KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SODYUM DODESİL SÜLFAT (SDS) VE SODYUM DODESİL BENZEN SÜLFONATIN (SDBS) *Allium cepa* L. var. *cepa* ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

GONCA AL

KOCAELİ 2015

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SODYUM DODESİL SÜLFAT (SDS) VE SODYUM DODESİL BENZEN SÜLFONATIN (SDBS) *Allium cepa* L. var. *cepa* ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

GONCA AL

Doç.Dr. Özlem AKSOY
Danışman, Kocaeli Üniv. .....

Prof.Dr. Fazıl ÖZEN
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv. .....

Doç.Dr. Gülden YILMAZ
Jüri Üyesi, Trakya Üniv. .....

Tezin Savunulduğu Tarih: 23.03.2015

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

İnsanlık geliştikçe organik ve inorganik kirleticilerin ekosistem üzerindeki tahribatı artmaktadır. Evsel ve endüstriyel kaynaklı kirleticilerin neden olduğu kirlilik sucul ve karasal ekosistemlerdeki canlıları tehdit etmektedir. Özellikle organik kirleticiler grubunda yer alan yüzey aktif maddeler tarım, endüstri ve ev temizliğinde sıkça kullanılırlar ve doğada yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar.

Çevresel kirliliğinin toksik etkilerinin belirlenmesinde çeşitli organizmalar biyoindikatör olarak kullanılmaktadır. Duyarlılıklarının yüksek olması bitkilerin genetik hasarın tespitinde tercih edilme sebebidir. Özellikle kolay elde edilmesi, hızlı sonuç vermesi sebebiyle *Allium cepa* araştırıcılar tarafından sıkça tercih edilmektedir. Tüm bu etmenler göz önüne alındığında yapılan yüksek lisans çalışmasının bundan sonraki araştırmalara yön vermesi hedeflenerek doğada en sık rastlanan yüzey aktif madde türlerinden SDS ve SDBS' nin *A. cepa* üzerindeki genotoksik etkileri incelenip söz konusu bitkideki genetik hasarlar gözlemlenmiştir.

Çalışma boyunca desteklerini ve ilgisini benden esirgemeyen, çok değerli bilgi ve görüşlerinden faydalandığım danışman hocam Sn. Doç Dr. Özlem AKSOY' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması sırasında değerli bilgi birikimlerinden faydalandığım Marmara Üniversitesi Fen Fakültesi Bölümü Öğretim Üyesi Sn. Doç Dr. Yıldız AYDIN' a teşekkürü bir borç bilirim.

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

Deney aşamasında laboratuvar çalışmalarımda desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Biyoloji Bölümü Öğretim elemanlarından Sn Arş. Gör. Rabia ÖZBEK ve Sn. Arş. Gör. Dr. Serhat KAYA' ya, ayrıca manevi desteklerini hep hissettiğim arkadaşlarım Biyoloji ABD yüksek lisans öğrencileri Sn. Burçak TÜTÜNOĞLU, Sn. Merve KÖSE ve Sn. Aylin HOROZAL' a sonsuz teşekkürlerimi iletirim.

Çalışmamın her aşamasında arkadaşlıkları ve desteklerini benden esirgemeyen Kocaeli Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü öğretim elemanlarından Sn. Arş. Gör. Simge ÇANKAYA' ya ve Sn. Arş Gör. Eylem TOPKAYA' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca dostluğunu her zaman yanımda hissettiğim arkadaşım Maden Mühendisi Sn. Selçuk ÇANKAYA' ya teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimi sırasında tanıştığım çalışma boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen tez yoldaşım, değerli arkadaşım Sn. Handan KIRKOÇOĞLU' na teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında yanımda olan ilgi, bilgi, yardım ve desteklerini esirgemeyen Kocaeli Üniversitesi Çevre Mühendisliğinde görev yapan çok değerli arkadaşım Sn. Arş. Gör. Utkan ÖZDEMİR' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında desteklerini esirgemeyen evlatları olmaktan gurur duyduğum sevgili annem Güldane AL' a ve sevgili babam Mustafa AL'a, ayrıca her daim yanımda olan canım kardeşlerim Gülyaz AL' a ve Görkem Anıl AL' a teşekkürlerimi sunarım.

Mart – 2015 Gonca AL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER iii
ŞEKİLLER DİZİNİ v
TABLOLAR DİZİNİ vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vii
ÖZET ix
ABSTRACT x
GİRİŞ 1
1. YÜZEY AKTİF MADDELERİN SINIFLANDIRILMASI VE ÖZELLİKLERİ 3
1.1. Anyonik Yüzey Aktif Maddeler 3
1.2. Katyonik Yüzey Aktif Maddeler 3
1.3. Amfoterik Yüzey Aktif Maddeler 4
1.4. Non İyonik Yüzey Aktif Maddeler 4
1.5. Yüzey Aktif Maddelerin Temel Özellikleri ve Zararları 4
1.6. Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve Sodyum dodesil benzen sülfonat (SDBS) 5
1.7. *Allium* Testi 6
1.8. Comet Testi (SGCE, Tek Hücre Jel Elektroforezi) 7
2. LİTERATÜR ÇALIŞMASI 10
3. MALZEME VE YÖNTEM 14
3.1. Bitki Materyali 14
3.2. SDS ve SDBS Hakkında Genel Bilgi 15
3.3. Test Materyalinin ve Kimyasalların Hazırlanması 15
3.3.1. *A.cepa*'nın hazırlanması 16
3.3.2. Anyonik surfaktan çözeltilerinin hazırlanması 16
3.3.3. *Allium* testinde kullanılan çözeltilerin ve boyanın hazırlanması 16
3.3.4. Comet testinde kullanılan çözeltilerinin hazırlanması 16
3.4 Kök İnhibisyon Testinin Uygulanması 17
3.5. Kromozom Anormalliği Testi 18
3.5.1. Fiksasyon, hidroliz, boyama ve preperatların hazırlanması işlemleri 18
3.6. Çekirdek İzolasyonu ve Comet Testi 19
3.7. Mikroskobik İncelemeler 19
3.8. Verilerin İstatistiksel Analizi 20
3.8.1. ANOVA tek yönlü varyans analizi 20
3.8.2. Duncan çoklu karşılaştırma testi 20
3.9. Kullanılan Cihazlar 20
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 23
4.1. SDS ve SDBS'nin Kök Büyümesi Üzerine Etkileri 23
4.2. SDS ve SDBS'nin Mitotik İndeks Üzerine Etkileri 25

4.3. *A.cepa* Kromozom Anormalliklerine SDS ve SDBS'nin Etkileri 28
4.4. SDS ve SDBS'nin Oluşturduğu DNA Hasarının Comet Testi ile Belirlenmesi 35
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 49
KAYNAKLAR 51
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER 59
ÖZGEÇMİŞ 60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Kimyasalların tartımında kullanılan hassas terazi 21
Şekil 3.2. Florasan ataçmanlı ışık mikroskobu 21
Şekil 3.3. Agarozların hazırlanmasında kullanılan mikrodalga fırın 21
Şekil 3.4. Çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanılan pH metre 22
Şekil 3.5. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan manyetik karıştırıcı 22
Şekil 3.6. Comet testinde kullanılan soğutmalı su banyosu elektroforez tankı ve güç kaynağı 22
Şekil 4.1. SDS' nin *A. cepa* üzerindeki EC_{50} değeri 24
Şekil 4.2. SDBS' nin *A. cepa* üzerindeki EC_{50} değeri 25
Şekil 4.3. Kromozom anormallikleri; a-anormal çekirdek, b-düzensiz profaz, c-yapışık kromozom, d- tabla kayması, e-köprü ve geri kalmış kromozom, f-c mitoz, g-binükleus, h-multipolarite, ı-yapışıklık, j-kutup kayması, k-enine bölünme, l-star anafaz 30
Şekil 4.4. Comet testinde hasar derecelerine göre çekirdeklerin sınıflandırılması: a)0-hasarsız DNA, b)1-kuyruk<0,5 baş, c)2-kuyruk>0,5 baş veya kuyruk başa eşit, d)3-kuyruk baş çapından büyük, e)4-kuyruk başın neredeyse 3 katıdır 35
Şekil 4.5. SDS' nin zamana ve konsantrasyonlara göre DNA hasarı (AU)..... 36
Şekil 4.6. SDBS'nin zamana ve konsantrasyonlara göre DNA hasarı (AU) 37
Şekil 4.7. SDS' nin *A. cepa* üzerindeki kuyruk DNA hasarı yüzdesi 38
Şekil 4.8. SDBS' nin *A. cepa* üzerindeki kuyruk DNA hasarı yüzdesi 39
Şekil 4.9. SDS' nin *A. cepa* üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi 40
Şekil 4.10.SDBS'nin *A. cepa* üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi..... 41

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Tezde kullanılan yüzey aktif madde türlerinin özellikleri 15
Tablo 4.1. SDS dozlarının *A.cepa* kök büyümesine etkisi 24
Tablo 4.2. SDBS dozlarının *A.cepa* kök büyümesine etkisi 25
Tablo 4.3. SDS ve SDBS'nin *A.cepa* mitotik indeks üzerindeki etkilerini gösteren ANOVA tablosu 26
Tablo 4.4. SDS'nin *A.cepa* kök uçlarındaki mitotik indekse etkileri..... 26
Tablo 4.5. SDBS'nin *A.cepa* kök uçlarındaki mitotik indekse etkileri 27
Tablo 4.6. SDS için hesaplanan ortalama mitotik indeks değerleri 27
Tablo 4.7. SDBS için hesaplanan ortalama mitotik indeks değerleri 28
Tablo 4.8. SDS' nin zamana bağlı kromozom anormalliği yüzdesi 29
Tablo 4.9. SDBS' nin 24 ve 48 saatlerde kromozom anormalliği yüzdesi 29
Tablo 4.10. *A. cepa* kök hücrelerinde SDS ve SDBS dozlarının etkisiyle ortaya çıkan kromozom hasarı çeşitleri ve oranları 31
Tablo 4.11. Kromozom anormallikleri Duncan tablosu 32
Tablo 4.12. SDS' nin *A. cepa* üzerindeki DNA hasarı (Arbitrary units, AU) 36
Tablo 4.13. SDBS' nin *A. cepa* üzerindeki DNA hasarı (Arbitrary units, AU)..... 36
Tablo 4.14. SDS' nin konsantrasyon ve zaman değişiminin kuyruk DNA % etkileri 38
Tablo 4.15. SDBS' nin konsantrasyon ve zaman değişiminin kuyruk DNA % etkileri 38
Tablo 4.16. SDS' nin *A. cepa* üzerindeki etkilerinin OTM ile incelenmesi 39
Tablo 4.17. SDBS' nin A. cepa üzerine etkilerinin OTM ile incelenmesi 40

SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR

A	:Amper
cm	:Santimetre
dk	:Dakika
g	:Gram
kg	:Kilogram
L	:Litre
µg/mL	:Mikrogram/mililitre
µM	:Mikromolar
mg/L	:Miligram/Litre
mL	:Mililitre
mm	:Milimetre
ppm	:Milyonda bir kısım
V	:Volt

Kısaltmalar

% H-DNA	:Baş DNA Yüzdesi
% T-DNA	:Kuyruk DNA Yüzdesi
% KA	:Kromozom Anormallik Yüzdesi
A. cepa	*:Allium cepa*
AE	:Alkilpoli Etoksilat
AU	:Arbitrary Units (Rastgele Seçilmiş Birimler)
BAC	:Benzolkonyum Klorür
CAPD	:Coco Amido Propil Beatin
CTAB	:Setil Trimetil Amonyum Bromür
DDAB	:Dimetildioktadesil Amonyum Bromür
DNA	:Deoksiribo Nükleik Asit
DTAB	:Dodesil Trimetil Amonyum Bromür
EDTA	:Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
HAB	:Hekzametil Amonyum Bromür
HDTMA	:Hekzadesiltrimetilamonyum Bromür
ITO	:İndium Tin Oksit
KKA	:Kardeş Kromatid Değişimi
LAS	:Lineer Alkil Benzen Sülfonat
LMP	:Düşük Erime Noktalı Agaroz
MI	:Mitotik İndeks
MN	:Mikronükleus
NMP	:Normal Erime Noktalı Agaroz
OTM	:Olive Kuyruk Momenti
SGCE	:Tek Hücre Jel Elektroforezi

SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat
SDBS	:Sodyum Dodesil Benzen Sülfonat
SLES	:Sodyum Loril Eter Sülfat
TL	:Kuyruk Uzunluğu
TM	:Kuyruk Momenti
TX	:Triton X-100

SODYUM DODESİL SÜLFAT (SDS) VE SODYUM DODESİL BENZEN SÜLFONATIN (SDBS) *Allium cepa* L. var. *cepa* ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Yüzey aktif maddelerin bilinçsiz kullanımı zehirlenmelere ve çevre kirliliğine yol açmaktadır. Özellikle anyonik yüzey aktif maddelerin ekosistem üzerindeki tahribatı oldukça yüksektir. Bu çalışma kapsamında sodyum dodesil sülfat (SDS) ve sodyum dodesil benzen sülfonatın (SDBS) *Allium cepa* üzerindeki genotoksik etkileri incelendi. Kök inhibisyon testi sonucunda, SDS için EC_{50} değeri 100 mg/L, $2xEC_{50}$ değeri 200 mg/L, SDBS için EC_{50} değeri 65 mg/L, $2xEC_{50}$ 130 mg/L bulundu. EC_{50} ve $2xEC_{50}$ değerleri kullanılarak 24 ve 48 saat süre ile muamele edilen soğanlara mitotik indeks (MI), *Allium* testi ve comet testi uygulandı ve kontrol grupları ile kıyaslandı. En düşük mitotik indeks değeri 130 mg/L'lik SDBS uygulamasında gözlendi. Ayrıca mitotik bölünmenin farklı safhalarında çeşitli anormallikler tespit edildi. Comet testi ile elde edilen deneysel verilerin incelenmesi için OTM (Olive kuyruk momenti), kuyruk DNA % (kuyruk DNA yüzdesi), AU (keyfi üniteler) parametreleri kullanılarak en yüksek DNA hasarına yol açan yüzey aktif madde ve konsantrasyonu belirlendi. Comet testi sonucunda SDBS konsantrasyonuna maruz kalan örneklerde, SDS muameli örneklere göre daha toksik etki oluştuğu tespit edildi. Ayrıca deneysel verilerin güvenirliğini test etmek amacıyla ANOVA tek yönlü varyans analizi ve Duncan çoklu karşılaştırma testleri uygulandı. İstatistiksel veriler, SDBS uygulamasının SDS uygulamasına göre *A.cep*a üzerinde daha toksik etkilere yol açtığını gösterdi (P: 0,002<0,007).

Anahtar Kelimeler: *Allium cepa*, *Allium* testi, Comet testi, SDS, SDBS.

DETERMINATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF SODIUM DODECYL SULFATE (SDS) AND SODIUM DODECYL BENZENE SULFONATE (SDBS) ON *Allium cepa* L. var. *cepa*

ABSTRACT

The insensible usage of surfactants have caused poisonings and environmental pollution. In particular, damages of anionic surfactants on the ecosystem are quite higher. In this study, genotoxic effects of sodium dodecyl sulfate (SDS) and sodium dodecyl benzene sulfonate (SDBS) on *Allium cepa* were investigated. EC_{50} value for SDS was 100 mg/L and $2xEC_{50}$ value for this was 200 mg/L. Whereas, EC_{50} value for SDBS was 65 mg/L 2x EC_{50} value for this was 130 mg/L which was measured by root inhibition test. Furthermore, by using EC_{50} and $2xEC_{50}$ values, onions were treated with SDS and SDBS for 24 and 48 hours and analysed by mitotic index (MI) and comet assay. Results were compared to the control group. The lowest mitotic index value was observed in the treatment of 130 mg/L SDBS. In addition, different kinds of abnormalities were determined in different phases of mitosis. Examination of the experimental values obtained with Comet assay, by using parameters; OTM (Olive Tail Moment), tail DNA % (Tail DNA percentage), AU (Arbitrary units). DNA damage and the most toxic concentration of surfactants were determined by using these parameters. Comet assay showed that samples treated with SDBS concentrations have more toxic effect than SDS treated samples. Also one-way ANOVA analysis of variance and Duncan's multiple comparison tests were performed to test the reliability of experimental data. Statistical studies showed that SDBS cause more toxic effects on *A.cepa* (P: 0,002<0,007).

Keywords: *Allium cepa*, *Allium* test, Comet assay, SDS, SDBS.

GİRİŞ

Toplumlar geliştikçe, bu gelişme paralelinde organik ve inorganik kökenli kirleticiler ekolojik sistemler üzerinde boyutları tehlikeli derecelere varan tahribata yol açmaktadırlar. Bu kirletici gruplarından olan organik kökenli kirleticiler, su ve toprak ekosistemlerinde önemli miktarlarda birikim göstermektedirler (Rao ve He, 2006; Yılmaz ve diğ., 2006). Organik kirleticilerin en önemli üyelerinden olan yüzey aktif maddeler, evsel ve endüstriyel ölçekli uygulamalar sonucunda ciddi çevresel risklere yol açan kimyasallardır (Mungray ve Kumar, 2009).

Yüzey aktif maddelerin deterjan, sabun, kozmetik, kişisel bakım ürünlerinin yanı sıra; endüstride boya, deri, tekstil, metal kaplama ve elektrik sanayisinde büyük ölçüde kullanım alanı bululunmaktadır (Casto ve diğ., 2005).

Yüzey aktif maddelerin anyonik sınıfında yer alan sodyum dodesil sülfat (SDS) ve sodyum dodesil benzen sülfonat (SDBS) tarımda ve endüstride yaygın olarak kullanılmakta ve ekosistemde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Liu ve diğ., 2010). Bu yüzey aktif maddelerin bakteriler, omurgalı hayvanlar, sucul ve karasal ekosistemlerde yaşayan bitkiler üzerinde bazı toksik etkileri olabileceği saptanmıştır (Ivankovıć ve Hrenovıć, 2010).

Çevre kirliliğinin neden olduğu toksik etkilerin belirlenmesinde, model organizmalar sıklıkla kullanılmaktadır. *Allium cepa;* hava, su ve toprak kirliliğinin neden olduğu sitotoksik ve genotoksik hasarın belirlenmesinde; ucuz, kolay erişilen ve hızlı cevap veren bir organizma olduğundan toksisite çalışmalarında çok tercih edilen indikatör bir bitkidir (Barbério, 2013). Ayrıca *A. cepa* genotoksik testlerde memeli hayvanlarla kıyaslandığında benzer sonuçlar göstermektedir (Yıldız ve diğ., 2009; Al ve diğ., 2013).

Kirleticilerin canlılar üzerinde yarattığı genetik hasar *in vivo* ve *in vitro* testler yardımı ile belirlenir. Bu testlerden bazıları; Ames testi, kromozom anormallikleri (KA) testi, kardeş kromatid değişimi testi (KKA), mikronükleus testi (MN) ve comet testidir (Şekeroğlu ve Atlı-Şekeroğlu, 2011). Comet testi DNA'da oluşan hasarın tespitinde hızlı, hassas ve güvenilir bir yöntemdir (Changhong ve diğ., 2010).

Bu çalışmada, anyonik yüzey aktif maddelerden sodyum dodesil benzen sülfonat (SDBS) ve sodyum dodesil sülfatın (SDS) toksik etkilerinin, *A. cepa* üzerindeki genotoksik değerlendirilmesine yer verilmiştir. Genetik hasarın belirlenmesinde kromozom anormallikleri (KA) testi ve Comet testi uygulanmıştır. Bu sayede, Comet testi uygulamalarında çok fazla yer almayan fakat gündelik yaşamda sıklıkla karşılaşılan kirletici türlerinden olan anyonik yüzey aktif maddelerin, genotoksik etkileri belirlenerek literatüre yenilikler sunulması planlanmıştır.

1. YÜZEY AKTİF MADDELERİN SINIFLANDIRILMASI VE ÖZELLİKLERİ

Günlük yaşamda sıkça kullanılan kimyasalların ham maddeleri, yüzey aktif maddeler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu maddelerin temelde hidrofilik (suyu seven) ve hidrofobik (suyu sevmeyen) grupları vardır (Ying, 2006). Bu özellikleri ile yüzey aktif maddeler yüzey gerilimini düşürerek farklı türlerde kümeleşme oluşumu sağlarlar (Cirelli ve diğ., 2009).

Yüzey aktif maddeler, anyonik, katyonik, amfoterik ve non iyonik olmak üzere dört temel grupta ele alınırlar.

1.1. Anyonik Yüzey Aktif Maddeler

Anyonik yüzey aktif maddeler baş gruplarında anyonik iyon bulundururlar. Anyonik yüzey aktif maddeler teknoloji ve araştırma alanlarında ilk çalışılan ve hala en yaygın kullanılan maddelerdendir (Cirelli ve diğ., 2009). Bu maddelere sodyum dodesil sülfat (SDS), lineer alkil sülfonat (LAS), sodyum dodesil benzen sülfonat (SDBS) bileşenleri örnek olarak verilebilir (Masakorala ve diğ., 2011; Wu ve diğ., 2010).

1.2. Katyonik Yüzey Aktif Maddeler

Kendisine daha az kullanım alanı bulan katyonik yüzey aktif maddeler, baş gruplarında katyonik iyon bulundururlar ve genellikle katkı maddesi olarak kullanılırlar. Anyoniklere göre daha pahalıdırlar bu nedenle kullanım alanları daha kısıtlıdır. Benzalkonyum klorür (BAC), dimetildioktadesil amonyum bromür (DDAB), katyonik yüzey aktif maddelere örnek olarak verilebilir (Ferk ve diğ., 2007).

1.3. Amfoterik Yüzey Aktif Maddeler

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

1.4. Non İyonik Yüzey Aktif Maddeler

Bütün yüzey aktif maddelerle bir arada bulunabilen yüksüz maddelerdir bu nedenle. oldukça zayıf elektriksel özellik gösterirler. Islatıcı madde,emülgatör ve polimer dengeleyici olarak görev yaptıklarından genelde anyonik yüzey aktif maddelerle birlikte kullanılırlar (Masakorala ve diğ., 2011; Cirelli ve diğ., 2009). Alkilfenol etoksilatlar örnek verilebilir (Gheorge ve diğ., 2013).

1.5. Yüzey Aktif Maddelerin Temel Özellikleri ve Zararları

Yüzey aktif maddeler kir sökücü ve çözücü özellik gösterdiklerinden sentetik deterjanların yapısında kullanılmaktadırlar. (Ivankovıć ve Hrenovıć, 2010). Yüksek miktarlarda üretilen deterjanlar kullanıldıktan sonra özellikle evsel atık olarak çevreye verilmektedir (Wolf ve Feijtel, 1998). Evsel atık su arıtma tesislerinde arıtım yapılarak ya da arıtım işlemine tabi tutulmadan kontrolsüz şekilde çevreye salınan bu kimyasallar sucul ve karasal ekosistemde yaşayan canlılar için ciddi tehlikeler yaratmaktadır (Cirelli ve diğ., 2008; Sobrino-Figueroa, 2013).

Yüzey aktif maddelerin canlılar üzerindeki etkileri gruplarına göre değişiklik göstermektedir. Örneğin; pozitif yüklü katyonik yüzey aktif maddeler hücre zarının yapısında bulunan negatif yüklü yağ asitlerine bağlanarak hücrenin bütünlüğünü bozarlar (Ferk ve diğ., 2007). Yüksüz olan non-iyonik yüzey aktif maddeler ise çeşitli proteinlere ve fosfolipid membrana bağlanarak antimikrobiyal aktivite gösterirler. Bu bağlanma, zar ve vezikül geçirgenliğini arttırarak düşük molekül ağırlığına sahip maddelerin kaybına yol açar. Sonuç olarak hücre ölümü ya da iyon ve aminoasit kaybı nedeniyle hücrede hasar meydana gelir. Negatif yüke sahip olan anyonik yüzey aktif maddeler peptidler, enzimler, DNA gibi biyoaktif makromoleküllere bağlanırlar. Bu maddeler DNA’ nın yapısını ve proteinlerin

polipeptid zincirlerin katlantısını bozarak ve molekül yüzeyindeki yük dağılımını değiştirerek etki gösterirler. (Ivankovıć ve Hrenovıć, 2010).

Yüzey aktif maddelerin farklı canlılar üzerinde zararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Sucul ekosistemde yaşayan organizmalardan kabuklularda (Nunes ve diğ., 2006), midyelerde (Liu ve diğ., 2010) ve balıklarda (Sandbacka ve diğ., 2000; Sobrino-Figueroa, 2013) bu etkiler açıkça ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca katyonik ve amfoterik yüzey aktif maddelerin suda yaşamını sürdüren organizmalara etkileri üzerinde de birçok çalışma vardır (Swedmark ve diğ., 1971 ;Lewis, 1991; Wu ve diğ., 2010; Gheorghe ve diğ., 2013). Karasal organizmalar ile yapılan çalışmalarda ise bitkiler (Belmont ve Metcalfe, 2003; Kekeç ve Cosgun, 2013), hayvanlar (Lee ve Maibach, 1995; Sirisattha ve diğ., 2004) ve insanlar (Chaturvedi ve Kumar, 2010) ön plana çıkmaktadır.

1.6. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Sodyum Dodesil Benzen Sülfonat (SDBS)

Çevre kirliliğinin tehlikeli boyutlara ulaştığı günümüzde anyonik deterjanlar başlıca kirletici grupları arasında gösterilmektedir (Smith ve diğ., 1999). Bu durum, anyonik yüzey aktif maddelerin alıcı ortamlarda köpük oluşturma, biyolojik degredasyon sonucunda oksijen eksikliğine yol açma, ötrofikasyona neden olma, canlılar üzerinde birikim gösterme gibi özelliklerinden ileri gelmektedir (Vural ve Kumbur, 1982; Patin, 1985).

Toksikoloji çalışmalarında etkileri incelenen anyonik yüzey aktif maddelere lineer alkil benzen sülfonat-LAS (Rapaport ve Eckhoff, 1990), sodyum dodesil benzen sülfonat-SDBS (Martinez-Tabche ve diğ., 1997), sodyum dodesil sülfat-SDS (Nunes ve diğ., 2005) örnek olarak verilebilir. Bu tez kapsamında SDBS ve SDS türü anyonik yüzey aktif maddelerin toksik etkileri araştırılacaktır.

1960'lı yılların sonlarına doğru kullanımına kısıtlamalar getirilen SDBS türü anyonik yüzey aktif maddeler, şu an yalnızca elektrik kaplama endüstrisi yıkama sularında ve bazı ağır sanayi tesislerinde kullanım alanı bulmaktadır. Fakat bu durum bile endüstriyel kaynaklı atıksularda SDBS konsantrasyonunun artmasına ve canlılara zarar vermesine yol açmaktadır. Dolayısıyla SDBS' nin toksikoloji ve arıtım çalışmalarında kendisine sıklıkla yer bulması oldukça önem taşımaktadır (Taffarel ve

Rubio 2010, Forni ve diğ., 2012). Doğayı en çok kirleten yüzey aktif madde türü olarak SDS kabul görmektedir. Bunun nedeni birçok yüzey aktif madde türünün yapısına katılması ve sanayide kendisine sıklıkla yer bulmasıdır. SDS kirliliğinin belirlenmesinde bazı organizmalar kullanılarak yapılan çalışmalar da mevcuttur (Sirisattha ve diğ., 2004; Pandey ve Gopal, 2010; Liu ve diğ.,2010).

1.7. *Allium* Testi

Genotoksik kimyasalların ve artan radyasyon seviyesinin neden olduğu çevre kirliliği ekosistemi, organizmaları özellikle de insanları olumsuz etkilemektedir. Bu durum su, hava, topraktaki kontaminasyonların hızlı ve etkili bir şekilde belirlenmesi ve değerlendirilmesi zorunluluğunu meydana getirmektedir.

Toksisite testlerinde tercih edilen canlılar genellikle; indikatör bakteri türleri, mayalar, mantar türleri, böcekler, memeli hücre sistemleri ya da laboratuvar fareleridir. (Maluszynska ve Juchimiuk, 2005) Kimyasalların canlılar üzerinde neden olduğu genetik hasarların tespitinde bitki biyotestleri yüksek duyarlılıkları sebebiyle uzun yıllardır kullanılmaktadırlar (Rank ve Nielsen, 1997; Pereira ve diğ., 2009). Bu testler; *Allium/Vicia* kromozom anormallik testleri veya mikronükleus testleri, *Tradescantia* mikronükleus testleridir (Chakraborty ve diğ., 2009).

Özellikle kolay elde edilmesi, uygulamanın basitliği sebebiyle *Allium testi* araştırmacılar tarafından sıkça tercih edilmektedir (Fındıklı ve Türkoğlu, 2010; Yılmaz ve diğ., 2012). *Allium testi* tüm mitotik evrelerdeki anormalliklerin belirlenmesini sağlamaktadır ve memeli test sistemleriyle iyi korelasyon göstermektedir (Rank ve Nielsen, 1997 , Yıldız ve diğ., 2009). Genel hatlarıyla *Allium* testinin avantajları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1) Kökleri test edilecek kimyasal ile direkt temas halinde olduğu için önemli bir *in vivo* model organizmadır.

2) Diğer test sistemlerine göre kolay elde edilmesi, ucuz olması, hücre döngüsünün kısa olması gibi nedenlerden dolayı sıkça tercih edilmektedir.

3) Ökaryotik bir canlı olan *A. cepa* mitoz ve mayoz geçirir, mutasyona uğrar. Kendiliğinden oluşan mutasyonlar nadiren gerçekleştiğinden, dolaylı yoldan insan sağlığını etkileyebilecek mutajenlerin tespit edilmesini doğru bir şekilde sağlar.

4) Kromozom sayısının ve yapısının sabit olması, kromozom morfolojisinin çeşitli olması nedenlerinden dolayı yapısal ve sayısal anormalliklerin tespit edilmesinde kullanılır (Arıkan 2006; Firbas ve Amon, 2013).

1.8. Comet Testi (SGCE, Tek Hücre Jel Elektroforezi)

Comet testi tek hücrede kimyasal ve fiziksel ajanlar nedeniyle oluşan DNA hasarının hassas bir şekilde belirlenmesine olanak sağlayan, kısa sürede uygulanabilen, ekonomik, sıkça kullanılan bir yöntemdir (Bedir ve diğ., 2004). Agaroza tek hücrenin yerleştirilmesinin ardından liziz, elektroforez, nötralizasyon, mikroskopta inceleme ve bilgisayar yazılımıyla görüntülerin yorumlanmasından oluşur. Hücreler mikroskopta incelenirken arkasında bıraktığı görüntü kuyruklu yıldıza benzediği için Comet Assay olarak adlandırılmıştır. Tek hücre jel elektroforezi yöntemi veya comet yöntemi ilk defa Östling ve Johansons (1984) tarafından denenmiştir. Çeşitli araştırmacılar tarafından günümüze kadar modifiye edilmiştir (Gichner ve diğ., 2003; Singh ve diğ., 1988; Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010).

SCGE genotoksikoloji, DNA hasarı, hasarın tamiri, ekotoksikoloji, biyolojik hasarın izlenmesi, çevresel zararların canlılar üzerindeki etkilerinin izlenmesi (çevresel biyomonitering), insan epidomiyolojisi (klinik ya da çevresel etkileşimler sonucu deneklerde meydana gelen DNA hasarı ve DNA onarım kapasitesinin ölçümü), radyo ve kemoterapi hastalarının takibinde kullanılmaktadır (Moller ve diğ., 2000; Fikrová ve diğ., 2011; Collins ve diğ., 2014).

Birçok canlı üzerinde başarıyla uygulanabilen SCGE için genelde tercih edilen canlılar bakteriler, hayvanlar, bitkiler ve insanlardır. Klinik araştırmalarda en çok kullanılan insan hücreleri kandan izole edilen lökositler ve lenfositlerdir (Fidan, 2009). *Phaseolus vulgaris* (fasülye) *Solanum tuberosum* (patates), *Nicotiana tabacum* (tütün), *Vicia faba* (bakla), *Allium cepa* (soğan), araştırıcılar tarafından kullanılan yüksek yapılı bitkilerdir (Akbaş ve diğ., 2012; Cotelle ve Ferard 1999; Gichner ve diğ., 2006; Cenkci ve diğ., 2010).

Comet yöntemi canlı dokulardan izole edilen çekirdeklerdeki DNA' nın ince agaroz jelde fikse edilerek elektriksel alanda yürütülmesi olarak ifade edilmektedir. Genotoksik hasara uğrayan DNA' lardaki kırıkların türüne ve ağırlığına göre anoda farklı hızlarda göç ederler (Güner ve diğ., 2013).

Comet yöntemi çift zincir kırıkları ve tek zincir kırıklarının, alkali değişime eğimli bölgelerin (apürinik ve apirimidinik bölgeler), tamamlanmamış eksizyon onarım bölgelerinin ve DNA-DNA çapraz bağları (timin dimeri) ve DNA-protein çapraz bağlarındaki hataların belirlenmesinde kullanılır (Gichner ve Plewa 1998; Hattab ve diğ., 2009; Radic ve diğ., 2010; Cortez-Gutierrez ve diğ., 2011).

Ortamın alkali olması hasarların belirlenmesinde büyük rol oynar. Ortam pH' sının 9,5-13,5 olması tercih edilir. Nötral ortam (pH 9,5) çift zincir kırıklarının saptanmasını sağlar, ancak hem tek hem de çift zincir kırıklarının belirlenmesi alkali ortamda olur (pH 10-13) (Guzy ve diğ., 2012; Ventura ve diğ., 2013). Çift ve tek zincir kırıklarının ve alkali değişim gösteren bölgelerin belirlenmesini aynı anda sağladığından alkali comet yöntemi (pH>13) araştırıcılar tarafından en çok kullanılan yöntemdir (Angelis ve diğ., 1999; Ünlü ve Sağlar, 2012).

Comet testinde elde edilen veriler bilgisayar yazılımları veya gözle sayma yöntemleri kullanılarak analiz edilmektedir. Baş kısmındaki DNA yüzdesi (% H-DNA) ve kuyrukta bulunan DNA yüzdesi (% T-DNA), kuyruk uzunluğu (TL, μm), kuyruk momenti (TM, μm, kuyruk kısmındaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu çarpımının 100' e bölünmesiyle elde edilir), Olive kuyruk uzunluğu (OTM, DNA kuyruk uzunluğu ve göç eden DNA parçacıklarının kafaya uzaklığını ölçer) bilgisayar yazılımlarıyla elde edilerek comet analizlerinde kullanılan parametrelerdir. Özellikle kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu daha sık kullanılmasına rağmen kullanımı artan ve kırık DNA frekansı ile doğru orantılı olan parametre hücre çekirdeğinden ayrılan kuyruk DNA yüzdesidir. Bu değer arbitrary units (keyfi üniteler)' dir (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010; Bozdağ, 2009; Kumaravel ve diğ., 2009).

Gözle sayımda kuyruk bölgesine göç eden DNA yüzdesi temel alınarak cometler 0-4 arasında 5 kategoride sınıflandırılmaktadır (Dikilitaş ve diğ., 2009).

Örneğin 100 çekirdek için 0-400 arasında keyfi üniteler (arbitrary units) hasar derecesi değerlendirilerek verilerin ortalamaları hesaplanmaktadır (Bozdağ, 2009).

2. LİTERATÜR ÇALIŞMASI

Bu çalışmada, anyonik yüzey aktif madde türlerinden SDS ve SDBS' nin *Allium cepa* üzerindeki genotoksik etkileri *Allium* testi ve comet yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Bu çalışma öncesi, yüzey aktif madde türlerinin karakteristikleri ve uygulanacak testlerin nitelikleri hakkında fikir sahibi olabilmek için çeşitli literatür taramaları yapılmıştır. Bu bölümde çalışmaya referans olabilecek bir takım bilimsel araştırmalara yer verilmiştir.

2007 yılında Ferk ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada katyonik iki yüzey aktif madde olan Benzolkonyum klorür (BAC) ve Dimetildioktadesil-amonyum bromür (DDAB)' nin farklı canlılar üzerindeki genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Fare karaciğer hücrelerine comet testi, insan periferal lenfosit hücrelerinde ve *Vicia faba* (bakla) kök meristem hücrelerinde MN testi uygulamışlardır. Comet testi ve kan hücrelerine uygulanan MN testinde BAC 1 mg/L, ve 3 mg/L DDAB.0,3 mg/L' de değerlerde düşüşler gözlemişlerdir. (0, 0, 0,11, 0,33, 1 mg/L) *V. faba* kök ucu hücrelerinde BAC ve DDAB için 1 ve 10 mg/L dozlarında hücre bölünmesinin engellendiği ve mikronükleus oluşumunun arttığı belirtilmiştir.

Forni ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada sucul ekosisteme ait olan; su mercimeği (*Lemna minor* L.) ve su eğreltisi (*Azolla filiculoides* Lam.) bitkilerinin anyonik yüzey aktif madde olan SDS' nin 2,50, 25 50, 100 ppm, dozlarına verdiği tepkiyi 1 hafta boyunca gözlemlemişlerdir. Su mercimeğini SDS' nin tüm dozlarından etkilenmiştir, su eğreltisinde 100 ppm dışındaki dozlarda değişim olmamıştır.

2004 yılında Garland ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada hidroponik sistemde yetiştirilen cüce buğdayın anyonik sodyum loril eter sülfat (SLES), amfoterik coco amido propil beatin (CAPD), ve non iyonik alkilpoli etoksilat (AE) olmak üzere,3 farklı sınıfa ait olan yüzey aktif maddeler verildiğinde gelişme hızlarında meydana

gelen değişiklikleri ortaya koymuşlardır. 21 gün yapılan deneyler sonunda SLES' in vejatatif büyüme üzerinde değişiklik meydana getirmediği ancak AE ve CAPD' nin vejatatif büyümede % 20-30' luk bir düşüşe neden olduğu belirlemişlerdir.

Wu ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada lineer alkilbenzen sülfonat (LAS)' ın değişik konsantrasyonlarının (0,1-500 mg/L) su bitkisi olan (*Hidrocharis dubis* Bl.) üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. LAS düşük dozlarda (<10 mg/L) büyüme parametrelerinde artışa, yüksek dozlarda (>10 mg/L) ise azalışa neden olduğu belirtilmiştir.

Masakorala ve diğerleri 2011 yılındaki çalışmalarında deniz makroalgi olan deniz marulu (*Ulva lactuca*)' nın anyonik SDS, non iyonik Triton X-100 (TX) ve katyonik hekzadesiltrimetilamonyum bromür (HDTMA) olmak üzere 3 farklı sınıfa ait sentetik yüzey aktif madde ile muamele edildikten sonraki değişimleri incelemişlerdir. Tüm yüzey aktif maddelerden 0-10 mg/L arasında çalışmışlar, en çok zarar veren maddenin HDTMA (EC_{50}=2,6 mg/L) olduğunu, TX' in küçük değişimlere yol açtığını en az zararlı olanın SDS olduğunu ortaya koymuşlardır.

2009 yılında Gonthier ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmada zakkum (*Nerium oleander*) bitkisiyle çalışmışlardır. Farklı dozlarda SDS (5-500 mg/L) içeren deniz aerosolları 5 hafta boyunca bitki yapraklarına spreyle sıkarak, bitkinin verdiği cevap gözlemişlerdir. Deney sonucunda 30 mg/L ve üzerindeki dozlarda yapraklarda gözle görülen hasarlar olduğunu tespit etmişlerdir.

Dane ve Dalgıç' ın 2005 yılında yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlarda (1, 2, 5, 10, 20 mM) kullandıkları Benomyl (Belate) fungusitinin *A. cepa* üzerindeki toksik etkilerini incelemişlerdir. Doz arttıkça hücre mitotik indekste ve kök uzunluğunda düşüş olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca bütün dozlarda mitotik evrelerde çeşitli anormallikler belirlemişlerdir.

Kumari ve arkadaşları 2009 yılındaki çalışmalarında değişik konsantrasyonlardaki (25, 50, 75, 100 ppm) 100 nm' den küçük gümüş nanopartiküllerin *A. cepa* üzerindeki genotoksik etkilerini incelemişlerdir. Nanopartikül konsantrasyonu arttıkça mitotik indekste düşüş, kromozom anormalliklerinde artış gözlenmiştir. 100 ppm' de hücre duvarı yapısında anormalliklerin meydana geldiği saptanmıştır.

Changhong ve arkadaşları 2008' de nitrobenzenin *Nicotiana tabaccum var xanthi* (tütün) DNA' sına verdiği hasarları comet yöntemini kullanarak tespit etmişlerdir. 5, 25, 100 mg/L dozlarıyla çalışmışlardır. Nitrobenzen dozlarındaki artışının DNA hasarını arttırdığını ortaya koymuşlardır. Özellikle 100 mg/L (19,74)' de kontrole (4,55) göre kuyruk DNA yüzdesinde artış belirlemişlerdir.

2011 yılındaki çalışmalarında Bhat ve arkadaşları oto tamirhanelerinin fazla olduğu alandan, 4 farklı yerden, kontrol grubu olarak elma bahçesinden 2 kg alınan toprak örneklerinin konduğu saksılarda *Trifolium repens* (yonca) yetiştirmişlerdir. Araştırıcılar tamirhanelerden kaynaklanan sinerjik sitogenetik etkileri kromozom anormalliği testi, MN testi ve comet testi ile ortaya koymuşlardır. Ağır metalce zengin toprakta yetiştirilen bitkilerde MN fazla, kromozom anormalliği yüksek çıkmıştır. Ayrıca ağır metal konsantrasyonu arttıkça kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruk DNA yüzdesinde artış meydana gözlemişlerdir.

Khallef ve arkadaşları 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada içme sularının dezenfeksiyonunda kullanılan bromoform (25, 50, 75, 100 µg/mL) ve kloroformun (25, 50, 100, 200 µg/mL) genotoksik etkilerinin belirlenmesinde *Allium* anafaz-telofaz testi ve comet yöntemini kullanmışlardır. Her iki kimyasal için; bromoformun 25 µg/mL dışındaki diğer konsantrasyonlarda mitotik indekste düşüş saptamışlardır. Ayrıca kloroform ve bromoformun 25 µg/mL haricindeki dozlarda anafaz-telofaz testinde incelenen kromozom anormalliklerinde artış gözlemişlerdir. Comet testinde bromoformun 75-100 µg/mL kloroformun 10-200 µg/mL dozlarında DNA hasarı kontrole göre fazla çıkmıştır.

Ciğerci ve arkadaşları 2013 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada 5 farklı konsantrasyonda 4 saat (12,5, 25, 50, 75, 100 ppm) uyguladıkları indium tin oksit (ITO) ' nun *A. cepa* kök hücreleri üzerinde yarattığı genotoksik hasarı *Allium* testi ve comet yöntemiyle ortaya koymuşlardır. Mitotik indeks ve kromozom anormalliklerinde doz artışına bağlı olarak artış gözlemişlerdir. Comet testinde konsantrasyon artttıkça DNA hasarı da artmıştır.

2012 yılındaki çalışmalarında Guzy ve arkadaşları hastane atık suyunun *A. cepa* üzerindeki genotoksik etkilerini araştırırken, comet testinin 4 farklı protokolünü

karşılaştırıp en uygun yöntemi belirlemeye çalışmışlardır. Farklı araştırıcıların yapmış oldukları yayınlarda kullandıkları, kendi içerisinde biraz farklılıklar içeren 4 yöntemi yetiştirdikleri soğanlar üzerine uygulamışlardır. Çalışılan ortam ısısının, hazırlanan çözeltilerin tazeliği ve sıcaklığının deney sonuçlarını önemli derece etkilediği sonucuna varmışlardır. Deneyde kullanılan genotoksik madde veya test materyalinin değişmesi halinde optimizasyon koşullarının yenilenmesi gerektiğini ortaya koymuşlardır.

Seth ve arkadaşları. 2008 yılında yaptıkları çalışmalarında kadmiyumun (10, 20, 40 μM) *A. cepa* meristem hücrelerinde 24 saatte meydana getirdiği hasarı *Allium* testi ve comet testi kullanarak belirlemişlerdir. Bu süre sonunda sonunda bitkileri 24 saat distile suda bekletip aynı testlerle iyileşme kapasitelerine bakmışlardır. Dozlarla doğru orantılı mitotik indekste azalma, mikroükleus oluşumunda ve kromozom hasarında artış gözlemişlerdir. Comet testinde kontrolle kıyaslandığında kuyruk uzunluğu 4,50, kuyruk momenti 0,86 40 μM' da kuyruk uzunluğu (85,70) ve kuyruk momenti (58,75) artmıştır. İyileşme süresi sonunda dozlara bağlı olarak mitotik indekste artış, kromozom anormalliği ve MN oluşumunda düşüş, kuyruk uzunluğu ile kuyruk momentinde azalışın meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Gengeç ve diğerleri 2013 yılında yaptıkları çalışmada reaktif azo boyaların çevreye toksik etkisi üzerindeki değerlendirmelerini yaparken ANOVA tek yönlü varyans analizinin istatistiksel açıdan verileri yorumlamada en etkin yollardan birisi olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, Sonsalla ve arkadaşları 1989 yılında yaptıkları toksisite çalışmasında Duncan çoklu karşılaştırma testini uygulayarak deneysel sonuçları yorumlamaya çalışmışlardır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada araştırma materyali olarak ticari olarak eşit büyüklükte temin edilmiş *Allium cepa* L. var *cepa* (mutfak soğanı) (2n=16) kullanılmıştır. Mutfak soğanı halk arasında "fiske" ya da "arpacık" olarak bilinmektedir. Kolay elde edilmesi, ucuz olması, her zaman kök oluşturma yeteneğinde olması, kromozom boyutlarının büyük olması ve kromozom sayısının az olması nedenlerinden dolayı kimyasal maddelerin toksik etkilerinin belirlenmesinde birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır. Aynı zamanda *A. cepa* memeli test sistemleri ile büyük korelasyon gösterdiği için test materyali olarak seçildi. Test öncesinde soğanlar oda sıcaklığında kuru ve ışık görmeyen bir ortamda muhafaza edildi.

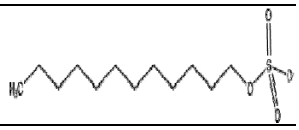
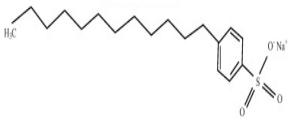
Sitogenetik araştırmalarda kullanılan *Allium cepa* L. var. *cepa* sistematik olarak şu şekilde sınıflandırılmaktadır (URL 1);

Alem (=Regnum) : *Plantae* – Bitkiler
Alt alem (=Subregnum) : *Tracheobionta* – Vasküler bitkiler
Süper Bölüm (=Super divisio) : *Spermatophyta* – Tohumlu bitkiler
Bölüm (=Divisio) : *Magnoliophyta* – Çiçekli bitkiler
Sınıf (=Classis) : *Liliopsida* – Monokotiledonlar
Takım (=Ordo) : *Asparagales*
Familya (=Familia) : *Amaryllidaceae*
Alt Familya(=Subfamilia) : *Allioideae*
Cins (=Genus) : *Allium* L. – Soğan
Tür (=Species) : *Allium cepa* L. – Mutfak soğanı
Varyete (=Variety): *Allium cepa* L. var. *cepa*

3.2. SDS ve SDBS Hakkında Genel Bilgi

Araştırmada anyonik yüzey aktif maddelerden; Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve Sodyum dodesil benzen sülfonat (SDBS) kullanılmıştır. SDS ve SDBS ile ilgili kimyasal bilgiler Tablo 3.1' de özetlendi.

Tablo 3.1**.** Tezde kullanılan yüzey aktif madde türlerinin özellikleri

Yüzey aktif madde Türü	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Molekül Formülü	CAS Numarası	Kimyasal Yapısı
SDS	288,38	$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$	151-21-3	
SDBS	348,49	$CH_3(CH_2)_{11}C_6H_4SO_3Na$	25155-30-0	

Tablodan da görüldüğü üzere çalışmada yüksek molekül ağırlıklı yüzey aktif madde türlerinin etkisi araştırıldı. Kimyasal yapılar ele alındığında *A. cepa* kök büyümesinde yapısında benzen halkası bulunduran SDBS türü yüzey aktif maddenin daha toksik etki yapması beklenmektedir. Ayrıca SDBS' nin SDS' ye ve diğer anyonik yüzey aktif maddelere göre sucul ve karasal ekosistemdeki birçok canlı için daha ciddi zararları olan bir kimyasal olduğu çeşitli çalışmalar ile ortaya koyulmuştur (Cserhati ve diğ., 2002; Forni ve diğ., 2012).

3.3. Test Materyalinin ve Kimyasalların Hazırlanması

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

3.3.1. *A. cepa*' nın hazırlanması

Deney için yaklaşık 10-20 mm çapında, 2-3 g ağırlığında soğanlar kullanıldı. Köklendirme işlemi yapılmadan önce; tabana yakın kabuklar soyularak, soğanların kök primordiyasına zarar verilmeden kuru kökler uzaklaştırıldı.

3.3.2. Anyonik yüzey aktif madde çözeltilerinin hazırlanması

Katı SDS ve SDBS' den hassas terazi kullanılarak 1' er g tartılmış, 1 L distile su ile tamamlanarak stok çözeltiler hazırlandı.

Deneyin yürütülebilmesi için test materyallerine standart yüzey aktif madde çözeltileri uygulandı. Bu doğrultuda stok yüzey aktif madde çözeltilerinden standart çözeltiler elde edildi. Standart çözeltiler, stok çözeltilerin istenilen yüzdelerde seyreltilerek distile su ile 1 L' ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

3.3.3. *Allium* testinde kullanılan çözeltilerin ve boyanın hazırlanması

Kaynatılmış 45 ml asetik asitin içine 2 g toz orsein atılarak eritilmiş, karışım soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra 55 mL distile su eklenip süzüldü (Ozban ve Özmutlu, 1994).

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

3.3.4. Comet testinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Çekirdek izolasyonu ve nötralizasyon işlemlerinde kullanılan 0.4 M Tris tampon çözeltisi hazırlamak için 9,7 g Tris (Sigma USA T-1503) tartılarak 180 mL distile su içinde çözdürüldü. Konsantre HCl yardımıyla pH 7,5' a ayarlandıktan sonra çözelti distile su ile 200 mL' ye tamamlandı.

NMP (normal erime noktalı) agaroz hazırlanırken 100 mg NMP (ROTH Germany 2267, Sigma, A9539) tartılıp, 10 mL su ilave edilerek mikrodalga fırında çözdürüldü. Deney yapılırken taze hazırlandı.

LMP (düşük erime noktalı) agarozu hazırlamak için 65 mg LMP (ROTH Germany, 6351, Sigma, A9414) tartılarak üzerine 10 mL PBS (Biochrom Cat.No.L1825) eklendi. Karışım mikrodalgada çözdürüldü. Tekrar kullanılmak istendiğinde mikrodalgada ısıtıldı.

DNA' nın çözülmesi ve DNA elektroforezinde kullanılan elektroforez tampon çözeltisi (1mM Na_2EDTA, 300Mm NaOH, pH>13) hazırlandı. 10 M NaOH için; 40 g NaOH tartılarak 100 mL distile su içinde çözdürülüp, oda sıcaklığında saklandı. 200mm $Na_2EDTA.2H_2O$ (E5134) için 14,89 g EDTA tartılıp 180 mL distile su içerisinde hafifçe ısıtılarak çözdürüldükten sonra, 10 N NaOH kullanılarak pH 10' a ayarladı. Çözelti 200 mL ye tamamlandı. 1 L elektroforez tampon çözeltisi (pH>13) hazırlanırken; NaOH çözeltisinden 30 mL, Na_2EDTA çözeltisinden 5 mL alınıp 965 mL distile su ile tamamlandı.

Florasan mikroskopta çekirdekleri görüntülemek için kullanılan RedSafe 20.000x' ten (1 mL, Cat. No.21141) 1 µL alınarak 999 µL distile su ile tamamlandı. Boya kullanılıncaya kadar karanlık, serin ortamda saklandı.

3.4. Kök İnhibisyon Testinin Uygulanması

SDS ve SDBS' nin genotoksik etkilerinin incelenmesi için yapılan *Allium* kök inhibisyon testi ile etki konsantrasyonu (kök uzunluğunu yarıya indiren konsantrasyon, EC_{50}) hesaplandı. Deneyler EC_{50} ve $2xEC_{50}$ konsantrasyonları ile gerçekleştirildi. Distile su (dH_2O) ile 50 mL' lik erlenlerde soğanlar 24 saat süreyle köklendirildi. Bu süre sonunda iyi gelişme gösteren, homojen köklenen soğanlar kontrol (distile su) ve farklı dozlarda SDS içeren çözeltilere 96 saat süre ile maruz bırakıldılar. Çözeltiler her 24 saatte bir yenilendi. Laboratuvarda 22±2ºC sıcaklıkta direkt güneş ışığı almayan kısımda denemeler gerçekleştirildi. Denemeler sonunda kontrol, SDS ve SDBS için homojen köklenmiş 3' er soğan kullanıldı. Etki konsantrasyonu (EC_{50}) belirlenirken 6 farklı doz (5, 25, 50, 100, 250, 500 mg/L) kullanıldı. SDS için ilk denemede EC50 değeri bulunurken SDBS' nin ilk denemede etki konsantrasyonu bulunamadı. İkinci denemede (5, 25, 50, 65, 100, 250, 500 mg/L) dozları uygulandı.

Denemeler sonunda her bir tekrar için 3 soğandan birbirine yakın uzunlukta olan 10 kök ölçüldü, EC_{50} belirlendi.

3.5. Kromozom Anormalliği Testi

A. cepa' nın kök ucu meristem hücrelerinin hücre döngüsünün 24 saat olduğu bilindiğinden mitotik indeks ve kromozom anormalliği testlerinin uygulanmasında 24 ve 48 saat seçilmiştir. 24 saat distile suda bekletilen soğanlardan homojen kök yapısına sahip olanlar seçilerek SDS için EC_{50} 100 mg/L ve iki katı 200 mg/L olan dozlarda 24 ve 48 saat bekletildi. Her süre için ayrı deney grubu hazırlandı. Her bir doz için 6 soğan distile suya konuldu, gelişimi zayıf olan soğan uzaklaştırıldı. 5 soğandan 5 kök örneği alındı. SDBS için EC_{50} değeri 65 mg/L ve iki katı 130 mg/L olarak belirlendi. 24 saat köklendirilen 6 soğan belirlenen SDBS dozlarında 24 ve 48 saat bekletilip, gelişimi iyi olmayan soğan uzaklaştırılarak 5 soğandan 5 kök örneği alındı, örnekler çalışılıncaya kadar muhafaza edildi.

3.5.1. Fiksasyon, hidroliz, boyama ve preperatların hazırlanması işlemleri

Fiksasyon işleminde uygulama sürelerinin sonunda soğan kök ucundan yaklaşık 1-2 cm uzunluğunda kesilen örnekler Carnoy fiksatifine (3 kısım % 95' lik etil alkol : 1 kısım glasiyal asetik asit) alınarak 24 saat +4 derecede bekletildi. Bu işlem sonunda kökler % 70' lik etil alkol içerisine alınarak kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edildi.

Meristem dokusu hücrelerinin ayrılıp kolay görüntülenebilmesi için hidroliz işlemi uygulandı. % 70' lik alkolden alınan kök uçları 1 N HCl' de saat camında, bek aleviyle hidroliz edildi.

Hidroliz işleminden sonra lam üzerine alınan kökler % 2 aseto orsein ile boyandı. Boyamanın daha yoğun olduğu 1-2 mm uzunluğundaki kök ucu kısmı lam üzerinde bırakılıp, geri kalan kısım atıldı. Üzerine lamel kapatılarak ezme-yayma preparat tekniği uygulandı.

3.6. Çekirdek İzolasyonu ve Comet Testi

Çekirdek izolasyonu yapılırken, 2,5-3 cm uzunluğunda kesilen yaklaşık 5-6 kök ucu 2 dk buz üzerinde bekletildi (Navarrete ve diğ., 1997) Soğuk 400 µL Tris tamponu (0,4 M Tris pH 7,5) eklendikten sonra kökler jilet yardımıyla nazikçe kesildi. Petri kabı buz üzerinde 15 dk hafifçe sallanarak çekirdeklerin dışarı çıkması sağlandı. Ucu kesik pipet yardımıyla çekirdeklerin bulunduğu karışım ependorf tüpe alındı. Deneyde kullanılacak lamlar 50 ºC' de hazırlanan %1' lik NMA (normal erime dereceli agaroz) ile kaplanarak düz bir zeminde oda sıcaklığında kurutuldu. 70 µL % 6,5' luk LMA (düşük erime noktalı agaroz) ile 70 µL hücre izolatı 37 ºC' de karıştırılarak NMA kaplı lam üzerine yayıldı. Karışım donmadan hemen lamel ile tabakalandırıldı. Buz kasetleri üzerinde 2-3 dk durduktan sonra üzerinden lamelleri alınan preparatlar 4 ºC' deki yatay elektroforez tankına düzgün bir şekilde yerleştirildi. Soğuk elektroforez tamponunda (1 mM Na_2EDTA, 300 mM NaOH pH >13) 15 dk DNA sarmalının açılması beklendi. 25 V 300 mA' de 20 dk elektroforez yapıldı. İşlem sonrası soğuk Tris tamponu ile dolu şalelere alınan preparatlar 15 dk süreyle nötralize edildi.

3.7. Mikroskobik İncelemeler

Hazırlanan preparatlar iki kimyasal için; doz ve süre göz önüne alınarak, her muamele için 5 soğan olacak şekilde incelendi. Mikroskobik incelemeler; tüm safhalardaki anormalliklerin floresans ataçmanlı Olympus BX51 marka mikroskop kullanılarak belirlendi. Mitotik indeksi bulmak için her doz için hazırlanan 5 preparatın her birinde 1000' in üzerinde hücre sayılarak toplamda yaklaşık 5000-6000 hücre sayıldı. Bölünen hücre sayısının gözlenen hücre sayısına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla mitotik indeks yüzdesi belirlendi (Souza ve diğ., 2013) Mitotik indeks hesaplamalarından sonra her preparatta 100 hücre olmak üzere 500 anormal hücre incelendi. En çok gözlenen kromozom hasarları tespit edildi.

Comet analizleri için hazırlanan preparatlar Red-safe (60 µL) ile boyandıktan sonra üzeri lamel ile kapatılarak floresans mikroskopta incelendi. Her doz için 25 çekirdek iki tekrarlı olacak şekilde sayıldı (Gichner ve diğ., 2003; Bandyopadhyay ve Mukherjee, 2011; Türkoğlu, 2012). Kameram comet analiz programı kullanılarak

kuyruk DNA yüzdesi (% kuyruk DNA) ve Olive kuyruk momenti (OTM), gözle analizde ise arbitrary units (AU, keyfi üniteler) ölçüldü.

3.8. Verilerin İstatistiksel Analizi

Denemeler sonucunda elde edilen verilere Minitab 16 programı kullanılarak ANOVA tek yönlü varyans analizi ve Duncan çok yönlü karşılaşma testi uygulanarak; kök uzunluklarındaki değişimlerin istatistiki açıdan değerlendirilmesi yapıldı.

3.8.1. ANOVA tek yönlü varyans analizi

ANOVA (Analysis of Variance) testi grup ortalamaları, grup içi ve gruplar arası varyasyonlara bağlı olan işlemleri analiz etmek için kullanılan temel bir istatistik modelidir. Parametrik bir çıkarım olan ANOVA, ana kütle ortalamaları arasında fark olup olmadığını çeşitli güven aralıklarıyla sınayan bir istatistiksel sistemdir (Ferguson ve Takane, 2005).

3.8.2. Duncan çoklu karşılaştırma testi

Duncan testi, grup ortalamaları karşılaştırılırken ortalamaların büyüklük sıralanışlarını baz alan bir yöntemdir. Ortalamalar, büyüklüklerin birbirlerinden uzaklıklarına göre hesaplanır ve değerlendirilir. Özellikle toksisite çalışmalarında oldukça sık kullanılan varyans analizlerindendir (Kesici ve Kocabaş, 1998).

3.9. Kullanılan Cihazlar

Kimyasalların Radwag PS 510/C/1 model hassas terazi ile tartıldı. *Allium* testi yapılırken floresans ataçmanlı Olympus marka ışık mikroskobu, görüntü almak için kullanıldı. Comet testi için LMP ve NMP agarozlar Arçelik MD554 model mikrodalga fırında yapıldı. OHAUS STARTER3000 pH metre ile comet testinde kullanılan nötralizasyon ve elektroforez tamponlarının pH ayarlamaları yapıldı. Heidolph, MR-Hei standart model manyetik karıştırıcı (ısıtma tablalı), comet testinde agarozların donmasını önlemek için ısıtmalı tabla olarak, kimyasalların hazırlanmasında ise manyetik karıştırıcı olarak kullanıldı. Cleaver CS-300V güç

kaynağı ve CSL-COM 20 (1000 mL) elektroforez tankı, comet testinde çekirdek hasarını belirlemede kullanıldı.

Deneysel aşamada kullanılan cihazlar Şekil 3.1-3.6 ‘ da verilmektedir.



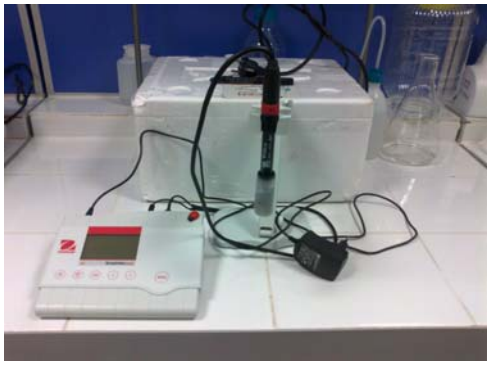
Şekil 3.1. Kimyasalların tartımında kullanılan hassas terazi



Şekil 3.2. Floresans ataçmanlı ışık mikroskobu



Şekil 3.3. Agarozların hazırlanmasında kullanılan mikrodalga fırın



Şekil. 3.4. Çözeltilerin pH' larının ayarlanmasında kullanılan pH metre



Şekil. 3.5. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan manyetik karıştırıcı



Şekil 3.6. Comet testinde kullanılan soğutmalı su banyosu elektroforez tankı ve güç kaynağı

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. SDS ve SDBS' nin Kök Büyümesi Üzerine Etkileri

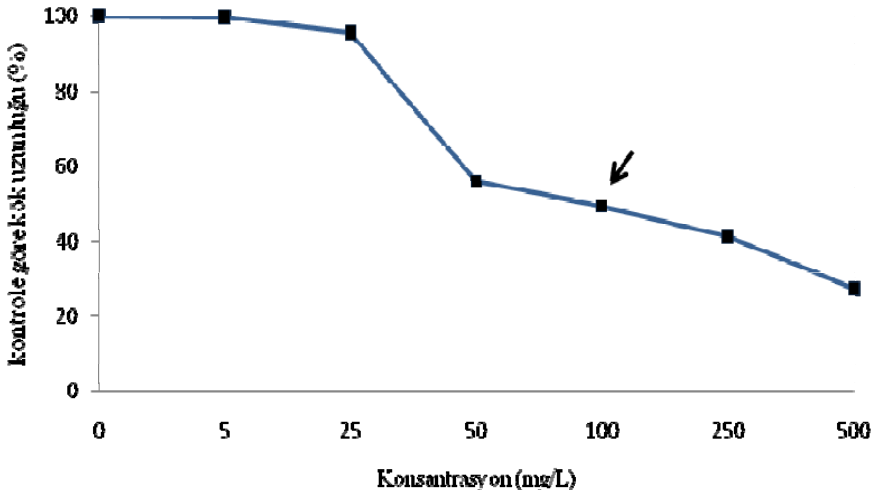
Distile suda 24 saat köklendirilen soğanlar SDS ve SDBS' nin çeşitli dozlarında 96 saat muamele edildi, kontrole göre kök uzunluğunu yarıya düşüren değer belirlendi.

SDS için dozlara karşı kök büyümesi tepkileri Tablo 4.1 ve Şekil 4.1' de verildi. Kök büyümesini yaklaşık olarak %50' ye düşüren değer 100 mg/L' dir. Mitotik indeks, kromozom hasarları ve comet testinde EC_{50} değeri (100 mg/L) ve iki katı (200 mg/L) kullanıldı.

Tablo 4.1. SDS dozlarının *A. cepa* kök büyümesine etkisi

Konsantrasyon mg/L	Kök uzunluğu cm X±SH*	Kontrole göre kök uzunluğu (%)	Kontrole göre azalış (%)
0	2,60±0,006	100	-
5	2,59±0,558	99,62	0,38
25	2,49±0,615	95,77	4,23
50	1,46±0,177	56,15	43,85
100	**1,29±0,373**	**49,62**	**50,38**
250	1,07±0,291	41,15	58,85
500	0,71±0,112	27,31	72,69

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



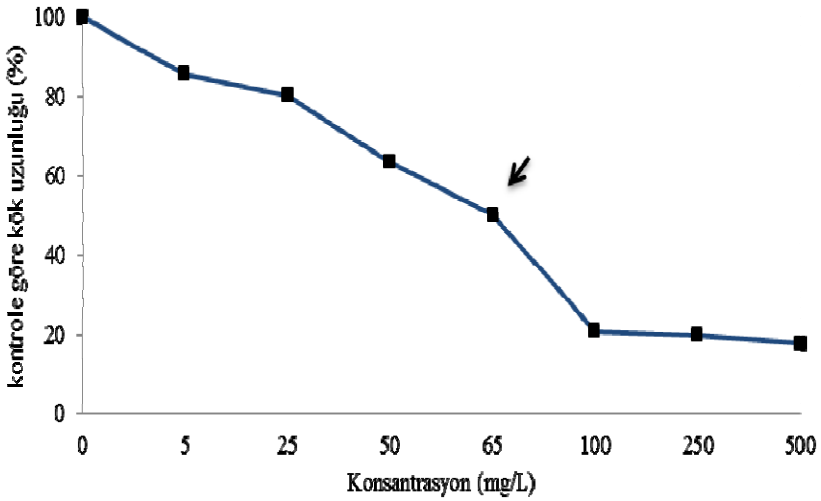
Şekil 4.1. SDS' nin *A. cepa* üzerindeki EC_{50} değeri

SDBS' nin farklı konsantrasyonlarının soğan kök uçlarına etkileri Tablo 4.2 ve Şekil 4.2' de gösterilmektedir. Kök büyümesinin yaklaşık olarak yarıya düştüğü değer 65 mg/L olarak belirlendi. Genetik hasarın belirlenmesinde kullanılan testler için EC_{50} (65 mg/L) ve bu değerin iki katı olan $2xEC_{50}$ (130 mg/L) konsantrasyonları kullanıldı.

Tablo 4.2. SDBS dozlarının *A. cepa* kök büyümesine etkisi

Konsantrasyon mg/L	Kök uzunluğu cm X±SH*	Kontrole göre kök uzunluğu (%)	Kontrole göre azalış (%)
0	3,28±0,569	100	-
5	2,81±0,654	85,67	14,33
25	2,63±0,210	80,18	19,82
50	2,08±0,110	63,41	36,59
65	**1,64±0,070**	50,00	50,00
100	0,68±0,060	20,73	79,27
250	0,65±0,425	19,82	80,18
500	0,58±0,030	17,68	82,32

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



Şekil 4.2. SDBS' nin *A. cepa* üzerindeki EC_{50} değeri

Genotoksisite testlerinde EC_{50} değeri test konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılan yararlı bir parametredir (Özkara ve diğ., 2014). Kök büyümesindeki bozukluklar; apikal meristem aktivitesine, farklılaşmada hücre büyümesi rolüyle ilişkilendirilmektedir (Liman ve diğ., 2012).

4.2. SDS ve SDBS' nin Mitotik İndeks Üzerine Etkileri

Farklı dozlarda SDS (100 mg/L, 200 mg/L) ve SDBS (65 mg/L, 130 mg/L)' nin 24 ve 48 saatlerde kontrol grubu (dH_2O) ile karşılaştırılmalı olarak *A. cepa* kök ucu meristem hücrelerindeki mitotik indekse etkileri incelendi.

SDS ve SDBS türü anyonik yüzey aktif maddelerin *A.cepa* kök büyümesi üzerindeki toksik etkileri ANOVA tek yönlü varyans analizi ile incelendi. Her iki yüzey aktif madde konsantrasyonunda mitotik indeks değerleri kontrole göre 24 ve 48 saat için önemli düzeylerde azaldığı görüldü ($P<0,05$). Ayrıca SDBS'nin *A.cep*a üzerinde daha toksik etkilere yol açtığı, mitotik indeks değerlerindeki azalma oranı ve % 95 güven aralıklı ANOVA testiyle ortaya konuldu (P: 0,002<0,007) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. SDS ve SDBS' nin *A. cepa* mitotik indeks üzerindeki etkilerini gösteren ANOVA tablosu

	Değişim Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F	P	Standart Sapma
SDS	İşlem	2	1,6159	0,8079	39,65	0,007	0,143
	Hata	3	0,0611	0,0204			
	Toplam	5	1,6770	-			
SDBS	İşlem	2	68,883	34,442	80,15	0,002	0,656
	Hata	3	1,289	0,430			
	Toplam	5	70,172	-			

Kontrol gruplarında 24 saatte % 13,42 ve 48 saatte % 13,75 olan mitotik indeksin SDS' nin 100 mg/L konsantrasyonu incelendiğinde 24 saatte % 12,81' e, 48 saatte ise % 12,70' e düştüğü görüldü. SDS' nin 200 mg/L konsantrasyonda 24 saatte % 12,35 olan mitotik indeks değerinin 48 saatte % 12,32' ye düştüğü gözlendi. SDBS muameleli soğanların kontrol gruplarında 24 saatte % 11,59 ve 48 saatte % 11,49 olan mitotik indeksin 65 ve 130 mg/L konsantrasyonları ile kıyaslandığında azaldığı görüldü. 65 mg/L muamelede 24 saatte % 9,52 olan mitotik indeksin 48 saatte % 7,92' ye düştüğü gözlendi. Özellikle 48 saatte kontrolde % 11,49 olan mitotik indeksin 130 mg/L' de % 3,32 'ye kadar azaldığı görüldü (Tablo 4.4-4.5).

Tablo 4.4. SDS' nin *A.cepa* kök uçlarındaki mitotik indekse etkileri

Süre (Saat)	Konsantrasyon (mg/L)	Sayılan Hücre Sayısı	Bölünen Hücre Sayısı	Mitotik indeks (%)
24	0	5150	691	13,42
	100	5088	652	12,81
	200	5288	653	12,35
48	0	5172	711	13,75
	100	5117	650	12,70
	200	5140	633	12,32

Tablo 4.5. SDBS' nin *A. cepa* kök uçlarındaki mitotik indekse etkileri

Süre (Saat)	Konsantrasyon (mg/L)	Sayılan Hücre Sayısı	Bölünen Hücre Sayısı	Mitotik indeks (%)
24	0	5006	580	11,59
	65	5063	482	9,52
	130	5007	171	3,42
48	0	5004	575	11,49
	65	5048	400	7,92
	130	5088	169	3,32

Varyans analizi sonucunda her iki kirletici için ortalama mitotik indeks değerleri Tablo 4.6 ve 4.7' de gösterildi. 24 ve 48 saatlerde yapılan deneyler 2 tekrar olarak ele alınarak ortalama bir mitotik indeks ve standart sapma değerleri hesaplandı.

Kontrol grubu soğan kök uçlarındaki mitotik indeks değeri $13,58 \pm 0,233$ iken SDS' nin 100 mg/L konsantrasyonunda $12,76 \pm 0,079$' dur. 200 mg/L konsantrasyonunda mitotik indekste az da olsa düşüş gözlenmektedir ($12,33 \pm 0,0242$). SDBS mitotik indeks verileri incelendiğinde kontrol grubunda $11,54 \pm 0,068$ olan değerin 65 mg/L' de $8,72 \pm 1,131$' e düştüğü görüldü. 130 mg/L' de $3,37 \pm 0,066$ mitotik indeks kontrolün yarısından fazla düşüş gösterdiği görüldü (Tablo 4.6-4.7)

Tablo 4.6. SDS için hesaplanan ortalama mitotik indeks değerleri

SDS		
Düzey*	N**	MI+SS***
0	2	$13,58 \pm 0,233$
100	2	$12,76 \pm 0,079$
200	2	$12,33 \pm 0,024$

* Düzey: Her iki yüzey aktif madde türü için konsantrasyonları ifade etmektedir.
** N: Her bir konsantrasyonda 24 ve 48 saat için deney sayısını ifade etmektedir.
*** MI+SH: Mitotik indeks ortalaması ± Standart hata.

Tablo 4.7. SDBS için hesaplanan ortalama mitotik indeks değerleri

SDBS		
Düzey*	N**	MI+SS***
0	2	11,54 ± 0,068
65	2	8,72 ± 1,131
130	2	3,37 ± 0,066

* Düzey: Her iki yüzey aktif madde türü için konsantrasyonları ifade etmektedir.
** N: Her bir konsantrasyonda 24 ve 48 saat için deney sayısını ifade etmektedir.
*** MI+SH: Mitotik indeks ortalaması ± Standart hata.

Mitotik indeks hücre döngüsünde bölünen hücrelerin toplamı olarak ifade edilmektedir Ayrıca mitotik indeks mitotik fazlardaki hücre oranını ölçen bir biyomarkır olarak kullanılmaktadır (Ping ve diğ., 2012). Çevre kirliliğine yol açan kimyasallar DNA veya protein sentezini kısıtlayarak MI değerlerinde düşüşe yol açmaktadır. Bu etkiler sonucunda hücre interfaz evresinde kalır veya hücre ölümü gerçekleşmektedir (Pereria ve diğ., 2009). Mitotik indeks değeri kontrole göre % 22' nin altına düşerse test organizma üzerinde lethal etki (Antonsie-wiez, 1990), % 50' nin altına düşerse sublethal etki (Panda ve Sahu, 1985) ortaya çıkmaktadır.

4.3. SDS ve SDBS' in *A. cepa* Kromozom Anormalliklerine Etkileri

A. cepa kök meristem hücrelerinde SDS ve SDBS' nin neden olduğu bazı anormallikler tespit edildi. Her konsantrasyon için 500 hücre sayılıp, bütün mitotik safhalarda meydan gelen anormallikler incelendi. SDS ve SDBS için süreler dikkate alınarak kromozom anormallikleri belirlendi. 15 ana başlık altında toplanan kromozom hasarları Tablo 4.8' de verildi. Sürelere göre kontrol ve yüzey aktif madde konsantrasyonlarının yüzdelerinin hesaplanması; bir anormallik türünün verilerinin toplamının tüm anormallik türlerinin verileri toplamına oranı olarak yapıldı.

Kontrol gruplarına göre SDS' nin EC_{50} ve $2xEC_{50}$ konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlerde kromozom anormallik yüzdesi (% KA) değişimi inceledi. % KA Kontrol gruplarında 24 saatte % 1,56, 48 saatte % 2,12 olarak görüldü. 24 saatte 100 mg/L' de % 12,87 olan % KA' nın 48 saatte % 21,23' e çıktığı gözlendi. Aynı şekilde 200

mg/L' de 24 saatte % 27,97 olan KA 48 saatte % 40,50' ye yükseldiği görüldü (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. SDS' nin zamana bağlı kromozom anormalliği yüzdesi

Konsantrasyon(mg/L)	Süre (saat)	KA (%±SH)*
0	24	1,56±0,66
	48	2,12±0,55
100	24	12,87±1,16
	48	21,23±0,81
200	24	27,97±1,88
	48	40,50±1,25

*İki farklı sürede kromozom anormallikleri yüzdesi ve standart hatayı verir.

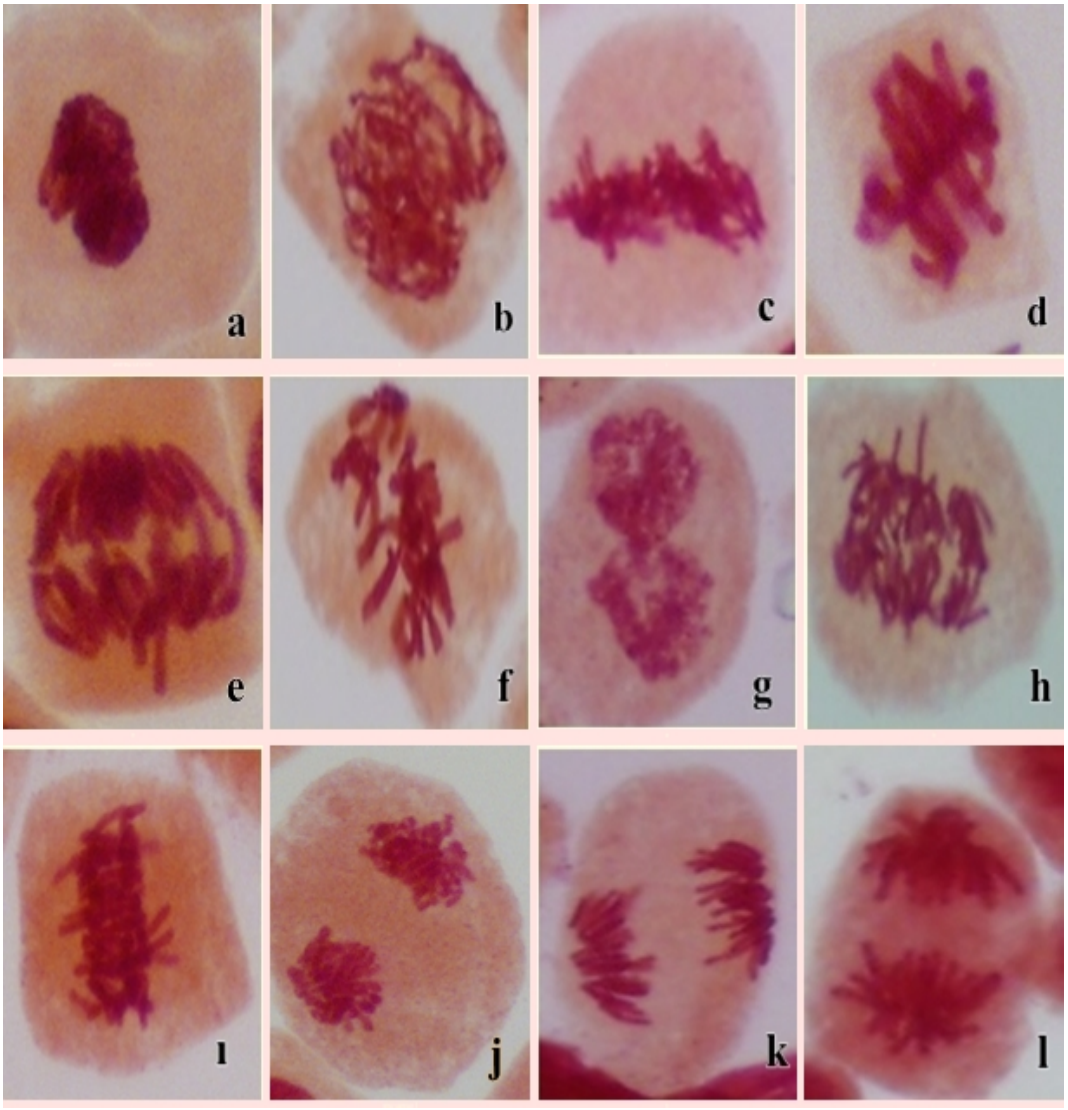
SDBS' nin kontrole göre zamana ve dozlara bağlı % KA incelendi. % KA kontrolde 24 saatte % 1,56, 48 saatte % 2,12 olarak gözlendi. Kontrole göre; % KA 24 saatte 65 mg/L' de % 9,45 iken 48 saatte % 16,33' e yükseldiği görüldü..130 mg/L' de 24 saatte % 19,9 olan % KA' nın 48 saatte % 50,08' e çıktığı gözlendi (Tablo 4.9)

Tablo 4.9. SDBS' nin 24 ve 48 saatlerde kromozom anormalliği yüzdesi

Konsantrasyon(mg/L)	Süre (saat)	KA (%±SH)*
0	24	1,87±0,81
	48	2,37±0,63
65	24	9,45±1,87
	48	16,33±0,95
130	24	19,90±1,70
	48	50,08±1,22

*İki farklı sürede kromozom anormallikleri yüzdesi ve standart hatayı verir

SDS ve SDBS için kromozom anormalliği yüzde tabloları incelendiğinde konsantrasyon ve zaman arttıkça % KA' da artış olduğu göze çarpmaktadır (Tablo 4.8-4.9). En sık rastlanan anormallikler anormal şekilli çekirdekler (A.Ç.), düzensiz profaz (D.P.) ve metafaz (D.M.), yapışık kromozom (Y.K.), köprü (K.) ve geri kalmış kromozom (G.K.K.), köprü ve geri kalmış kromozom (K. ve G.K.K.) c mitoz, binükleus (B.), multipolarite (M), poliploidi (P.), tabla kayması (T.K.), kutup kayması (K.K.) ve star anafazdır (S.A.) (Tablo 4.8, Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Kromozom anormallikleri; a-anormal çekirdek, b-düzensiz profaz, c-yapışık kromozom, d-tabla kayması, e-köprü ve geri kalmış kromozom, f-c mitoz, g-binükleus, h-multipolarite, ı-yapışıklık, j-kutup kayması, k-enine bölünme, l-star anafaz

Tablo 4.10. *A. cepa* kök hücrelerinde SDS ve SDBS dozlarının etkisiyle ortaya çıkan kromozom hasarı çeşitleri ve oranları

	Süre saat	Konsantrasyon mg/L	Sayılan Hücre	A.Ç.	D.P.	D.M.	Y.K.	T.K.	K.	G.K.K	K.ve G.K.K.	C Mitoz	B.	M.	P.	K.K.	E.B.	S.A.
SDS	24	0	500	2	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		100	500	11	2	2	3	1	1	2	0	2	1	0	0	0	0	0
		200	500	16	3	3	6	2	2	3	1	7	2	0	0	0	0	0
	48	0	500	2	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		100	500	14	6	4	3	4	3	3	3	1	3	3	0	0	0	0
		200	500	17	12	5	7	7	4	9	5	3	10	4	0	0	0	0
		Toplam	**500**	**62**	**25**	**16**	**21**	**14**	**11**	**21**	**15**	**5**	**22**	**10**	**0**	**0**	**0**	**0**
		Anormallik Yüzdesi	%	27,93	11,26	7,21	9,46	6,31	4,95	9,46	6,76	2,25	9,91	4,50	0	0	0	0
SDBS	24	0	500	1	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		65	500	19	5	2	4	1	0	2	1	4	0	2	1	1	0	0
		130	500	37	9	3	6	2	1	4	4	5	0	3	3	3	0	0
	48	0	500	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
		65	500	47	8	4	5	2	0	2	2	1	6	0	2	2	0	1
		130	500	53	10	6	7	4	3	5	6	6	12	2	4	4	3	2
		Toplam	**500**	**158**	**33**	**17**	**26**	**10**	**4**	**14**	**15**	**12**	**27**	**2**	**12**	**10**	**3**	**3**
		Anormallik Yüzdesi	%	45,66	9,54	4,91	7,51	2,89	1,16	4,05	4,34	3,47	7,80	0,58	3,47	2,89	0,89	0,89

SDS uygulanan hücrelerde en çok rastlanan hasarlar çekirdek anormalliği (% 27,93), düzensiz profaz (% 11,26), binükleus (% 9,91)' dur. En az rastlanan hasar ise c mitoz (% 2,25)' dur. SDS ile muamele edilen örneklerde poliploidi, kutup kayması, enine bölünme, star anafaz anormalliklerine rastlanmamıştır. SDBS ile muamele edilen hücrelerde sıkça rastlanan anormallikler; anormal çekirdek (% 45,66), düzensiz profaz (% 9,54), binükleus (% 7,80),olurken en az rastlanan anormalliklerin multipolarite (% 0,58), enine bölünme (% 0,87), star anafaz (% 0,87) olduğu tespit edildi (Tablo 4.10).

Duncan çoklu karşılaştırma testine göre (Tablo 4.11) SDS' de anormal çekirdek, yapışık kromozom, geri kalmış kromozom, binükleus anormallikleri önemli düzeyde belirlenmiştir. SDBS' de ise; anormal çekirdek, düzensiz profaz, yapışık kromozom, geri kalmış kromozom, köprü ve geri kalmış kromozom, c mitoz, poliploidi, kutup kayması diğer anormalliklere göre anlamlı düzeyde fazla belirlenmiştir.

Tablo 4.11. Kromozom anormallikleri Duncan tablosu

Kromozom Anormallikleri	**SDS (%) (X±SH)****	**SDBS (%) (X±SH)****
Anormal çekirdek	27,93±0,46^{a*}	45,66±0,88^{a*}
Düzensiz profaz	11,26±0,96^{a}	9,54±0,23^{b}
Düzensiz metafaz	7,21±0,17^{a}	4,91±0,66^{a}
Yapışık kromozom	9,46±0,88^{b}	7,51±0,24^{c}
Tabla kayması	6,31±0,97^{a}	2,89±0,58^{a}
Köprü	4,95±1,46^{a}	1,16±1,24^{a}
Geri kalmış kromozom	9,46±0,85^{c}	4,05±0,43^{d}
Köprü ve Geri kalmış k.	6,76±0,13^{a}	4,34±0,90^{e}
C-mitoz	2,25±0,55^{a}	3,47±0,33^{f}
Binükleus	9,91±0,48^{d}	7,80±0,75^{a}
Multipolarite	4,50±0,67^{a}	0,58±1,67^{a}
Poliploidi	-	3,47±0,81^{g}
Kutup kayması	-	2,89±0,67^{h}
Enine bölünme	-	0,87±1,67^{a}
Star anafaz	-	0,87±1,14^{a}

*Satırlardaki farklı harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ortalama kromozom anormalik yüzdeleri arasında önemli düzeyde fark olduğunu ifade etmektedir (P<0,05).

**Her bir sütun kendi içerisinde değerlendirilmiş olup, farklı yüzey aktif madde türlerinin birbirleri ile etkileşimi Duncan testiyle yapılmamıştır.

Kromozom anormallikleri terminolojisi sitogenetik deneylerde kromozom değişikliklerinin; sayısal (öploidi, anöploidi) ve yapısal (delesyon, inversiyon, dublikasyon, translokasyon) hasarların belirlenmesinde kullanılır (Barberio ve diğ., 2011). Kromozom sayısındaki değişmeler, anojenik ajanlar tarafından kromozomların anormal yerleşmesi sonucunda oluşur. Kromozom kaybı, geri kalmış kromozom, yapışıklık, multipolarite, c- mitoz anojenik etkilere örnek olarak verilebilir. Klastojenik ajanlar Kromozom köprüsü ve kırık oluşturarak kromozom yapısında değişikliğe neden olurlar (Leme ve Marin-Morales, 2009, Radic ve diğ., 2010)

Çekirdek anormallikleri, interfazda nükleusta morfolojik değişiklikler olarak ifade edilir. Loblu çekirdek, birden çok çekirdek taşıyan hücreler, mini hücreler, çekirdekte tomurcuk oluşumu örnek gösterilebilir. Loblu çekirdek ve birden çok çekirdek taşıyan hücrelerin görülmesi hücre ölümünün gerçekleştiğine işaret eder (Leme ve Marin-Morales, 2009). Çekirdekte tomurcuk oluşumu poliploidizasyon mekanizmasını harekete geçirebilir (Fernandes ve diğ., 2007).

Kromozom yapışıklığı genotoksik ajanın hücreye geri dönülmez derecede hasar verdiğini gösterir ve bu hasar hücre ölümüne yol açabilir (Herrero ve diğ., 2012). Anojenik ajan iğ ipliklerini etkisiz hale getirerek kromozomların kutuplara çekilmesini engeller, metafazı bloke eder. Kutuplara göç edemeyen kromozomlar birbirlerine yaklaşarak yapışık bir görüntü alırlar (Ventura-Camargo ve diğ., 2011).

C-mitoz mikrotübül ya da iğ ipliklerinde meydana gelen hata sonucunda ortaya çıkabilen, geri döndürülebilen bir anormaliktir. Poliploidik hücrelerin oluşum mekanizması ile c- mitozunki aynıdır (Özkara ve diğ., 2014; Ventura-Camargo ve diğ., 2011; Ciğerci ve diğ., 2013). Binükleus oluşumu hücre plağı oluşumunda deformasyon veya mitotik düzensizlikler sonucunda oluşabilir (Ciğerci ve diğ., 2013).

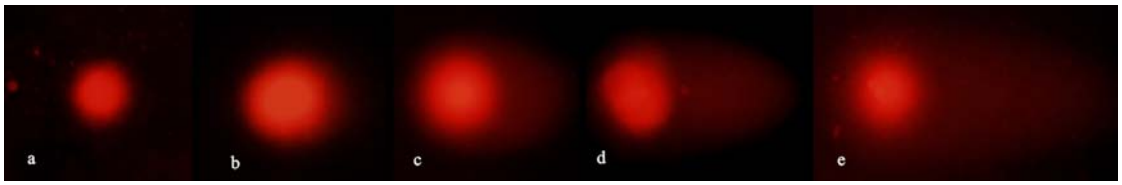
Kromozom köprüsü metafaz evresinde kromatin ipliklerin kardeş kromatinlere tutunarak, geç anafaz veya telofaza kadar ayrılmaması sonucunda oluşabilir. Eğer bu bağ çok güçlü olursa kromatinler kırılır ya da anafazda birleşik görüntü oluşturur (Kumar ve Srivastava, 2011). Anafaz köprüsü eşit olmayan kromatin değişimindeki

transanlokasyon, disentrik kromozom varlığı, kromozom ve kromotinlerin kırılması sonucunda oluşabilir (Liman, 2013).

Geri kalmış kromozomlar; hücrenin farklı kutuplarına göç ederken geç kalan kromozomlardan kaynaklanmaktadır. Asentrik kromozom fragmentleri de geri kalmış kromozom olarak kabul edilmektedir. Ayrıca iğ ipliklerinin organizasyon veya fonksiyonlarında meydana gelen bozukluklar sonunda geri kalmış kromozomlar oluşabilir (Yıldız ve diğ., 2009; Fındıklı ve Türkoğlu, 2010; Türkoğlu, 2012).

4.4. SDS ve SDBS' nin oluşturduğu DNA Hasarının Comet Testi ile Belirlenmesi

SDS ve SDBS muamelesi sonucunda meydana gelen DNA hasarının tespiti için comet testinin alkalin versiyonu uygulandı. DNA hasarı 3 farklı parametre kullanılarak incelendi. Şekil 4.4' te comet testinde hasar derecelerine göre çekirdeklerin mikroskop görüntüsüne yer verildi.



Şekil 4.4. Comet testinde hasar derecelerine göre çekirdeklerin sınıflandırılması: a)0-hasarsız DNA, b)1-kuyruk<0,5 baş c)2-kuyruk>0,5 baş veya kuyruk başa eşit, d)3-kuyruk baş çapından büyük, e)4-kuyruk başın neredeyse 3 katıdır.

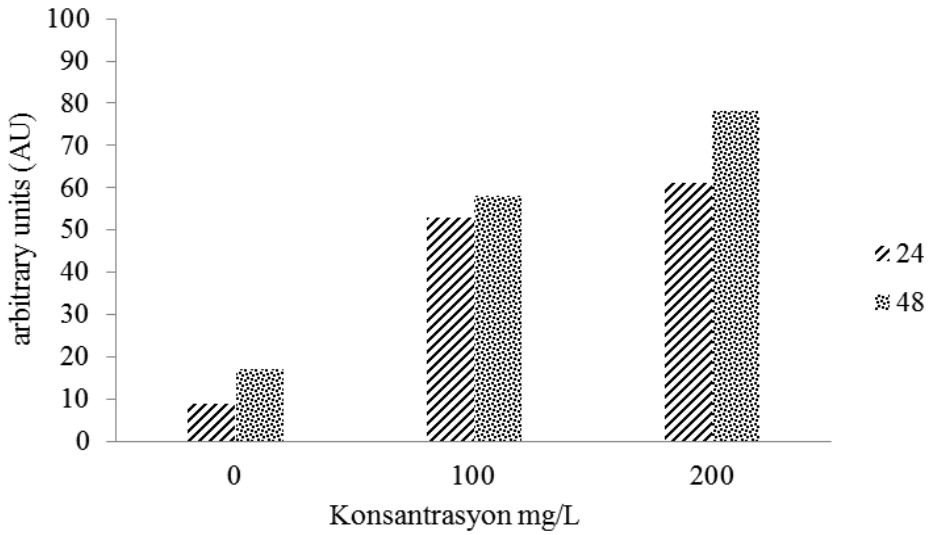
SDS ve SDBS' nin kontrol gruplarında 24 ve 48 saatlerde 0 olarak adlandırılan hasarsız çekirdekler ve 1 olarak isimlendirilen az DNA hasarlı çekirdekler gözlendi. SDS' nin 100 mg/L konsantrasyonunda 24 saatte çoğunlukla 1., 48 saatte ise çoğunlukla 2. tip DNA hasarı almış çekirdekler gözlendi. 200 mg/L konsantrasyonda ise 24 saatlik muamelede çoğunlukla 2 ve 3. tip, 48 saatlik muamelede ise çoğunlukla 3. tip DNA hasarlı çekirdekler görüldü.

SDBS 65 mg/L konsantrasyonunun 24 saat muamelesinde çoğunlukla 3. tip 48 saatlik muamelesinde ise 3 ve 4. tip DNA hasarlı çekirdek gözlendi. 130 mg/L konsantrasyonun 24 saat muamelesinde 3 ve 4. tip, 48 saatte ise çoğunlukla 4. tip DNA hasarlı çekirdekler gözlendi.

SDS ve SDBS' nin konsantrasyonlara ve zamana göre DNA hasarı (arbitrary units, AU) Tablo 4.12-4.13 ve Şekil 4.5-4.6' da verilmektedir. Buna göre kontrolle kıyaslandığında SDS konsantrasyonu arttıkça hasarın da arttığı görüldü. Ancak zamana bağlı hasarın daha fazla olduğu gözlendi. SDBS için kontrolle karşılaştırma yapıldığında 65 mg/L' de 24 saatte DNA hasarında artış olduğu görüldü. 48 saatte 65 mg/L konsantrasyonda artış olduğu gözlendi. 130 mg/L' de 65 mg/L' ye nazaran DNA hasarında yükseliş görüldü ancak zamana bağlı hasar farkının çok olmadığı gözlendi.

Tablo 4.12. SDS' nin *A. cepa* üzerindeki DNA hasarı (Arbitrary units, AU)

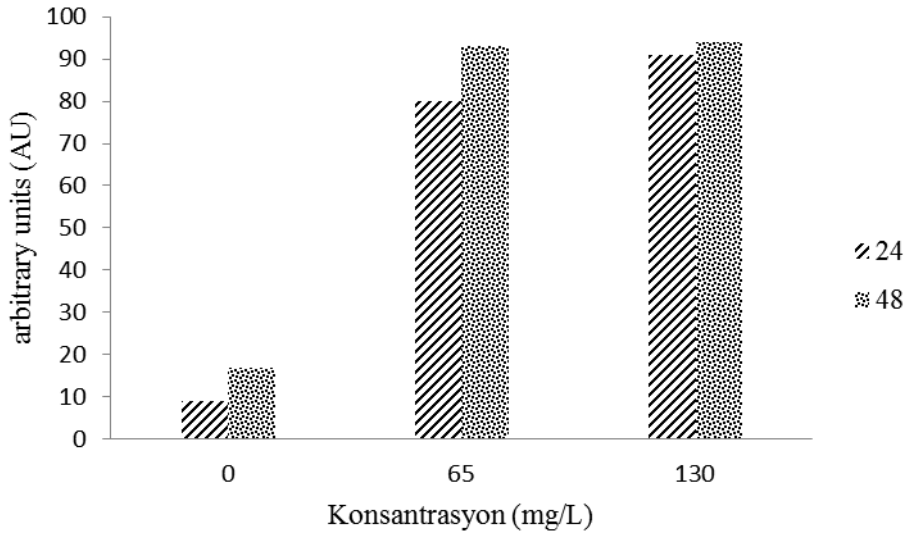
Konsantrasyon (mg/L)	Süre (saat)	Arbitrary Units (AU)
0	24	9
0	48	17
100	24	53
100	48	58
200	24	61
200	48	78



Şekil 4.5. SDS'nin zamana ve konsantrasyonlara göre DNA hasarı (AU)

Tablo 4.13. SDBS' nin *A. cepa* üzerindeki DNA hasarı (Arbitrary units, AU)

Konsantrasyon (mg/L)	Süre (saat)	Arbitrary Units (AU)
0	24	9
0	48	17
65	24	80
65	48	93
130	24	91
130	48	94



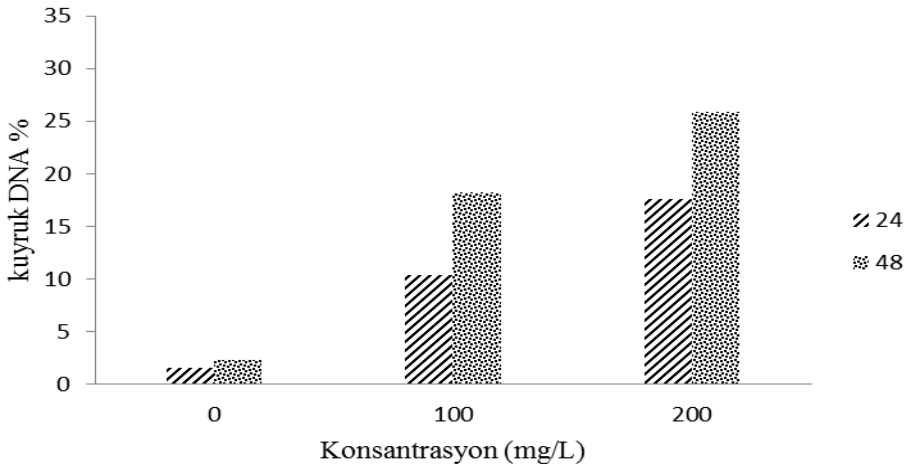
Şekil 4.6. SDBS'nin zamana ve konsantrasyonlara göre DNA hasarı (AU)

SDS ve SDBS' nin farklı konsantrasyonlarının zamana bağlı olarak kuyruktaki DNA yüzdesine (kuyruk DNA %) etkileri incelendi. SDS için incelenen veriler Tablo 4.14 ve Şekil 4.7' de gösterildi. Kontrol grubunda 24 saatte % 1,59, 48 saatte % 2,33 olarak gözlenen kuyruk DNA hasarının SDS' nin 100 mg/L konsantrasyonunda 24 saatte % 10,32, 48 saatte ise% 18,21' e yükseldiği görüldü. SDS' nin 200 mg/L konsantrasyonunda 24 saat muamele edilen soğanlardaki kuyruk DNA yüzdesinin % 17,62, 48 saat muamele edilenlerdekinin ise % 25,9 olduğu gözlendi. SDBS' nin zamana ve konsantrasyonlara göre kuyruktaki DNA yüzdesine etkileri Tablo 4.15 ve Şekil 4.82 de gösterildi.

65 mg/L' de 24 saatte % 22,99 olan hasarın 48 saatte % 29,8' e çıktığı gözlendi. 130 mg/L konsantrasyonunda 24 saatte kuyruktaki DNA yüzdesi % 24,32 iken 48 saatte bu değerin % 31,65' e çıktığı görüldü.

Tablo 4.14. SDS' nin *A. cepa* üzerindeki kuyruk DNA hasarı yüzdesi

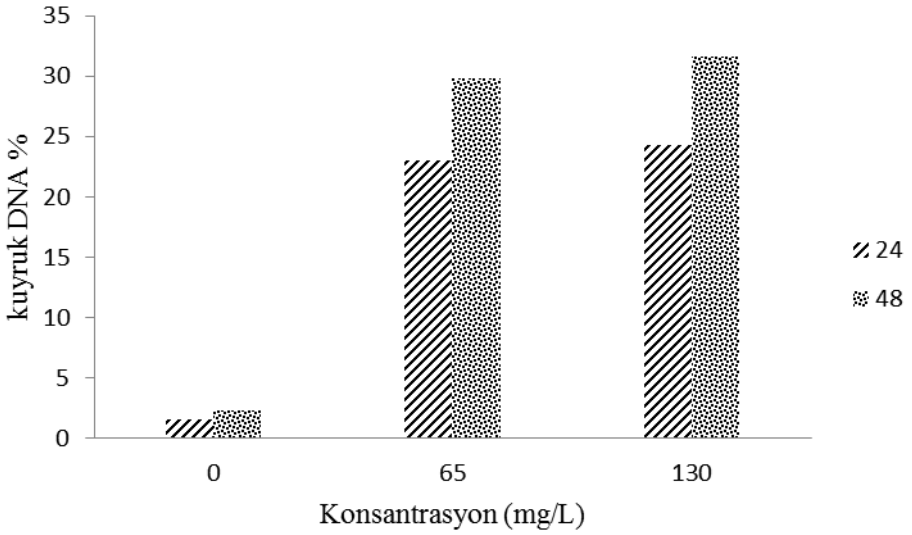
Konsantrasyon (mg/L)	Süre (saat)	Kuyruk DNA %
0	24	1,59
0	48	2,33
100	24	10,32
100	48	18,21
200	24	17,62
200	48	25,9



Şekil 4.7. SDS' nin *A. cepa* üzerindeki kuyruk DNA hasarı yüzdesi

Tablo 4.15. SDBS' nin *A. cepa* üzerindeki kuyruk DNA hasarı yüzdesi

Konsantrasyon (mg/L)	Süre (saat)	Kuyruk DNA %
0	24	1,59
0	48	2,33
65	24	22,99
65	48	29,8
130	24	24,32
130	48	31,65

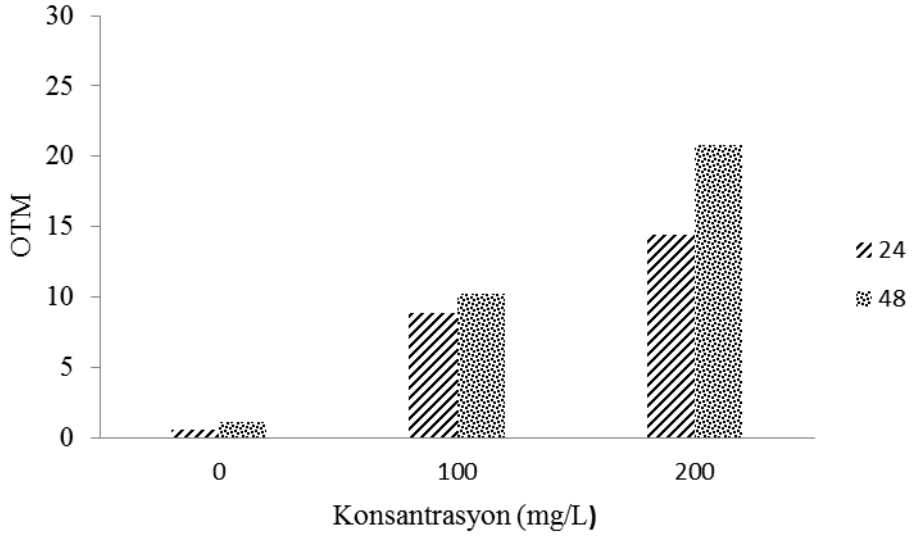


Şekil 4.8. SDBS' nin *A. cepa* üzerindeki kuyruk DNA hasarı yüzdesi

Tablo 4.16 ve Şekil 4.9' da SDS' nin, Tablo 4.17 ve Şekil 4.10' da ise SDBS' nin süreyle ve konsantrasyon değişiminin Olive kuyruk momenti (OTM)' ye etkisi incelendi. Kontrole karşılaştırıldığında SDS ve SDBS konsantrasyonları arttıkça OTM değeri de yükseldiği gözlendi. Bu artışın özellikle SDBS' nin 130 mg/L konsantrasyonunun 48 saat uygulamasında en fazla olduğu görüldü.

Tablo 4.16. SDS' nin *A. cepa* üzerine etkilerinin OTM ile incelenmesi

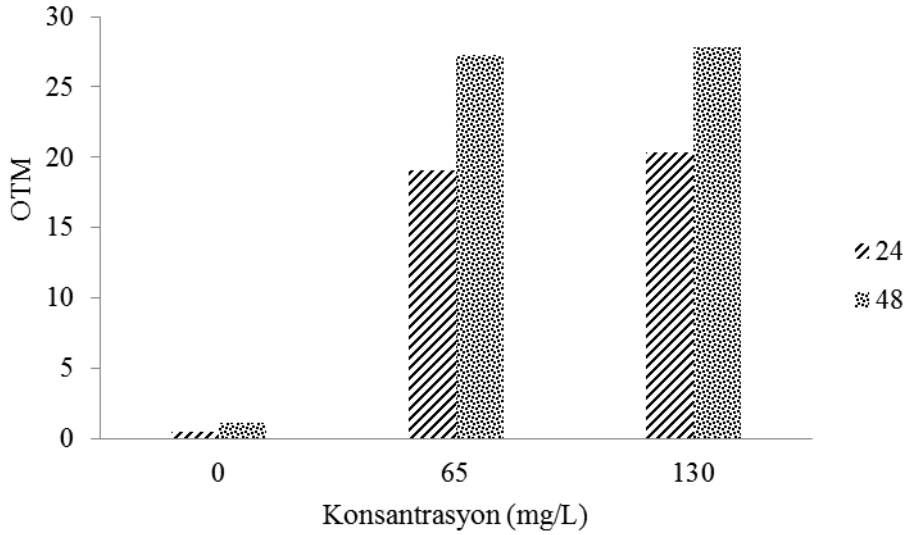
Konsantrasyon (mg/L)	Süre (saat)	OTM
0	24	0,52
0	48	1,11
100	24	8,87
100	48	10,2
200	24	14,43
200	48	20,83



Şekil 4.9. SDS' nin *A. cepa* üzerine etkilerinin OTM ile incelenmesi

Tablo 4.17. SDBS' nin *A. cepa* üzerine etkilerinin OTM ile incelenmesi

Konsantrasyon (mg/L)	Süre (saat)	OTM
0	24	0,52
0	48	1,11
65	24	19,04
65	48	27,28
130	24	20,31
130	48	27,85



Şekil 4.10. SDBS' nin *A. cepa* üzerine etkilerinin OTM ile incelenmesi

OTM ve kuyruk DNA yüzdesi genotoksik kimyasalların dozlarıyla iyi korelasyon gösterir ve comet ölçümlerinde güvenilen parametrelerdir (Kumaravel ve diğ., 2009). AU comet fotoğraflarının gözle incelenerek 0-4 arasında değer verilmesi sonucunda DNA hasarının ölçülmesini sağlayan bir ölçme yöntemidir (Türkoğlu, 2012). AU ile elde edilen verilerle kuyruk DNA yüzdesi yöntemiyle elde edilen veriler benzerlik göstermektedir (Lovell ve Omori, 2008).

DNA hasarındaki artış, yüksek toksik etki ile açıklanabilir. Kirleticilerin bazı bitkiler üzerindeki genotoksik etkileri incelenmiş konsantrasyon ve DNA hasarı arasındaki ilişki olduğu ortaya konmuştur (Gichner ve diğ., 2006).

Comet testi, kök inhibisyon testi, mitotik indeks ve kromozom anormallik testlerinin kimyasal maddelerin toksik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan birbirlerini tamamlayan parametreler olduğu bilinmektedir. Özellikle kromozom anormalliği testi ve comet testi birçok araştırıcı tarafından tercih edilen kromozom hasarını karşılaştırılmalı olarak inceleyen genotoksisite testleridir (Liman, 2013; Türkoğlu, 2012).

Yüzey aktif maddelerin canlılar üzerindeki toksik etkilerini ortaya koyan pek çok çalışma mevcuttur. Yüzey aktif maddelerin protein ve peptidlere bağlanması birçok kere gösterilmiştir. SDS kimyasal yapısında bulunan kararlı halkasal grupların

varlığından dolayı su ve toprakta çözünmez, birikim gösterir (Kekeç ve Cosgun 2013).

Sirisattha ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları araştırmada LAS ve SDS' nin toksik etkilerini belirlemek için *Saccharomyces cerevisiae*' yi kullanmışlardır. Her iki yüzey aktif madde türünün, karbon metabolizmasında değişikliğe yol açarak hücre zarına hasar verdiğini ve oksidatif stres cevabı oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Lipid peroksidasyona neden olduğunu, glutatyon ürünlerinde artışa neden olduğunu belirmişlerdir.

Çalışmada SDS' nin 48 saatlik muamelesinin 200 mg/L konsantrasyonunda ve SDBS' nin 130 mg/L konsantrasyonunun 24 ve 48 saat muamelerindeki kök hücrelerine yapılan *Allium* testinde hücrelerin yapılarında değişiklikler meydana geldiği gözlendi. Ayrıca SDBS 130 mg/L konsantrasyonundaki kök hücreleri morfolojik olarak incelendiğinde kök uçlarında sertleşmeler olduğu görüldü.

Çalışmada yapılan kök inhibisyon testi ile konsantrasyon arttıkça kök uçlarında azalma tespit edildi. Kekeç ve Cosgun 2012 yılında yapmış oldukları araştırmada *Zea mays* (mısır) kök uçlarına SDS' nin 100, 200, 400 mg/L konsantrasyonlarını uygulamış, kök uçlarındaki azalma 100 mg/L' de %17, 200 mg/L' de % 36, 400 mg/L' de ise %85 çıkmıştır. Diğer konsantrasyonlarla muamele edilen kök uçları uzunlukları ile karşılaştırıldığında bu oranın 400 mg/L' de fazla olduğu görülmektedir.

Yaptığımız çalışmada SDS için uygulanan en yüksek konsantrasyonda (500 mg/L) kök uzunluğunda azalış % 72,69 olarak tespit edildi. SDBS' nin 500 mg/L konsantrasyonunda kök uzunluğunda % 82,32 azalış gözlendi. Kök uzunluğunu yarıya düşüren konsantrasyonların değerleri ise SDS için 100 mg/L, SDBS içinse 65 mg/L olarak belirlendi. SDS ve SDBS' nin genotoksik hasarlarını belirlemek için 24 ve 48 saat mumele edilen soğanlar ile yapıldı.
Mitotik indeks (MI) değerlerindeki değişim incelendiğinde her iki madde türünde de süre ve konsantrasyon arttıkça düşüş gözlendi. Kontrol grubunda 24 saat bekletilen soğan kök hücrelerinde mitotik indeks % 13,42, 48 saat bekletilende ise % 13,75 olarak görüldü. SDS' nin 100 mg/L konsantrasyonunda 24 saatte % 12,81 olarak

gözlenenen mitotik indeks 48 saatte % 12,70' e indi. 200 mg/L' de 24 saatte mitotik indeks % 12,35, 48 saatte ise % 12,32 olarak gözlendi.

Özkara ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmada Anilofos pestisitinin 25, 50 ve 100 ppm konsantrasyonlarının 24, 48, 72 saatlerdeki mitotik indekste meydana gelen değişimler kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. En çok düşüş 100 ppm konsantrasyonda 72 saatte % 18,78 olarak gözlenmiştir. Konsantrasyonlar ve süreler arttıkça mitotik indekte azalma olduğu görülmüştür.

Kontrol grubunda mitotik indeks 24 saatte % 11,59, 48 saatte % 11,49 olarak gözlendi. SDBS' nin 65 mg/L konsantrasyonunun 24 saat muamelesinde mitotik indeks % 9,52, 48 saat muamelesinde ise % 7,92 olarak gözlendi. 130 mg/L konsantrasyonunda 24 saat beklerilen soğan kök uçlarındaki mitotik indeks %3,42, 48 saat bekletilenlerde ise % 3,32 olarak gözlendi.

Yıldız ve diğerlerinin 2009 yılındaki araştırmalarında bakır sülfat ve kobalt klorürün 24 ve 48 saatlerde *A. cepa* mitotik indeks üzerindeki etkisi incelenmiştir. Kontrol grubunda 24 saatte % 9,02 olarak gözlenen mitotik indeks 48 saatte % 9,48 olarak görülmüştür. Bakır sülfatın EC_{50} değeri olan 1,5 ppm' de 24 saat muamelede % 4,56 olan mitotik indeksin 48 saat muamelede % 4,28' e düştüğü görülmüştür. $2xEC_{50}$ değeri olan 3 ppm' de 24 saatlik muamelede % 3,52 gözlenen mitotik indeks değeri 48 saatlik muamelede % 3,42 olarak görülmüştür. Kobalt klorürün EC_{50} değeri olarak belirlenmiş olan 5,5 ppm' de 48 saat muamelede % 6,48 olan mitotik indeks 48 saatte % 5,66' ya düşmüştür. $2xEC_{50}$ değerinin 24 saatlik uygulamasında % 4,72 olan mitotik indeks 48 saatte % 4,14 olarak gözlenmiştir.

Bizim çalışmamızda bulunan veriler ile karşılaştırıldığı zaman mitotik indeks verilerinde zamana ve konsantrasyona bağlı olarak düşüş olduğu görülmektedir. En fazla düşüşe SDBS' nin 130 mg/L konsantrasyonunun 48 saatlik muamelesinde rastlandı. Kontrole göre azalan mitotik indeks SDS ve SDBS' nin sitotoksik *A. cepa* üzerindeki sitotoksik potansiyelini göstermektedir. Mitotik indeks değerindeki kayda değer düşüş kimyasalların mitodepresif etkileri sonucunda normal hücre döngüsünde hatalara neden olarak hücre bölünmesini sınırlandırması ile açıklanabilir (Özkara ve diğ., 2014).

Yapılan çalışmada SDS' nin 100 ve 200 mg/L konsantrasyonları ile SDBS' nin 65 ve 130 mg/L konsantrasyonlarıyla 24 ve 48 saat muamele edilen soğan kök hücrelerinde hasarlar tespit edildi. Kromozom hasarları DNA çift zincirinde kırıklarının onarılamaması veya onarımının iyi gerçekleşmemesi sonucunda meydana gelir (Maluszynska ve Juchimiuk, 2005). Sık görülen anormallikler köprüler, yapışıklıklar, c-mitoz, geri kalmış kromozom, multipolarite, fragment oluşumudur (Yıldız ve diğ., 2009).

Deneysel araştırmada en sık gözlenen anormallikler Duncan testi verilerine dayanılarak SDS' de anormal çekridek, yapışık kromozom, geri kalmış kromozom, binükleustur. SDBS' de ise anormal çekirdek, düzensiz profaz, yapışık kromozom, geri kalmış kromozom, köprü ve geri kalmış kromozom, c mitoz, poliploidi, kutup kaymasıdır.

Ayrıca, anormal çekirdekli hücreler interfaz evresinde görüldü Yapışık kromozom anormalliğine en çok metafaz evresinde rastlandı. Yapışıklık kromozomlardaki toksik etkilerin belirtisidir ve geri döndürülemez ve sonunda hücre ölümü gerçekleşir. Metafaz evresindeki düzensizlikler iğ ipliklerinde meydana gelen hatadan dolayı oluşabilir. (Kumari ve diğ., 2009).

Poliploid hücreler ve poliploidi metafazın; hücre bölünmesi esnasında fragmoplast oluşumunun engellenmesi ile ortaya çıkmış olabilir (Fernandes ve diğ., 2007). Binükleus oluşumu hücre döngüsünde kontrol noktalarında sitokinezin engellenmesi sonucunda ortaya çıkmış olabilir (Liman ve diğ., 2010).

Anafaz ve telofaz evrelerinde gerçekleşen anormallikler tübilin polimerizasyonunda meydana gelen hataların iğ ipliklerinin işlevini yerine getirememesi sonucunda gerçekleşmiş olabilir (Liman, 2013).

SDS konsantrasyonu arttıkça; kromozomda yapışıklık, köprü, geri kalmış kromozom, düzensiz metafaz gibi anormalliklerde artışa neden olduğu bilinmektedir (Kekeç ve Cosgun, 2013).

Bu tez çalışmasında, anafaz ve telofaz evrelerinde ger kalmış kromozom, köprü, köprü ve geri kalmış kromozom en çok gözlenen anormalliklerdendir. Anafaz ve

telofaz evrelerinde gerçekleşen anormalliklerin tübilin polimerizasyonunda meydana gelen hatalardan kaynaklandığı belirlendi. Ayrıca metafaz evresindeki düzensizlikler de iğ ipliklerinde meydana gelen hatalardan kaynaklanabilir.

Al ve arkadaşlarının 2013 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada organik kirletici içeriği oldukça yüksek olan tekstil boyalarının *A.cepa*'nın kök büyümesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada organik kirleticilerin kök büyümesi üzerinde önemli derecede olumsuz etkilere yol açtığı görülmüştür. Ayrıca elde edilen deneysel sonuçlar çeşitli istatistiksel modellemeler ile desteklenmiştir.

Bu genotoksik alanda yapılan tez çalışmasında, organik kirletici türlerinden deterjanların *A.cepa* kök uzunluğu üzerindeki olumsuz etkileri ortaya koyuldu. Ayrıca organik kirleticilerden SDS' nin 100 ve 200 mg/L konsantrasyonları ile yine organik kirleticilerden SDBS' nin 65 ve 130 mg/L konsantrasyonlarıyla 24 ve 48 saat muamele edilen soğan kök hücrelerinde önemli derecede hasarlar tespit edildi.

Diğer yandan yapılan deneyler sonucunda, SDS' de en sık gözlenen % KA; anormal çekirdek (% 27,93), yapışık kromozom (% 9,46), geri kalmış kromozom (% 9,46) ve binükleus (% 9,91) oldu.

Bu durum daha toksik bir organik kirletici olan SDBS için ise anormal çekirdek (%45,66), düzensiz profaz (% 9,54), geri kalmış kromozom (% 4,05), c- mitoz (% 3,47), poliploidi (% 3,47), ve kutup kayması (% 2,89) şeklinde gerçekleşti.

Kromozom köprüleri genellikle yapışık kromozom ya da desentrik kromozom sonucu oluşmaktadırlar (Çavuşoğlu ve diğ., 2011). Yapışık kromozomlar, kromozom organizasyonunda görev alan bazı özel histon proteinlerin işelvini yerine getirememesi sonucunda oluşabilir. Bu proteinlerin fonksiyonlarındaki değişiklikler toksik ajan etkisiyle veya yapısal gendeki mutasyon sonucunda gerçekleşmiş olabilir (Türkoğlu, 2012).

Anafazda yanlış düzenleme veya kırıklar iğ iplikleri proteinlerinin görevini yerine getirememesi sonucunda oluşur. Anormallik oluşumunda, iğ iplikleri ve histon olmayan proteinlerin yapısındaki değişikliklerin rol oynadığı, SDS ve SDBS'nin hücre içinde birikim gösterdiği açıkça görülmektedir (Çavuşoğlu ve diğ., 2011).

Ekosistemde bitkilerin çevresel kirleticilerden etkilendikleri bilinmektedir. Fakat çevresel kirleticilerin genotoksik etkilerini belirlemeye bazı bitki türleri uygun değildir. Bu kısıtlamalar nedeniyle örneğin ksenobiyotiklere maruz kalan bitkilerin üzerindeki genotoksik etkileri belirlemek zor olabilmektedir. Bu güçlüklerin üstesinden DNA hasarını tespit eden comet testi ile gelinebilmektedir. Alkali comet testi (pH: 12,3), çevresel kirleticilerin genotoksik hasarlarının belirlenmesinde kullanılan faydalı bir tekniktir. Bitki dokularında bulunan kirleticilerden etkilenen DNA'nın tespitinde kullanılır. Ayrıca tek zincir kırıkları, çift zincir kırıkları, tamamlanmamış eksizyon tamir alanları ve çapraz bağların tespitinde de kullanılmaktadır (Liman ve diğ., 2011)

Bu çalışmada comet testi SDS'nin 100 mg/L ve 200 mg/L konsantrasyonlarının, 24 ve 48 saat muamelelerinde DNA hasarını belirlemek için kullanıldı. SDBS'nin 65 mg/L ve 130 mg/L konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik muamelelerinin *A.cepa* kök uçlarında yarattığı DNA hasarı tespit edildi.

Chakraborty ve diğerlerinin 2009 yılında yaptıkları çalışmada kömür külünün %5-100 konsantrasyonları ile muamele edilen soğan kök uçlarındaki genetik hasarı belirlenmiştir. DNA kuyruk yüzdesi, Olive kuyruk momenti parametreleri ile çalışmışlardır.

Bu çalışma kapsamında ise DNA kuyruk yüzdesi, Olive kuruk momenti ve arbitrary units (rastgele seçilmiş birimler) comet testindeki verileri kullanıldı. Kuyruk DNA yüzdesi verileri incelendiğinde kontrol grubu 24 saatte %1,59, SDS'nin 100 mg/L konsantrasyonunda %10,32, 200 mg/L konsantrasyonunda ise %18,21 olarak görüldü.

Ayrıca 48 saatte kontrol grubunda kuyruk DNA yüzdesi %2,33 olarak bulundu. SDS'nin 100 mg/L konsantrasynunda aynı değer %17,62; 200 mg/L konsantrasyonunda ise %25,9 olarak gözlemlendi.

En yüksek DNA kuyruk yüzdesi değeri kontrolle kıyaslandığında SDS'nin 200 mg/L konsantrasyonunun 48 saatlik uygulamasının maksimum değerde olduğu görüldü.

SDBS'nin kuyruk DNA yüzdeleri 65 mg/L konsantrasyon ve 24 saatlik uygulamada %22,99, aynı konsantrasyon ve 48 saatlik uygulamada ise %29,80 olarak bulundu. 130 mg/L'nin 24 saatlik ve 48 saatlik muamelelerinde ise bu değerler sırasıyla %24,32 ve %31,65 olarak tespit edildi.

SDS ve SDBS verileri karşılaştırıldığında DNA kuyruk yüzdesindeki en büyük artışın SDBS'nin 130 mg/L konsantrasyonunun 48 saatlik uygulamasında olduğu belirlendi.

Olive kuyruk momenti (µm), kontrol gruplarının 24 saat uygulamasında 0,52, 48 saat uygulamasında 1,11 olarak gözlemlendi. SDS'nin 100 mg/L konsantrasyonunun 24 saat muamelesinde 8,87, 48 saat muamelesinde 10,2 olarak tespit edildi. Öte yandan konsantrasyonun 200 mg/L olduğu durumlarda 24 ve 48 saatlik uygulamalar için sırasıyla 14,43 ve 20,83 olarak bulundu.

OTM, SDBS'nin 65 mg/L konsantrasyonunun 24 saat uygulamasında 19,04, 48 saat uygulamasında 27,28 olarak bulundu. Aynı çalışma 130 mg/L konsantrasyon ile yapıldığında ise 24 saat ve 48 saat için sırasıyla 20,31 ve 27,85 olarak tespit edildi.

OTM verileri karşılaştırıldığında SDS'nin kontrole göre en yüksek değerinin 200 mg/L'nin 48 saat uygulamasında olduğu görüldü. SDS ve SDBS'nin OTM verileri kıyaslandığında SDBS'nin 130 mg/L konsantrasyonunun 48 saatlik uygulamasının maksimum değeri aldığı gözlemlendi.

Charaborty ve diğerlerinin 2009 yılında yapmış oldukları çalışmanın OTM verileri incelendiğinde konsantrasyon arttıkça OTM verilerinde artış olduğu göze çarpmışır.

Liman ve diğerleri 2011 yılında yapmış oldukları çalışmada Fenaminosulf pestisitinin *A.cepa* üzerindeki genotoksik etkilerini incelemişlerdir. Comet değerlerinin AU cinsinden hesaplanması sonucu elde edilen veriler incelendiğinde; kontrol grubunun 24 saat uygulamasında 18,66; 96 saat uygulamasında 28,66 olduğu görülmüştür. Pestisitin 12,5 ppm dozunda 24 saatlik uygulamada 20,66 olarak tespit edilen DNA hasarı 96 saatte 28,66 olmuştur.

25 ppm konsantrasyonda 24 saat mumaelede 23,33 olan DNA hasarı 96 saatte 57,00 olarak gözlenmiştir. 50 ppm'de 24 saatlik uygulamada 35,33 olan DNA hasarı 96 saat uygulamada 60,00 olmuştur.

Yapılan çalışmada AU kontrol grubunda 24 saat uygulamada 9,00, 48 saat uygulamada 17,00 olarak gözlendi. AU değeri, SDS'nin 100 mg/L konsantrasyonunun 24 saat uygulamasında 53,00; 48 saat uygulamasında 58,00 olarak gözlemlendi. 200 mg/L konsantrasyonun 24 saat uygulamasında 61,00 olan AU değeri, 48 saat muamelede 78,00'e yükseldi. SDBS'nin 65 mg/L konsantrasyonunun 24 saat muamelesinde 80,00 olarak gözlenen AU 48 saat uygulamasında 93,00 olarak gözlendi. 130 mg/L konsantrasyonunun 24 saatlik uygulamasında ise 91,00 olan AU 48 saat muamelede 94,00 olarak tespit edildi.

Liman ve diğerlerinin 2011 yılında yaptıkları çalışma ile tez çalışması parelellik göstermektedir. Konsantrasyon ve süre arttıkça AU değerlerinde yani DNA hasarında artış olduğu görülmektedir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Günümüzde yüzey aktif maddelerin canlılar üzerinde zararlı etkiler oluşturduğu bilinmektedir. Birçok canlı türüne olumsuz etkilere yol açması ve doğal ortamda sıklıkla karşılaşılması yüzey aktif maddeler ile yapılan çalışmaların sayısında ciddi artışlara yol açmaktadır. Bu tez çalışması, hem ülkemizin hem de dünyanın en ciddi kirleticileri arasında yer alan yüzey aktif maddelerin canlılar üzerindeki genotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla yapıldı. Çalışma kapsamında seçilen yüzey aktif madde türleri anyonik sınıflandırmadan olup, doğal ortamda sıklıkla karşılaşılan SDS ve SDBS olarak seçildi. Yapılan deneyler sonucunda her iki yüzey aktif maddenin; *Allium* testiyle kromozom anormalliklerine, comet testiyle de DNA hasarına yol açtıkları belirlenmeye çalışıldı.

Bu çalışmada anyonik yüzey aktif maddelerden SDS ve SDBS' nin farklı dozlarının 24 ve 48 saatlerde soğan kök meristem hücrelerine etkileri incelendi. Konsantrasyon ve zaman arttıkça kök uzunluğu ve MI değerinin kontrole göre azalış gösterdiği görüldü. % KA, AU, kuyruk DNA % ve OTM değerlerinde ise zamana ve konsantrasyona bağlı artış gözlendi. Yapılan deneyler sonrasında, SDS' de en sık gözlenen % KA; anormal çekirdek (% 27,93), yapışık kromozom (% 9,46), geri kalmış kromozom (% 9,46) ve binükleus (% 9,91) olurken, SDBS için anormal çekirdek (%45,66), düzensiz profaz (% 9,54), geri kalmış kromozom (% 4,05), c-mitoz (% 3,47), poliploidi (% 3,47), ve kutup kayması (% 2,89) oldu. % KA testinde SDBS' de SDS'den farklı olarak poliploidi, enine bölünme, kutup kayması, star anafaz anormalliklerine rastlandı. AU, OTM ve kuyruk DNA % değerlerine göre; en yüksek DNA hasarının SDBS' nin 130 mg/L konsantrasyonunda 48 saatlik muamelede olduğu görüldü.

Toksik etkilerle oluşan DNA hasarının yüksek konsantrasyonlarda artış göstermesinin nedeni olarak serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin oksitatif DNA modifikasyonlara yol açması gösterilebilir. Bu nedenle gelecek çalışmalarda

SDS ve SDBS' nin reaktif oksijen türleri ve kromozom anormallikleri arasındaki ilişkisi üzerine yoğunlaşılabilir.

Çalışma bir bütün olarak ele alındığında ve yapılan testler sonucu elde edilen veriler karşılaştırıldığında, SDBS' nin *A. cepa* kök meristem hücrelerine verdiği zararın nispeten fazla olduğu görüldü. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, evlerimizde ve sanayilerde oldukça sık kullanılan yüzey aktif maddelerin doğaya ciddi zararlar verdiğinin göstergesi olarak kabul edilebilir. Özellikle ülkemizde birçok endüstriyel kuruluşun yıllar boyu atıklarını bilinçsiz bir şekilde doğaya bıraktığı bilinmektedir. Doğaya deşarj edilen bu atıkların, organik madde yükleri incelendiğinde deterjan sınıfı olarak kabul gören yüzey aktif maddelerin varlığı küçümsenemeyecek derecede çoktur. Son yıllarda Avrupa Birliği'ne ve çevre yönetim sistemlerine uyma zorunluluğu bu durumu tersine çevirmeye başlasa da geçmiş yılların etkilerinin neler olduğu bilimsel araştırmalar ışığında insanlara sunulmalıdır. Kocaeli Üniversitesi Biyoloji ABD'de hazırlanan bu tez çalışması ile yüzey aktif maddelerin toksik etkileri ortaya konmaya çalışılarak, organik maddelerin genotoksik etkileriyle ilgili literatüre katkılar sunulmaktadır.

KAYNAKLAR

Akbaş H., Dane F., Yılmaz G., Öztürk F., Leventer S., Phytotoxic effects of six surfactants on *Allium cepa* L. plantlets, *Fresen. Envıron. Bull.*, 2012, **21**, 2853-2858.

Al G., Özdemir U., Aksoy Ö., Cytotoxic effects of Reactive Blue 33 on *Allium cepa* determined using Taguchi's L_8 orthogonal array, *Ecotox. Environ. Safe*., 2013, **98**, 36-40.

Angelis K. J., Dusinska M., Collins A. R., Single cell gel electrophoresis: Detection of DNA damage at different levels of sensitivity, *Electrophoresis,* 1999, **20**, 2133-2138.

Antonsie-wiez D., Analysis of the cell cycle in the root meristem of Allium cepa under the influence of Leda krin., *Folia Histochemica et Cytobiologica* 1990 **26**, 79-96.

Arıkan E. S., Quizalofop-p-etil herbisitinin *Allium cepa* L. kök meristem hücreleri üzerine sitogenetik etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, 2006, 181417.

Bandyopadhyay A., Mukherjee A., Sensitivity of *Allium* and *Nicotiana* in cellular and acellular comet assays to assess differential genotoxicity of direct and indirect acting mutagens, *Ecotox. Environ. Safe*., 2011, **74**, 860-865.

Barbério A., Bioassays with Plants in the Monitoring of Water Quality, Editors: Elshorbagy W., Chowdhury R. K., *Water Treatment*, 1st ed., InTech Press, Rijeka, 317-334, 2013.

Bedir A., Bilgici B., Yurdakul Z., Gürsel B. Ş., Alvur M., DNA hasarı analizinde μ-FADU ve comet yöntemlerinin karşılaştırılması, *Türk Klinik Biyokimya Derg.*, 2004, **2**, 97-103.

Belmont M. A., Metcalfe C. D., Feasibility of using ornamental plants (*Zantedeschia aethiopica*) in subsurface flow treatment wetlands to remove nitrogen, chemical oxygen demand and nonylphenol ethoxylate surfactants-a laboratory-scale study, *Ecol. Eng.*, 2003, **21**, 233–247.

Beltrán-Heredia J., Sánchez-Martín J., Frutos-Blanco G., *Schinopsis balansae* tannin-based flocculant in removing sodium dodecyl benzene sulfonate, *Sep. Purif. Technol.*, 2009, **67**, 295-303.

Bhat T. M., Ansari M. Y. K., Choudhary S., Aslam R., Alka, Synergistic cytotoxic stress and DNA damage in clover (*Trifolium repens*) exposed to heavy metal soil from automobile refining shops in Kashmir-Himalaya, *ISRN Toxicol*., DOI: 10.5402/2011/109092.

Bozdağ A., 2,4-D ve DİKAMBA herbisitlerinin fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) köklerindeki genotoksik etkilerinin RAPD ve comet assaylerle belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, 2009, 244385.

Castro M. J. L., Kovensky J., Fernandez Cirelli A. Ecologically safe alkyl glucoside-based gemini surfactants, *Arkivoc* 2005 12, 253–267.

Cenkci S., Yıldız M., Ciğerci İ. H., Bozdağ A., Terzi H., Arıkan Terzi E. S., Evaluation of 2,4-D and Dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays, *Ecotox. Environ. Safe.*, 2010, **73**, 1558-1564.

Chakraborty R., Mukherjee A., Mukherjee A. K., Evaluation of genotoxicity of coal fly ash in *Allium cepa* root cells by combining comet assay with the *Allium* test, *Environ. Monit. Assess*., 2009, **153**, 351–357.

Changhong G., Yuwei C., Rui L., Liang S., Jun M., Zening Y., Nitrobenzene induces DNA damage in tobacco, 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Chengdu, China, 18-20 Haziran 2010.

Chaturvedi V., Kumar A., Toxicity of sodium dodecyl sulfate in fishes and animals. A review, *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Tech.,* 2010, **1**, 630-633.

Ciğerci İ. H., Liman R., Özgül E., Konuk M., Genotoxicity of indium tin oxide by *Allium* and Comet tests, *Cytotechnology*., DOI 10.1007/s10616-013-9673-0.

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

Collins A., Koppen G., Valdiglesias V., Dusinska M., Kruszewski M., Møller P., Rojas E., Dhawan A., Benzie I., Coskun E., Moretti M., Speit G., Bonassi S., The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project, *Mutat. Res.-Rev. Mutat*., 2014, **759**, 27-39.

Cortés-Gutiérrez E. I., Dávila-Rodríguez M. I., Fernández J. L., López-Fernández C., Gosálbez A., Gosálvez J., New application of the comet assay: chromosome-comet assay, *J.Histochem. Cytochem.*, 2011, **59**, 655-660.

Cotelle S., Ferard J. F., Comet assay in genetic ecotoxicology: A review, *Environ. Mol. Mutagen*.,1999, **34**, 246-255.

Dane F., Dalgıç Ö., The effects of fungicide benomyl (benlate) on growth and mitosis in onion (*Allium cepa* L.) root apical meristem, *Acta Biol. Hung*., 2005, **56**, 119-128.

Dikilitaş M., Koçyiğit A., Canlılarda "tek hücre jel elektroforez" yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi, *HR.Ü.Z.F. Dergisi*, 2010, **14**, 77-89.

Dikilitaş M., Koçyiğit A., Yiğit F., A molecular-based fast method to determine the extent of DNA damages in higher plants and fungi, *Afr. J. Biotechnol*., 2009, **8**, 3118-3127.

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

Ferk F., Misık M., Hoelzl C., Uhl M., Fuerhacker M., Grillitsch B., Parzefall W., Nersesyan A., Micieta K., Grummt T., Ehrlich V., Knasmüller S., Benzalkonium chloride (BAC) and dimethyldioctadecyl-ammonium bromide (DDAB), two common quaternary ammonium compounds, cause genotoxic effects in mammalian and plant cells at environmentally relevant concentrations, *Mutagenesis.*, 2007, **22**, 363-370.

Fernandes T. C. C., Mazzeo D. E. C., Marin-Morales M. A., Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide, *Pestic. Biochem. Phys*., 2007, **88**, 252–259.

Fındıklı Z., Türkoğlu Ş., Glyphos ve DDVP' nin *Allium cepa* L.' da mitoz bölünme ve kromozomlar üzerine etkisi, *C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2010, **31**, 49-62.

Fidan A. F., DNA hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi, *AKÜ-Fen Bilimleri Dergisi*, 2009, **8**, 41-52.

Fikrová P., Štětina R., Hronek M., Hyšpler R., Tichá A., Zadák Z., Application of the comet assay method in clinical studies, *Wien. Klin. Wochenschr*., 2011, **123**, 693-699.

Firbas P., Amon T., *Allium* chromosome aberration test for evaluation effect of cleaning municipal water with constructed wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia, *J. Bioremed. Biodeg.*, 2013, **4**, 1-5.

Forni C., Braglia R., Harren F. J. M., Cristescu S. M., Stress responses of duckweed (*Lemna minor* L.) and water velvet (*Azolla filiculoides* Lam.) to anionic surfactant sodium-dodecyl-sulphate (SDS), *Aquat. Toxicol*., 2012, **110-111**, 107-113.

Garland J. L., Levine L. H., Yorio N. C., Hummerick M. E., Response of graywater recycling systems based on hydroponic plant growth to three classes of surfactants, *Water Res*., 2004, **38**, 1952-1962.

Gengeç E., Özdemir U., Özbay B., Özbay İ., Veli S., Optimizing dye adsorption onto a waste-derived (modified charcoal ash) adsorbent using Box–Behnken and central composite design procedures, *Water Air Soil Pollut*., DOI 10.1007/s11270-013-1751-6.

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

Gichner T., Patkova Z., Kim J. K., DNA damage measured by the comet assay in eight agronomic plants, *Biol. Plantarum*, 2003, **47**, 185-188.

Gichner T., Patkova Z., Szakova J., Demnerova K., Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals, *Ecotox. Environ. Safe*., 2006, **65**, 420-426.

Gichner T., Plewa M. J., Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gelelectrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants, *Mutat. Res.*, 1998, **401**, 143–152.

Gonthier, P., Nicolotti, G., Rettori, A., Paoletti, E., Gullino, M. L., Testing *Nerium oleander* as a biomonitor for surfactant polluted marine aerosol, *Int. J. Environ. Res.*, 2010, **4**, 1-10.

Guzy J., Zgorska A., Ziembinska A., Comet assay optimization with Allium cepa as an indicator for ecotoxicological usage, *Archit. Civil. Eng.*, 2012, **3**, 109-116.

Güner U., Gökalp Muranlı F. D., Balıklarda tek hücre jel elektroforezi (comet assay), *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 2013, **3**, 103-114.

Hattab S., Chouba L., Ben Kheder M., Mahouachi T., Boussetta H., Cadmium and copper induced DNA damage in *Pisum sativum* roots and leaves as determined by the Comet assay, *Plant Biosyst*., 2009, **143**, 6-11.

Herrero O., Pérez Martín J. M., Fernández Freire P., Carvajal López L., Peropadre A., Hazen M. J., Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test, *Mutat. Res.-Gen. Tox. En*., 2012, **743**, 20-24.

Ivanković T., Hrenović J., Surfactants in the environment, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 2010, **61**, 95-110.

Kekeç G., Cosgun S., Genotoxicity potentials of anionic and cationic amino acid-based surfactants, *Toxicol. Ind. Health*, DOI: 10.1177/07 482337 12469657.

Kesici T., Kocabaş Z., *Biyoistatistik*, 1. Basım, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara/Türkiye, 203-282, 1998.

Khallef M., Liman R., Konuk M., Ciğerci İ. H., Benouareth D., Tabet M. Abda A., Genotoxicity of drinking water disinfection by-products (bromoform and chloroform) by using both *Allium* anaphase-telophase and comet tests, *Cytotechnology*., DOI: 10.1007/s10616-013-9675-y.

Kumar G., Srivastava N., genotoxic effects of two commonly used food additives of boric acid and sunset yellow in root meristems of *Trigonella foenum-graecum*, *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng*., 2011, **8**, 361-366.

Kumaravel T. S., Vilhar B., Faux S. P., Jha A. N., Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biol. Toxicol*., 2009, **25**, 53–64.

Kumari M., Mukherjee A., Chandrasekaran N., Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*, *Sci. Total. Environ.*, 2009, **407**, 5243–5246.

Lee C. H., Maibach H. I., The sodium lauryl sulfate model: an overview, *Contact Dermatitis*, 1995, **33**, 1-7.

Leme D. M., Marin-Morales M. A., Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application, *Mutat. Res.-Rev. Mutat*., 2009, **682**, 71-81.

Lewis M. A., Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: A review and risk assessment, *Water Res*.,1991, **25**, 101‑113.

Liman R., Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by *Allium* and Comet assay, *Chemosphere.*, 2013, **93**, 269-273.

Liman R., Gökçe U. G., Akyıl D., Eren Y., Konuk M., Evaluation of genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts of *Linaria genistifolia* subsp. *genistifolia*, *Braz. J. Pharmacogn*., 2012, **22**, 541-548.

Liu B., Yu Z., Song X., Yang F., Effects of sodium dodecylbenzene sulfonate and sodium dodecyl sulfate on the *Mytilus galloprovincialis* biomarker system, *Ecotox. Environ. Safe*., 2010, **73**, 835-841.

Lovell D. P., Omori T., Statistical issues in the use of the comet assay, *Mutagenesis*, 2008, **23**, 171-182.

Maluszynska J., Juchimiuk J., Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 2005, **56**, 177-184.

Martinez-Tabche L., Mora B. R., Faz C. G., Castelan I. G., Ortiz M.M., Gonzalez V. U., Flores M. O., Toxic effect of sodium dodecylbenzenesulfonate, lead, petroleum, and their mixtures on the activity of acetylcholinesterase of *Moina* macrocopa in vitro. *Environ. Toxic. Water*, 1997, **12**, 211-215.

Masakorala K., Turner A., Brown M. T., Toxicity of synthetic surfactants to the marine macroalga, *Ulva lactuca*, *Water Air Soil Pollut*., 2011, **218**, 283-291.

Møller P., Knudsen L. E., Loft S., Wallin H., The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors, *Cancer Epidem. Biomar*., 2000, **9**, 1005-1015.

Mungray A. K., Kumar P., Fate of linear alkylbenzene sulfonates in the environment: A review *International Biodeterioration & Biodegradation* 2009, **63** 981–987.

Navarrete M. H., Carrera P., Miguel M., Torre C., A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants, *Mutat. Res.-gen. Tox. En*., 1997, **389**, 271-277.

Nunes B., Carvalho F., Guilhermino L., Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*, *Ecotox. Environ. Safe*., 2005, **61**, 413-419.

Nunes B., Carvalho F., Guilhermino L., Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*, *Chemosphere,* 2006, **62**, 581–594.

Ozban, N., Özmutlu, Ö., *Mikropreparasyon Yöntemleri*, 1. Basım, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basım Evi, İstanbul, 1-25, 1994.

Östling, O., Johanson, K.J., Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1984, **123**, 291-298.

Özkara A., Akyıl D., Eren Y., Erdoğmuş S. F., Potential cytotoxic effect of Anilofos by using *Allium cepa* assay, *Cytotechnology,* DOI: 10.1007/s10616-014-9716-1.

Panda B.B., Sahu U.K. Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells od Allium cepa by the organophosphorus insecticide fensulfotion. *Cytobios*, 1985, **42**, 147-155.

Pandey P., Gopal B., Effect of detergents on the growth of two aquatic plants: *Azolla pinnata* and *Hydrilla verticillata*, *Environ. We Int. J. Sci. Tech*., 2010, **5**, 107-114.

Patin S.A., Ecologo-toxicological Aspects of Pollution of Marine Environment, *Leningrad: Gidrometeoizdat*, 1985, **1**, 1-20.

Pereira F. C., Lima A. P., Ribeiro A. S. B. B., Silva H. D., Silveira-Lacerda E. P., Pavanin L. A., Cytotoxic and genotoxic effects of cis-Tetraammine (oxalato)Ruthenium(III) Dithionate on the root meristem cells of *Allium cepa*, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2009, **128**, 258–268.

Ping K. Y., Darah I., Yusuf U. K., Yeng C., Sasidharan S., Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: an *Allium cepa* assay, *Molecules*., 2012, **17**, 7782-7791.

Radic S., Stipanicev D., Cvjetko P., Mikelic I. L., Rajcic M. M., Sirac S., Pevalek-Kozlina B., Pavlica P., Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (*Lemna minor* L.) as a test organism, *Ecotoxicology*, 2010, **16**, 216-222.

Rank J., Nielsen M. H., *Allium cepa* anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on *N*-methyl-*N*-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate, *Mutat. Res.*, 1997, **390**, 121-127.

Rao H., He M., Adsorption of anionic and nonionic surfactant mixtures from synthetic detergents on soils *Chemosphere*, 2006, **63**, 1214-1221.

Rapaport R.A., Eckhoff W.S., Monitoring linear alkyl benzene sulfonate in the environment: 1973–1986. *Environ. Toxicol. Chem*., 1990, **9**, 1245-1257.

Ravey J. C., Stebe M. J., Properties of fluorinated non-ionic surfactant-based systems and comparison with non-fluorinated systems, *Colloid Surface A.*, 1994, **84**, 11-31.

Sandbacha A., Christianson I., Isomaa B., The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish−A comparative study, *Toxicol. in vitro*, 2000, **14**, 61-68.

Seth C. S., Misra V., Chauhan L. K. S., Singh R. R., Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*:cytogenetic and Comet assay approach, *Ecotox. Environ. Safe.*, 2008, **71**, 711–716.

Singh N. P., McCoy, T., Tice., R. R., Schneider, E. L., A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res*. 1988, **175**, 84–192.

Sirisattha S., Momose Y., Kitagawa E., Iwahashi H., Toxicity of anionic detergents determined by *Saccharomyces cerevisiae* microarray analysis, *Water Res*., 2004, **38**, 61-70.

Smith V. H., Tilman G. D., Nekola J. C., Eutrophication: Impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems, *Environ. Pollut*., 1999, **100**, 179-196.

Sobrino-Figueroa A. S., Evaluation of oxidative stress and genetic damage caused by detergents in the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae), *Comp. Biochem. Phys. A*., 2013, **165**, 528-532.

Sonsalla P. K., Nicklas W. J., Heikkila R. E., Role for excitatory amino acids in methamphetamine-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity, *Science*, 1989, **243**, 398-400.

Souza P. M. S., Corroque N. A., Morales A. R., Marin-Morales M. A., Innocentini Mei L. H., PLA and Organoclays nanocomposites: degradation process and evaluation of ecotoxicity using *Allium cepa* as test organism, *J. Polym. Environ*., 2013, **21**, 1052–1063.

Swedmark M., Braaten B., Emanuelsson E., Granmo A., Biological effects of surface active agents on marine animals, *Mar. Biol*., 1971, **9**, 183-201.

Şekeroğlu V., Atlı-Şekeroğlu Z., Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 2011, **68**, 241-252.

Taffarel S. R., Rubio J., Adsorption of sodium dodecyl benzene sulfonate from aqueous solution using a modified natural zeolite with CTAB, *Miner. Eng*., 2010, **23**, 771-779.

Türkoğlu Ş., Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay, *Pestic. Biochem. Phys*., **103**, 224-230.

URL -1: http://eol.org/pages/1084354. (Ziyaret tarihi: 10 Aralık 2014).

Ünlü S., Sağlar E., Tek hücre jel elektroforezi yöntemi için alternatif güvenli boyalar, *Cumhuriyet Med. J.*, 2012, **34**, 393-398.

Varga I., Keszthelyi T., Meszaros R., Hakkel O., Gilanyi T.., Observation of a liquid−gas phase transition in monolayers of alkyltrimethylammonium alkyl sulfates adsorbed at the air/water interface, *J. Phys. Chem. B.*, 2005, **109**, 872-878.

Ventura L., Giovannini A., Savio M., Dona M., Macovei A., Buttafava A., Carbonera D., Balestrazzi A., Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing, *Chemosphere*., 2013, **92**, 1-9.

Ventura-Camargo B. C., Maltempi P. P. P., Marin-Morales M. A., The use of the cytogenetic to identify mechanisms of action of an azo dye in *Allium cepa* meristematic cells, *J. Environment. Analytic. Toxicol.*, 2011, **1**, 1-12.

Vural N., Kumbur H., Detergents and fraction of detergents in Ankara Stream and quantitative analysis of metals, *Doğa Bilim Dergisi*, 1982, **6**, 61-67.

Wolf W., Feijtel T., Terrestrial risk assessment for linear alkyl benzene sulfonate (LAS) in sludge-amended soils, *Chemosphere*, 1998, **36**, 1319-1343.

Wu Z., Yu D., Li J., Wu G., Niu X., Growth and antioxidant response in *Hydrocharis dubis* (Bl.) Backer exposed to linear alkylbenzene sulfonate, *Ecotoxicology,* 2010, **19**, 761-769.

Yılmaz G., Akbaş H., Dane F., Leventer S., Öztürk F., micellization and related behaviours of polyoxyethylene-type non-ionic surfactants on root elongation of *Allium cepa* L. *Asian J. Chem.*,2012, **24**, 5743-5745.

Yıldız M., Ciğerci İ. H., Konuk M., Fidan A. F., Terzi H., Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*, 2009, **75**, 934–938.

Yılmaz Ö., Sunlu U., Sunlu F. S., İzmir Körfezi' nde anyonik deterjan düzeylerinin araştırılması, *E.U: J. Fish. & Aquat. Sci.*, 2006, **23**, 107-111.

Ying G. G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment *Environment International* 2006, **32**, 417 – 431

Zhang M., Liao X., Shi B., Adsorption of surfactants on chromium leather waste, *J. Soc. Leath. Tech. Ch.*, 2005, **90**, 1-6.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Al G., Özdemir U., Aksoy Ö., Cytotoxic effects of Reactive Blue 33 on *Allium cepa* determined using Taguchi's L_8 orthogonal array, *Ecotox. Environ. Safe*., 2013, **98**, 36-40.

Aksoy Ö., Deveci A., **Al G**., The effects of some pesticides on pollen germination of *Begonia semperflorens*, *J. Funct. Environt. Botany*., 2013, **3**, 114-119

Özdemir U., **Al G**., Çevre korunmasında atığın atıkla giderilmesi prensibi, *Taksad*., 2012, **1**, 373-379.

Deveci A., Aksoy Ö., **Al G**., The effect of Quizalofop-P-Ethyl on pollen germination of Hyacinthus orientalis (Liliaceae), *21. Ulusal Biyoloji Kongresi,* İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül 2012.

Al G., Özdemir U., Taner S., küresel ısınma ve iklim değişiklerinin ekolojik sistemler üzerindeki etkisinin uzaktan algılama ve coğrafi bilgi sistemi içerisinde değerlendirilmesi, *Ekoloji 2013 Sempozyumu,* Tekirdağ, Türkiye, 2-4 Mayıs 2013.

Al G., Özdemir U., Taner S., Sanayi kökenli atıksuların arıtılmasında biyosorpsiyon yönteminin uygulanabilirliği *XI.Ekoloji ve Çevre Kongresi*, Samsun, Türkiye, 1-4 Ekim 2013.

ÖZGEÇMİŞ

16/02/1988 yılında Trabzon'da doğmuştur. Liseyi 2005 yılında İzmit Gazi Lisesi (YDA)'nde tamamlamıştır. 2011 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü bitirmiştir. Halen Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD'de yüksek lisans eğitimini sürdürmektedir.