

Muhafaza ve beslenme şartları:

Deney hayvanlarının tutulduğu ortamın sıcaklığı balık türüne göre uygun olan değeri \pm 2'yi aşmamalıdır. Yapay aydınlatma yapılmalı ve 12 saat aydınlatılıp 12 saat karartılmalıdır. Beslenme amacıyla uygun yemler kullanılabilir. İn vivo kromozom hatası testi yapılacağı zaman besleme, test maddesinden uygun miktarda yeme karıştırılarak yapılmalıdır. Hayvanlar teker teker ya da aynı cinsiyete bağlı küçük gruplar halinde muhafaza edilmelidir. Genç ve sağlıklı bireyler, kontrol ve muamele gruplarına ayrılmalı, balıklar markalanmalı ve en az 5 gün laboratuvar şartlarına adaptasyonu sağlanmaktadır.

Doz ayarlaması:

Katı test maddesi (şayet gerekli ise) eritilmeli veya uygun çözücülerde veya aletler içerisinde süspansiyon edilir ve sulandırılır. Sıvı test maddeleri balığa direkt olarak veya sulandırılarak uygulanabilir. Yeni hazırlanmış test maddeleri depolama süresini aşmadıkça kullanılabilir.

Test şartları:**Çözücü/alet:**

Çözücü/alet, kullanılmış doz seviyelerinde toksik etkiler üretmemeli ve test maddeleri ile kimyasal reaksiyona girme şüphesi taşımamalıdır. Şayet çok iyi tanınan çözücü /aletlerden başka biri kullanılacaksa, bunların uygunluğunu gösteren veriler varsa dikkate alınmalıdır. Kullanımın uygun olup olmadığına karar verildikten sonra, öncelikle sulu bir çözücü/aletin kullanımına karar verilir.

Kontroller:

Uygun pozitif ve negatif (çözücü/alet) kontrolleri, her bir testteki her bir cinsiyeti kapsamaludur. Test maddeleri ile muamele için olanlar hariç, kontrol gruplarındaki balıklar, muamele edilmiş gruplardaki hayvanlara özdeş bir usulde ele alınmalıdır.

Pozitif kontroller, mevcut şartlar üzerinde belirlenebilir bir artış vermesi beklenen maruz bırakılma seviyelerinde in vivo yapısal kromozom hataları üretmelidir. Pozitif kontroller, etkileri belirginleştirmek (açığa çıkarmak) için tercih edilmelidir, yoksa okuyucuya kodlanmış lamların tayinini derhal göstermek için değil. Pozitif kontrolün test maddesinden farklı bir yolla tatbik edildiği ve sadece bir kez örneklendiği kabul edilebilir. Kullanışlı olduğu takdirde, pozitif kontrol kimyasallarıyla ilgisi olan kimyasal sınıfın kullanımı düşünülebilir. Pozitif kontrol madde örnekleri aşağıdaki çizelgedekileri (çizelge2.6.) içerir.

Çizelge 2.6. Pozitif kontrol madde örnekleri [24].

Kimyasal ve CAS No:
Triethylenemelamine [CAS No:51-18-3]
Ethyl methanesulphonate [CAS No:62-50-0]
Ethyl nitrosourea [CAS No:759-73-9]
Mitomycin [CAs No:50-07-7]
Cyclophosphamide (monohydrate) [CAS No:51-18-0;CAS No:6055-19-2]

Negatif kontroller, yalnız çözücü veya alet ile muamele edilmiş ve muamele grupları gibi aynı yolda başka türlü muamele edilmiş, her örnekleme zamanını kapsamaludur, hayvanlar arası değişebilirlik kabul edilebilir olmadıkça kromozom hatalı hücrelerin frekansları tarihsel(önemli) kontrol verisinden elde edilebilir. Şayet negatif kontroller için tek bir örnekleme yapılacak ise, en uygun zaman ilk örnekleme zamanıdır. Ayrıca, muamele edilmemiş kontroller, seçilen çözücü/alet tarafından oluşturulmuş zararlı veya mutajenik etkiler olmaksızın (onu) göstererek tarihsel veya basılı kontrol verisi olmadıkça kullanılabilir.

Prosedür:

Hayvan sayısı ve cinsiyeti:

Her bir muamele ve kontrol grubu aynı cinsiyette en az 5 hayvan içermelidir. Şayet çalışma zamanı, aynı türlerde çalışmalardan elde edilebilir veri varsa onu gösteren aynı maruz bırakma usulü kullanılmışsa, cinsiyetler arası toksisitede önemli farklılıklar yoktur, daha sonra tekbir cinsiyette test etme yeterli olacaktır.

Muamele programı:

Test maddeleri, tercihen tek bir muamele olarak tatbik edilir. Ayrıca, test maddeleri ikiye bölük doz olarak (örneğin, büyük hacimli bir materyale uygulamayı kolaylaştırmak için, birkaç saatten çok olmamak suretiyle ayrılmış aynı günde iki muamele şeklinde) ta uygulanabilir. Diğer doz sistemleri bilimsel olarak ayarlanmalıdır.

Örnekler, bir günde muameleyi takip eden iki ayrı zamanda alınabilir. Örneğin, ilk örnekleme aralığı, muameleyi takiben 1,5 normal hücre döngüsü uzunluğu (en az 12–14 saat) şeklinde belirlenebilir. Zira, hücre döngüsü kinetikleri üzerinde etkisi gibi test maddelerinin kavrama ve metabolizması için ihtiyaç duyulan zaman, kromozom hatasını belirlemek için ihtiyaç duyulan optimum zamanı etkileyebilir. Daha sonraki örnek toplama ilk örnekleme zamanından 24 saat sonra yapılabilir. Şayet bir günden daha çok doz rejimleri kullanılacak ise, son muameleden sonraki 1,5 normal hücre döngüsü uzunluklarında bir örnekleme zamanı kullanılabilir[23].

Öldürmeden önce, balıklara, i.p. olarak metafaz durdurma amili (örn; kolsemid veya kolşisin) enjekte edilir. Daha sonra balıklar uygun bir aralıkta (yaklaşık 3–5 saat) örneklenir. Hücreler dokudan hasat edilir ve kromozom hatalarını belirlemek için analiz edilir.

Doz seviyeleri:

Şayet, seri bulgu çalışması yapılıyorsa (çünkü elverişli veri mevcut değildir), aynı laboratuarda, aynı tür, hat, cinsiyet ve temel çalışmada kullanmak için muamele rejimi kullanılarak yapılmalıdır. Şayet toksiklik var ise, aynı örnekleme zamanı için üç doz seviyesi kullanılır. Bu doz seviyeleri maksimumdan aza doğru (toksiklik yok) bir seri içermelidir. Sadece daha sonraki örnekleme zamanında en yüksek doz

kullanılır. En yüksek doz, daha yüksek doz seviyelerinin (aynı dozlama rejimine dayanarak) öldürücülüğünü üretmek için beklenmiş (ummak) olacağı böyle toksikliğin doz üretme işaretleri olarak beklenilir. Düşük, toksik olmayan dozlarda özel (belirli) biyolojik aktiviteli maddeler (örneğin, hormonlar ve mitojenler) doz yerleştirme kriterine istisnalar olabilir ve sebep-sonuç temeline dayandırılarak değerlendirilmelidir. Ayrıca, en yüksek doz, bazı toksiklik belirtisi üreten (Ör, mitotik indekste %50 azalmadan daha büyük) bir doz olarak belirlenebilir.

Limit testi:

Eğer günde tek bir veya 2 kadar muamele kullanılarak en az 2000 mg/kgv.a. doz seviyesinde bir test gözlemleyen toksik etkiler üretiyorsa ve şayet genotoksiklik yapısal olarak ilgili unsurlardan sağlanan veriye dayanarak beklenilecekse, daha sonra üç doz seviyesi kullanılarak tam bir çalışma gerekliliği göz önüne alınmayabilir. Daha uzun süreli çalışmalar için, limit doz 14 güne kadar muamele için 2000mg/kg/v.a./gün'dür ve 14 günden daha uzun muamele için 1000 mg/kg/v.a./gün'dür.

Dozların uygulanması:

Test maddesi genellikle bir mide tüpü veya uygun bir "intubation cannula" kullanılarak gauage yoluyla veya i.p. enjeksiyon yoluyla tatbik edilir. Test maddesine diğer maruz bırakma yolları türleri göre ayarlanabilir. Bir defada enjeksiyon yoluyla tatbik edilebilen maksimum sıvı hacmi test hayvanının büyüklüğüne bağlıdır. Hacim 2 ml 100g v.a.'mı aşmamalıdır. Bunlardan daha yüksek hacimlerin kullanımı, daha yüksek konsantrasyonlar ile normal olarak kötüleşme gösterecek olan tahrik edici veya aşındırıcı maddeler için hariç, test hacimdeki değişebilirlik bütün doz seviyelerinde sabit bir hacim sağlamak için konsantrasyonu ayarlamak suretiyle minimum hale getirilir.

Kromozom preparasyonu:

Balık öldürüldükten hemen sonra, doku elde edilir, hipotonik solüsyona maruz tutulur ve fiske edilir. Hücreler daha sonra lam üzerine yayılır ve boyanır.

Analiz:

Muamele edilen (pozitif kontroller de dâhil) bütün balıklar ve muamele görmemiş negatif (kontrol grubu balıklardan) her bir birey için en az 1000 hücrede sitotoksikliğin bir ölçme olarak mitotik indeks belirlenmelidir. Her bir balık için en az 100 hücre analiz edilmelidir. Bu sayı yüksek sayıda hatalar gözlenildiğinde azaltılabilir. Bütün lamalar (Pozitif ve negatif kontrollere ait lamlarda dâhil olmak üzere) mikroskopik analizden önce bağımsız olarak kodlanmalıdır. Zira lam preparasyonu prosedürleri, genellikle kromozom kayıplı metafazlar oranında uygunsuzluk gösterir, bundan dolayı sayılan hücreler $2n \pm 2$ sayısına eşit sentromer sayısı içerecektir.

Veri ve kayıt:**Sonuçların sunulması:**

Hayvanlara ait bireysel veriler, çizelge halinde sunulur. Deney birimi hayvandır. Her bir hayvan için hücre sayısı belirlenir, her bir hücredeki hata sayısı ve yapısal kromozom hatalı hücrelerin yüzdesi değerlendirilir. Muamele edilmiş ve kontrol gruplarına göre farklı kromozom hatası tipleri listelenmelidir. Açıklıklar (gap) müstakil olarak kaydedilir ve rapor edilir, fakat genellikle toplam hata frekansı kapsamına alınmaz. Şayet cinsiyetler arasında toksit maddeye karşı gösterilen tepkilerde farklılık yoksa elde edilen veri istatistik analiz için birleştirilir.

Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması:

Pozitif sonuç belirtmek için birkaç kriter vardır. Örneğin, kromozom hatalı hücrelerin nispi sayısındaki bir doz-ilişki artışı veya tek bir örnekleme zamanında tek bir doz grubundaki hatalı hücre sayısındaki belirgin bir artış dikkate alınabilir. Sonuçların biyolojik uygunluğu dikkate alınacak ilk unsurdur. İstatistik metotlar, test sonuçlarını değerlendirmede yardımcı olarak kullanılabilir. İstatistik önemi pozitif bir cevap için sadece faktör belirleme olmamalıdır. Eşdeğerlik sonuçları, deneysel şartların bir modifikasyonunu kullanarak, daha ileri test etmek suretiyle aydınlatılır. Poliploidlikteki bir artış, daha öncede belirtildiği gibi, test maddesinin sayısal kromozom hataları oluşturma potansiyeline sahip olduğunu gösterebilir.

Endoreduplikasyondaki bir artış test maddesinin hücre döngüsü ilerlemesini durdurma potansiyeline sahip olduğunu gösterebilir.

Sonuçları yukarıdaki kritere yaklaştırmak için test maddesinin bu testte mutajenik olmadığı düşünülür. Her ne kadar, deneylerin çoğu pozitif veya negatif sonuçları açık olarak verecek olsa da, nadir olaylarda veri seti test maddesinin aktivitesi hakkında kesin bir yargıya varmaya engel olacaktır. Sonuçlar, yapılan deney sayısının yetersiz veya kuşkulu olduğunu gösterecektir.

İn vivo kromozom hatası testinden elde edilen pozitif sonuçlar, bir maddenin test edilen türün dokusunda kromozom hataları oluşturduğunu gösterir. Negatif sonuçlar ise, test şartları altında, test maddesinin test edilen türün dokusunda kromozom hatası oluşturmadığını gösterir [23].

Test maddesi veya metabolitelerinin genel (kan) dolaşım sirkülasyonuna veya özel olarak hedef dokuya (örneğin sistemik toksiklik) eriştiği (tesir ettiği) ihtimali tartışılmalıdır.

Test raporu:

Test raporu aşağıdaki bilgileri içermelidir:

Test maddesi:

- Marka özellikleri ve CAS No. (Şayet biliniyorsa),
- Fiziksel yapısı ve saflığı,
- Çalışmanın yürütülmesi ve ilgili fizikokimyasal özellikleri,
- Test maddesinin sağlamlığı (biliniyorsa),

Çözücü / alet:

- Alet seçimi sebebi,
- Çözücü / alet içinde test maddesinin çözülebilirliği veya stabilliği,

Test hayvanları:

- Kullanılan tür / hat
- Hayvan sayısı, yaşı, cinsiyeti,

- Kaynağı, muhafaza şartları, diyet vs.
- Hayvanların testin başlangıcındaki bireysel ağırlığı (vücut ağırlığı serisini kapsayacak şekilde), her bir grubun ortalaması ve standart sapması,

Test şartları:

- Pozitif ve negatif (alet / çözücü) kontrolleri,
- Seri (range)-bulgu çalışmasında elde edilen veri (şayet rehberlik edecek ise),
- Doz seviyesi seçimi için gerekçe,
- Test maddesi preparasyonunun detaylandırılması,
- Test maddesinin tatbikinin detayları,
- Tatbik yolu için gerekçe,
- Test maddesinin genel sirkülasyonu veya hedef dokuya eriştiğini doğrulama, tetkik metotları,
- Hazırdaki doza diyet / içme suyu test maddesi konsantrasyonundan (ppm) değişim, şayet uygulanabilirse,
- Besin ve su kalitesi değeri,
- Muamele ve örnekleme programı,
- Toksikite ölçüm metotları,
- Metafazda durdurma maddesinin tarifi, konsantrasyonu ve muamele süresi,
- Lam hazırlama metotları,
- Hataları sayma kriteri,
- Her bir balık için analizi yapılan hücre sayısı,
- Pozitif, negatif veya iki taraflı olarak düşünülen çalışmalar için kriter,

Sonuçlar:

- Toksiklik belirtileri,
- Mitotik indeks,
- Her bir balık için ayrı ayrı olacak şekilde hata tipi ve sayısı,
- Her bir grup için toplam hata sayısı, ortalama ve standart sapmalar,
- Ortalama ve standart sapmaları verilerek her bir grup için hatalı hücrelerin sayısı,
- Ploidydeki değişimler (şayet görünüyorsa),
- Doz-cevap ilişkisi(mümkün olduğu kadar),

- İstatistik analizler,
- Negatif kontrol verisi uyumu,
- Serili, ortalamalı ve standart sapmalı tarihsel negatif kontrol verisi,
- Pozitif kontrol verisi uyumu,

Sonuçların tartışılması:

Sonuç

Literatür

Ek

İn-vitro kromozom hatası testi

İn-vido'da olduğu gibi, in vitro kromozom hatası testide, kültürü yapılan hücrelerde yapısal kromozom hatalarına sebep olan amili tespit etmek amacıyla yapılır. Bu testin prensibi, hücre kültürlerinin metabolik aktivasyonlu ya da aktivasyonsuz test maddesine maruz bırakılmasına, önceden belirlenen aralıklarda metafazda durdurulmasıdır.

İn-vitro kromozom hatası testinde, oluşturulmuş hücre hatları, hücre soyları veya primer hücre kültürlerinin kültürlerini kullanılabilir. Kullanılacak hücreler; kültürde büyütülebilirliği, karyotip kararlılığı, kromozom sayısı, kromozom farklılığı ve kromozom hatalarının kendiliğinden olan frekansı gibi özellikler dikkate alınarak seçilir [23].

İn-vitro yürütülen testler, genellikle egzogenous bir metabolik aktivasyon kaynağının kullanımına ihtiyaç duyar. Bu metabolik aktivasyon sistemi tamamen in vivo şartları taklit etmez. Hakiki mutajenliği yansıtmayan ve pH, osmolalitedeki değişikliklerden veya yüksek sitotoksikliklerden ortaya çıkabilen pozitif sonuçlara sebep olan şartlardan kaçınmak için dikkatli olunmalıdır.

Bu test, mutajen ve kanserojenleri görüntülemek için kullanılır. Bu testte pozitif olan birçok bileşim memelilerde kanserojendir; bununla beraber bu test ve kanserojenlik arasında tam bir korelasyon yoktur. Korelasyon kimyasal sınıfa bağlıdır. Ve bu test yardımıyla belirlenemeyen kanserojenlerin olduğu hususunda giderek artan deliller

vardır, çünkü (onlar) direkt DNA hasarından başka mekanizmalar yüzünden harekete geçerler. Bu test metodunda hücre kültürleri metabolik aktivasyonlu olsun yada olmasın her iki test maddesine de maruz bırakılabilirler.

Preparasyonlar

Hücre:

Balıklara ait fibroblast ve periferel kan limfositlerinden hazırlanan hücre hatları, soyları veya primer hücre kültürleri kullanılabilir.

Ortam (besiyeri) ve kültür şartları :

Hücre kültürü yapımında besiyeri ve kültür şartlarının (kültür kaplarının, karbondioksit konsantrasyonunun, sıcaklığın ve nemliliğin] uygun olmasına dikkat edilmelidir. Hücre hatları ve soyları, modal (temel) kromozom sayısı ve mikoplazma kontaminasyonu hususunda rutin olarak kontrol edilmelidir. Şayet kontaminasyon varsa kullanılmalıdır (kontaminasyon varlığı besiyerinin bulanık olmasıyla anlaşılabilir). Hücrelerin normal hücre döngüsü zamanı ve kültür şartları iyi bilinmelidir [23].

Kültürlerin hazırlanması:

- Hücre hatları ve soyları: Hücreler stok kültürlerden yayılmalı, hasat zamanından önce kültürlerin bir araya karışmış olarak uzanmayacak bir yoğunluktaki kültür ortamında ekilmeli ve uygun sıcaklıkta inkübe edilmelidir.
- Limfositler: Tam kan, bir anti-koagulant (pıhtılaşmayı önleyici, ör; heparin) ile muamele edilmeli veya sağlıklı bireylerden elde edilen ve saflaştırılmış limfositler bir mitojen (ör; PHA) içeren kültür ortamına ekilir ve uygun sıcaklıkta inkübe edilir.

Metabolik aktivasyon :

Hücreler uygun bir metabolik aktivasyon sisteminin varlığında ve yokluğunda test maddesine maruz bırakılmalıdır. En yaygın kullanılan sistem, Aroclor 1254 veya Phenobarbitone ve β -Naphthoflavone karışımı gibi enzim oluşturan amiller ile

muamele edilmiş kemirgen hayvanların karaciğerinden hazırlanan ko-faktör ilaveli post-mitokondrial fraction (S9)'dur. Post-mitokondrial fraction, genellikle son test ortamında %1–10 v/v'lik bir seri konsantrasyonda kullanılır. Metabolik aktivasyon sisteminin durumu, testi yapılan kimyasalın sınıfına bağlı olabilir. Bazı durumlarda, post-mitokondrial fraction'un bir konsantrasyonunda daha çok kullanmak uygun olabilir. Hücre hatlarının seçimi, bilimsel olarak doğrulanmalıdır (Ör; test maddesinin metabolizması için Cytochrome P450 izo enziminden faydalanılır).

Test şartları:

Çözücü/alet test maddesi ile kimyasal reaksiyona girme şüphesi taşımamalı ve hücrelerin yaşabilirliği ve S9 aktivitesi ile uyumlu olmalıdır. Suyla kimyasal yapısı değişebilen maddeler test edileceği zaman, kullanılan organik çözücülerin suyu alınmalıdır. Su moleküler bir elek eklemek suretiyle uzaklaştırılabilir.

Maruz bırakma konsantrasyonları:

En yüksek konsantrasyon belirleneceği zaman, dikkate alınması gereken kriterlerden birisi, bu test sistemindeki sitotoksiklik, çözülebilirlik ve pH veya ozmolarityedeki değişikliklerdir.

Sitotoksiklik, hücre bütünlüğünün ve büyümesinin uygun bir göstergesini (yani bir araya karışma derecesi, yaşabilir hücre sayıları veya mitotik indeks) kullanarak asıl deneydeki metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz belirlenmelidir. Ön bir deney yapılarak sitotoksiklik ve çözülebilirlik belirlemek uygun olabilir.

En az üç analiz yapılabilir konsantrasyonda kullanılmalıdır. Sitotoksiklik meydana geldiği yerde, konsantrasyonlar maksimumdan aza (veya hiç toksik olmayan konsantrasyona) kadar bir seri şeklinde hazırlanmalıdır; böylece genellikle konsantrasyonların 2 ve 10 arasında bir faktörden daha fazla olmayacak şekilde ayrılmalıdır. Hasat zamanında en yüksek konsantrasyon karışma derecesi, hücre sayma veya mitotik indeksdeki (hepsi %50'den daha büyük) önemli bir azalmayı göstermelidir. Mitotik indeks, sadece sitotoksik / sitostatik etkilerin direkt ölçümüdür

ve muameleden sonraki süreye bağlıdır. Bununla beraber, mitotik indeks diğer toksit ölçümlerinin külfetli ve pratik olmayabilen süspansiyon kültürleri için kabul edilebilir. Hücre döngüsü kinetikleri hakkında bilgiyi (ör; ortalama generasyon zamanı =Average generation time), destekleyici bir bilgi olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, AGT her zaman gecikmiş alt popülasyonların varlığını ortaya koymayan kapsamlı bir ortalama değildir. Hatta, AGT’deki hafif artışlar bile hataların optimal ürün zamanındaki çok önemli gecikme ile ilişki kurabilir. Nispeten sitotoksik bileşikler için maksimum konsantrasyon, en düşük hangisi olursa olsun, 5 µg/ml, 5mg/ml ve 0.1 M olmalıdır.

Çözünemeyen konsantrasyondan daha düşük konsantrasyonlarda toksik olmayan nispeten çözünemeyen maddeler için en yüksek doz, muamele periyodu sonunda son kültür ortamındaki çözünebilirlik sınırının üzerinde bir konsantrasyon olmalıdır. Bazı durumlarda (ör; toksiklik sadece en düşük çözülme konsantrasyonundan daha yüksekte meydana geldiği zaman), görünebilir çökeltmeli bir konsantrasyondan daha çoğunda test etmek tavsiye edilir. Çözünebilirlik, hücreler, S9, serum vs. mevcudiyetinden dolayı test sistemindeki maruz bırakma süresi esnasında değişebileceği gibi, muamele başlangıcı ve sonunda çözülebilirliği tayin etmek için kullanışlı olabilir. Çözülme ise, çıplak gözle belirlenebilir. Çökeltme, sayma ile karıştırılmamalı.

Kontroller:

Metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz uygun pozitif ve negatif (çözücü veya alet) kontroller her bir deneyde de yapılmalıdır. metabolik aktivasyon kullanıldığı zaman pozitif kontrol kimyasal mutajenik bir cevap vermek için aktivasyona ihtiyaç duyan birisi olmalıdır.

Pozitif kontrol konsantrasyonları, etkilerin belirginleşmesi için seçilmeli, fakat okuyucuya kodlanmış lamların tayinini derhal ortaya koymamalıdır. Pozitif kontrol maddeleri örnekleri aşağıdaki kimyasalları içerir:

Çizelge 2.7. Pozitif kontrol maddeleri örnekleri için kimyasallar [24].

Metabolik aktivasyon durumu	Kimyasal ve CAS No.
Exogenous metabolik faaliyetsiz	Methal methanesulphonate [CAS No.66-27-3]
	Ethyl methanesulphonate [CAS No.62-50-0]
	Ethyl nitrosourea [CAS No.759-73-9]
	Mitomycin C [CAS No.50-07-7]
Exogenous metebolik faaliyetli	Benzo(a) pyrene [CAS No.50-32-8]
	Cyclophosphamide(monohydrate) [CAS No.51-18-0]

Farklı uygun olan pozitif kontrol maddeleri de kullanılabilir. Kullanışlı olduğu takdirde, pozitif kontrol kimyasallarının bağlı bulunduğu kimyasal sınıfın kullanımı düşünülebilir.

Muamele ortamında (besiyerinde) yalnız çözücü veya aletten oluşan ve muamele kültürleri gibi aynı yolla muamele edilmiş negatif kontroller her hasat zamanı için hesaba katılmalıdır. Ayrıca, muamele edilmemiş kontroller, seçilen çözücü tarafından oluşturulmuş zararlı veya mutajenik olmaksızın (onu) göstererek tarihsel kontrol verisi olmadıkça kullanılmalıdır.

Prosedür

Test maddesi ile muamele :

Bölünen(proliferating) hücreler, metabolik aktivasyon sistemi bulunması ve yokluğunda test maddesi ile muamele edilirler. Limfositlerin muamelesi, mutajenik uyardan sonra yaklaşık 48 saat (insanlar için) sonra başlamalıdır.

Duplike (ikincil) kültürler, normal olarak her bir konsantrasyonda kullanılmalı ve negatif çözücü kontrol kültürleri için kuvvetle tavsiye edilirler. İkincil kültürler arasında tarihsel veriden minimal değişim gösterebildiği yerde her bir konsantrasyonda kullanılmak amacıyla tekli kültürler için kabul edilebilir. Gazlı ve

buharlaşabilen maddeler, uygun metotlar yardımıyla (Ör; kapalı kültür kapları içinde) test edilmelidir.

Kültür hasat zamanı:

İlk deneyde hücreler 3–6 saat süreyle metabolik faaliyetli ve aktivasyonsuz test maddelerine maruz tutulurlar ve muamelenin başlamasından sonra yaklaşık 1,5 normal hücre döngüsü uzunluğuna eşit bir zamanda örneklenir. Şayet bu protokol, aktivasyonlu ve aktivasyonsuz olarak her ikisiyle de negatif sonuçlar veriyorsa, yaklaşık 1,5 normal hücre döngüsü uzunluklarına eşit bir zamanda örnekleme kadar, devamlı muamele ile aktivasyonsuz ilave bir deney yapılmalı. Bazı kimyasallar 1.5 döngü uzunluğundan daha uzun muamele / örnekleme suretiyle çok kolay olarak belirlenebilir. Metabolik faaliyetli negatif sonuçlar, sebep –sonuca bakılarak desteklenmeye ihtiyaç duyarlar. Negatif sonuçların desteklenmesinin gerekliliği düşünülmediği durumlarda, “justification” kullanılabilir.

Kromozom preparasyonu:

Hücre kültürleri genellikle hasattan 1–3 saat önce kolsemid veya kolşisin ile muamele edilir. Her bir hücre kültür hasat edildikten sonra kromozom preparasyonu için ayrı ayrı işleme tabi tutulur. Kromozom preparasyonu, hücrelerin hipotonik muamelesi, fikzasyonu ve boyanmasını ihtiva eder.

Analiz:

Pozitif ve negatif kontrollere ait bütün lamalar, mikroskopik analizden önce teker teker kodlanmalıdır. Zira fiksasyon prosedürleri genellikle belli bir oranda kromozom kayıplı metafaz hücreleri oluştururlar. Bundan dolayı hücreler bütün hücre tipleri için modal sayı ± 2 'ye eşit sentromer sayısı içerirler. Her konsantrasyon için en az 200 iyi yayılmış metafaz sayılmalı ve kontrol eşleşmeler arasında eşit olarak bölünmelidir(şayet uygun ise). Bu miktar, yüksek hata sayıları gözlenildiğinde azaltılabilir.

Al-Sabti (1991), tarafından su ile taşınan veya oluşturulan genotoksik amillerin risklerinin bir göstergesi olarak balıklardaki kromozom hataları kullanıldığı zaman

herhangi bir laboratuvar çalışması için ihtiyaç duyabilecek bir tablo şu şekilde önerilmektedir. [22].

Araştırmacının adı: Kromozomları inceleyen kişinin adı.

Tür: Deney yapılan canlının yaygın ve bilimsel adı.

Deney Tarihi :

Yer: Deneyimizin saha veya laboratuvar şartlarında olup olmadığı.

Örnek Numarası : Deneyde kullanılan bütün örneklerin Latin sayıları

Lam Numarası : Lamların rakamsal kodlanması.

Lam üzerinde metafazın pozisyonu: Mikroskop yardımıyla lam üzerinde tespit edilen metafazın yerini şüpheli durumlarda tekrar bulabilmek, diğer araştırmacılar tarafından da kullanılmasını sağlamak ve fotoğrafını çekebilmek için koordinatlarının yazılması.

Muamele: Numunenin içinde kirletici olduğundan şüphelenilen su kütlelerindeki doğal ortamlarından yakalanarak mı elde edildiği veya laboratuvar şartlarında genotoksik amillere mi maruz bırakıldığı veyahut da etkisi araştırılacak amilin numuneye i.p veya i.m enjeksiyonuyla mı muamele edildiği.

Doz: İn vitro deneylerin çoğu doz-cevap çalışmaları şeklinde planlanmıştır. Bu nedenle kullanılan dozlar tabloda yer almalıdır.

Normal metafaz: Sayılmış bütün normal metafazların frekansı.

Hatalı metafaz: Numunedeki sayılan hatalı metafazların sayısı.

Kromozomal anormalliklerin tipi: Farklı tipteki kromozom hatalarının frekansı.

Karyotip: Söz konusu balığın normal karyotipi de diploid sayı ($2n$) ve m,sm,st,t veya a ile kol sayısı (NF) verilerek ifade edilmelidir.

Toplam: Tablonun sonunda, ifade edilen bütün veriler için toplamlar belirtilmelidir.

Her bir SCE ve mikronukleus testi için istenilen tablo kullanılabilir veya şayet gerekli ise standart tabloda birleştirilebilirler: Mesela, mikronuklei / 1000 hücre frekansı SCE / hücre frekansı, tabloda hatalı metafazların yerine kullanılabilirler.

Aşağıda örnek olması amacıyla, metafaz analizi için bir tablo düzenlenmiştir.

Araştırmacının Adı: Mehmet Ulupınar

Tür: Gökkuşağı alabalığı (*O.mykiss*)

Tarih: 15.09.1997

Yer: K.T.Ü, Sürmene Den. Bil. Fak. Laboratuvarı

Çizelge 2.8. Balık Kromozomları Üzerinde Genotoksik Etkiler [23].

Num No:	Lam No:	Metafaz Pozis.	Muamel Tarzı	Doz mg/kg	Nor. Metefaz Sayısı	Hatalı metefaz sayısı	Hata Tipleri	Karyotip (2n=60) m+sm+s t+a veya t
1	12a	23-130	Benzidin (i.p.)	10	203	35	r,dic.,br ,gap	44m,sm +16st+a
2	23c	31-125	"	40	154	47	r,dic.,gap	
3	7a	27-111	"	80	136	83	b,r.,gap. ,frag.	
TOP								

Çizelge 2.9. Balık kromozomlarında SCE' ye sebep olan genotoksik etkiler [22].

Numune no	Lam no	Metafaz pozis.	Muamele tarzı	Doz mg /kg	Metafaz sayımı	SCE frekansı/1 hücre	SCE frekansı/100 Hücre
1	76d	13-11	Benzidine (i.p.)	10	123	18±0.78	23±0.43
TOP.							

Num une no	Lam no	Mikronukleus Pozisyonu.	Muamele tarzı	Doz mg /kg	Sayılan Eritrosit Sayısı	Nükleotidli Eritrosit Sayısı 1Mn 2Mn	3Mn	Top lam Mn Sayı sı
1	98c	22-145	Benzidine (i.p.)	10	1000	19 3	0	22
TOP								

2.3.1.2. Kromatid Tipi Hataların Belirlenmesi

Balıklarda yapılmış çalışmalar

Araştırmacılar şuna kadar birçok türün (özellikle memeliler) hücreleriyle çalışmış ve bu türlerin hücre sitogenetiği hakkında oldukça yeterli bilgiye sahip olmalarına karşın, balıklar ve özellikle bunların kromozomları üzerinde yapılan çalışmaların yetersizliği araştırmacıları bu canlı üzerinde daha yoğun olarak çalışmaya sevk etmiştir. Ancak balıklar için kullanılan teknikler, aynı amaçla diğer organizmalar için kullanılanlardan birçok bakımdan farklılık arz etmektedir.

Kromozom çalışmaları, çevre koruma ile ilgili birçok programdaki önemine ilaveten çiftlikte yetiştirilmiş balıkların genetik ıslahı için de giderek artan bir öneme sahiptir. Bu çalışmada, günümüz saha ve laboratuvar şartları altında genotoksik amillerin bir göstergesi olarak kromozom hatası tayininin kullanılmasının uygunluğu ileri sürülmektedir. Ayrıca, farklı genotoksik amillerin balık kromozomları üzerindeki etkilerinin nasıl olacağı kısaca tartışılmıştır. Burada, kromozom hatalarının değişik tipleri sunulmuş ve bunlara sebep olan mekanizmalar ortaya konulmuştur.

Genotoksik etkiyi belirlemede en geçerli metotlardan birisi olarak “Sister Chromatid Exchanges (SCE) (=Kardeş kromozomlarda Kromatid değişimi (KKD)” dir. Sitogenetik zararı belirleme konusundaki diğer iki metot ise “Micronuclei (M)” ve “Anaphase Aberrations (AA) (=Anafaz Hataları(AH))”metotları olup bu metotlar SCE tekniğine göre çok hızlı ve daha ucuz testlerdir. Ancak, balık kromozomlarının boylarının küçük ve sayılarının fazla olması nedeniyle hata analizlerinin yapılması zordur. Bununla beraber, mikronuklei ve anafaz hataları testi sistemleri, teknik olarak daha basit ve uygulamak için daha kolaydır. Böylece, özellikle balıkların buldukları suyun kalitesi hakkında hızlı sonuçlara ihtiyaç duyan balık üreticileri ve biyologlar için daha kullanışlıdır.

Kardeş kromatid değiştirme (SCE) analizi çalışmaları

Kardeş kromatid değiştirme: SCE olarak bilinen bu teknik son birkaç yıl içinde geliştirilmiştir ve standart kromozomal tekniklerin kullanımıyla keşfedilen kromozomlar üzerindeki genotoksik etkileri meydana çıkarmak için Kligerman ve Bloom(1976),[25]' tarafından balıklarda uygulanmıştır.

Canlının mutajenik-kanseronejik amillere maruz kaldığını belirleyebilen metotlardan biri olan SCE metodu kromozom kırılması analizinden daha hassas bir metottur (Resim2). Birçok mutajenik ve kanseronejik kirletici SCE frekanslarında önemli artışlara sebep olabilmektedir. Az ya da büyük olmayan kromozom hasarı meydana getiren seviyelerdeki bazı kimyasallar (mitomisin C, EMS, MMS, HN2 vb.) ile kültür edilmiş hücrelerde önemli SCE artışları gözlenmiştir.

SCE, tek bir kromozomun iki kromatidi üzerinde görünüşte benzer mevkilerde DNA kırılması ve yeniden birleşmesinin sitolojik görünmesidir.

Bir kardeş kromatid değiştirme noktasında kromozomlar, bir açık, bir koyu kromatide sahiptir; değiştirilmiş meteryalli olanlar açık ve koyu bölge kromatidlere sahiptir. SCE analizleri, orada görünmeleri sebebiyle SCE frekansı ve kromozom hasarı vasıtalarına (ör; radyasyon ve kimyasallar) maruz olma arasında iyi bir korelasyon olması sebebiyle iyi bir göstergedir. Bu yüzden, bu tip analizler

mutagenesis ve balıklarda çevresel zehirleyiciler çalışma hususunda değerli bir yoldur. Çalışmalar, in vivo dokularda, deneysel balıklardan kültürlenmiş limfositlerde ve in vitro vasıtalarla maruz bırakılmış hücrelerde yapılabilir [26, 27]. SCE, ihtiva eden hücre kültürlerini belirlemek için birçok sistem kullanılmaktadır. İn vitro sistemler, önemli deneysel özelliklere sahiptir, fakat kimyasal maddeler canlı bir hayvana girdiği zaman ne olacağını sadece kabaca bilgi verir. Bununla beraber bromodeoxyuridine (BrdU) probu ile SCE' nin varlığının ortaya konulduğu iki in vivo sistem vardır. Vicia faba kök uçları, tavuk ve fare embriyoları bu teknikler ile, aynı kromozomun iki kardeş kromatidi arasındaki genetik materyalin değişiminin gözlenmesi kolaydır. Bu işlem, DNA replikasyonunun en az iki çevrimde timidinin analogu olan 5-bromodeoxyuridine (BrdU)'e bölünmekte olan hücreleri maruz bırakmak suretiyle gerçekleştirilebilir.



Resim 2: Örn: SCE frekansı tespiti

Fakat genel olarak kullanılabilirliği tespit edilmiş bir BrdU konsantrasyonu yoktur. Balığın sıcak veya soğuk su, deniz veya tatlı su, karnivor veya omnivor vb. olması gibi farklı faktörlere bağlı olarak, optimum değer balık türlerine göre değişebilir. BrdU konsantrasyonunun en uygun seviyesini belirlemek için, araştırmacı, hücre kültürü ortamında veya i.p. (intraperitoneal=karın boşluğu) veya i.m. (intramuscular=kas içi) enjeksiyonuyla deneme yapmalıdır.

Kromozom hatası testi, yüksek dozlarda bulduklarında farklı kromozomal hatalara sebep olabilen kanserojenik-mutajenik kimyasallar ve iyonize radyasyon'un etkilerini belirlemek için uygundur. SCE metodu yardımıyla ise, söz konusu amillerin düşük dozlarındaki etkileride çok kolay belirlenebilir. Bu ise kimyasal veya amilin aksiyon mekanizmasına (yani onun S-fazına bağımlı olup olmamasına) bağlıdır.

Bu durum, Kligerman ve Bloom [28]'un Mudminnow (*Umbra limi*) üzerindeki çalışmalarında SCE sistemini geliştirmelerine yardımcı olmuştur. Bu teknik çevre kirliliği problemleri ile ilgili laboratuvar çalışmalarında çok popüler olmuştur. Bu test için çeşitli balık hücreleri kullanılmıştır (ör; Barker ve Rackham (1979) tarafından [15] *Amea splendens*, Stromberg vd. (1981) tarafından [29] English sole (*Paophrys vetulus*), Park ve Grimm (1981) tarafından [27] Avrupa yılanbalığı (*Anguilla anguilla*), Landolt ve Kocan (1983) tarafından [11] Pasifik sanddab (*Citharichtys sordidus*) ve Van de Kerhhoff ve Van der Gaag (1985) tarafından [30] *Nothobranchius rachowi*'da kullanılmıştır.

Kligerman vd. (1981) tarafından [17] tarif edilen SCE metodu şöyledir;

1. Balıklara 500µg BrdU/g vücut ağırlığı hesabıyla i.p.enjeksiyonu yapılır.
2. 24 saat sonra, balıklara test amili (etkisi araştırılan kirletici madde) i.p. yoluyla enjekte edilir veya bu madde balığı içinde bulunduğu akvaryuma belli bir oranda konularak balığın bu maddeden etkilenmesi sağlanır.
3. 4 gün sonra ve öldürülmeden yaklaşık 7 saat önce her bir balığa metafazda bölünen hücreleri bloklamak için 25µg kolsemid/g v.a. veya kolşisin verilir.
4. Balıklardan solungaçlar böbrek ve bağırsak alınır ve 30dk.%0,4'lük KCl (hipotonik solüsyon) ile muamele edilir.
5. Dokular, methanol: asetik asit içinde 1 gece fiske edilir ve dilute hücre süspansiyonu elde etmek amacıyla iyi bir çökme lamında %50'lik asetik asit te yumuşatılır.
6. Hücre süspansiyonu, hücrelerin tek tabaka halinde bir halka oluşturması için 50°C'ye kadar ısıtılmış bir lam üzerine konulur.

7. Boyama için, lamalar, 30–45 dak. Şiddetli floresan ışığına ıslak konmuş lamaların maruz bırakılmasını takiben Hoechst 33.258 (200µg/ml) ile 10 dak. muamele edilir.
8. Lamalar hava ile kurutulur, xylol ile temizlenir ve üzerine konur.

2.3.1.3. Anafaz Hatası Çalışmaları:

Anafaz Hataları (AA): Anafaz hatası tekniği, bazı kirleticilerin genotoksik etkilerini daha iyi ortaya koyması ve su ortamındaki mutajenlerin bir göstergesi olarak cazibeli olmasından dolayı çok önemlidir [31]. Bu test sistemi, metafazdaki kromozom hatalarının belirlenmesinden çok daha basittir. Bu teknik, in vitro hücre kültürlerinde [32], ve hem in vitro hem de in vivo'nun her ikisinde Liguori ve Landolt (1985) [33], genoto-oksidantların yüksek seviyelerine maruz kalan canlılarda, anafaz esnasında mitoz hücrelerindeki kromozomal makro lezyonları belirlemeyi sağlar.

Anafaz hataları anafaz esnasındaki metafaz plağından bir veya daha fazla kromozomun hareketindeki bir gecikme(anafaz gecikmesi) gibi veya ayrılması suretiyle meydana gelebilir, fakat sentromer her iki karşı kutbun iğlerine bağlı olan hariç hala bölünmemiştir. İz (Trailing=kuyruk) ve bitişik kırılmış parçalar anafaz hatalarında en sık görünen tipler olup anafaz esnasında ayrılmış kromozomlar arasında derin bir boyanmış yapı olarak görünebilirler. Gökkuşluğu alabalığı hücrelerinde anafaz hataları testi Liguori ve Landolt (1985) tarafından [33] aşağıdaki şekilde önerilmiştir.

1. Formalinde fiske edilmiş embriyolar yumurta sarısından ayrılır.
2. 2–3 saat %50-70'lik asetik asit içinde bekletilir.
3. 1 kısım aside 19 kısım boya oranında propionik asit içeren %2'lik aceto-orcein boyasına 2–3 saatliğine bırakılır.
4. Boyanmış embriyo bir lam üzerindeki bir damla asetik asit içine konulur.
5. Lam ve lamel arasında yavaşça ezilir.
6. Ezme preparasyonlar temiz tırnak cilası ile kapatılır.

7. Hatalı anafazların sayısı, ilk yüz anafaz hücresinin sayılması veya bir ışık mikroskobu (X1000) kullanma lamalar üzerinde mevcut anafaz hücrelerinin tamamının sayılması suretiyle belirlenir.

2.3.1.4. Mikronükleus (M) Çalışmaları

Mikronükleus testi, kromozomal kırığın kalitatif tayininin hızla yapılmasını sağlamaktadır ve kimyasalların mutajenliğini aksettiren bir metot olup kolay başarılmış ve sitoplazmada daimidir. Mikronükleinin tanınması teknik olarak çok kolaydır ve bu teknik metafazdaki kromozomların direk gösterilmesinden 15 defa daha hızlıdır.

Mikronüklei, anafaz esnasında kromozom veya aksentrik kromozom fragmentlerinden şekillenen kromatin içerikli sitoplazmik cisimcikler olup hücre siklusunda kardeş çekirdeklerin birbirleriyle birleşmeleri sırasında meydana gelir. Kromozom kırılmaları, yapısal anormal kromozomlar ve iç anormalliklerinin sonucu olan genetik hasarlar mikronüklei oluşumuna yol açtığından dolayı, mikronüklei indeksi bu tip genetik hasarların bir göstergesidir. Esansiyel olarak klastojen etki gösteren tüm ajanların mikronükleiye neden olduğu saptanmıştır. Mikronüklei sayımı kromozomal aberrasyon tespitine göre daha az teknik malzeme gerektirdiğinden ve daha hızlı olduğundan dolayı bu teste nazaran daha fazla tercih edilmektedir. Bunun yanı sıra klastojenezis ve iç bozuklukları gibi önemli iki genetik hasardan meydana geldiği için, bu tip hasarlara neden olan kimyasalların taranmasında yaygın olarak kullanılan bir testtir.

Mikronükleus testi, hayvanlardan alınan periferik kan hücrelerinin (eritrositlerinin) analizi yoluyla eritroblastlarının mitoz cihazlarında veya kromozomlarda test maddesi tarafından oluşturulmuş hasarın belirlenmesi için kullanılır. Mikronüklei (M), asentrik kromozom parçalarının yoğunlaştırılması suretiyle veya anafazı takip ederek asıl nükleide dâhil olmayan bütün kromozomlar tarafından oluşturulmuştur. Bir mikronükleus, bir hücrenin stoplazmasında ışık mikroskobu yardımıyla görülebilen bir fazlalık (supernumerary) nükleustur.

Mikronuklei testleri içerisinde ise en yaygın kullanım alanı bulanı İn vivo memeli eritrosit mikronuklei testidir. Bu İn vivo mikronukleus testi, eritroblastların mitotik aparatları veya kromozomlarında test substansları tarafından meydana getirilen hasarın tespitini sağlar. Bu test genellikle rodentlerin kemik iliği ve / veya periferal kan numunelerindeki eritrositlerin analizi yoluyla yapılır. Rodent kemik iliği, polikromatik eritrositler bu dokuda üretildiği için bu testte rutin olarak kullanılırlar. Polikromatik (immature) mikronukleili eritrositleri dalak tarafından dolaşım kanından uzaklaştırılmadığı bilinen türlerde periferal kan da kemik iliğine eşit şekilde mikronuklei ölçümünde kabul edilebilir bir dokudur [34].

İn vivo memeli mikronukleus testinin amacı mikronuklei şekillenmesiyle sonuçlanan sitogenetik hasara neden olan substansların ayrımını yapmaktır. Kemik iliğinin normal fizyolojisinde, bir eritroblast bir polikromatik eritrosite dönüşürken, ana nukleus çıkarılır. Ancak patolojik olarak bir mikronukleus formu gelişmişse mikronuklei çekirdeksiz sitoplâzma içerisinde kalır. Mikronukleilerin mikroskop altında görülmesini spesifik boyama teknikleri ve hücrede bir çekirdeğin olmayışı kolaylaştırmaktadır. Uygulama yapılan hayvanların mikronukleili polikromatik eritrositlerinin frekansında bir artış, kromozomal hasarın ve o kimyasalın potansiyel karsinojenik / mutajenik olduğunun göstergesidir [35].

İn vivo memeli mikronukleus testi, İn vivo metabolizma, farmakokinetik unsurlar, DNA onarım prosesleri, türlere özel farklılıklar ve dokular arası etkileşim gibi faktörlerin değerlendirilmesini de mümkün kıldığından gerçek bir mutajenik değerlendirme sağlar. Bu yüzden mutajenik defektlerin tespitlerin İn vitro sistemlere göre daha kullanışlı bulunmaktadır [34-43].

Schmid (1975), mikronükleinin sitoplâzma da aşağıdaki gibi şekillendiğini ifade etmişlerdir [44]. Anafazda, sentrik elementler iğ kutuplara doğru hareket ettikleri zaman sentrik bir kromotid ve kromozom parçaları geri kalırlar. Telofazdan sonra zarar görmemiş kromozomlar sentrik parçalar gibi düzenli “daughter (evlat)” nuklei’ye sebep olurlar geciken elementlerin çoğu evlat hücreler içerisinde dahildirler, fakat önemli bir oran, asıl nukleustan çok daha küçük (1/5-1/20) olan bir

veya birkaç ikincil nükleli olarak şekillenirler ve bu yüzden “mikronülei” olarak adlandırılırlar.

Al-Sabti ve Hardig (1990) [48], balıklardaki mikronükleinin, büyüklük olarak Schmid (1975) tarafından belirtilenden [44] daha küçük olabileceğini ifade etmiştir. Çünkü onların açıklamaları büyük kromozomlara sahip olan memeli hücrelerine dayandırılmaktaydı. Diğer taraftan, balık kromozomları çok daha küçüktürler, mikronükleli asıl nükleustan yaklaşık 1/10-1/30 daha küçük olabilir demiştir. Mikronükleli gözlemleri çok hızlı yapılabilir. Balık türlerinin çoğunda eritrositler oldukça iridirler ve büyük bir nükleusa sahiptirler [12].

Son birkaç yıl içinde düşük dozda iyonize radyasyon ile problemler arasındaki ilişki artmıştır. Balıkların genetik materyali farklı yollarla iyonize radyasyon tarafından etkilenebilirler. İyonize radyasyonun, en azından yüksek dozlardan sonra kromozom hatasına sebep olduğu bilinmektedir. Çernobil’e benzer radyasyon kazalarının sonuçlarının araştırılmasında sadece fiziksel ölçümlerle yetinilmemelidir, ayrıca biyolojik metotlar da kullanılmalıdır. Balıklarda, radyo kontaminantlar ve genetik etkiler arasındaki ilişki iyi bilinmemektedir. Genotoksik ortama maruz kalınmanın basit bir testi, balık eritrositlerinde mikronükleli frekansını çalışmaktır.

Radionükleid’lerden kaynaklanan radyasyon, ya doğrudan ya da aktive edilmiş metabolitler yardımıyla DNA’ya saldırır ve mutasyonlara sebep olur ve daha sonra genotoksik olarak düşünülür. Göllerdeki ve diğer sulardaki balıkların bütün vücudu ışınlamaya (irradiation) maruz kalabilir. Balık hücreleri radyasyona maruz kaldıkları zaman her bir kromotitte mevcut olan tek bir DNA çiftinin kırılması derhal gerçekleşir. Bu kırıkların çoğu, diğer hücreler anormal olarak yenilenirken farklı periyotlarda yenilenecektir.

Balıklarda mikronükleli testi, kromozom hasarı frekansını sağlar ve dolaylı olarak çevresel rado-kontaminantlar ve su ekosistemimizde insanlar tarafından oluşturulmuş ve doğal diğer birçok kirleticilerden insan sağlığı için riskin olup olmadığının

anlaşılmasını sağlar. Bu test genotoksik maddeler veya amillerin birinci derecede görüntülenebildiği bir test olarak hizmet edebilir.

Her hangi bir hücre tipi için mikronükleus analizi, muamele edilmiş populasyonun önemli bir kısmının mitoz geçirmesine, böylece birinci hücre döngüsü esnasındaki muamele yoluyla sebep olunmuş sentrik parçaların ikinci veya daha sonraki hücre döngülerinin her hangi bir safhasında sitoplâzmadaki mikronüklei gibi kendilerini açıkça göstermelerini gerektirir.

Bu metotta, hayvanlar uygun bir usulle test maddesine maruz bırakılır, uygun bir zaman sonra periferal kan alınır, yayma preparasyonları yapılır ve boyanır. Periferal kanla çalışmalar için, son maruz bırakma işlemi ile hücre hasatı arasında mümkün oldukça az zaman harcanmalıdır. Preparasyonlar mikronüklei mevcudiyetini tespit için preparasyonlar analiz edilir. Analiz için, en az toplam 1000 eritrosit sayarak her bir hayvan için toplam(olgun+olgun olmayan) eritrositler içinde olgun olmayanların oranı tespit edilir. Pozitif ve negatif kontrolleri içeren bütün lamalar, mikroskopik analizden önce birbirinden bağımsız olarak kodlanır. Her hayvanda en az 2000 olgun eritrosit, mikronükleuslu olgun olmayan eritrositlerin oluş derecesini tespit için sayılır. İlave işlem olarak, mikronüklei için olgun eritrositler sayılabilir. Lamalar analiz edilirken, toplam eritrosit içinde olgun olmayan eritrositlerin oranı kontrol değerinin %20'den daha az olmamalıdır. Ayrıca hayvanlar 4 hafta veya daha fazla bir süre devamlı olarak muamele edileceği zaman, her bir hayvanda en az 2000 olgun eritrosite mikronüklei oluşum derecesi için sayılmalıdır. Otomatik analiz sistemleri (imaj analizi ve hücre süspansiyonları flow sitometrisi) doğrulama için alternatif olarak kabul edilir.

İlk olarak fareler de kullanılmak amacıyla geliştirilmiş olmakla beraber, bu teknik, daha sonra laboratuarda balıklara uygulanmak amacıyla Hooftman ve Raat (1982), tarafından geliştirilmiştir [47]. Bu modifikasyon, "piscine micronucleus test" olarak bilinir ve kimyasal kontaminasyonlu balık ve omurgasızların hızlı ve ucuz bir in situ biyolojik indikatörü olarak önerilmektedir. Bu metot AA ve SCE testlerinde mevcut

problemlerden kaçınmak maksadıyla balık sitogenetikçileri tarafından daha fazla tercih edilmektedir.

Mikronüklei testi, mutasyonel hasarın frekanslarını tayin etmeyi ve çevresel kirleticilerin insan sağlığına direkt ve indirekt tesirini tespit etmeyi sağlar. Herhangi bir hücre tipi için mikronükleus tayini, ilk hücre döngüsü esnasında muamele sonucu oluşturulmuş sentrik parçaların ikinci veya daha sonraki hücre döngülerinin herhangi bir safhasında sitoplazmadaki mikronüklei gibi kendilerini göstereceğini diye, muamele edilmiş populasyonun gerçek bir parçasının mitozu çekilmesine ihtiyaç duyar.

Balıklarda mikronüklei ölçümleri, laboratuvar ve çevre şartları altında, çevre ile ilgili çalışmalarda kromozom hatalarından daha iyi bir parametre olarak gösterilmektedir [11, 31, 48-53].

Her ne kadar çok hızlı yapılabilmesine ve ucuz olmasına rağmen, balıklarda mikronüklei oluşumu, toksikologlar tarafından nadiren kullanılmıştır. Carrasso at all (1990), aşağıdaki faktörlerin balıklar, kurbağagiller ve omurgasızlarda mikronükleus testinin, biyolojik bir gösterge olarak kimyasal kontaminasyonun kesin teşhisini engellediğini tespit etmişlerdir [49].

1. Zaten varolan çekirdek morfolojisindeki düzensizliklerin mikronükleinin genotoksik analoglarının sanılması.
2. Çekirdek lezyonlarının gerçekten genotoksiteden mi kaynaklandığı ya da her hangi bir exogeneous amile maruz kalmadan mı kaynaklandığı hususunda laboratuvar verilerinin yetersizliği.
3. Genotoksit lezyonlarının özelliklerini veya birkaç fotoğrafını içerecek şekilde verinin olmaması.
4. Laboratuvar çalışmalarında kimyasal maddeye maruz bırakma metotlarında uyumsuzluğun bulunması.
5. Biyolojik örneklerin toplandığı sahalarda kimyasal kontaminantların varlığını teyit etmek için kimyasal analizlerin yapılmamış olması.

6. Biyolojik bir göstergenin önemli olduğu yerlerde, ara kirlilik şiddetine sahip bölgelerden yeterince örneğin toplanması.

Hooftman ve Raat (1982) ve Hooftman ve Vink (1981) laboratuvar şartlarında etil metanesülfonat ile mudminnow (*Umbra pygmaena*)’da mikronüklei oluşturmuşlardır [47,52]. Ayrıca, yine laboratuvar şartlarında, sazangillerden üç tür (doğa sazani, *Cyprinus carpio*; ot sazani, *Ctenopharyngodon idella*; kadife balığı, *Tinca tinca*)’de mikronüklei oluşturmak amacıyla 5 çeşit kanserojenik-mutajenik kimyasal (alfatoxin B1, aroclor 1254, benzidine, benzo(a)pyrene ve 20-methyl-cholanthrene) test edilmiştir [12].

Birleşmiş Milletlerde, Carrasso at all (1990) ve Hose at all (1987), Güney Kaliforniya açıklarındaki kontamine olmuş bölgelerden elde ettiği iki deniz balığı (White croaker, *Genyonemus lineatus* ve Klep bass, *Paralabrax calthratuse*)’nda eritrosit mikronükleisi dolaşım frekansının, daha düşük kontamine olmuş mevkilerden elde edilen balıklara nispetle yüksek olduğunu bulmuşlardır [49,54]. Bu tahlil sistemi, İsveç’te endüstriler tarafından kirletilen Baltık Denizi’nin çeşitli bölgelerinden ve radiosezyum ile kirletilmiş İsveç göllerinden elde edilen balıkların hücrelerinde saha şartları altında başarılı olunacağını göstermiştir [55].

2.4. Araştırma Örneklerinin Alındığı Alanın Özellikleri

Ardahan ve Kars il sınırları içerisinde kalan Çıldır Gölü 123 km² alanı ile Doğu Anadolu Bölgesi’nin en büyük tatlı su ve en büyük ikinci göldür. Deniz seviyesinden 1965 m yüksekte bulunan gölün en derin noktası 22 metre ve tektonik oluşumlu bir göldür. Birçok dere ve pınarlarla beslenmekte olan gölün tek çıkışı kuzey batısında yer alan Ermenistan sınırında bulunan Arpaçayın kolu olan Telek Çayı’dır. En büyük olanı Akçakale harabelerinin yanında yer alan adadır. Göl etrafında çok az bitki örtüsü gelişmiştir, ancak gölü çevreleyen otlaklarda yoğun hayvancılık yapılmaktadır [56].

Yılın dört mevsiminde yapılabilen balıkçılık yöre halkı için önemli bir ekonomik gelir kaynağı teşkil etmektedir. Gölde balıkçılık önemli bir insan aktivitesi olup, kışın buz tutan gölde kalın buz tabakası kırılarak balık avlanmaktadır. Gölde yakalanan en

önemli balık türü Sazan'dır (*Cyprinus carpio*). Ancak kurak geçen mevsimlerde, göl seviyesi hızla çekilmekte ve bu nedenle sazan gibi türlerin üremesi için gerekli sızlıklar daralmaktadır. Bununla beraber birçok balıkçının yasaklara uymayarak kontrolsüz avlanmaları balık stoklarını olumsuz etkilemektedir [56].



Resim 3. Çıldır Gölü

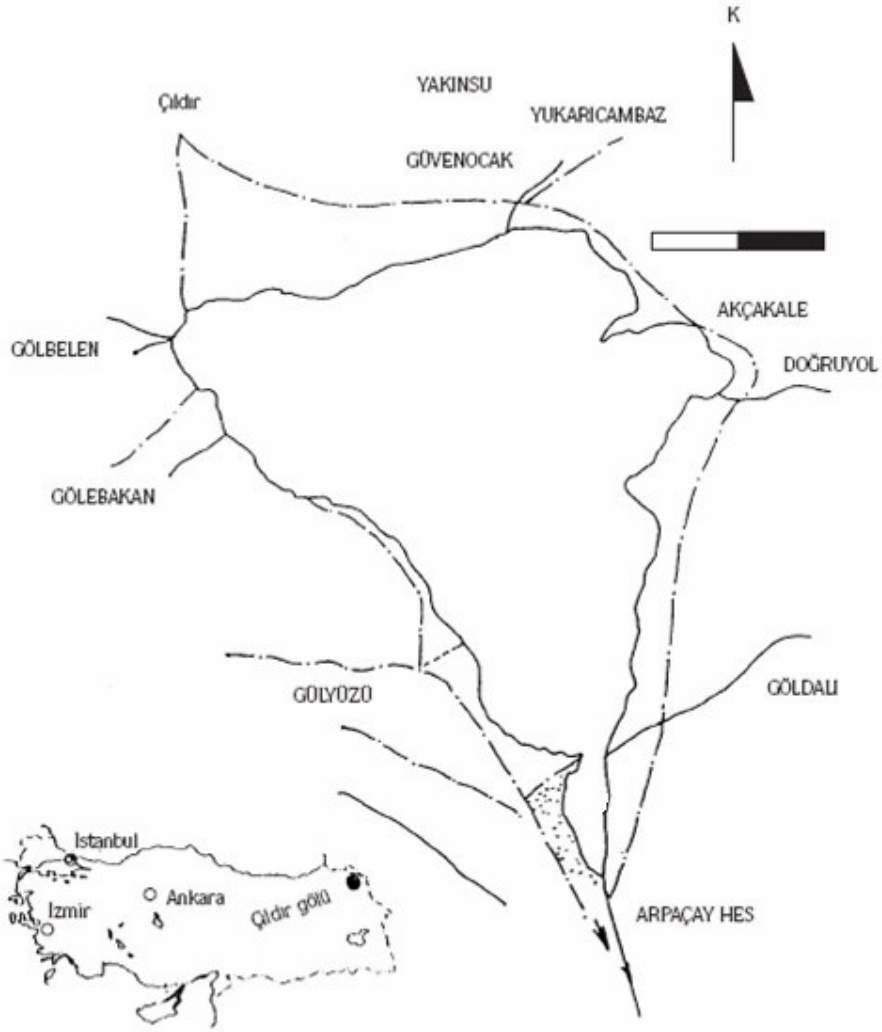
Gölün sadece kuzey batısında seddeyle ayrılmış bataklık ve sulak çayırlar bulunur. Genelde göl çevresi mera vasıflı olup, sert bölge iklimi tarıma olanak vermez. DSI tarafından gölü beslemek amacı ile yapılan derivasyon tünellerinin hem diğer havzalardaki kirlilik yükünü göle taşıması, hem de hayvancılık açısından çok önemli çayırların kurumasına neden olması mümkündür.

Ayrıca inşaatı henüz tamamlanmamış olan Kuzey derivasyonunun Çıldır'ın çok önemli çayırlığı olan Karaçay ovasının ot verimini ciddi boyutta etkilemesi söz konusudur.

Göl ve çevresindeki tarım alanlarında kullanılan tarımsal kimyasalların (özellikle yüksek oranda azot içeren gübrenin) bilinçsizce ve yörenin ekolojik ve iklimsel koşulları göz ardı edilerek kullanılmasının göl üzerindeki kötü etkileri belirtilmektedir.

- Kontrolsüz ve aşırı avlanma
- Erozyon
- Yüksek besin girdisi Çıldır Gölü için tehdit oluşturmaktadır.

Gölde aşırı bir kirlilik gözlenmemesine rağmen yine de artan bir evsel kirlilik göze çarpmaktadır. Adalardaki insan baskısının artması bu alanları kuluçka için kullanan türleri olumsuz etkilemektedir. Yapımı planlanan otel ise yeniden gözden geçirilmelidir. Son yıllarda artan turizmle birlikte insan baskısı artmış ve turistik tesisler inşa edilmeye başlanmıştır [56].



Harita 1. Çıldır Gölü haritası [57].

Göl Hakkında Diğer Bilgiler:

Konum	Ardahan ili
Alan (ha)	12.350
Koordinatlar	41 ⁰ 03' N ve 43 ⁰ 15' E
Rakım (m)	1962
Maksimum derinlik (m)	22

2.5. *Acanthalburnus microlepis* Hakkında Genel Bilgiler

2.5.1. Familya: Cyprinidae

Ülkemizde yaşayan kemikli balıkların, özellikle de tatlı su balıklarının büyük bir kısmını oluşturan bu familya, Kura-Aras Havzasında da oldukça yaygındır. Bu balıklarda baş çıplak, vücut ise sikloit tip pullarla örtülüdür. Ağızda maksiller (maxiller) diş bulunmaz. Bazı türlerde ağız protraktil karakterde (körüklü) olup, tıpkı bir körüklü hortum şeklinde ileriye doğru azalıp kısalabilir. Yağ yüzgeci (adipöz) bulunmaz. Bu familyanın en karakteristik özelliği olarak farinks dişlerinin varlığı gösterilebilir. Bu dişler genellikle operkulumun altında ve 4. solungaç yaylarının gerisindeki faringien kemikler üzerinde olup sıra, sayı ve şekilleri türlere göre büyük farklılıklar gösterir. Bu nedenle, cinslerin ve türlerin ayırımında önemli diagnostik özellikler olarak dikkate alınırlar. Sırtta daima tek dorsal yüzgeç vardır. Ventral yüzgeçler ise, bütün cins ve türlerde abdominal tiptedir. Hava keseleri mevcut olup, daima bir boğumla iki loba ayrılmıştır. Ayrıca pneumatofor adı verilen bir kanal sayesinde özofagus ile devamlı irtibat halindedir. Omur şeridinin ilk dört omuru birbiriyle az çok kaynaşarak Weber kemikleri denilen özel bir formasyon meydana getirmişlerdir. Mide civarında plorik çekum denilen kör barsaklar bulunmaz. Genellikle bıyıksız iseler de bazen bir veya iki çift bıyık taşıyan temsilcilerine rastlanmaktadır. Ağız konumu itibariyle terminal, yukarıya yönelik veya alt durumlu olabilir.

Çoğunlukla sürüler halinde yaşarlar. Üreme zamanı İlkbahar ve Yaz aylarıdır. Bu zamanda özellikle erkeklerin daha parlak ve süslü bir görünüm kazandığı, özellikle

baş ve vücutları üzerinde küçük üreme tüberküllerinin meydana geldiği dikkati çekmektedir.

Ekonomik önemi olan bu familyanın bazı temsilcileri çabuk büyümeleri, yapay dölleme yoluyla yetiştirilmelerinin nispeten kolay olması gibi nedenlerle doğal yaşam alanlarının dışındaki birçok ülkelere insanlar tarafından taşınmışlardır.

Esas itibarıyla, Eski Dünya Kıtaları adını verdiğimiz Asya, Avrupa ve Afrika'yı tamamen kaplamışlardır. Bununla beraber, Amerika'nın Kuzeye yakın bölgelerinde de bulunmaktadır. Daha da genelleştirecek olursak, Madagaskar, Avustralya, Yeni Zelanda, Güney Amerika, Kuzey Kanada ve Alaska, Grönland ve İzlanda hariç olmak üzere bütün dünyaya dağılmışlardır. Madagaskar ve Amazon civarındaki mevcudiyetleri insanlar tarafından çeşitli maksatlar için taşınmalarıyla mümkün olmuştur. Bu familya dünya yüzünde 1500'e yakın tür ile temsil edilirse de, Türkiye'de 30 cins ve 70 türü yaşamaktadır [58, 59].

2.5.2. Cins: *Acanthalburnus*

Kura-Aras sisteminde yaşarlar. Ülkemizde tek bir türü vardır. *A.microlepis*'de D III 8-9, A III 13-17 L.I.71-80 dir. Ağız uç konumlu; üst çene alt çeneden daha uzun; farinks dişleri 2.5-5.2 ya da 2.5-4.2'dir. Kuyruk yüzgeci uzun ve ortadaki çöküntüsü derin; yan taraflarında koyu geniş bir bant var. Sırt ve kuyruk yüzgeçlerinin uçları koyu renklidir [60].

2.5.3. Tür: *Acanthalburnus microlepis* (Filippi, 1863)

Vücut şekli yönünden *Alburnus* türlerine çok benzerse de yanlardan fazla yassılaşmış olması ile ayırt edilir. Standart boyda vücut yüksekliğinin 3.5-4.5 katıdır. Dorsal yüzgecin sonuncu basit ışını iyi kemikleşmiş olup, aşağı yukarı sert bir diken şeklindedir ve uzunluğu baş boyuna eşittir. Ağız küçük yapılı ve hafif yukarıya yöneliktir. Üst çene alt çeneden daha uzundur. Gözler nispeten iri yapıdadır ve çapları baş boyunun 1/4'ü kadardır. Kuyruk yüzgeci derin girintili ve loplarının ucu sivridir.

Renk, *Alburnus*'larda olduğu gibi parlak beyaz görünüştedir. Vücut yanlarında baştan kuyruğa kadar uzanan, siyah renkli geniş birer bant bulunur. Dorsal ve kaudal yüzgeçlerin serbest uçları genellikle siyah renklidir. Diğer yüzgeçler ise, çoğu kez gri, bazen de kırmızı renklidir. Asıl yayılış alanı Kura ve Aras nehir sistemleri olan bu tür, lkemizde Aras nehri, ölçek suyu (Ardahan), Akçalar suyu (Arpaçay) ve Kars ayından bilinmektedir. Etleri yenmekle beraber çok kılçıklı olduğundan fazla ekonomik önemi yoktur [58].

Diagnostik Özellikleri:

D: III; 8–9

A: II-III; 13–17

L. lat: 68–83

L.tran: 13–15/6–8

Farinks dişleri: 2.5–5.2 veya 2.5–4.2

Solungaç dikenleri: 9–10

Regnum (Alem) : Animalia

Subregnum (Alt alem) : Metazoa

Phylum (Şube) : Chordata

Subphylum (Alt şube) : Gnathostomata

Superclass (Üst sınıf) : Pisces

Class (Sınıf) : Osteichthyes

Subclass (Alt sınıf) : Actinopterygii

Superordo (Üst takım) : Teleostei

Order (Takım) : Cypriniformes

Family (Aile) : Cyprinidae

Genus (Cins) : *Acanthalburnus*

Species (Tür) : *Acanthalburnus microlepis* [58].



Resim 4. İnci balığı (*Acanthalburnus microlepis*, Filippi 1863)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasal

Sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonu yaklaşık olarak %12,5–25 oranında aktif klorin gazı (Cl₂) içerdiğinden biosid özelliğine sahip olup evsel, endüstriyel, tıbbi ve bilimsel uygulamalarda yaygın bir biçimde kullanılmaktadır [61]. Sodyum hipoklorit, yaklaşık 100 yıldan fazla zamandır dezenfektan olarak kullanılmakta olup, birçok mikroorganizma üzerine hızlı etkili bir ajan özelliği taşımaktadır. Sodyum hipokloritin antiseptik özelliği bakteri, sporlar, algler, virüsler ve hatta protozoonlar üzerine geniş etki spektrumu ile klinik pratikte çok yaygın bir şekilde kullanılmasını sağlamıştır [62]. Sodyum hipokloritin su veya atık sularla karışması durumunda, kolayca nükleotid bazları ve proteinler gibi birçok biyolojik materyalle reaksiyona girerek stabil, lipofilik ve akuatik çevre için toksik olan organik klorinli bileşiklerin ortaya çıkmasına sebep olur [61].

3.2. Deney Materyali

Deneylerde kullanılan *A. microlepis* örnekleri Çıldır Gölü [(lat 38° 35'E, long 45° 45'N)] 1947 metre yükseklikte bulunan Akçakale köyü yakınlarından elektrikli şoker ve serpme ağ kullanılarak yakalandı. *A. microlepis* örnekleri vücut şekli yönünden *Alburnus* türlerine çok benzerse de yanlardan fazla yassılaştığı olması ile ayırt edilir. Standart boyda vücut yüksekliğinin 3,5–4,5 katıdır. Dorsal yüzgecin sonuncu basit ışını iyi kemikleşmiş olup, aşağı yukarı sert bir diken şeklindedir ve uzunluğu baş boyuna eşittir. Ağız küçük yapılı ve hafif yukarıya yöneliktir. Üst çene alt çeneden daha uzundur. Gözler nispeten iri yapıdadır ve çapları baş boyunun 1/4'ü kadardır. Kuyruk yüzgeci derin girintili ve loplarının ucu sivridir.

Renk, *Alburnus*'larda olduğu gibi parlak beyaz görünüştedir. Vücut yanlarında baştan kuyruğa kadar uzanan, siyah renkli geniş birer bant bulunur. Dorsal ve kaudal yüzgeçlerin serbest uçları genellikle siyah renklidir. Diğer yüzgeçler ise, çoğu kez gri, bazen de kırmızı renklidir. Kura ve Aras Havzasına endemik olan bu tür, ülkemizde Aras nehri, Ölçek suyu (Ardahan), Akçalar suyu (Arpaçay) ve Kars çayından bilinmektedir [58].

3.3. Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

1. Etanol (C₂H₅OH), (Merck, K35091886 537)
2. Sodyum hipoklorit solüsyonu (NaOCl), (%6–14), (Merck, B921414 643)
3. Potasyum di-hidrojen fosfat (KH₂PO₄), (Merck, A651773 524)
4. Sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄), (Merck, K34623780 516)
5. Benzen (C₆H₆), (Labkim, B.0032.10.21)
6. Giemsa (Merck, HX694620)
- 7.

Fosfat Buffer Solüsyonu : Potasyum di-hidrojen fosfat (KH₂PO₄)’dan 9.1 gr. alınır ve 1000 ml. bidistile suya tamamlanır. Başka bir balon jøjeye de sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄)’dan 11,9 gr alınır ve 1000 ml. bidistile suya tamamlanır ve stok çözeltiler hazırlanmış olur [22].

Sorenson Fosfat Tampon Solüsyonu: KH₂PO₄ çözeltilerinden 60 ml. ve Na₂HPO₄ çözeltilerinden 30 ml. alınarak şaleye konulur ve üzerine 10 ml. giemsa boyası eklenmesi suretiyle %10 luk giemsa-sorenson fosfat tampon çözeltilerimiz hazırlanmış olur. Sorenson fosfat tampon çözeltileri çeşitli pH değerlerine ayarlanabilir, bu işlem için her iki çözeltilerin değişik miktarları kullanılarak pH istenilen değere ayarlanır [22].

Çözelti 1:

KH₂PO₄..... 9.1 gr.
Bidistile su.....1000 ml.

Çözelti 2:

Na₂HPO₄.....11.9 gr.
Bidistile su.....1000 ml.

pH 5,6 için: Çözelti 2 den 5 ml. Ve çözelti 1 den 100 ml.

pH 6,0 için: Çözelti 2 den 12.3 ml. Ve çözelti 1 den 100 ml.

pH 6,5 için: Çözelti 2 den 30 ml. Ve çözelti 1 den 100 ml.

pH 6,8 için: Çözelti 2 den 50 ml. Ve çözelti 1 den 100 ml.

pH 7,2 için: Çözelti 2 den 70 ml. Ve çözelti 1 den 100 ml.

3.4. Mikronükleus Testi

Deneylerde kullanılan *A. microlepis* örnekleri Çıldır Gölü [(lat 38° 35'E, long 45° 45'N)] 1947 metre yükseklikte bulunan Akçakale köyü yakınlarından elektrikli şoker ve serpme ağ kullanılarak yakalandı. Yakalanan balıkların laboratuara transferleri polietilen tanklar içerisinde ve havalandırmaları sağlanarak yapıldı. Laboratuara getirilen balıklar iyice havalandırılmış akvaryumlara yerleştirilerek bir hafta boyunca ortama uyumları sağlanmıştır. Uyum periyodunda suyun fizikokimyasal özelliklerinin anlaşılması için yapılan analizlerde sıcaklığın 19±1, pH'ın 7,2–7,3, çözülmüş oksijen (mg/l) 8–9 ve toplam sertlik (CaCO₃) (mg/L) 150–170 olarak tespit edilmiş olup çizelge 10' de bu değerler gösterilmektedir.

Mikronükleus testi için deneylere başlamadan önce akvaryumlar iyice yıkanarak içerisinde hiçbir maddenin kalmaması sağlandı. Akvaryumlara sırayla sodyum hipokloritin ppm (mg/ lt) olarak hesaplanmış değerleri (0,05 mg/ lt, 0,10 mg/ lt, 0,25 mg/ lt, 0,37 mg/lt, 0,50 mg/ lt, 0,75 mg/ lt, 1 mg/ lt) en küçüğünden başlanılarak konuldu ve her akvaryuma 10 balık yerleştirildi. Balıkların ortalama ağırlıkları 2–5 gr, boyu ise ortalama olarak 10–15 cm civarında idi. Akvaryumlara, balığın her bir gramı için 1 lt su konulduğundan, ortalama her akvaryuma 30 lt su konulmuştur. Bir akvaryuma hiçbir madde konulmayarak 10 balık yerleştirmiş ve kontrol grubu oluşturulmuştur. Ayrıca pozitif kontrol olarak 10 mg/lt Benzen kullanıldı. Pozitif kontrolün uygulandığı akvaryuma 10 balık yerleştirildi ve buradaki balıklardan 36.saat, 72.saat ve 6. gün sonunda kan numuneleri alınarak, 1000 eritrosit hücresi sayılmış ve mikronükleili hücre sayısı tespit edilmiştir. Mikronükleus frekansının tespiti için 60 balık kullanıldı ve sonuçların sağlıklı bir şekilde elde edilmesi için her deneme 2 kez tekrarlandı. Deney ortamındaki ışıklandırma, doğal periyota uygun olarak 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Değişik zaman aralıklarında (36.saat, 72. saat ve 6. gün) kontrol ve canlı balık bulunan deney gruplarından 3 adet balıktan kan numuneleri caudal vena'dan alınarak her kan numunesinden 5 adet preparat hazırlandı. Preparatlar havada kurutulduktan sonra 20 dakika süreyle metanolde fikse edildi. Preparatların tekrar havada kurumaması sağlanarak, % 10'luk giemsa-fosfat buffer solüsyonunda 15 dakika boyandı. Bu süre sonunda preparatlar solüsyondan

ıkarılarak fosfat buffer solusyonu ile yıkanmış ve havada kurumaları sağlanmıştır. Preparatlar ışık mikroskobunda x1000 lik büyütme ile incelenerek ve her preparatta 1000 eritrosit hresi sayılarak mikronkleili hücre sayısı tespit edildi. Preparattaki düzgün nükleuslu eritrositlerde ana nükleustan ayrı ve yuvarlak yapılı partiküller mikronükleus olarak değerlendirilmiştir. Boya partikülleri ile MN'yi karıştırmamak için mikrovida ile kontrol yapılmış nkleusla MN nin birlikte kaybolup tekrar görülmesi bu ayrımı sağlamıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler istatikselsel olarak değerlendirildi.

3.5. Letal Dozun Hesaplanması

Sodyum hipoklorit'in, *A.microlepis*'teki öldürücü dozlarının (LC değerleri) tespiti için akvaryumlara sırayla sodyum hipoklorit'in ppm (mg/ lt) olarak hesaplanmış değerleri (0,05 mg/ lt, 0,10 mg/ lt, 0,25 mg/ lt, 0,37 mg/ lt, 0,50 mg/ lt, 0,75 mg/ lt, 1 mg/ lt) en kgnden başlanılarak konuldu ve her akvaryuma 10 balık yerleştirildi. Ayrıca bir akvaryuma kimyasal madde eklenmeden 10 balık konularak kontrol grubu oluşturuldu. Akvaryumlara, balığın her bir gramı için 1 lt su konulduğundan, ortalama her akvaryuma 30 L su konulmuştur. Deney ortamındaki ışıklandırma, doğal periyota uygun olarak 15 saat aydınlık ve 9 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Letal dozun tespiti için 60 balık kullanıldı ve sonuçların sağlıklı bir şekilde elde edilmesi için her deneme 3 kez tekrarlandı. Letal dozların hesaplanması için sırasıyla 24. saat, 48. saat, 72.saat ve 96. saat sonlarında akvaryumlarda ölen ve canlı kalan balıkların sayıları not edildi ve 96. saat sonunda elimizdeki veriler istatikselsel olarak değerlendirildi.

3.6. İstatikselsel Analiz

Yapılan alışmalar sonucunda, *A.microlepis* türünde mikronükleus frekansının tespiti için elde edilen veriler ANOVA testi ile istatikselsel olarak değerlendirildi. Ayrıca *A.microlepis*'in akut LC₅₀ değerinin belirlenmesi için elde edilen veriler Simply Probit ve SPSS Analizi ile istatikselsel olarak değerlendirilerek sodyum hipoklorit'in *A.microlepis*'teki letal dozları tespit edilmiştir.

Çizelge 3.10. Akvaryumlarda kullanılan suyun fizikokimyasal özellikleri.

Parametreler	Değerler
Sıcaklık (°C)	19±1
pH	7,2–7,3
Çözünmüş Oksijen (mg/L)	8–9
Toplam Sertlik (CaCO ₃) (mg/L)	150–170

4- BULGULAR

Gelişen sanayi ve teknolojiye paralel olarak sayıları hızla artan kimyasal maddeler insan yaşamını kolaylaştırmaları, istenmeyen bazı olguların ortaya çıkmasını engellemeleri gibi pek çok faydalı yararlar göstermeleri yanında özellikle bunların kullanıldıktan sonra gereken şekilde yok edilmemeleri, saklanma ve kullanma talimatlarına tam olarak uyulmaması nedeniyle canlılar üzerinde pek çok olumsuz durumu da paralelinde getirmektedir. Bu yüzden son yıllarda, besin zinciri halkaları düşünülerek bu kimyasal maddelerin canlılar üzerindeki genotoksik etkisi pek çok araştırmacı tarafından incelenmektedir. Bu nedenle suların ve bunun dışında çok geniş bir kullanım alanında dezenfektan olarak kullanılan sodyum hipokloritin genotoksik etkisinin görülebilmesi için, bu maddenin kullanım esnasında ve sonrasında sucul alana geçmesi düşünülerek sucul alandaki pelajik bölgede bulunan balıklar araştırma materyali olarak kullanılmıştır.

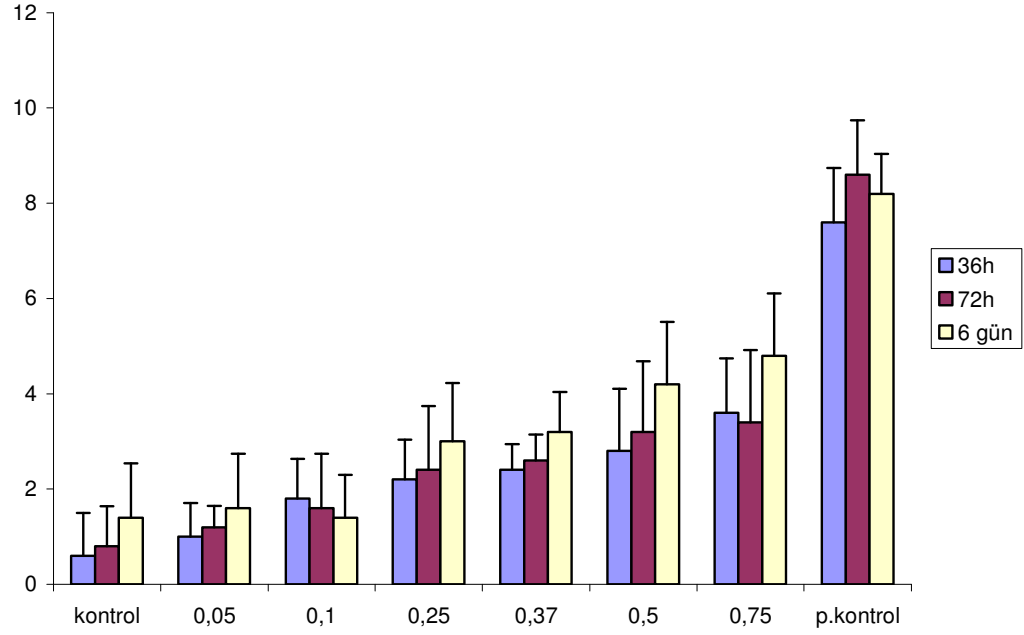
4.1. MN İle İlgili Bulgular

Mikronükleus testi ile sodyum hipoklorit'in genç eritrositler üzerine yaptığı etki gösterilmiştir. Mikronükleus testi için akvaryumlara sırasıyla 0,05 mg/ lt, 0,10 mg/ lt, 0,25 mg/ lt, 0,37 mg/lt, 0,50 mg/ lt, 0,75 mg/ lt, 1 mg/ lt konulup, 36. saat, 72. saat ve 6. günde balıklardan kan örnekleri alınarak eritrosit hücreleri incelendi. 36. saatte elde edilen verilere göre ortalama her 1000 eritrosit hücresinde kontrol grubunda 0,6, sodyum hipokloritin konulduğu akvaryumlardan alınan kan örneklerinde ise konulan ppm (mg/ lt) değerlerinin en küçüğünden başlanılarak yapılan sayımlarda elde edilen verilere göre mikronükleus değerleri sırasıyla 1, 1,8, 2,2, 2,4, 2,8, 3,6 olarak bulunmuştur. 72. saatte elde edilen verilere göre ortalama her 1000 eritrosit hücresinde kontrol grubunda 0,8, sodyum hipokloritin konulduğu akvaryumlardan alınan kan örneklerinde ise konulan ppm (mg/lt) değerlerinin en küçüğünden başlanılarak yapılan sayımlarda elde edilen verilere göre mikronükleus değerleri sırasıyla 1,2, 1,6, 2,4, 2,6, 3,2, 3,4 olarak bulunmuştur. 6. günde elde edilen verilere göre ortalama her 1000 eritrosit hücresinde kontrol grubunda 1,4, sodyum hipokloritin konulduğu akvaryumlardan alınan kan örneklerinde ise konulan ppm (mg/lt) değerlerinin en küçüğünden başlanılarak yapılan sayımlarda elde edilen verilere göre mikronükleus değerleri sırasıyla 1,6, 1,4, 3, 3,2, 4,2, 4,8 olarak

bulunmuştur. Pozitif kontrol için 10 ppm (mg/lt) benzen konulan akvaryumdaki balık eritrositlerinde ise 36.saat, 72.saat ve 6.günde yapılan sayımlarda ortalama her 1000 eritrosit hücresinde sırasıyla 7.6, 8.6, 8.2 mikronükleus tespit edilmiştir.

Ayrıca çalışmada kullanılan suyun fizikokimyasal özellikleri incelenerek bunların benzer diğer çalışmalarda kullanılan su özelliklerine sahip olması amaçlanmıştır (Çizelge 10). Deneyler sonucunda sodyum hipoklorit'in mikronükleus oluşumuna etki ettiği ve artan doz miktarıyla orantılı olarak mikronükleus oluşumunda da artış olduğu, kullanılan sodyum hipoklorit'in doz miktarının artışıyla çekirdeğin morfolojisinde de belirgin değişimlerin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 2, a, b, c, d, e ve Şekil 3.)

Sodyum hipoklorit kullanılmasına bağlı olarak görülen mikronuklei formasyonlarına ilişkin sonuçlar çizelge 11 ve grafik 1 de gösterilmiştir. Tablodan da görüldüğü üzere, 0,50 ve 0,75 mg/L doz uygulanan deney gruplarından elde edilen mn sonuçları 36.saat, 72.saat ve 6. gün için istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,001$). Pozitif kontrol olarak benzen kullanılan gruptan elde edilen mn sayıları istatistiksel olarak tüm numune zamanlarında diğer gruplara göre önemli bir fark göstermektedir ($P<0,001$). Her doz grubu kendi içerisinde, numune alma zamanları bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli bir fark görülmemiştir. Ancak, elde edilen mn sayıları bakımından grafik 1'de görüldüğü üzere; 0,05 mg/lt, 0,25 mg/lt, 0,37 mg/lt ve 0,50 mg/lt doz gruplarında 36. saatten itibaren düzenli bir artış görülmektedir. Bununla beraber 0.50 mg/lt ve 0.75mg/lt micronuclei deneme gruplarında ilk 24 saatte ölümler görülmüştür.



Grafik 1: Deneme grupları, 36.saat, 72.saat ve 6. gün MN frekansları.

Tüm grupların numune alma zamanlarındaki mn sayıları ve standart sapma değerleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Çizelge 4.11. *Acanthalburnus microlepis*' te sodyum hipokloritin 36.saat, 72. saat ve 6. gün sonundaki MN değerleri.

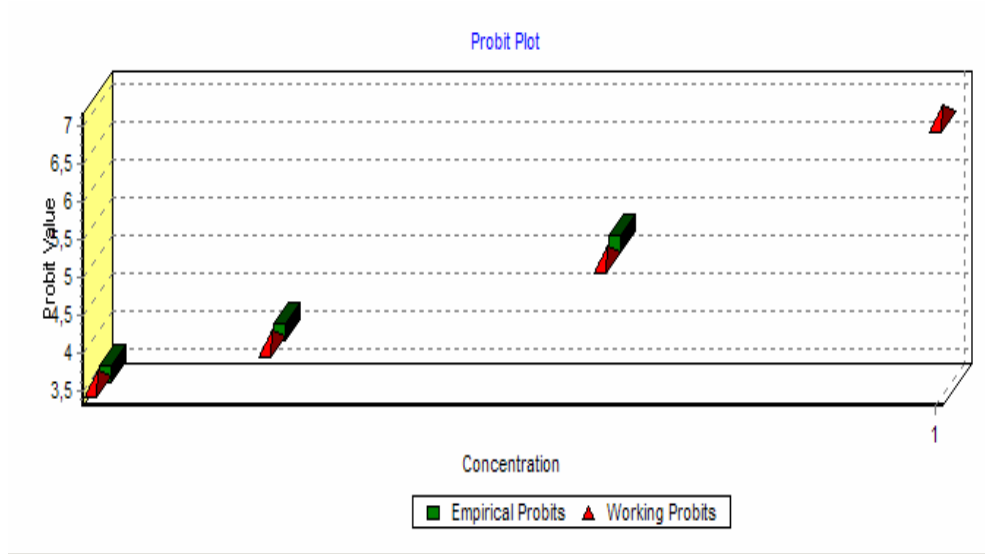
Uygulama	MN Frekansı (Mean ±StDev)		
	36. Saat	72. Saat	6. Gün
Negative control	0,6±0,8944	0,8±0,837	1,4±1,140
Positive Control (10 mg/lt Benzene)	7,6±1,1402*	8,6±1,140*	8,2±0,837*
0,05 mg/lt	1±0,7071 ^{ns}	1,2±0,447 ^{ns}	1,6±1,140 ^{ns}
0,1 mg/lt	1,8±0,8367 ^{ns}	1,6±1,140 ^{ns}	1,4±0,894 ^{ns}
0,25 mg/lt	2,2±0,8367 ^{ns}	2,4±1,342 ^{ns}	3±1,225 ^{ns}
0,37 mg/lt	2,4±0,5477 ^{ns}	2,6±0,548 ^{ns}	3,2±0,837 ^{ns}
0,50 mg/lt	2,8±1,3038*	3,2±1,483*	4,2±1,304*
0,75 mg/lt	3,6±1,1402*	3,4±1,517*	4,8±1,304*

Ns : non-significant

* p<0,001

4.2. LC₅₀ İle İlgili Bulgular

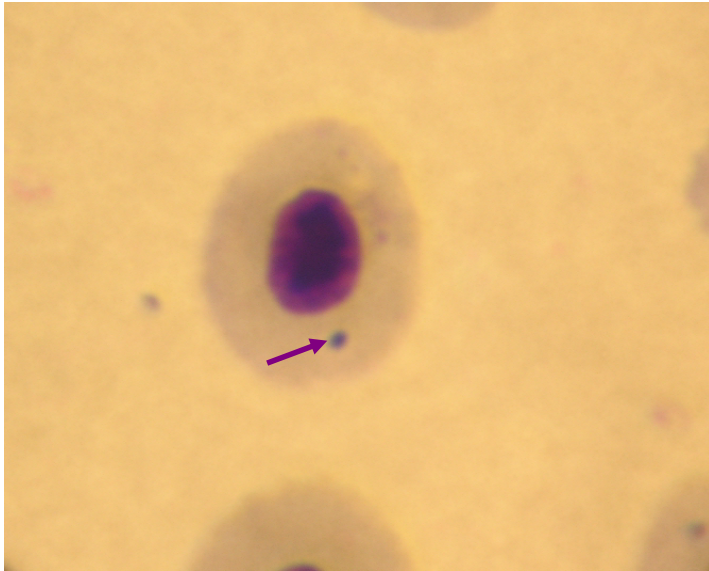
Çalışmamızda sodyum hipokloritin *Acanthalburnus microlepis*'te MN frekansı üzerine olan etkisinin yanı sıra toksisiteside değerlendirilmiştir. Toksikite çalışmasına ilişkin elde edilen bulgular simply probit analizi ile değerlendirilmiş olup sonuçları tablo 2 ve grafik 2 de gösterilmektedir. Toksikite çalışması sonunda sodyum hipokloritin *Acanthalburnus microlepis*' te LC₉₀ değeri 0.91 mg/lt, LC₅₀ değeri 0.63 mg/lt iken LC₁₀ değeri 0.44 mg/ lt olarak tespit edilmiştir. Verilerin SPSS analizi ile değerlendirilmesi sonucu da LC₅₀ değeri 0.63 mg/ lt olarak bulunmuş olup, sonuç simply probit analizi ile uyum göstermektedir. *Acanthalburnus microlepis*' te sodyum hipokloritin 24-48-72-96.saat sonundaki akut toksitite LC değerleri için gerekli olan konsantrasyonlar (mg/lt), bu konsantrasyonların %95 güven aralığındaki alt ve üst limitleri çizelge 12'de verilmektedir.



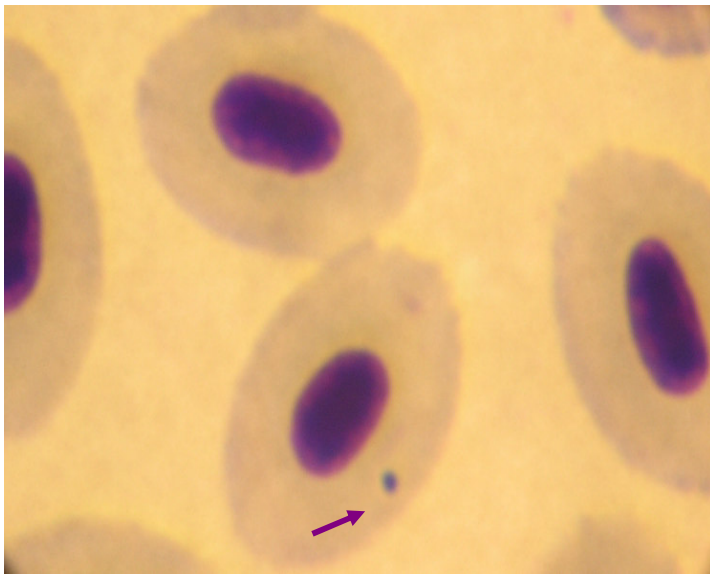
Grafik: 2 Deneme gruplarının 24-48-72-96.saat sonundaki LC(10-20-30-40-50-60-70-80-90) Değerleri

Çizelge 4.12. *Acanthalburnus microlepis'* te sodyum hipokloritin 24-48-72-96.saat sonundaki akut toksitesisi (Simply Probit Analizi).

LC Değerleri	Konsantrasyon(mg/lit)	% 95 Güven Aralığı	SE log LDx
LC 10	0,4416	0,3947-0,494	0,02486
LC 20	0,5001	0,4554-0,5493	0,02077
LC 30	0,5475	0,5038-0,5949	0,01841
LC 40	0,591	0,5473-0,6381	0,01701
LC 50	0,6343	0,5892-0,6828	0,01633
LC 60	0,6808	0,6324-0,7328	0,01631
LC 70	0,7348	0,6804-0,7936	0,01705
LC 80	0,8044	0,739-0,8756	0,01879
LC 90	0,9111	0,8237-1,008	0,02234
Observation used=3	Chi-squared=7,467	G= 0,04534	



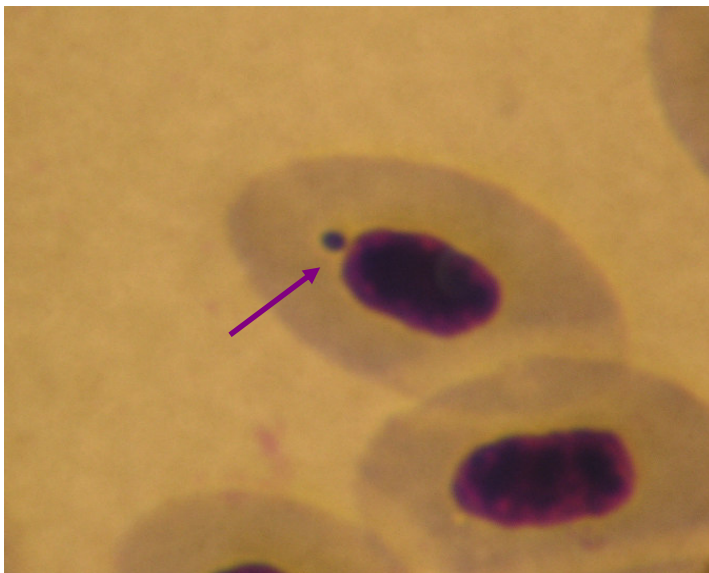
a.



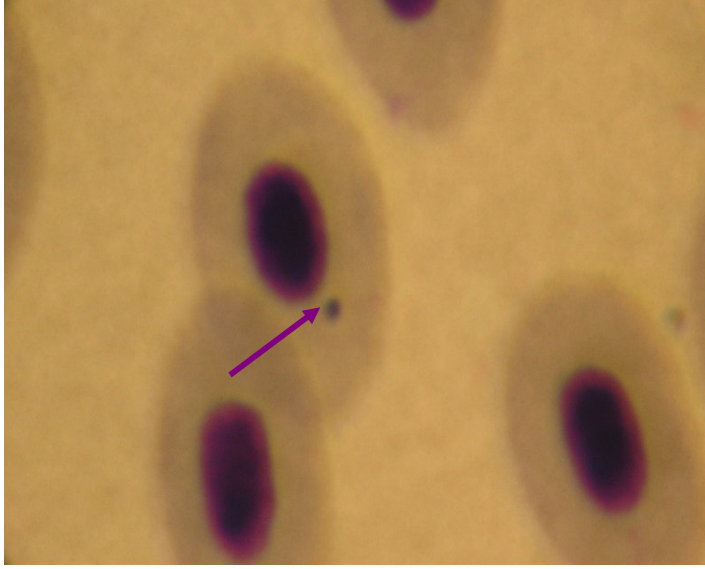
b.



c.



d.



e.

Resim 5: a, b, c, d, e: *A. microlepis* eritrositleri. Ok, mikronükleus oluşmuş eritrositleri göstermektedir.



Resim 6: *A. microlepis* eritrositi. Ok, çift mikronükleus oluşumunu göstermektedir.

5- SONUÇ VE TARTIŞMA

Akarsu, göl ve denizler yerüstü sularını oluştururlar. Dünya nüfusunun hızla artmasına rağmen su kaynaklarının sabit olması, bu kaynakların kirletilmemesini ve çok iyi kullanılmasını gerektirmektedir. Bilinçli su kullanımıyla, yaşam kalitemizi bozmadan alacağımız basit tedbirlerle su kaynaklarımızın kirlenmesini ve tükenmesini önleyebiliriz. Bununla birlikte; üç tarafı denizlerle çevrili olan ve çok sayıda yerüstü ve yeraltı su kaynaklarının bulunduğu ülkemizde sular, evsel ve endüstriyel atıklarla kirlenmektedir. Bu atıkların arıtılmadan su yataklarına verilmesi, katı atıkların düzensiz olarak alıcı ortama bırakılması, ayrıca bilinçsizce yapılan zirai ilaçlama ve gübrelemeden dolayı yerüstü suları kirlenmektedir.

Sanayinin çevre üzerindeki olumsuz etkisi diğer faktörlerden çok daha fazladır. Sanayi kuruluşlarının; sıvı atıkları ile su kirliliğine, buna bağlı olarak gelişen toprak ve bitki örtüsü üzerinde aşırı kirlenmelere sebep olduğu ve doğa tahribine yol açtığı bilinmektedir. Ayrıca son yıllarda sanayi ve teknolojinin hızla gelişmesi sonucu köyden kente göç olayı artmış, bu durum hızlı ve düzensiz yapılaşmaya yol açmıştır. Zirai mücadele için yapılan ilaçlamalarda, havadaki ilaç zerrecilerinin rüzgârla sulara taşınması veya tarım ilaçları üretimi yapan fabrikaların atıklarının su kaynaklarına arıtılmadan verilmesi sebebiyle sular kirlenmektedir.

Diğer yandan kimyasal gübrelerin bilinçsizce ve aşırı kullanımı da zamanla toprağı çoraklaştırmakta, bunun sonucunda hem toprağın verimi düşmekte, hem de yeraltı sularına sızması ve yüzey su akışlarıyla birlikte yerüstü sularına karışması neticesinde su kirliliğine sebep olmaktadır [63].

Gelişmekte olan ülkelerde içme sularının kontaminasyonu ve yetersiz hijyen bir yılda yaklaşık 4 milyar kişide diyare ortaya çıkmasına ve bunların, çoğu beş yaş altı çocuk olmak üzere 2.2 milyonunun ölmesine sebep olmaktadır. Kontamine sular diyare'nin yanısıra tifo, hepatit A, polio ve kolera gibi salgın hastalıkların ortaya çıkmasına da sebep olmaktadır. Bu tür su kökenli hastalıkların önüne geçebilmek için suların klorlanması yaklaşık 100 yıldır etkili olarak kullanılıyor. Çalışmalar, klorlanmış su

içiminin üriner ve gastrik kanser oluşumunun yanı sıra üreme sistemi ve gelişim üzerine etkili olduğunu göstermiştir.

Sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonu yaklaşık olarak %12,5-25 oranında aktif klorin gazı (Cl₂) içerir. Biosid özelliğine sahip olup evsel, endüstriyel, tıbbi ve bilimsel uygulamalarda yaygın bir biçimde kullanılmaktadır [61]. Sodyum hipoklorit (NaOCl) genellikle sulu çözeltiler halinde deneylere katılır. Bazik şartlarda (pH>9.5) sulu çözeltilerde nispeten karardır. Sodyum hipoklorit, nötral sulu çözeltilerde serbest HOCl'ya kolaylıkla hidrolize olur. Zayıf asidik şartlarda Cl₂ açığa çıkar. Hipokloröz asit için plazma yarı ömrü süttten kesilmemiş hayvanlarda 89 saat süttten kesilmiş hayvanlarda 44 saattir. Cl⁻ iyonları plazmada bulunabilen tek metabolittir; klorit ve klorat iyonları tespit edilmemiştir. Ağızdan alındıktan sonra dokularda herhangi bir depolanmaya rastlanmamıştır. Hali hazırdaki veriler NaOCl'ın düşük akut oral toksisiteye sahip olduğunu göstermektedir (Fare'de oral LD₅₀ değeri 5800–6800 mg/kg). toksisite işaretleri düşük genel aktiviteyi, hipotermiyayı, diareyi, hemolizi, pilo-ereksiyonu ve mukoz membran irritasyon ve yanıkları içerir. Sulu NaOCl çözeltileri ciddi şekilde irritasyona veya cilt ve gözlerde tahrişe sebep olur. 4. saatlik tek bir uygulama için üst deriyi tahriş eden en düşük derişim %2 dir. Tavşan gözlerinde bir tahribat etkisi oluşturabilmesi için bu değerin % 0.5 ten küçük olması yeterlidir. İçme sularındaki alt kronik dozaj (30–190 mg/kg NaOCl) farelerdeki değişimlerin tedavisinde etkin değildir (Yüksek dozajlardaki vücut ağırlığı kazanımının inhibisyonu hariç). NaOCl'nin mümkün mutajenik aktivitesi ile ilgili birçok literatüre rastlamak mümkündür [64].

Sularda gelişen toksik maddeler endüstriyel, tarımsal ve kentsel atıkların yanı sıra suların dezenfekte edilmesinden de kaynaklanmaktadır [65]. Özellikle sanayi tesislerinde fouling önleyici olarak kullanımı sulara direkt verilmesi açısından önemlidir. Su ihtiyaçlarını temin etmek amacıyla deniz kıyısında kurulan sanayi tesislerinin su giriş ve çıkış boruları, zamanla fouling oluşturan çeşitli organizmalar tarafından tıkanmakta ve su akışı engellenmektedir. Bu olayı önlemek için genellikle kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla çoğunlukla ucuz, etkili ve uygulama kolaylığı bakımından klor tercih edilmektedir. Klor uygulaması kesikli

olarak şoklama şeklinde yapılabildiği gibi ortama devamlı klor verilmesi şeklinde sürekli sistemlerde yapılabilmektedir. Yapılan bir araştırmaya göre sürekli sistem uygulandığı zaman makro fouling organizma kontrolünü daha etkili bir şekilde yapıldığı bildirilmektedir. Özellikle demir- çelik endüstrisi termik santraller ve nükleer santraller gibi yoğun soğutma suyu kullanan tesislerde bu sorunun bertaraf edilebilmesi için anti fouling kimyasallar kullanılmakta ve yaygın olarak hipoklorit bileşikleri tercih edilmektedir [66, 67]. Yapılan bir araştırmada foulinge neden olan *Pinctada radiata* adı verilen inci istiridyesinde, klor kaynağı olarak sodyum hipokloritin kullanıldığı 24 saatlik öldürücü klor konsantrasyonları LC₅₀ için 1.75 mg l⁻¹, LC₉₀ için 5,36 mg l⁻¹, LC₉₅ için 7,58 mg l⁻¹ olarak bulunmuştur [68]. *Pinctada radiata*'ta LC değerlerinin bizim çalışmamıza göre daha düşük çıkmasının en önemli sebeplerinden biri bu organizma, klor uygulamasının yapılmaya başlanılmasından itibaren, oldukça uzun bir süre kapaklarını kapatmakta ve dış ortamla ilişkisini kesmektedir. Bu nedenle, uygulanan klor konsantrasyonlarındaki ölümler, belki de çok daha önce ortaya çıkması gerekirken daha geç olarak ortaya çıkmaktadır.

Su kaynaklı hastalıklara ve bununla beraber ölümlere sebep olan etmenlerin ortadan kaldırılması için uzun bir süreden beri içme suları klorinizasyona tabi tutulmaktadır. Bu muamele sonucu suda yaşayan patojenlerin mortalitesinde oldukça iyi sonuçlar vermiştir. Ancak 2004 yılında Monarca, klorinlenmiş olan bu içme sularında bazı karsinojenik ürünlerin (kloroform ve trihalometanlar gibi) olduğunu buldu . Ayrıca, kullanılan kimyasal dezenfektanların ve bunların parçalanması sonucu oluşan toksik ürünlerinin sucul ortamda yaşayan organizmalarda birçok yan etkilere yol açtığı anlaşılmıştır [69].

Yapılan birçok epidemiyolojik çalışma, klorinli içme sularının insanlarca tüketilmesi sonucu özellikle gastrointestinal ve üriner bölge kanserlerinin ortaya çıkmasındaki riski arttırdığı sonucunu desteklemektedir. Kimyasal analizler, epidemiyolojik çalışmalar ve long-term karsinogenite testlerinin yapılmasındaki zorluklar karşısında, karsinojenik aktiviteyi önceden belirleyebilen, hızlı ve ucuz olan short-term mutajenitesi testleri uygulamaya başlandı [69]. Birçok araştırmacı tarafından yıllardır yapılan çalışmalar dezenfekte suların neden olduğu kirliliğin deniz canlıları

üzerindeki potansiyel etkilerini genotoksisite de içinde olmak üzere short-term testlerle araştırmaktadırlar [70]. Klorinli içme sularında, salmonella/microsome (AMES) başta olmak üzere in vitro test sistemleri uygulandığında bu sulara yüksek mutajenik aktivite tespit edilmiştir. Örneğin yapılan bazı çalışmalarla hen İtalya hem de diğer yerlerde salmonella mutajenitesi gibi in vitro olan short-term testlerle içme sularındaki mutajenlerin varlığı kolayca tespit edilmiştir [71]. Salmonella/microsome (AMES) testi ile klorine suların genotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiş, bu aktivitenin genelde klorinli dezenfektanların suda doğal olarak bulunan bazı maddelerle (humik asit ve fulvik asit gibi) etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir [69].

Geçtiğimiz 15 yıldan beri mikro çekirdek testi büyük bir hızla geliştirilerek yaygınlaşmaktadır. Sitogenetikçi olmayanların bile sonuçlarını değerlendirebilmesi, ucuz ve fazla masraf gerektirmemesi, testi cazip kılan noktalardır. Hatta son yıllarda araştırmacılar, klasik kromozomal aberasyonların analizine, alternatif olduğunu bildirmişlerdir.

Birleşik Devletler, Ulusal Toksikoloji Programı (U.S. N.T.P.). Mikroçekirdek denemelerini başka bir in vitro kısa süreli test olan Salmonella Testi (Ames Testi) ile birlikte yapılmasını ya da değerlendirilmesini önermektedir. 29 Kanserojen ve 17 kanserojen olmayan madde Salmonella denemelerinde ve fare kemik iliğinde mikro çekirdeğe yol açıp açmadığını tespit etmek için test edilmiştir. Her iki denemede pozitif tepki veren 13 kimyasal maddenin kanserojen olduğu saptanmıştır. Salmonella denemelerinde negatif sonuç veren, fakat fare kemik iliğinde test sonucu pozitif olan 8 kimyasal madde arasından 6 sının kanserojen olduğu belirlenmiştir. Bu noktada “in vivo” testinin Salmonella denemesinde gözden kaçan 6 kanserojeni tanıdığı sadece 21 taneden 2 tanesinde yanlış pozitif tepki verdiği bildirilmektedir. Her iki testte de negatif sonuç veren 10 kimyasal madde arasında 4 kanserojenin olduğu tespit edilmiştir. Ancak bunlarında gerçek genotoksik olmayan kanserojen olduğu görüşü yaygındır. Uluslar arası kanser araştırmaları ajansının (I.A.R.C.) değerlendirmesinde insan için kanserojenik olmayan bir madde olarak varsayıлып sınıflandırılmıştır. Bu konuda Birleşik Devletler Ulusal Toksikoloji Programı ve Uluslararası Çevre Örgütü (U.S. N.T.P. ve E.P.A) önemli sonuçlara ulaşmıştır.

Bunlardan birincisi, Salmonella Testinin tek başına genotoksinleri fark edemeyeceği yönündedir. İkincisi ise, “in vivo” bulgusundaki negatif yeterlilik ve uygunluk, pozitif “in vitro” sonuçlarına baskın değildir. Bu düşüncelerden anlaşılacağı üzere in vivo testler ve buna bağlı mikroçekirdek testi, kanserojenlerin belirlenmesinde daha çok güvenilir görünmekle birlikte, diğer kısa süreli testlerle beraber alınan sonuçlarında dikkate alınması yerinde olacaktır. Aslında mikroçekirdek testini bu derece ve bu açıdan önemli kılan: in vivo çalışmalar için doğrudan ya da metabolize edildikten sonra etki gösteren mutajenlerin, memelilerde oluşturduğu genetik zararları belirlemede çok uygun olmasındandır. Bu test mutajenlerin hücre döngüsünün özgül zamanları üzerindeki etkilerini ve kemik iliği hücrelerinin çoğalma durumları hakkında bilgi verir.

Bilindiği gibi balıkların eritrositleri çekirdeklidir. Bu yüzden mikronukleus izlenmesi daha kolaydır. Mikronukleus testi çevresel kirleticilerin sulara meydana getirdiği kirliliğin izlenebilmesi açısından oldukça kullanışlıdır. Balıklarla mikronukleus testi ile ilgili pek çok çalışma vardır [3]. Mikronukleus kromozom ya da kromozomal fragmentlerin mitoz esnasında sentromerlerini kaybetmeleri sonucu nukleusa katılmayarak ayrı bir çekirdek grubu oluşturmasıdır. Al-Sabti ve Hardig (1990), tekstil sanayinde kullanılan boyaların balıklar üzerinde mikronukleus etkisini incelemişler. 3, 6 ve 9 gün boyunca maddeye maruz bırakılan canlıların hücrelerinde mikronukleus oranında büyük artışlar olduğu saptamışlardır [48]. Bu çalışmada yine pozitif kontrol olarak benzen ve negatif kontrol olarak çeşme suyu kullanılmıştır. Bizde çalışmamızda benzeni kullandık. Bilindiği gibi benzen suları kirleten önemli bir hidrokarbondur.

Arhipcuk at all (2005), yine balıkların yüzgeç epitel hücrelerinde mikronukleus oranına bakmışlar. Ağır metallerle yapılan bu çalışmada mikronukleus oranı incelenmiştir [72]. Grisolia (2001), mytomycin ve çeşitli pestisitlerin fare ve balıklarda mikronukleus üzerine etkisini araştırmıştır. Farelerde negatif kontrol olarak distile su balıkta ise çeşme suyu kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak farelerde mytomycin-C, balıklarda ise siklofosamid kullanılmıştır. Kullanılan bileşiklerin tümünde mikronukleus oranını arttırdığını saptamıştır [73]. Cavas at all (2003),

florasan bir boya olan akridin oranj kullanarak metronidazol'ün genotoksik etkisini araştırmışlardır. Yine siklofosamid pozitif kontrol olarak eşme suyu da negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Mikronukleus oranındaki artışın doza ve zamana bağlı olarak arttığını saptamıştır. Metronidazolun hem sitotoksik hem de genotoksik etkisinin olduğu saptanmıştır [3]. Sanches-Galen at all (2001), yılan balığında kadmiyum ve civanın etkisini araştırmışlar ve mikronukleus oranında oldukça belirgin artışlar gözlemlemişlerdir. Yalnız bu çalışmada balığın bulunduğu ortama kirletici vermek yerine direk balığın karın bölgesinden enjeksiyonlama yöntemini kullanmışlardır. Mikronükleus oranında önemli artışlar gözlemlemişlerdir [74].

36. saat, 72. saat ve 6. gün sonunda, 0.05mg/lt, 0.10 mg/lt 0.25mg/lt, 0.37 mg/lt,0.50 mg/lt 0.75 mg/lt NaOCl [75-79] verilen balıklardan elde edilen eritrosit hücrelerindeki mikronükleus oluşumu, negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında arttığı tespit edildi. 36. saat, 72. saat ve 6. gün için 0.50 mg/lt ve 0.75 mg/lt doz uygulanan deney gruplarından elde edilen MN sonuçları istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,001$). Pozitif kontrol olarak benzen kullanılan gruptan elde edilen MN sayıları istatistiksel olarak tüm numune zamanlarında diğer gruplara göre önemli bir fark göstermektedir ($P<0,001$). Her doz grubu kendi içerisinde, numune alma zamanları bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli bir fark görülmemiştir. Ancak 36. saatten sonra tüm doz gruplarında MN sayılarında artış grlmştir.

Su kirliliğine sebep olan kimyasal maddelerin bir kısmının kanserojen özellik taşıması, mutajenik ve genotoksik etkiye sahip olması, kirliliğin şimdiki ve daha sonraki nesiller üzerinde yaratacağı olumsuz etkilerini düşünmemiz açısından kirliliğe sebep olan kimyasallar üzerine yapılan sitogenetik çalışmaların önemini daha da arttırmaktadır. Çalışmamızda çeşitli amaçlarla kullanılan sodyum hipokloritin balık eritrositlerinin nükleusları üzerindeki genotoksik etkisi araştırılmıştır. Deneyler sonucunda elde edilen veriler, madde dozundaki artışla birlikte mikronükleus oranında ve çift mikronükleus oluşumunda artış olduğu tespit edilmiştir. Sodyum hipokloritin kullanımına bağlı olarak hücre içi anormal

oluşumlardaki artışın, bu maddenin genotoksik etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Elde edilen verilerin ve sonuçların daha sağlıklı değerlendirilmesi için üzerinde genotoksik etkileri açısından yeterli çalışma bulunmayan sodyum hipokloritin araştırmalarda canlılar üzerinde daha fazla kullanılması gereklidir. Elde edilen verilerin daha önceki çalışmalarla karşılaştırılarak daha kesin sonuçlara varılacağı, özellikle genotoksik maddelerin tespitinde son yıllarda yaygın olarak kullanılan mikronükleus çalışmaları bu maddelerin deneme yapılan canlıların genetik materyali üzerindeki etkilerini görmemiz açısından oldukça yararlı sonuçlar elde etmemizi sağlar. Bu amaçla İnci balığı'nda sodyum hipoklorit'in genotoksik etkisi ve LC₅₀ değeri belirlenerek elde edilen veriler ışığında bu maddenin genotoksik etkiye sahip olabileceği anlaşılmıştır. Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz verilerin ve sonuçların daha sonra yapılacak olan benzer çalışmalara kaynak ve yararlı olacağı kâsındayız.

6. KAYNAKLAR

1. www.suvakfi.org.tr (15.02.2007)
2. Ulupınar, M., Alaş, A., "Balık Sitogenetiği ve Laboratuar Teknikleri Kitabı" I Baskı, s. 10 (2002).
3. Çavas, T., Ergene-Gozukara, S., "Evaluation of genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells", *Mutat. Res.*, 534 (1-2): 93-99 (2003).
4. Özyurt, M., Klimik Dergisi. Cilt 13, Özel Sayı. 2000, s: 41–48.
5. Martin, SF., Walter., "Sterilization, disinfection, and antisepsis in the hospital", In: Hausler, JW., Hemann, KL., Isenberg, HD., Shadomy, HJ., eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth ed. Washington, DC: *American Society for Microbiology*, 1991:183–200.
6. Hidalgo, E., Bartolome, R., Dominguez, C., "Cytotoxicity mechanisms of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts and its bactericidal effectiveness", *Chemico-Biological Interactions.*, 139, 265-282, (2002).
7. Nakano, K., Suyama, K., Fukazawa, H., Uchida, M., Wakabayashi, K., Shiozawa, T., Terao Y. "Chlorination of harman and norharman with sodium hypochlorite and co-mutagenicity of the chlorinated products". *Mutation Research.*, 470 141–146 (2000).
8. Purdom, C.E., Lincoln, R.F., "Chromosome Manipulation in Fish in Genetics and Mutagenesis of Fish (Schroders, J.H. ed.)", *Springer-Verlag.*, Berlin 5:83-89 (1973).
9. Purdom, C.E., "Radiation Induced Gynogenesis and Androgenesis in Fish", *Heredity.*, 2:431–444 (1969).
10. Nagy, A., Rajki, K., Horvath, L., Csanyi, V., "Investigation on Carp (*Cyprinus carpio*) Gynogenesis", *J.Fish Biol.*, 13:215–224 (1978).
11. Landolt, M.L., Kocan, R.M., Fish cell cytogenetics: "A measure of the genotoxic effects of environmental pollutants", *Aquatic Toxicology.*, 335–353 (1983).
12. Al-Sabti, K., "Clastogenic effects of five carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp, *Cyprinus carpio*", *L. Comp. Biochem. Physiol.*, 85C, 1, 5–9 (1986).
13. Alink, G.M., Frederix-Wolters, E.M.H., Van der Gaag, M.A., Van Kerkhoff, J.F.J., Poels, C.L.M., "Induction of Sister-Chromatid Exchanges in Fish Exposed to Rhine Water", *Mutat. Res.*, 78:369–374 (1980).

14. Al-Sabti, K., Fijan, N., Kurelec, B., Frequency of Chromosomal Aberrations in the Rainbow Trout, (*Salmo gairdneri* Rich.) Exposed to Detergent and Benzene. *Vet Arh.*, 54:83–89 (1984).
15. Barker, C.J., Rackham, B.D., "The Induction of Sister-Chromatid Exchanges in Cultured Fish Cells (*Ameioba splendens*) by Carcinogenic-Mutagens" , *Mutat. Res.*, 68:381–387 (1979).
16. Andaya, A., and Di, Giulio, R., " Acute toxicities and hemotological effects of two substituted naphthoquinones in channel catfish", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 16, pp. 233–238 (1987).
17. Kligerman, A.D., Bloom, S.E., Howell, W.M., "Umbra limi: a Model for the study of chromosome Aberration in Fishes" , *Mutat. Res.*, 31, 225–233 (1975).
18. Landolt, M.L., Kocan, R.M., "Fish cell cytogenetics: A measure of the genotoxic effects of environmental pollutants", *Aquatic Toxicology.*, 335–353 (1983).
19. Prein, A.E., Thie, G.M., Alink, G.M., Koeman, J.H., "Cytogenetic Changes in Fish Exposed to Water of The River Rhine" , *Sci Total Envir.*, 9:287–291 (1978).
20. Refstie, T., "Tetraploid Rainbow Trout Produced by Cytochalasin", *Aquaculture.*, 25:51-58 (1981).
21. Al-Sabti, K., "An in vitro binucleated blocked hepatic cell technique for genotoxicity testing in fish" , 335, 2:109-120 (1995).
22. Al-Sabti, K., "Handbook of genotoxic effects and fish chromosomes", *J. Stefan Institute*, 221pp, Printed by Kristoft, Ljubljana, Yugoslavia (1991).
23. Ulupınar, M., Okumuş, İ., "Gökkuşuğu Alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) kromozom analizi için ıslah edilmiş bir metot", *IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu*, Süleyman Demirel Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Eğridir, Isparta (1997).
24. OECD., "Guideline for the testing Of Chemical Proposal for Updating Guideline 473, In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test", OECD, 12pp (1997).
25. Kligerman, A.D., Bloom, S.E., "Sister-Chromatid Differentiation and Exchanges in Adult Mudminnow (*Umbra limi*)", *Cytogenet. Cell Genet.*, 18, 182-196 (1976).
26. Kligerman, A.D., "Fishes as Biological Detectors of The Effect of Genotoxic Agents, In: mutagenicity, new Horizons in Genetic Toxicology" , *J. Heddle (Ed)*, 335–356 (1982).

27. Park, E.H., Grimm, H., "Distribution of C-Band Hetrochromatin in the ZW Sex Chromosomes of European and American Eels (Anguillidae,Teleostomi)" , *Cytogen. Cell Genet.*, 31(3):167–174 (1981).
28. Kligerman, A.D., Bloom, S.E., "A cytogenetics model for the study of chromosome aberrations in fishes", *Mutat.Res.*, 31, 5, 334-335 (1975).
29. Stromberg, P.T., Landolt, M.L., Kocan, R.M.," Alteration in the frequency of Sister-Chromatid Exchanges in Faltfish From Puget Sound,Washington, Following Experimental and Natural Exposure to Mutagenic Chemicals", *NOAA Technical Memorandum OMPA*, 10:48pp (1981).
30. Van de Kerkhoff, J.F.J., Van der Gaag, M.A., "Some Factors Affecting Optimal Differantial Stainnig of Sister-chromotids In Vivo in the Fish Nothobrachus rachowi" , *Mutat.Res*, 143,39-43 (1985).
31. Metcalfe, C.D., "Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocyte of Mudminnows (*Umbra limi*) and Brown Bullheads (*Ictalurus nebulosus*)", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 40C, 489–495 (1988).
32. Kocan, R.M., Landolt, M.L., Sabo, K.M., "Anaphase aberrations: a measure of genotoxicity, in mutagene-treated fish cells" , *Environ. Mutagen.*, 4,181–189 (1982).
33. Liguori, V.M., Landolt, M.L., "Aberrations: an In Vivo Measure of Genotoxicity. Short-Term Bioassy in the Analysis of Complex Environmental Mixture IV (Water, M.D., Sandhu, S.S., Lewtas, J., Glaxton, L., Strauss, G., Nesnow, S., eds)", *Plenum Publishing Co.*, 87–98 (1985).
34. Suralles J., Xamena N., Creus A., Cataian J., Norppa H. and Marcos R., "induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures" , *Mutat. Res.*, 341:169-184 (1995).
35. Ortiz G.G., Reiter R.J., Zuniga O., Meichiorri D., Sewerynek E., Pabios MI., Oh C.S., Garcia J.J., Bitzer-Quintero OK., "Genotoxicity of paraquat : induced micronuclei induced in bone marrow and peripheral blood are inhibited by melatonin" , *Mutat. Res.*, 464:239-245 (2000).
36. Chauhan, L.K.S., Agarwal, D.K. and Sundararaman, V., "In vivo induction of sister chromatid exchange in mouse bone marrow following oral exposure to commercial formulations of alpa-cyano pyrethroids", *Tox. Let.*, 93:153-157 (1997).
37. Das, R.K., Nanda, N.K., "Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish, *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent", *Mutat. Res.*, 175, 67–71 (1986).

38. EPA, 1999, Summary of OPP redect risk pesticides initiative. US. EPA,2.pp
39. Fahmy, M.A. and Aiy, F.A.E., "In vivo and in vitro studies on the genotoxicity of cadmium chloride in mice", *J. Of App. Tox.*, 20:231-238 (2000).
40. Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Btakey, D.H., Volders, M.K., Oleson, Jr F.B., Pacchierotti, F.H., Romagna, F., Shimada, H, Sutou, S., and Vannier, B., "In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay" , *Mutat. Res.*, 312: 293-304 (1994).
41. Hayashi, M., MacGregor, J.T., Gatehouse, DC., Adler, i.D., Biakey, D.H., Dertinger, S.D., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., Sutou, S., "In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. ii. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring", *Env. Mol. Mut.*, 35.234–252 (2000).
42. Krishna, G., and Hayashi, M., "In vivo rodent micronucieus assay : protocol, conduct and data interpretation" , *Mutat. Res.*, 455:155 – 166 (2000).
43. MacGregor, J.T., Wehr, M., Henika, P.R. and Shelby, M.D., "The in vivo erythrocyte micronucieus test: Measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies", *Fun. and App. Tox.*, 14.51 3–522 (1990).
44. Schmid, W., "The micronucleus test", *Mutat. Res.*, 31, 9–15 (1973).
45. Microsoft Encarta Encylopedia (2004).
46. Bates, A.D., Neuteboom, I., Hofker, M., Den Engelse, L., "A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN, DMN) in hepatocytes of rat liver in vivo", *Mutat Res.*, 74: 11–20 (1980).
47. Hoofman, R.N., Raat, W.K., "Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of Eastern Mudminnow (*Umbra pygmaena*) by ethyl methanesulphonate", *Mutat. Res.*, 104, 147–152 (1982).
48. Al-Sabti, K., Hardig, J., "Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of industrial waste products in the Baltic Sea, Sweden" , *Comp. Biochem. Physiol.*, 97C, 1, 179–182 (1990).
49. Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S.,"Assesment of the piscine micronucleus test as in situ biological indicator of chemical contaminant effects", *Canad. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47(11), 2123–2136 (1990).
50. Cross, J.N., Hose, J.E., "The reproductive cycle of demersal fishes in an area receiving Urban wates", *Sixth International Ocean Disposal Symposium*, April 21–25, Pacific Grove, California, 116–117 (1988).

51. Dass, S.B., Ali, S.F., Heflich, R.H., Casciano, D.A., " Frequency of spontaneous and induced micronuclei in the peripheral blood of aging mice" , *Mutat. Res.*, 381:105-110 (1997).
52. Hoofman, R.N., Vink, G.J., " Cytogenic Effects on the Eastern Mudminnow (*Umbra pygmaea*) Exposed to Ethyl Methanesulphonate, Benzo(a)pyrene and River Water" , *Ecotoxicol. Environ. Safety.*, 5, 261–269 (1981).
53. ICPEMC., "Testing For Mutagens and Carcinogens; The Role Of Short-term Genotoxicity Assays" , *Mutat. Res.*, 205:3–12 (1988).
54. Hose, J.E., Cross, J.M., Smith, S.G., Dario, D., " Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Souther California" , *Mar. Environ. Res.*, 22, 167–176 (1987).
55. Al-Sabti, K., "Monitoring the Genotoxicity of radiocontaminants in Swedish Lakes by fismicronuclei" , *Cytobios.*, 70, 101–106 (1992).
56. www.ardahanemniyet.gov.tr/ilimiz/cildir.asp. (2006).
57. Yerli, S., Zengin, M., "Çıldır Gölü (Ardahan, Kars)’ndeki *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758]’nun Üremesi Üzerine Bir Araştırma” , *Tr. J. Of Veterinary and Animal Sciences.*, 22, 309-313 (1998).
58. Kuru, M., "Omurgalı Hayvanlar” , *Atatürk Üniversitesi Yayınları*, Erzurum, No: 646, s. 735 (1987).
59. Geldiay, R., Balık, S., "Türkiye Tatlısu Balıkları IV Baskı” , *Ege Üniv. Fen Fak. Kitaplar Serisi*, No: 9, İzmir., s. 520 (1988).
60. Demirsoy, A., "Yaşamın Temel Kuralları, Omurgalılar/Anamniyota" , *Meteksan Yayınları*, Ankara, (1993).
61. Emmanuel, E., Keck, G., Blanchard, J.M., Vermande, P., Perrodin, Y., "Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater" , *Environment International.*, 30: 7 891-900 (2004).
62. Hidalgo, E., Bartolome, R., Dominguez, C., "Cytotoxicity mechanisms of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts and its bactericidal effectiveness" , *Chemico-Biological Interactions.*, 139, 265-282 (2002).
63. www.gumuscevre.org (2007)
64. Gray, K.D., Duggan, I.C., Macisaac, H.J., "Can sodium hypochlorite reduce the risk of species introductions from diapausing invertebrate eggs in non-ballasted ships" , *Marine Pollution Bulletin.*, 52: 689-695 (2006).

65. Monarca, S., Zanardini, A., Feretti, D., Dalmiglio, A., Falistocco, E., Manica, P., Nardi, G., "Mutagenicity of lake drinking water treated with different disinfectants in bacterial and plant tests", *Wat. Res.*, 32, No. 9. 2689-2695 (1998).
66. Mattice, J.S., Zittel, H.E., "Site Specific Evaluation of Power Plant Chlorination", *WPCF.*, 48, no. 10, p. 2284-2308 (1976).
67. Petruccia, G., Rosellini, M., "Chlorine dioxide in seawater for fouling control and post-disinfection in potable waterworks", *Desalination.*, 182, 283–291(2005).
68. Göksu, Z., Çevik, F., Fındık, Ö., "İnci istiridyesi *Pinctada radiata* (Leach, 1814) için öldürücü Klor konsantrasyonları", *Turk J Vet Anim Sci.*, 26, 157-160 (2002).
69. Monarca, S., Zani, C., Susan, D., Richardson, D., Thruston, Jr., Massimo, M., Donatella, F., Milena, V., "A new approach to evaluating the toxicity and genotoxicity of disinfected drinking water", *Water Research.*, 38, 3809–3819 (2004).
70. Thomas, H., Hutchinson, Awadhesh N. Jha., James, Mackay, M., Barry, M., Elliott., David, R., Dixon., "Assesment of developmental effects, cytotoxicity and genotoxicity in the marine polychaete (*Platynereis dumerilii*) exposed to disinfected municipal sewage effluent", *Mutation Research.*, 399, 97-108 (1998).
71. Guzzella, L., Monarca, S., Zani, C., Feretti, D., Zerbini, I., Buschini, A., Poli, P., Rossi, C., Richardson, SD., "In vitro potential genotoxic effects of surface drinking water treated with chlorine and alternative disinfectants." *Mutat Res.*, Dec 12; 564(2):179-93 (2004).
72. Arkhipchuk, V.V. and Garanko, N.N., "Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells" *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 62, 42-52 (2005).
73. Grisolia, C.K., and Starling, F.L.R.M., "Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoa, under influence of sewage treatment plant discharges" *Mutat. Res.*, 491 (1-2), 39-44 (2001).
74. Sanchez-Galan, S., Linde, A.R., Ayllon, F., and Garcia-Vazquez, E., "Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals" *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 49 (2), 139-143 (2001).
75. Crebelli, R., Conti, L., Monarca, S., Feretti, D., Zerbini, I., Zani, C., Veschetti, E., Cutilli, D., Ottaviani, M., "Genotoxicity of the disinfection by-products resulting from peracetic acid- or hypochlorite-disinfected sewage wastewater" *Water Research.*, 39 (6): 1105-1113 (2005).
76. Clasena, T., Edmondson P., "Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) tablets as an alternative to sodium hypochlorite for the routine treatment of drinking water at the household level" *Int. J. Hyg. Environ.-Health.*, 209 173–181 (2006).

77. Khomvilai, C., Kashiwagi, M., Sangrungruang, M., Yoshioka, M., "Preventive efficacy of sodium hypochlorite against water mold infection on eggs of chum salmon *Oncorhynchus keta*", *Fisheries Science.*, 72: 28–32 (2006).
78. Powell, M.D., Perry, S.F., "Acid–base and ionic fluxes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during exposure to chloramine-T" , *Aquatic Toxicology.*, 43: 13–24 (1998).
79. Borgmann-Strahsen, R., "Comparative assessment of different biocides in swimming pool water", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51 291 – 297 (2003).

7. ÖZ GEÇMİŞ

Pınar AKSU; 1983 Yılında Kars-Kağızman'da doğdu. İlk öğretimini ve lise öğretimini Kağızman' da tamamladı. 2001 yılında kazandığı Ondokuzmayıs Üniversitesi Ordu Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2005 yılında mezun oldu. 2005 yılında Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansa başladı. Şu an yüksek lisansa devam ediyor.