

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ORTAK PROGRAMI

**TEKSTİL ENDÜSTRİSİNDE KULLANILAN REAKTİF RED 195 BOYASININ PCR-
TABANLI MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AHMET ALKAYA

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. İSMAİL POYRAZ

BİLECİK, 2021

10380182

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ORTAK PROGRAMI

**TEKSTİL ENDÜSTRİSİNDE KULLANILAN REAKTİF RED 195 BOYASININ PCR-
TABANLI MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AHMET ALKAYA

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. İSMAİL POYRAZ

BİLECİK, 2021

10380182

T.C.
BILECIK SEYH EDEBALI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF SCIENCES
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS
ANADOLU UNIVERSITY JOINT PROGRAM

**INVESTIGATION of GENOTOXIC EFFECTS of REACTIVE RED 195 DYE USED in
TEXTILE INDUSTRY USING PCR-BASED MOLECULAR METHODS**

MASTER'S THESIS

AHMET ALKAYA

THESIS ADVISOR
ASSOC. PROF. DR. ISMAIL POYRAZ

BILECIK, 2021

10380182

BEYAN

‘Tekstil endüstrisinde kullanılan reaktif red 195 boyasının PCR-tabanlı moleküler yöntemlerler genotoksi etkilerinin incelenmesi’ adlı yüksek lisans yeterlik tezi hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel ahlak kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Bu çalışmamın, Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte beyan edilmelidir.	
DESTEK ALINMIŞTIR	DESTEK ALINMAMIŞTIR
Destek alındı ise;	
Destekleyen Kurum:	
Desteğin Türü	Proje Numarası
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)	
2- TÜBİTAK	
Diğer;	

Ahmet ALKAYA

İMZA

ÖNSÖZ

Bu yüksek lisans çalışmasının yazılmasında, çalışmamı sahiplenerek takip eden ve her koşulda desteğini eksik etmeyen çok değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. İsmail POYRAZ'a değerli katkı ve emekleri için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yaşamım ve eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, varlıklarını her zaman yanımda hissettiren en büyük moral kaynaklarım annem Menekşe ALKAYA ve babam Ejder ALKAYA'ya teşekkürü borç bilirim. Ayrıca eğitimimi ve sosyal hayatımı destekleyen ablam Burcu ALKAYA NANE'ye ağabeyim Barış ALKAYA'ya ve kardeşim İbrahim ALKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca teknik konulardaki yardımlarından dolayı doktora öğrencisi, Burcu BOZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak tanıdığım günden beri her konuda yanımda olan değerli arkadaşlarım; Muhammed DİNÇ'e, Mehmet Çağrı GEVHEROĞLU'na, Yusuf ÇELİK'e ve Azizcem BAKIR'a teşekkürlerimi sunarım.

Ahmet ALKAYA

ÖZET

TEKSTİL ENDÜSTRİSİNDE KULLANILAN REAKTİF RED 195 BOYASININ PCR-TABANLI MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Tekstil endüstrisi, özel beceriler gerektirmeden istihdam sağlayan ve birçok ülkenin ekonomisinde önemli bir rol oynayan dünyanın en büyük endüstrilerinden biridir. Tekstil endüstrisi, üretim sürecinde çeşitli kimyasallar ve büyük miktarda su kullanır. Bu işlem sırasında oluşan atık su, çevreye ve insan sağlığına zarar verebilecek Cr, As, Cu ve Zn gibi eser metaller içeren çok miktarda boya ve kimyasal içerir. Tekstil atık suyu genotoksik etkiye sebep olmakta ve kanamaya, cilt ülserine, mide bulantısına, cilt tahrişine ve dermatite neden olabilmektedir. Suda bulunan kimyasallar güneş ışığını bloke eder ve biyolojik oksijen ihtiyacını arttırarak fotosentez ve yeniden oksijenlenme sürecini engeller. Bu çalışmada, tekstil endüstrisinde kullanılan reaktif red 195 (RR195) boyasının farklı konsantrasyonları (5ppm, 10ppm, 50ppm, 75ppm, 100ppm ve 150ppm) üç farklı zaman periyodunda (24,48 ve72 saat) *A. cepa* kök hücrelerine uygulanmıştır. RR195 boyasının genotoksik etkileri PCR tabanlı moleküler markör yöntemleri olan ISSR ve RAPD-PCR kullanılarak karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Mitotik indeks analizi ile RR195 boyasının sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Elde edilen veriler, RR195 boyasının *A. cepa* kök hücreleri üzerinde doz ve zamana bağlı olarak genotoksik ve sitotoksik etkilerinin olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Reaktif Red 195, Genotoksisite, *Allium cepa*, RAPD-PCR, ISSR-PCR, Mitotik İndeks

ABSTRACT

INVESTIGATION of GENOTOXIC EFFECTS of REACTIVE RED 195 DYE USED in TEXTILE INDUSTRY USING PCR-BASED MOLECULAR METHODS

The textile industry is one of the largest industries in the world that provides employment without special skills and plays an important role in the economies of many countries. The textile industry uses a variety of chemicals and large amounts of water in the production process. The wastewater generated during this process contains a large amount of dyes and chemicals that contain trace metals such as Cr, As, Cu and Zn, which can harm the environment and human health. Textile wastewater causes a genotoxic effect and can cause bleeding, skin ulcers, nausea, skin irritation and dermatitis. Chemicals in the water block sunlight and increase the biological oxygen demand, preventing the process of photosynthesis and re-oxygenation. In this study, different concentrations (5ppm, 10ppm, 50ppm, 75ppm, 100ppm and 150ppm) of reactive red 195 (RR195) dye used in textile industry were applied to *A. cepa* root tip cells in three different time periods (24,48 and 72 hours). Genotoxic effects of RR195 dye were analysed comparatively using PCR-based molecular marker methods, ISSR and RAPD-PCR. Cytotoxic effects of RR195 dye were investigated by mitotic index analysis. The data obtained showed that RR195 dye has genotoxic and cytotoxic effects on *A. cepa* stem cells depending on dose and time.

Keywords: Reactive Red 195, Genotoxicity, *Allium cepa*, RAPD-PCR, ISSR-PCR, Mitotic Index

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
GRAFİK LİSTESİ	ix
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Tekstil Endüstrisi.....	1
1.2. Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Boyalar	2
1.2.1. Selüloz Elyaf Boyaları.....	3
1.2.2. Reaktif Boyalar	4
1.2.3. Sentetik Elyaf Boyaları	5
1.3. Tekstil Endüstrisinde Atıklar ve Su Kullanımı.....	7
1.3.1. Tekstil Atıklarının Çevresel Etkileri	8
1.4. Tekstil Atıksu Bertarafı Standartları	9
1.4.1. Tekstil Atıklarının Geleneksel Arıtımı.....	10
1.5. Moleküler Markörler	10
1.5.1. Hibridizasyona Tabanlı Moleküler Markörler	12
1.5.2 PCR Tabanlı Moleküler Markörler	12
1.6 Genotoksisite	17
1.6.1. Mitotik İndeks (MI)	18
1.6.2. Genotoksikoloji Çalışmalarında <i>Allium cepa</i> 'nın önemi	18
2. MATERYAL ve METOD.....	20
2.1. Materyal.....	20
2.1.1 Bitkisel Materyal	20
2.2. Metod	20
2.2.1. <i>A. cepa</i> Örneklerinin Ekimi	20
2.2.2. <i>A. cepa</i> Köklerinin Reaktif Red 195 Muamelesi.....	22
2.2.3. DNA İzolasyonu.....	24
2.2.4. Spektrofotometre ile DNA Konsantrasyonu, Saflık ve Kalite Tayini	25
2.2.5. ISSR-PCR ve RAPD-PCR İçin Kalıp DNA Hazırlığı	25

2.2.6. ISSR-PCR Analizleri.....	25
2.2.7. ISSR-PCR Hazırlığı ve Koşulları.....	25
2.2.8. Agaroz jel elektroforezi ile ISSR-PCR ürünlerinin yürütülmesi.....	27
2.2.9. RAPD-PCR Analizleri	27
2.2.10. RAPD-PCR Hazırlığı ve Koşulları	27
2.2.11. Agaroz jel elektroforezi ile RAPD-PCR ürünlerinin yürütülmesi	29
2.2.12. Mitotik İndeks	30
2.2.13. İstatistiksel Analiz	30
3. BULGULAR	31
3.1. DNA İzolasyonu Sonucu Spektrofotometre ile DNA Konsantrasyonu, Saflık ve Kalite Tayini.....	31
3.2. ISSR-PCR Sonuçları	32
3.3. RAPD-PCR Sonuçları	36
3.4. Mitotik İndeks ve İstatistiksel Analiz	41
4.TARTIŞMA ve SONUÇ.....	44
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ	57

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Azo boyalarının sınıflandırılması.....	6
Tablo 1.2. Tipik arıtılmamış tekstil atık suyunun özellikleri.	8
Tablo 1.3. Bazı farklı moleküler markör türlerinin karşılaştırılması (Devam ediyor).	11
Tablo 1.4. Teknik gereksinimlere göre bazı moleküler markörlerin sınıflandırması.....	12
Tablo 1.5. Allium cepa'nın taksonomisi	19
Tablo 2.1. Kullanılan RR195 konsantrasyonları	22
Tablo 2.2. <i>A. cepa</i> köklerine muamele edilen RR195 boya konsantrasyonları, muamele saatleri ve tüplerin numaralandırılmaları	23
Tablo 3.1. <i>A. cepa</i> kök ucu örneklerinin mitotik indeks oranı	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Reactive Red 195 (RR-195) kimyasal yapısı.....	7
Şekil 1.2. PCR reaksiyonu	13
Şekil 1.3. RAPD tekniğinin çalışma prensibi	15
Şekil 1.4. ISSR primeri kullanarak PCR amplifikasyonu	16
Şekil 1.5. Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları.....	17
Şekil 2.1. 12 günlük <i>A. cepa</i>	20
Şekil 2.2. Ekimi yapılan <i>A. cepa</i> örnekleri (0.Gün).....	21
Şekil 2.3. Ekimi yapılan <i>A. cepa</i> örnekleri (12.gün).....	21
Şekil 2.4. <i>Allium cepa</i> (12.gün)	22
Şekil 2.5. 24/48/72 saat RR195 tekstil boyasının muamele edildiği <i>A. cepa</i> örnekleri	23
Şekil 2.6. 100bp plus DNA ladder marker	30
Şekil 3.1. ISSR-01 primerinin jel görüntüsü. M: Markör, K: Kontrol.....	32
Şekil 3.2. ISSR-01 primerinden oluşan bant profilleri.....	32
Şekil 3.3. ISSR-07 primerinin jel görüntüsü. M: Markör, K: Kontrol.....	33
Şekil 3.4. ISSR-07 primerinden oluşan bant profilleri.....	33
Şekil 3.5. ISSR-309 primerinin jel görüntüsü. M: Markör, K: Kontrol.....	33
Şekil 3.6. ISSR-309 primerinden oluşan bant profilleri.....	34
Şekil 3.7. ISSR-310 primerinin jel görüntüsü. M: Markör, K: Kontrol.....	34
Şekil 3.8. ISSR-310 primerinden oluşan bant profilleri.....	34
Şekil 3.9. ISSR-PCR primerinden oluşan dendogram.	35
Şekil 3.10. ISSR-PCR primerinden oluşan Jaccard benzerlik matrix'i.	36
Şekil 3.11. RAPD-P5 primerinin jel görüntüsü. M: Markör, K: Kontrol.	37
Şekil 3.12. RAPD-P5 primerinden oluşan bant profilleri.	37
Şekil 3.13. RAPD-P11 primerinin jel görüntüsü. M: Markör, K: Kontrol.	37
Şekil 3.14. RAPD-P11 primerinden oluşan bant profilleri.	38

Şekil 3.15. RAPD-P14 primerinin jel görüntüsü. M: Markör, K: Kontrol.	38
Şekil 3.16. RAPD-P14 primerinden oluşan bant profilleri.	38
Şekil 3.17. RAPD-P16 primerinin jel görüntüsü. M: Markör, K: Kontrol.	39
Şekil 3.18. RAPD-P16 primerinden oluşan bant profilleri.	39
Şekil 3.19. RAPD-PCR primerinden oluşan dendogram.	40
Şekil 3.20. RAPD-PCR primerinden oluşan jaccard benzerlik matrix'i.....	41
Şekil 3.21. 10x ve 40x'lik objektifte incelenen <i>A. cepa</i> kök ucu preparatlarının görüntüsü. (K: Kontrol)	42



GRAFİK LİSTESİ

Grafik 3.1. Farklı dozlara maruz kalan örneklerin istatistiksel analizi.	43
--	----



ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan ISSR primer bilgileri.....	26
Çizelge 2.2. Kullanılan ISSR-PCR bileşenleri ve miktarları.	26
Çizelge 2.3. ISSR-PCR reaksiyon protokolü.	27
Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan RAPD primer bilgileri.....	28
Çizelge 2.5. Kullanılan RAPD-PCR bileşenleri ve miktarları.....	28
Çizelge 2.6. ISSR-PCR reaksiyon protokolü.	29
Çizelge 3.1. <i>A. cepa</i> köklerinden elde edilen DNA miktarı ve saflıkları.....	31
Çizelge 4.1. ISSR primerlerinin bant sayıları ve polimorfizm oranları	45
Çizelge 4.2. RAPD primerlerinin bant sayıları ve polimorfizm oranları	45

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

A: Adenin

AFLP: Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Ar: Arsenik

B: Bor

BOD: Biyolojik oksijen ihtiyacı

bp: Baz çifti

C: Karbon

C: Sitozin

COD: Kimyasal oksijen ihtiyacı

Cr: Krom

Cu: Bakır

DAF: DNA Amplifikasyonu Parmak İzi (DNA Amplification Fingerprinting)

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksiribonükleotid Tri Fosfat

F: Flor

Fe: Demir

G: Guanin

Hg: Civa

ISSR: Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm (Inter Simple Sequence Repeat)

K: Kontrol

L: Litre

Mg: Miligram

Mg⁺²: Magnezyum

MgCl₂: Magnezyum klorür

MI: Mitotik İndeks

Mn: Manganez

N: Azot

Ni: Nikel

O: Oksijen

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

pH: Hidrojen Gücü (Power of Hydrogen)

ppm: miligram/L (milyonda bir/parts per million)

RAPD: Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi (Random Amplified Polymorphic DNA)

RFLP: Sınırlı Parça Uzunlukları Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RR195: Reaktif red 195

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)

SSR: Basit Tekrarlı Diziler veya Mikrosatellitler (Simple Sequence Repeat)

T: Timin

Taq: Taq DNA Polimeraz

UNSD: Birleşmiş Milletler İstatistik Bölümü

UV: Ultraviyole

V: Vanadyum

V: Volt

Zn: Çinko

µg: Mikrogram

µl: Milrolitre

µM: Mikromolar

1. GİRİŞ

1.1. Tekstil Endüstrisi

Günümüzde dünya nüfusu 8 milyar sınırına yaklaşmaktadır (Worldometers, 2020). Tüm dünyada insanların yaşamındaki en temel gerekliliklerin başında gıda ve giyecek gelmektedir. Tekstil ve giyim sanayisi bu gerekliliği karşılamak için insanlığın vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. Tekstil endüstrisinin büyüklüğü ve önemi göz önüne alındığında dünyada en temel ikinci ihtiyacın tekstil ve giyim sektörü olduğu düşünülmektedir (Shishoo, 2012: 1).

Tekstil kelimesi Latince "texere" kelimesinden benimsenen dokuma anlamına gelir. Tekstiller hem elde hem de makinelerle dokunabilir. Tekstil hammaddeleri doğal ve sentetik elyaflardır (Elliott vd., 1954: 377). Doğal liflerin kaynakları mineraller, hayvanlar ve bitkilerdir. Teknolojinin ilerlemesiyle, lifler artık kimyasallardan çıkarılabiliyor. Bununla birlikte, bitki kaynakları, hayvansal ve mineral kaynaklardan elde edilenlere göre daha fazla miktarda lif verir. Üretilen tekstillerin çoğu, ipliklerden liflerin eğrilmesinin bir sonucudur (Kuusisto, 2010: 30).

Öte yandan atık su hacmi ve içeriği düşünüldüğünde, tekstil endüstrisinden kaynaklanan atık sular, endüstriyel kirliliğin birinci sırada yer alan kaynağı olarak sınıflandırılabilir. Tekstil endüstrisinde kullanılan prosesler arasında boyama ve terbiye aşamaları en çok su kullananlardır (Sen ve Demirer, 2003).

Tahminlere göre, piyasada 100.000 farklı ticari boya mevcuttur ve her yıl 0,7 milyon tonun üzerinde boya üretilmektedir (Robinson vd., 2001: 250). Ayrıca boyamada kullanılan bu boyalar ve diğer kimyasallar çevreden gelen etkilere dayanıklı olarak geliştirilmektedir (Hendrickx ve Boardman, 1995: 1). Bu nedenle ve boyama işlemindeki verimsizlik nedeniyle, bu boyaların tonları atık sularda bulunur ve çoğu zaman geleneksel işlemlerle arıtılması mümkün değildir (Chequer vd., 2013: 152).

Tekstil endüstrisi üç ana kategoriye ayrılır: selüloz elyaflar (pamuk, suni ipek, keten, rami, kenevir ve liyosel), protein elyafları (yün, angora, tiftik, kaşmir ve ipek) ve sentetik elyaflar (polyester, naylon, spandeks, asetat, akrilik, ingeo ve polipropilen). Tekstil endüstrisinde kullanılan boya ve kimyasalların cinslerinin üretilen kumaşlara göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Reaktif boyalar (remazol, procion MX ve cibacron F), direkt boyalar (kongo kırmızısı, direkt sarı 50 ve direkt kahverengi 116), naftol boyalar (hızlı sarı GC, hızlı kırmızı R ve hızlı mavi B) ve indigo boyalar (indigo beyaz, tyrian mor ve indigo karmin) selüloz liflerini boyamak için kullanılan boyalardan bazılarıdır (Lorimer vd., 2001: 1957-Robert vd.,

2008: 360). Protein lifleri asit boyalar (azo boyalar, triarilmetan boyalar ve antrakinon boyalar) ve lanaset boyalar (Mavi 5G ve Bordo B) kullanılarak boyanır (Robert vd., 2008: 360- Schmidt vd., 2002: 28). Sentetik lifleri boyamak için dispersiyon boyalar (Disperse yellow 218 ve dispers navy blue 35), bazik boyalar (basic orange 37 ve basic red 1) ve direkt boyalar gibi diğer boyalar kullanılır (Burch, 2020).

Tekstil endüstrisi, organik ve inorganik bileşikler içeren büyük miktarlarda sıvı atık üretir (Elliott vd., 1954: 377). Boyama işlemleri sırasında kumaşlara uygulanan tüm boyalar üzerine sabitlenmez ve bu boyaların her zaman kumaşlara sabitlenmeden kalan ve yıkanan bir kısmı vardır. Bu sabitlenmemiş boyaların tekstil atıklarında yüksek konsantrasyonlarda olduğu bulunmuştur (Schmidt vd., 2002: 28). Tüketilen ve salınan su miktarı da üretilen kumaşların cinsine göre değişiklik göstermektedir. 1 kg kumaş üretmek için yaklaşık 0,08-0,15 m³ su kullanılmaktadır (Moustafa, 2008).

Günde yaklaşık 12-20 ton tekstil işlendikten sonra yaklaşık 1.0003.000 m³ suyun boşaltıldığını tahmin ediyor. Bu atıklar, bazıları biyolojik olarak parçalanmayan ve kanserojen olan ve uygun şekilde işlenmezse sağlık ve çevre için büyük bir tehdit oluşturan boyalar ve kimyasallar açısından zengindir (Pagga ve Brown, 1986: 481-Al-Kdasi vd., 2004: 222).

Bu atık suların arıtılması için birkaç birincil, ikincil ve üçüncül arıtma işlemleri kullanılmıştır. Bunlar arasında flokülasyon, kimyasal pıhtılaşma, basit sedimantasyon, havalandırılmış lagünler, aerobik aktif çamur, damlama filtreleri, ters ozmoz ve elektrodiyaliz vardı. Ancak, bu işlemlerin endüstride kullanılan tüm boyaların ve kimyasalların çıkarılmasına karşı etkili olmadığı görülmüştür (Mohamed ve Ahmed, 2017: 65). Bu atık sular sadece yüksek konsantrasyonda boyalar içermez, aynı zamanda çeşitli işlem aşamalarında kullanılan kimyasalları da içerir. Bu atık sularda Cr, As, Cu ve Zn gibi bazı eser metaller bulunur ve kanama, cilt ülseri, mide bulantısı, ciddi cilt tahrişi ve dermatit gibi çeşitli sağlık sorunlarına neden olabilir (Nese vd., 2007: 97). Tekstil atıklarının diğer organik ve mikrobiyal safsızlıkları da içerdiği bulunmuştur (Laxman, 2009).

1.2. Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Boyalar

Boyalar, tekstil, inşaat, ahşap, metal sanayi, deri, kağıt hamuru ve kağıt, gıda ve plastik gibi günümüz üretiminde önemli etkileri olan birçok endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır (Sadettin ve Donmez, 2006: 836-Yuzhu ve Viraraghavan, 2001: 251).

İnsan ve hayvan sağığı için tehlikeli bir tehdit oluşturan son derece toksik, kanserojen ve zehirlenmeye neden olan birçok sentetik boya sınıfı vardır. Düşük konsantrasyonlarda bile kimyasal ve biyolojik oksijen ihtiyacı açısından zararlı etkileri ile karakterizedirler (Gergo vd., 2012: 148). Boyaların toksisitesinin etkileri, genetik mutasyonlar, doğum kusurları ve kalıtsal hastalıklar yoluyla daha ileri nesillere taşınabilir (Yagub vd., 2014: 172).

Boyalar üç ana sınıfa ayrılır; anyonik (direkt, asit ve reaktif boyalar), katyonik (tüm bazik boyalar) ve iyonik olmayan (dispersiyon boyalar). En yaygın kullanılanlar arasında selüloz lifler için orta ila yüksek haslık sunan reaktif boyalardır. Dünyada senede ortalama 700.000 ton ve 10.000 farklı boya ve pigment üretilmektedir. Bu boyaların önemli bir kısmı atık su ile çevreye karıştırılmakta ve çevreyi kirletmektedir (Deveci vd., 2004: 25).

Bu boyaların çevre üzerinde olumsuz etkileri hakkında birçok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir. Örneğin, reaktif boyalar organizmaların birçoğu için toksik etki yapmaktadır ve esas olarak güneş ışığını bloke etmeleri ve dolayısıyla canlılar için son derece önemli olan fotosentezi ve çözünmüş oksijen konsantrasyonunu azaltmaları nedeniyle ekosistemler için büyük bir tehdit oluşturur (Moussavi ve Mahmoudi, 2009: 807- Mahony vd., 2002: 457). Ayrıca, birçok boya veya metabolitin insanlar ve diğer yaşam formları üzerinde kanserojen, teratojenik ve mutajenik etkileri vardır (Sun vd., 2007:648- Ozer vd., 2005: 120).

Bu nedenle atık su bertaraf edilmeden önce boyaların uzaklaştırılması son derece önemlidir. Atık sudan boyaları uzaklaştırmak için fotokimyasal oksidasyon, membran filtrasyonu, ozon işleme, aktif karbon adsorpsiyonu, ters ozmoz ve koagülasyon gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bununla birlikte, özellikle parlak renkli, suda çözünür reaktif ve asit boyaların çıkarılmasında etkisizdirler (Yang vd., 1998: 27).

1.2.1. Selüloz Elyaf Boyaları

Selüloz, tekrarlayan glikoz birimlerinden oluşur. Selüloz tekstiller için en yaygın kullanılan boya reaktif boyalardır. Diğer boya türleri, fiziksel ve mekanik yöntemlerle kıl, lifler arası protein ve epidermisin giderilmesidir. Deri, önce lifli olmayan proteinleri uzaklaştırmak için sindirim enzimleriyle işlenir ve ardından pH'ı düşürmek için sülfürik aside batırılır. Daha sonra çeşitli tabaklama yöntemleri kullanılarak tabaklama işlemine tabi tutulur: mineral / krom tabaklama, bitkisel tabaklama ve yağlı tabaklama. Son olarak, deri boyama ve terbiye işlemlerinden geçer (Dooley, 2008: 60).

1.2.2. Reaktif Boyalar

Reaktif boyalar bazen fiber reaktif boyalar olarak adlandırılır. Selülozik lifler için en önemli boyama sınıfıdır ve ayrıca yün ve ipek gibi protein liflerini boyamak için kullanılırlar. Reaktif boyalar, fiber molekülü ile kovalent bağlar oluşturabilir ve kullanılan en etkili ve kalıcı boyalar olarak kabul edilir. Farklı sıcaklıklar altında herhangi bir selüloz lifi üzerinde iyi çalıştıkları bulunmuştur (Lorimer vd., 2001: 1957).

Reaktif boyalar iki tiptedir: homobifonksiyonel ve heterobifonksiyonel. Homobifonksiyonel reaktif boyalar iki monoklorotriazin grubu içerir ve heterobifonksiyonel reaktif boyalar bir monoklorotriazin ve bir vinil sülfon grubu içerir. Alkali koşullar altında boyanın yaklaşık %50-70'i tek reaktif grup içeren boyalar kullanılarak elyaf üzerine sabitlenir ve yaklaşık %80-95'i iki reaktif grup içeren boyalar kullanılarak elyaf üzerine sabitlenir. (Holme, 2000: 196).

Birleşmiş Milletler İstatistik Bölümü, reaktif boyalar ve bunlara dayalı müstahzarlar için toplam dünya ithalat ve ihracat pazarının 1988'de 125.000 tondan 2011'de 350.000 tona yükseldiğini bildirdi (23 yılda ~ 3 kat artış) (UNSD, 2013).

Hayvanlardan elde edilen tüm lifler (yün ve ipek gibi) protein lifleri olarak kabul edilir. Proteinler yirmi temel amino asitten oluşur. Tekrarlanan şeker birimlerinden yapılan selülozdan daha karmaşıktırlar. Bu nedenle yüksek pH denatüre proteinler ve asit boyalar yün, angora, kaşmir ve ipeği boyamak için kullanılır. Bu boyalar kumaşlara asit çözültileriyle birlikte uygulanır. Boya ve lif arasındaki kimyasal reaksiyon, lif üzerinde çözünmeyen bir boya molekülünün oluşmasına neden olur. En önemli üç asit boyası, azo boyaları, triarilmetan boyaları ve antrakinondur (Valko, 1957: 1).

Reaktif boyaların kromofor gruplarına göre ayrılan azo boyaları, tüm boya gruplarının %60-70'ini oluşturur ve diğer boya sınıflarına kıyasla parlak ve yüksek yoğunluklu renkler verdiği bulunmuştur (University of Bristol, 2012). Bir boyanın rengi, olasılıkla boyanın renginin yoğunluğunu belirleyen çeşitli moleküler orbitaller arasındaki elektronik geçişten kaynaklanmaktadır. Bu boyaların iki grup içerdiği bulunmuştur: kromofor ($N = N$, $C = C$, $C = O$) ve oksokrom ($-OH$, $-NH_2$, $-NR_2$) (Babu vd., 2007:142). Genel olarak pamuğun, yapısındaki hidroksilik grupların varlığından dolayı pikrik asit veya diğer anyonik veya katyonik boyalarla iyi bağlanmadığı görülmüştür. Bu nedenle, basit azo boyalarının pamuk boyamada o kadar etkili olmadığı bulunmuştur (Arya ve Kohli, 2009: 2).

Genel olarak azo boyaları, (a) bir aromatik veya heterosiklik çekirdeğe bağlı bir kromoforik azo grubuna ($-N=N-$) ve diğer ucunda (b) karbosiklik, heterosiklik veya alifatik tipte doymamış bir moleküle sahip olanlar olarak tanımlanabilir. Bu boyaların Renk İndeksi (CI) 10.000'den fazla olan en büyük boyalar sınıflandırması olduğu bulunmuştur, renklerin ton, parlaklık ve doygunluğa göre sistematik düzenlemesidir. Azo boyaları Tablo 1.1.'deki gibi gruplar halinde mono azo, di azo, tri azo, ve tetra azo olarak sınıflandırılır (Davis vd., 2008).

Merkezine bağlı azo gruplarının sayısına göre. Bir mono azo boyası bir $N=N$ bağına sahipken di ve tri azo grupları sırasıyla iki ve üç $N=N$ bağına sahiptir. Karışıklıkları önlemek için, üç veya daha fazla azo grubuna sahip boyalar genellikle poli azo boyalar olarak kabul edilir. Azo grupları genel olarak benzen ve naftalen halkalarına bağlıdır, ancak aromatik heterosikllere veya enolize edilebilir alifatik gruplara da eklenebilir. Bağlanan yan gruplar boyaya rengi verir. Bir boyanın renk indeksinin, eklenen azo gruplarının sayısına bağlı olarak değiştiği bulunmuştur (Robert vd., 2008: 360).

Reaktif azo boyaları, azo bağları ($N=N$) ile karakterize edilir ve selüloz liflerini boyamak için kullanılır. Azo boyalarının rengi, ilişkili kromoforlarla azo bağının varlığından kaynaklanmaktadır. Reaktif Red 195 (RR-195), tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılan sülfonatlı bir azo boyadır (Shyamala vd., 2014: 422). RR195 boyasının kimyasal görünümü Şekil 1.1'deki gibidir.

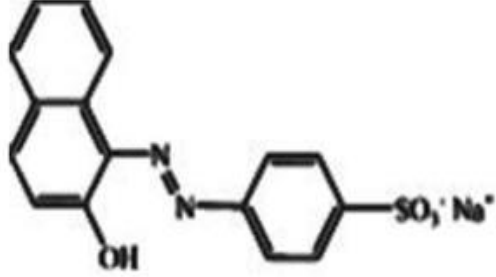
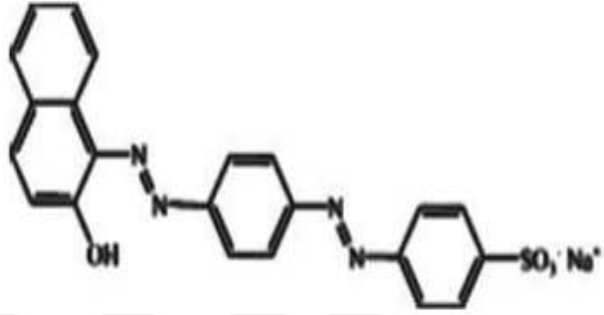
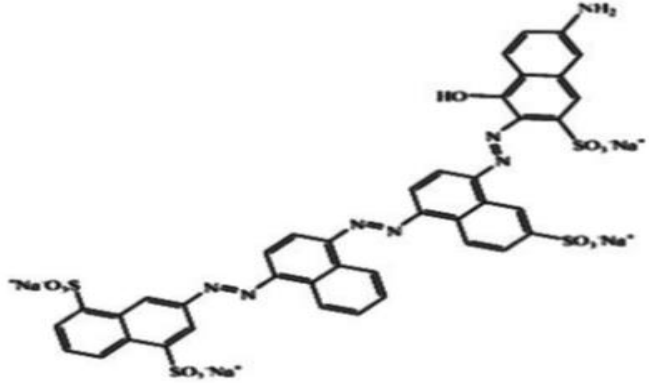
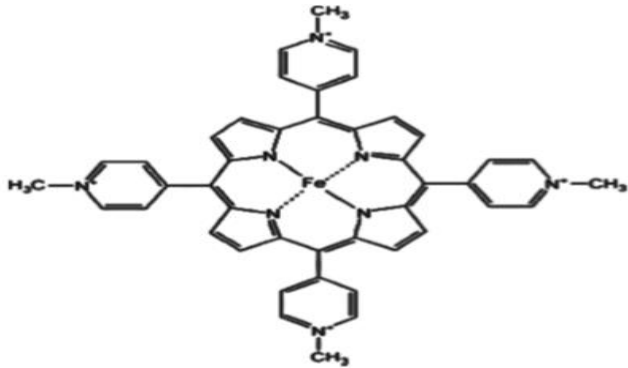
1.2.3. Sentetik Elyaf Boyaları

Sentetik lifler için yaygın olarak kullanılan boyalar, dağılmış boyalardır. Bu boyalar esas olarak polyester, naylon ve asetat baskılarında kullanılmaktadır. Bazı dispersiyon boyalar da endüstrilerde baskı mürekkebi olarak kullanılmaktadır. Dispersiyon boyalar, enerjilerine göre üç türe ayrılır. E tipi düşük enerjilidir ve termosol boyamada kullanılır. S tipi yüksek enerjilidir ve yüksek sıcaklık/yüksek basınç boyamada kullanılır. Diğer SE tipi, tüm boyama yöntemleri için uygundur (Etter vd., 2011: 853).

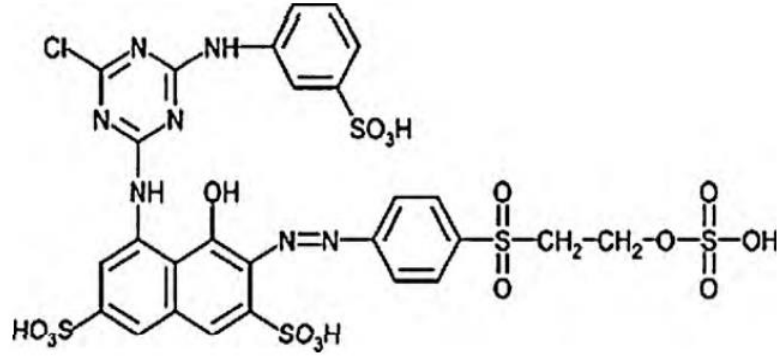
Bu boyalar, düşük suda çözünürlük özelliğine sahip koloidal bir durumda bulunur ve boyanacak elyafın kalınlığına bağlı olan gerekli sıcaklıkta bir boya banyosu koşulunda uygulanır (Burkinshaw, 1995).

Protein liflerini boyamak için yaygın olarak kullanılan doğrudan boyalar, naylon ve suni ipek gibi sentetik lifleri boyamak için de kullanılabilir. Bu boyalar, elektrolitler ve iyonik tuzlar içeren sulu bir banyo altında uygulanır. Direkt boyalar, kumaşlara uygulandıktan sonra çabuk kuruma özelliğinden yoksundur (Burch, 2020).

Tablo 1.1. Azo boyalarının sınıflandırılması

Sınıflandırmalar	Yapısı
Mono azo	
Diazo	
Triazo	
Tetrakis	

Kaynak: (Kirk ve Othmer, 2007)



Şekil 1.1. Reaktif Red 195 (RR-195) kimyasal yapısı

Kaynak: (Aksakal ve Uçun 2010: 667).

1.3. Tekstil Endüstrisinde Atıklar ve Su Kullanımı

Tekstil endüstrisi, çevreye yönelik en büyük tehditlerden biri olarak kabul ediliyor. Tekstil endüstrisinde gerçekleştirilen çeşitli işlemler büyük miktarlarda gaz, sıvı ve katı atık üretir. Tekstil endüstrisi, tüm üretim aşamaları için çeşitli kimyasallar ve büyük miktarda su kullanır. 1 kg tekstil üretmek için yaklaşık 200 L su kullanılır. Su esas olarak şunlar için kullanılır: (a) kimyasalın tekstile uygulanması ve (b) üretilen tekstillerin durulanması (Ntuli vd., 2009: 1). Bununla birlikte, gereken tam su miktarı, boyama işlemine ve üretilen kumaşların türüne bağlı olarak sanayiden sanayiye değişiklik göstermektedir. Islak işlemler genellikle çok fazla kimyasal ve su kullanır. 1 kg kumaş üretmek için yaklaşık 80-150 m³ su kullanılmaktadır. Günde yaklaşık 12-20 ton tekstil işlendikten sonra yaklaşık 1.000-3.000 m³ atık suyun yeniden üretildiği tahmin edilmektedir (Atif, 2002).

Tekstil boyama işleminde her zaman su ile birlikte yıkanan sabitlenmemiş boyanın bir kısmı vardır. Tekstil atık suyunun, bu fikse edilmemiş boyaların konsantrasyonunda yüksek olduğu tespit edilmiştir. Katı atıkların çoğu kuru işlemde kaynaklanırken, ıslak işlem yalnızca az miktarda katı atık verir. Katı atıkların çoğu kumaş parçaları ve ambalaj malzemelerinden oluşmaktadır. Tekstil üretiminden kaynaklanan kurumuş çamur da önemli bir katı atık kaynağıdır. Katı atıklar genel olarak tehlikeli bulunmaz. Bununla birlikte, boşaltılan kimyasal kaplar eser miktarda zararlı madde içerebilir (Fletcher, 2008: 98).

Tekstil endüstrilerinde gerçekleştirilen işlemlerin çoğu gaz emisyonları üretir. Kazanlar, fırınlar ve depolama tankları tekstil endüstrisindeki en önemli üç hava kirliliği kaynağıdır. Kazanlar kükürt oksitler ve nitrojen üretir. Yüksek sıcaklıkta tekstil kurutma işlemi hidrokarbonlar yayar. Kirleticiler ayrıca ısı çöktürme işlemi sırasında lif hazırlama

kalıntılarından da yayılır. Boyama işlemi sırasında kimyasallardan da gazlar çıkabilir (Georgiou vd., 2003: 2248).

1.3.1. Tekstil Atıklarının Çevresel Etkileri

Tekstil atıklarının özellikleri, üretilen tekstil türüne ve kullanılan kimyasallara göre değişir ve bağlıdır. Tekstil atık suyu, askıya alınmış ve çözünmüş katılar, biyolojik oksijen ihtiyacı (BOD), kimyasal oksijen ihtiyacı (COD), kimyasallar, koku ve renk dahil olmak üzere çevreye ve insan sağlığına zarar veren yüksek miktarda etken içerir. BOD/COD oranlarının çoğu, biyolojik olarak parçalanamayan maddelerin varlığını gösteren 1:4 civarında bulunmuştur (Arya ve Kohli, 2009: 2). Tekstil atığının tipik özellikleri Tablo 1.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 1.2. Tipik arıtılmamış tekstil atık suyunun özellikleri.

Parametre	Aralık
pH	6-10
Sıcaklık (° C)	35-45
Toplam çözünmüş katı madde (mg / L)	8,000-12,000
BOD (mg/L)	80-6,000
COD (mg/L)	150-12,000
Toplam askıda katı madde (mg / L)	15-8,000
Toplam Çözünmüş Katılar (mg / L)	2,900-3,100
Klor (mg / L)	1,000-6,000
Serbest klor (mg / L)	<10
Sodyum (mg / L)	
Eser elementler (mg / L)	
Fe	<10
Zn	<10
Cu	<10
As	<10
Ni	<10
B	<10
F	<10
Mn	<10
V	<10
Hg	<10
PO4	<10
Cn	<10
Yağ ve gres (mg / L)	10-30
TNK (mg/L)	10-30
NO3-N (mg/L)	<5
Serbest amonyak (mg / L)	<10
SO4 (mg/L)	600-1000
Silika (mg / L)	<15
Toplam Kjeldahl Azotu (mg / L)	70-80
Renk (Pt-Co)	50-2,500

Kaynak: (Eswaramoorthi vd., 2008)

Tekstil atık suları çevreye zarar verebilecek Cr, As, Cu ve Zn gibi eser metaller içerir (Eswaramoorthi vd., 2008). Sudaki boyalar kötü bir renk verir ve kanama, cilt ülseri, mide

bulantısı, şiddetli cilt tahrişi ve dermatit gibi hastalıklara neden olabilir (Nese vd., 2007: 97). Güneş ışığının su yüzeyinden girmesini engelleyerek fotosentezi önleyebilirler (Laxman, 2009).

Boyalar aynı zamanda alıcı suyun biyokimyasal oksijen ihtiyacını da arttırır ve dolayısıyla yeniden oksijenizasyon sürecini azaltır ve dolayısıyla foto-ototrofik organizmaların büyümesini engeller (Nese vd., 2007: 97). Atık sulardaki askıda katı madde konsantrasyonları, yağlı pislikle birleştikleri ve hava-su arayüzündeki oksijen transfer mekanizmasına müdahale ettikleri için çevreyi etkilemede önemli bir rol oynarlar (Laxman, 2009).

Tekstil atık sularındaki inorganik maddeler, fazla çözünebilir tuz konsantrasyonu nedeniyle suyu kullanıma uygun hale getirmez. Bu maddelerin daha düşük miktarlarda bile su yaşamı için toksik olduğu bulunmuştur. Hidroklorik asit, sodyum hipoklorit, sodyum hidroksit, sodyum sülfür ve reaktif boyalar gibi bazı inorganik kimyasallar deniz yaşamı için zehirlidir. Organik bileşenlerin, sudan oksijenin uzaklaştırılmasıyla sonuçlanan kimyasal ve biyolojik değişikliklere uğradığı bulunmuştur (Tholoana, 2007: 50). Su kirliliğinin ciddiyeti, ıslak işlemde kullanılan su ve kimyasalların miktarına bağlıdır (Laxman, 2009).

Bir boyahanedeki boya konsantrasyonu, boyanın tipine ve gerçekleştirilen işleme bağlı olarak 0.01 g/L ila 0.25 g / L arasında değişir (Reife ve Freeman, 1996: 295). Tekne boyaları 0,05-0,1 g/L (Reife ve Freeman, 1996: 295) aralığında bir konsantrasyonda kullanılırken, indigo boyalar 0,02 g/L konsantrasyonda kullanılmaktadır (Wamburguh ve Chianelli, 2008: 2189).

Tekstil boyarmaddelerinin, bozunması zor olan ve aerobik bozunmaya dirençli büyük miktarda organik madde içerdiği bulunmuştur. Ayrıca anaerobik koşullar altında kanserojen ajanlara indirgendığı bulunmuştur (Jain vd., 2003: 243).

İnsanların tekstil boyalarına maruz kalması, akciğer ve cilt tahrişlerine, baş ağrılarına, konjenital malformasyonlara ve mide bulantısına neden olmuştur (Mathur vd.,2005). Tekstil boyalarına uzun süre maruz kaldıktan sonra işçilerde böbrek, karaciğer ve idrar kesesi kanserlerinin oluştuğu kanıtlanmıştır (Lima vd., 2007). Reaktif boyalara uzun süre maruz kaldıktan sonra işçiler tarafından dermatit, astım, nazal problemler ve rinitin edinildiği bulunmuştur (Nilsson vd., 1993).

1.4. Tekstil Atıksu Bertarafı Standartları

Dünya çapında birçok çevre koruma ajansı, insan sağlığının korunması ve çevrenin tekstil endüstrisinin neden olduğu kirlilikten korunmasıyla ilgili kurallar koymuştur. Bu

kuruluşlar, atık suların çevreye atılması konusunda belirli sınırlamalar getirmiştir. Bertaraf limitlerinin ülkeden ülkeye farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bununla birlikte, güvenli ve sağlıklı bir ortam sağlamak için ara sıra bu deşarj limitleri üzerinde sürekli bir kontrol tutulmalıdır (Yusuf, Sonibare, 2004: 213)

1.4.1. Tekstil Atıklarının Geleneksel Arıtımı

Tekstil endüstrilerinden boşaltılan atıklar, flokülasyon, pıhtılaşma ve ozonlama gibi çeşitli fiziko-kimyasal işlemlere ve nitrojen, organik, fosfor ve metalin uzaklaştırılması için biyolojik arıtmaya tabi tutulur (Adin ve Asano, 1998: 80). Fiziko-kimyasal arıtma işleminin dezavantajları şunlardır: (a) çamur oluşumu ve bertarafı ve (b) gerekli alan. Biyolojik arıtma işlemlerinin dezavantajları şunlardır: (a) atık suda mikroorganizmanın büyümesini etkileyen toksik ağır metallerin varlığı (b) kullanılan boyaların çoğu doğada biyolojik olarak parçalanmaz ve (c) bunun için gereken uzun süre atıkların arıtılması. Tekstil atıklarının arıtılması üç arıtma sürecini içerir: birincil, ikincil ve üçüncül işlemler. (Chipasa, 2001: 141).

1.5. Moleküler Markörler

Genellikle, moleküler markör, genomik seviyedeki farklılıkların temsilcisi olan belirli bir DNA segmenti olarak tanımlanır. Bu belirteçler, bir özelliğin fenotipik ifadesi ile ilişkili olabilir veya olmayabilir. Teknik, DNA'daki belirli bölgeler için popülasyondaki bireyler arasında varyasyon veya polimorfizmlerin tespit edilmesini sağlar (Williams, 1991: 6531).

Bu polimorfizmler, genetik haritalar oluşturmak ve bir popülasyondaki belirli özelliklerin ifadesinde, bu farklılıkların özelliğin genetik belirlenmesi açısından doğrudan bir etkisini gösterebilecek belirteçler arasındaki farklılıkları değerlendirmek için kullanılabilir (Bishop vd., 1995: 62).

Moleküler markörler, genetik haritalama, babalık testleri, kalıtsal hastalıklarla bağlantılı mutant genleri saptama, çeşitlerin tanımlanması, ürünlerin marker destekli yetiştirilmesi, popülasyon geçmişi, epidemiyoloji ve gıda güvenliği, popülasyon çalışmaları gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır.

Geleneksel bir yetiştirme programı, bütün genomların çaprazlanmasını ve ardından çeşitli segregasyon ürünleri arasından üstün rekombinantların seçilmesini içerir. Gerçekte, böyle bir prosedür zaman alıcı ve zahmetlidir, birkaç çaprazlama, birkaç nesil ve dikkatli fenotipik seçimi içerir ve bağlantı sürüklemesi (arzu edilmeyen lokusların istenen lokuslarla sıkı bağlantısı) istenen amaca ulaşmayı daha da zorlaştırabilir. Günümüzde birçok bitki yetiştiricisi, önemli bitkilerin istenen özelliklerini kanıtlamak ve tanımlamak için moleküler

belirteçler kullanmaktadır. Çeşitli bitki araştırmacıları, genetik polimorfizmi ve bağlantı haritaları yapısını incelemek için moleküler belirteçler kullanırlar (Schulmann, 2007: 317).

Morfolojik ve biyokimyasal belirteçlere kıyasla moleküler belirteçlerin birçok avantajı vardır. Örneğin, morfolojik belirteçleri moleküler belirteçlerle karşılaştırırken, bu tür belirteçlerin ifadesi hem baskın-resesif ilişki hem de epistatik-pleiotropik etkileşimden etkilenir. Bu tür belirteçlerin kullanımı, morfolojik özellikler kullanılarak germplazmalar arasındaki genetik varyasyonun incelenmesi emek ve zaman alıcı olduğu için eleştirilmiştir (Cooke 1984: 59-60).

DNA polimorfizmini tahmin etmek için çeşitli tipte moleküler markörler kullanılır. Temelde bu markörler; hibridizasyon tabanlı markörler ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı markörler olarak sınıflandırılır. (Saiki vd., 1988: 487).

Hibridizasyon tabanlı markör tekniklerine örnek olarak; RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism/Sınırlı Parça Uzunlukları Polimorfizmi), PCR tabanlı markör tekniklerine ise; SSR (Simple Sequence Repeat/Basit Tekrarlı Diziler veya Mikrosatelitler), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA/Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism/Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat/Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm) verilebilir (Botstein vd., 1980).

Bazı farklı moleküler markör türlerinin karşılaştırılması Tablo 1.3.'te verilmiştir. Teknik gereksinimlere göre bazı moleküler markörlerin sınıflandırması Tablo 1.4.'te verilmiştir.

Tablo 1.3. Bazı farklı moleküler markör türlerinin karşılaştırılması (Devam ediyor).

Türü	Avantajları	Dezavantajları	Teknikler
Hibridizasyona dayalı DNA markörleri	Hedefin sekans bilgisine ihtiyaç duymaz	Maliyetli ve Zaman Tüketen	RFLP
	Eş-baskın	İzotoplar kullanılır	
	Çevresel faktörlerden etkilenmez	Büyük miktarlarda yüksek moleküler ağırlıklı DNA gerektirir Otomatikleştirmek zor	
PCR'ye dayalı DNA markörleri	Düşük miktarlarda DNA gerekir	Pahalı Ekipman gerektirir	SSR

Tablo 1.3.'ün devamı

PCR'ye dayalı DNA markörleri	Hızlı ve kolay analiz	Sekans bilgisi gerektir	AFLP
PCR'ye dayalı DNA markörleri	Yüksek doğruluk, Primer tasarımı kolay, Zaman tasarrufu, Düşük miktarlarda DNA gerekir		RAPD
PCR'ye dayalı DNA markörleri	Yüksek doğruluk, Düşük miktarlarda DNA gerekir, Düşük bütçe, Zaman tasarrufu, Kolay analiz,		ISSR
PCR'ye dayalı DNA markörleri	Çevresel faktörlerden etkilenmez		SNP

Kaynak: (Mishra vd.,2019:96-97)**Tablo 1.4.** Teknik gereksinimlere göre bazı moleküler markörlerin sınıflandırması

Marker Türleri	Restriksiyon Enzimi	PCR	Spesifik Primer	Jel	DNA miktarı
RFLP	+	-	-	+	-
RAPD	-	+	-	+	Düşük
AFLP	+	+	-	+	Orta
İSSR	-	+	-	+	Düşük
Microsatellite	-	+	+	+	Düşük

Kaynak: (Mishra vd.,2019:98)**1.5.1. Hibridizasyona Tabanlı Moleküler Markörler**

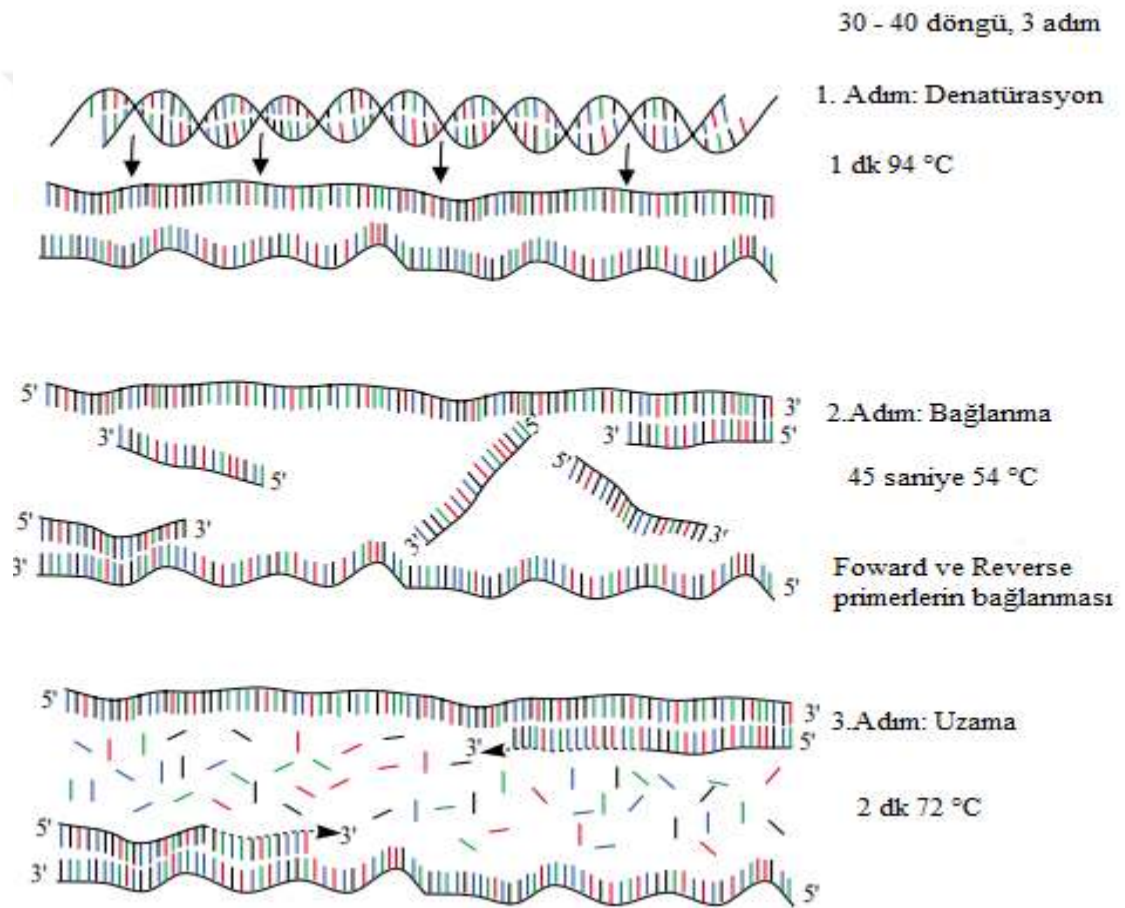
Hibridizasyon tabanlı markörlerde DNA profilleri, restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak DNA fragmanının elde edilmesi ve bilinen sekansın elde edilen DNA fragmanlarının spesifik olarak bağlanabilen bir proba hibridize edilmesiyle görselleştirilir (Saiki vd., 1988: 487).

1.5.2 PCR Tabanlı Moleküler Markörler

Spesifik DNA sentezi için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknolojisinin icadından bu yana, görünür basitliği ve yüksek başarı olasılığı nedeniyle PCR tekniğine dayalı moleküler

markörlerin üretimi için çok sayıda araştırma yapılmıştır (Mullis ve Faloona., 1987: 350). RAPD ve AFLP durumunda olduğu gibi rastgele primerler, bu moleküler belirteçlerin çeşitli gerekçelerde kullanımını kolaylaştıran PCR için daha önceki sekans bilgilerinin kısıtlamasının üstesinden gelmek için kullanılır (Nandani ve Thakur., 2014: 6).

PCR, amplifiye edilmek istenen gen dizisinin iki ucuna özgü primerler kullanılarak, bu bölge DNA'sının in-vitro olarak sentezlenmesi işlemidir. PCR reaksiyonunda kullanılan temel bileşenler kalıp DNA (template), primerler, nükleotidler (dNTP), DNA Polimeraz Enzimi, Tampon çözelti (Buffer) ve Magnezyumdan ($MgCl_2$ veya $MgSO_4$) oluşmaktadır. Temelde bir PCR reaksiyonu (Şekil 1.2)'de verilmiştir.



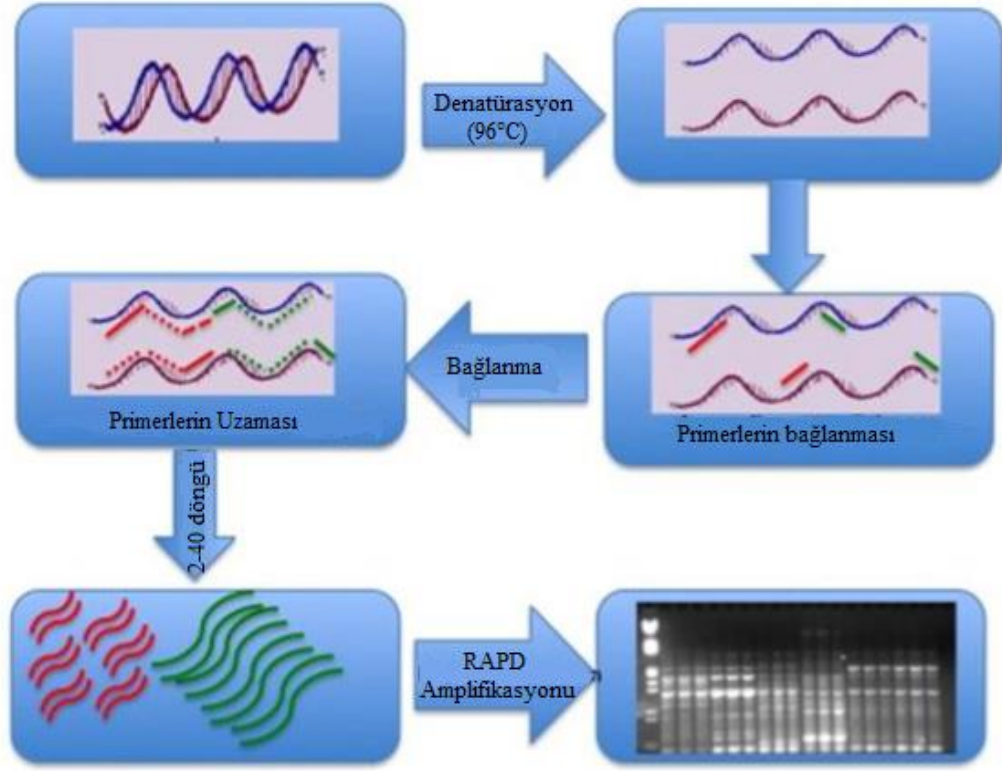
Şekil 1.2. PCR reaksiyonu

Kaynak: (Vierstraete, 1999)

RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA/Rastgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi)

RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA, Randomly Amplified Polimorphic DNAs) ilk kez 1990 yılında rastgele belirlenmiş primerlerin kullanıldığı ve PCR baz alan bir yöntem olarak kullanılmaya başlanmıştır (Botstein vd., 1980). Yakın tarihlerde başka bir çalışma grubu tarafından çalışılmış ve AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) olarak adlandırılmıştır (Brooks vd., 2010). 1991 yılında ise bu yöntemle aynı çalışma prensibine dayanan ancak farklı olarak 10 nükleotitten daha kısa primerlerle daha karmaşık DNA parmakizi profili görüntülenen DAF (DNA Amplification Fingerprinting/ DNA Amplifikasyonu Parmak İzi) olarak adlandırılan diğer benzer bir yöntem yayınlanmıştır (Brown, Epifanio., 2003: 458).

RAPD tekniğinin temel çalışma prensibi, ilgili model organizmaya ait genomik DNA'da rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotid primerin, düşük bağlanma sıcaklıklarında rastgele bir biçimde bağlanarak PCR ile amplifiye edilmesidir. Yöntemin ileriki aşamasında amplifikasyon ürünü jel elektroforezinde yürütülür ve amplifiye ürünleri bantlar elde edilerek görüntülenir. Elde edilen bu bantlar, varlığı veya yokluğuyla analiz edilebilmektedir (Brooks vd., 2010). RAPD tekniğinin çalışma prensibi (Şekil 1.3)'de verilmiştir.



Şekil 1.3. RAPD tekniğinin çalışma prensibi

Kaynak: (Vierstraete, 1999: 107)

Diğer bazı markör yöntemleriyle karşılaştırıldığında RAPD yönteminin en büyük avantajı çalışılan model organizmanın gen dizileriyle ilgili bir ön bilgi gerektirmemesidir. PCR amplifikasyonunda çalışılan bütün organizmalar için aynı oligonükleotid primer dizisi kullanılabilir (Brooks vd., 2010). Bir primerle, birbirinden farklı organizmaların genomik DNA'ları farklı olduğu için bağlanan RAPD markörleride farklı olacaktır (Litt ve Luty., 1989: 397). Bu farklılık model organizmaların ayrılmasında ve karşılaştırılmasında fayda sağlamaktadır. Bununla beraber, çokça zaman gerektiren radyoaktiviteye, Southern transferlere veya DNA hibridizasyonuna ihtiyaç duyulmadan jel görüntüsü elde edilerek analiz edilebilmektedir. RAPD markörlerinin sayısı sınırsızdır. Kullanılan oligonükleotid primerlerin sayısı arttırıldıkça elde edilen bant sayısı da artacaktır. Bu nedenle birbirine benzer organizmaların karşılaştırılmasında izozimden daha etkilidir (Chakraborty, 1981: 461). Bazı araştırmacılar kodominant data gerektirmeyen sistematik çalışmalarda RAPD markörlerin güçlü bir biçimde tercih edildiğini söylemektedir (Chow vd., 1993: 620).

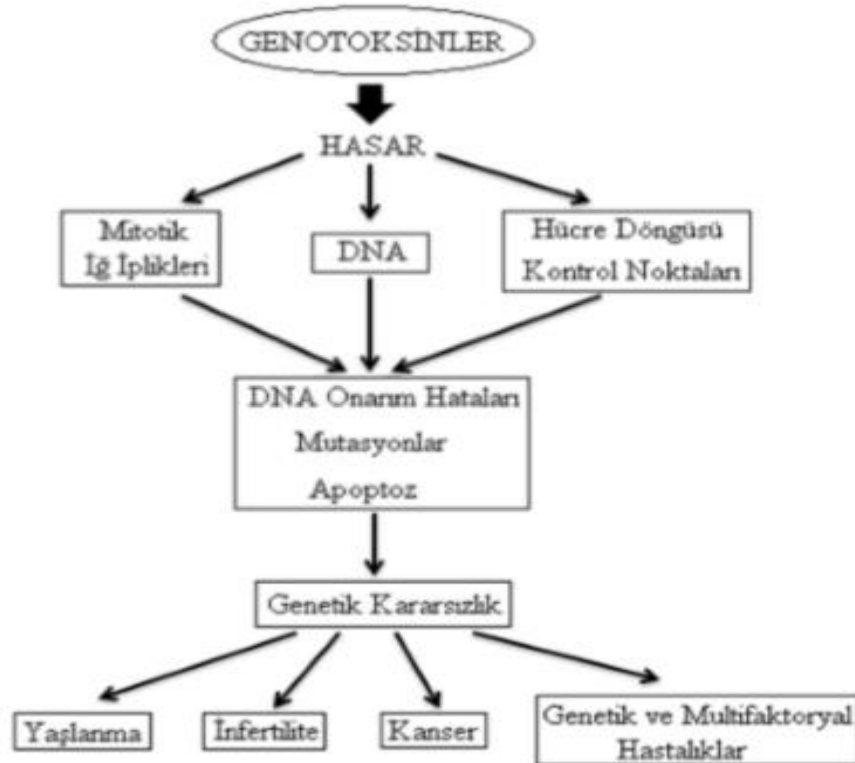
RAPD yönteminin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. RAPD yöntemi çalışma açısından kolay olmasına rağmen, markörleri dominanttır ve heterozigotları tanılamak oldukça güçtür (Chakraborty, 1981: 461). Elde edilen data'nın tekrarlanabilirliği, çok fazla değişkene

1.6 Genotoksisite

Genotoksisite yani genetik toksikoloji, toksikolojinin bir alt dalıdır. Genotoksisite organizmaların biyolojik işleyişleri sırasında fiziksel, kimyasal ya da biyolojik etmenlerin sebep olduğu DNA üzerindeki değişimlerin incelendiği bilim dalıdır (Vural, 2005: 115).

Genotoksisite; hücre çekirdeği, kromozomlar ve DNA üzerinde oluşan DNA eklentileri, DNA kırıkları, genlerin yapısında meydana gelen mutasyonlar, kromozom anormallikleri, klastojenite ve anöploid gibi hasarların tamamını içerisine alan genel bir bilim dalıdır. DNA veya genomun kopyasının oluşmasını sağlayan enzimlerle etkileşebilen ve mutasyona sebebiyet veren genotoksik maddelerin DNA’da hasara sebep olması veya DNA yapısında değişimlere yol açması ise genotoksik etki olarak isimlendirilmektedir (Mortelmans ve Rupa, 2004: 379).

DNA üzerinde değişimlere sebep olan mutajenler, bu etkiyi doğrudan, ya da protein yapılarına bağlanarak dolaylı yollarla gösterirler. Mutajenlerin DNA üzerinde sebep olduğu bu hasarlar doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoryal hastalıklara sebep olmaktadır (Kirsch vd., 2003: 63). Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları Şekil 1.5.’te verilmiştir.



Şekil 1.5. Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları

Kaynak: (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011: 222)

Genotoksisite ve karsinojenite ilişkisi hakkında birçok çalışma yapılmış ve organizmalar için karsinojen etkiye sahip çok sayıda bileşiğin genotoksik etkisi olduğu tespit edilmiştir. Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri ile karsinojenik etkileri arasında şiddetli bir benzerliğin olduğunun belirlenmesi, genotoksisite testlerinin çeşitli endüstriler tarafından kimyasal maddelerin karsinojenik etkilerinin ortaya konulmasında tarama testleri olarak kullanılması gerekliliğini ortaya koymuştur (Althoff vd., 2007: 477)

Yaygın olarak kullanılan bazı genotoksisite testleri arasında Ames testi ve Comet testi örnek olarak verilebilir. Sitotoksik testlere örnek olarak mitoz indeksi testi verilebilir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011: 223).

1.6.1. Mitotik İndeks (MI)

Mitoz indeksi organizmaların tamamı için toksik etkinin araştırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Toksik etkiye sahip maddeler genellikle mikrotübül oluşumunu inhibe ederek anormal mitoz oluşumuna neden olurlar. Araştırmacıların birçoğu oluşan anormal hücre yapılarını; C-mitoz, multipolar anafaz ve yapışkanlıklar gibi iğ ipliği formasyonunun inhibisyonu ile ilişkilendirmektedir (Chandra vd., 2005: 46).

Toksik etkiye sahip tekstil boyaları iğ iplikleri formasyonunun inhibisyonuna neden olmaktadır ve bunun sonucunda C-mitoz meydana gelmektedir. Bu sebeplere bağlı olarak poliploidi ve anöploidi oluşmaktadır. İğ ipliklerinin tamamen parçalanması sonucu multipolaranafaz meydana gelirken, iğ ipliği oluşumunun kısmen engellenmesi sonucu kalgın kromozomlar ve bu sebebin meydana getirdiği mikronukleuslar oluşmaktadır. Mikronukleuslar, normal iğ ipliğinin işlevini gerçekleştirememesiyle oluşan asentrik kromozom fragmentlerinin bir ürünüdür (Chandra vd., 2005: 46).

Mikronukleusların, genotoksik ajanların *in vivo* ve *in vitro* potansiyellerini belirlemede önemli bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Mikronukleusların sonraki mitotik bölünmelerde anöploid ve poliploid hücrelere yol açtığını ve böylece mutasyonlara sebep olduğunu bildirmişlerdir (Chauhan vd., 1989: 26).

1.6.2. Genotoksikoloji Çalışmalarında *Allium cepa*'nın önemi

Mısır soğanı, soğan, arpacık soğanı gibi pek çok geleneksel isimle bilinen *Allium cepa*, Alliaceae familyasına aittir. 2n=16 kromozom sayına sahiptir.

A. cepa, genotoksikoloji çalışmaları için kullanımının birçok avantajı vardır, duyarlıdır, manipüle edilmesi kolaydır, hızlı yanıt biyoanalizördür, ucuzdur ve bu tür çalışmalar için memeli hücrelerini kullanan modellerle iyi bir korelasyondur (Moyeni, 2013: 241).

Temin edilmesi kolay bir bitki türü olan *A. cepa* ucuz ve kolay yetiştirilebilirliğiyle genetik toksisite çalışmalarında çokça tercih edilmektedir. *A. cepa*'nın taksonomik sınıflandırılması Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 1.5. *Allium cepa*'nın taksonomisi

Taksonomi Derecesi	Taksonomik Adları
Sınıf	Monocotyledons
Superorder	Liliiflorae
Order	Asparagales
Familya	Alliaceae
Tribe	Alliae
Cins	<i>Allium</i>
Tür	<i>Allium cepa</i>

Kaynak: UniProt (2020)

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal

2.1.1 Bitkisel Materyal

Bu çalışmada model organizma olarak ticari soğan, *Allium cepa* kullanılmıştır.



Şekil 2.1. 12 günlük *A. cepa*

2.2. Metod

2.2.1. *A. cepa* Örneklerinin Ekimi

Allium cepa örneklerinin ekimleri yapıp 12. günde kök uzunlukları 3-6 cm uzunluğuna geldiğinde örnekler toplanmıştır. Ekimi yapılan *A. cepa* örnekleri Şekil 2.3, Şekil 2.4. ve Şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.2. Ekimi yapılan *A. cepa* örnekleri (0.Gün)



Şekil 2.3. Ekimi yapılan *A. cepa* örnekleri (12.gün)



Şekil 2.4. Allium cepa (12.gün)

2.2.2. *A. cepa* Köklerinin Reaktif Red 195 Muamelesi

Reaktif Red 195 tekstil boyasından Tablo 2.1’de gösterilen konsantrasyonlar için 50ml stok hazırlandı. DNA izolasyonu ve mitotik indeks çalışmaları için 1 kontrol grubu ve 3’erli gruplar halinde toplam 19 adet 50cc’lik falkon tüpü hazırlandı ve numaralandırıldı.

Hazırlanan stoktan önceden hazırlanan ve numaralandırılan 50cc’lik falconlara Tablo 2.1.’deki konsantrasyonlar sırasıyla dağıtıldı ve 50 ml’ ye saf su ile tamamlandı. *A. cepa* köklerine muamele edilen RR195 boya konsantrasyonları, muamele saatleri ve tüplerin numaralandırılmaları Tablo 2.2.’da verilmiştir.

Tablo 2.1. Kullanılan RR195 konsantrasyonları

RR195 Konsantrasyonları	RR195 Stoğundan Aktarılan Miktar
5 mg/L (5 ppm)	250 µl
10 mg/L (10 ppm)	500 µl
50 mg/L (50 ppm)	2.5 ml
75 mg/L (75 ppm)	3.75 ml
100 mg/L (100 ppm)	5 ml
150 mg/L (150 ppm)	7.5 ml

Tablo 2.2. *A. cepa* köklerine muamele edilen RR195 boya konsantrasyonları, muamele saatleri ve tüplerin numaralandırılmaları

<u>Reaktif red 195 konsantrasyonu</u> 5 ppm	<u>Reaktif red 195 konsantrasyonu</u> 10 ppm
<u>Reaktif red 195 muamele süreleri (Örnek numarası/saat)</u> (A1/24) (A2/48) (A3/72)	<u>Reaktif red 195 muamele süreleri (Örnek numarası/saat)</u> (B1/24) (B2/48) (B3/72)
<u>Reaktif red 195 konsantrasyonu</u> 50 ppm	<u>Reaktif red 195 konsantrasyonu</u> 75 ppm
<u>Reaktif red 195 muamele süreleri (Örnek numarası/saat)</u> (C1/24) (C2/48) (C3/72)	<u>Reaktif red 195 muamele süreleri (Örnek numarası/saat)</u> (D1/24) (D2/48) (D3/72)
<u>Reaktif red 195 konsantrasyonu</u> 100 ppm	<u>Reaktif red 195 konsantrasyonu</u> 150 ppm
<u>Reaktif red 195 muamele süreleri (Örnek numarası/saat)</u> (E1/24) (E2/48) (E3/72)	<u>Reaktif red 195 muamele süreleri (Örnek numarası/saat)</u> (F1/24) (F2/48) (F3/72)

Örnekler kökleriyle birlikte nazikçe topraktan çıkarılıp RR195 konsantrasyonları dağıtılan falkon tüplere konuldu ve tüplerin alt kısımlarına ışık gelmeyecek şekilde alüminyum ile sarılıp 24/48/72 saatlik muameleye bırakıldı. 24/48/72 saat RR195 tekstil boyasının muamele edildiği *A. cepa* örneklerinin görüntüsü Şekil 2.6’da verilmiştir.



Şekil 2.5. 24/48/72 saat RR195 tekstil boyasının muamele edildiği *A. cepa* örnekleri

Mitotik indeks için Etil Alkol/Glasiyel asetik asit (3/1) oranında fiksatif hazırlandı.

Mitotik indeks için her örneğe eppendorf tüp hazırlandı ve üzerlerine hazırlanan fiksatiften 1'er ml konuldu.

Muamele edilen *A. cepa* kökleri sırasıyla nazikçe çıkarılıp kök uçlarından yaklaşık 0,5 cm kesilip mitotik indeks için hazırlanan eppendorf tüplere konuldu. Gövde kısmı ise DNA

izolasyonu için alüminyum folyalara sarıldı. Örnekler bir sonraki çalışmaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

2.2.3. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu EURx DNA Purification Kit ile protokolüne uygun yapılmıştır.

- ❖ Ekstraksiyon sonunda saf elde edilecek kalıp DNA örnekleri için eppendorfler hazırlanıp numaralandırıldı.
- ❖ Çalışmadan önce su banyosu 65 °C’ye ayarlandı.
- ❖ Çalışma kolonlarını aktive etmek için 40 µl Buffer P konuldu.
- ❖ *A. cepa* gövdeleri -20 °C’den çıkarılıp azotla öğütüldü.
- ❖ Azotla öğütülen her bir örnek için eppendorf tüpler hazırlanıp numaralandırıldı. Azotla öğütülen kök örnekleri pipet ucuyla dikkatlice alınıp hazırlanan eppendorflere sırasıyla konuldu.
- ❖ Kolonlar hazırlanıp her bir örnek için numaralandırıldı.
- ❖ Azotla öğütülen her bir örneğe 400 µl Lyse P konulup lizis aşaması yapıldı.
- ❖ Üzerlerine sırasıyla 2,5µl RNase ve 7µl proteinaz K eklendi.
- ❖ Örnekler su banyosuna konulup 65 °C’de 30 dk bekletildi. Bu aşamada 5 dk’da bir örnekler alt üst edildi.
- ❖ Her bir örneğe 130 µl Buffer AC eklendi ve yavaşça alt üst edilip örnekler buzda 5 dk bekletildi.
- ❖ 2 ml’lik eppendorf içerisindeki lizati 10 dk 15000 g’de santrifüj edildi.
- ❖ Her örneğin 400 µl süpernatant’ı yeni bir tüpe aktarıldı.
- ❖ Buffer Sol P’den her bir örneğe 350 µl eklendi.
- ❖ %96’lık etanolden her bir örneğe 250 µl eklendi ve tüpler birkaç kez alt üst edildi ve örnekler 1 dk 14000 g’de santrifüjlendi.
- ❖ Süpernatantların 600 µl’si önceden hazırlanan spin kolonlarına konuldu ve 1 dk 14000 g’de santrifüjlendi.
- ❖ Spin kolonları alınıp toplama tüplerindeki sıvı boşaltıldı ve kolonlar tekrardan tüplere yerleştirildi.
- ❖ Spin kolonuna her bir örnek için 500 µl Buffer Wash PX eklendi ve 1 dk 14000 g’de santrifüjlendi.
- ❖ Spin kolonu alınıp toplama tüplerindeki sıvı boşaltıldı ve spin kolonları tekrar yerleştirildi.

- ❖ Spin kolonuna her bir örnek için 500 µl Buffer Wash PX eklendi ve 2 dk 14000 g'de santrifüjlendi.
- ❖ Spin kolonu alınıp çalışmanın başında hazırlanan kalıp DNA'ların bulunacağı tüplere konuldu. Üzerlerine her bir örnek için 150 µl Elution Buffer kolonların tam ortasından eklendi ve örnekler oda ısısında 3 dk inkübe edildi.
- ❖ Örnekler 1 dk 14000 g'de santrifüjlendi ve spin kolonları atılıp toplama tüpünde kalan DNA ileriki çalışmalar için 2-8 °C'de saklandı.

Bu çalışmada, 1 kontrol ve 18 RR195 ile muamele edilmiş *A. cepa* köklerinden toplamda 19 örnek izole edilmiştir ve izole edilen DNA örneklerinden 5 µl alınarak %0,8'lik 80 ml agaroz jelde 90 volt'ta 35 dk. yürütülmüş ve ileriki uygulamalar için DNA varlığı kontrol edilmiştir.

2.2.4. Spektrofotometre ile DNA Konsantrasyonu, Saflık ve Kalite Tayini

İzolasyonu tamamlanan genomik DNA materyallerinin PCR aşaması için kullanımına geçmeden önce saflık derecelerinin ve kalite miktarlarının ölçülmesi gerekmektedir.

Genomik DNA materyallerinin Nanodrop Spektrofotometre cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarında okuması yapılmış, nanogram veya mikrogram cinsinden saflık ve miktarları tespit edilmiştir. Bu ölçümlerde izolatların DNA peletleri, DNA izolasyonu sırasında Elution Buffer ile çözdürüldüğü için kör olarak Elution Buffer kullanılmıştır. Ölçümlerde 260 ve 280 nm dalga boyundaki 1.8'den büyük ölçüm sonuçları PCR aşaması için uygun görülmüştür. Spektrofotometre'de okunan değerler ile DNA miktarı= OD260 x dilüsyon katsayısı x 50µl/ml formülü kullanılarak DNA miktarı saptanmıştır.

2.2.5. ISSR-PCR ve RAPD-PCR İçin Kalıp DNA Hazırlığı

Genomik DNA'lardan %2'lik çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. DNA miktarı µl'de 2 ng DNA olacak şekilde genomik DNA'lar steril distile su ile seyreltilmiştir.

2.2.6. ISSR-PCR Analizleri

Bu çalışmada 5 adet ISSR primeri kullanılarak, herbir primer için örneklerin tamamına PCR yapılmıştır.

2.2.7. ISSR-PCR Hazırlığı ve Koşulları

Kullanılan ISSR primerlerinin Genomik DNA'ya PCR sırasında uygun koşullarda bağlanabilmesi için bağlanma sıcaklıkları $(A+T \text{ baz sayıları}) \times 2 \text{ }^{\circ}\text{C} + (G+C \text{ baz sayıları}) \times 4 \text{ }^{\circ}\text{C} = T_A \text{ }^{\circ}\text{C}$ formülü ile hesaplanmıştır.

ISSR primeri, Sentromer (İstanbul, Türkiye) firmasından temin edilmiş ve bu çalışmada kullanılmıştır (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan ISSR primer bilgileri.

Primer Kodu	Primer Dizisi	T _A °C	Sonuç
ISSR-01	AGAGAGAGAGAGAGAGG	52,8	+
ISSR-02	GAGAGAGAGAGAGAGAT	48,4	-
ISSR-03	GTGTGTGTGTGTGTGTC	50,8	-
ISSR-04	ACACACACACACACACC	50,8	-
ISSR-06	GAGAGAGAGAGAGAGAC	50,8	-
ISSR-07	GACAGACAGACAGACA	47,2	+
ISSR-09	GGATGGATGGATGGAT	47,2	-
ISSR-309	GAGAGAGAGAGAGAGAA	47,2	+
ISSR-310	AGAGAGAGAGAGAGAGG	47,2	+
ISSR-312	ACACACACACACACAC	47,2	-

ISSR-PCR reaksiyonları her örnek için 25µl'lık hacimde yapılmıştır. Reaksiyon içeriği Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Kullanılan ISSR-PCR bileşenleri ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
H ₂ O	14.8µl
10X Taq Buffer	2.5µl (1x)
25mM MgCl ₂	1.5µl (2.5µM)
2.5mM dNTP	2µl (2.5µM)
2.5mM Primer	2µl (2.5µM)
Kalıp DNA	2µl(4ng)
Taq Polimeraz	0.2µl
Toplam	25µl

ISSR-PCR reaksiyonları için 96-Well Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. PCR reaksiyonunun koşulları Çizelge 2.3.'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. ISSR-PCR reaksiyon protokolü.

Aşamalar	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	1	95	4 dk.
Denatürasyon		94	45 sn.
Bağlanma	45	47.2-52.8	45 sn.
Uzama		72	90 sn.
Final Uzaması		72	7 dk.

2.2.8. Agaroz jel elektroforezi ile ISSR-PCR ürünlerinin yürütülmesi

Elde edilen ISSR-PCR ürünleri yatay jel elektroforezi (Thermo, Midicell Promo) ile %1,2'lik agaroz jel'de yürütülmüştür.

Agaroz jeller 5X TBE stok tamponunun seyreltilmesi ile elde edilen 0.5X TBE tamponu ile hazırlanmıştır. Erlen içersinde 0.5X TBE tampon ve %1,2'lik agaroz kaynatıldı. Jel katılaşmadan önce 10X'lik 7 µl etidyum bromid ilave edilerek karıştırıldı ve jel tablasına nazıkçe döküldü. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi için her jelde ilk kuyucuklara 100 bç'lik DNA ladder yüklenmiştir Şekil 2.7. PCR ürünleri her bir kuyucuğa 9 µl örnek 1 µl yükleme tamponu olmak üzere 10 µl yüklenmiş ve 90 V'ta 70 dk. yürütülmüştür.

2.2.9. RAPD-PCR Analizleri

Bu çalışmada 5 adet RAPD primeri kullanılarak, herbir primer çifti için örneklerin tamamına PCR yapılmıştır.

2.2.10. RAPD-PCR Hazırlığı ve Koşulları

Kullanılan RAPD primerlerinin Genomik DNA'ya PCR sırasında uygun koşullarda bağlanabilmesi için bağlanma sıcaklıkları $(A+T \text{ baz sayıları}) \times 2 \text{ }^{\circ}\text{C} + (G+C \text{ baz sayıları}) \times 4 \text{ }^{\circ}\text{C} = \text{TA } ^{\circ}\text{C}$ formülle hesaplanmıştır.

RAPD primeri, Sentromer (İstanbul, Türkiye) firmasından temin edilmiş ve bu çalışmada kullanılmıştır (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan RAPD primer bilgileri.

Primer Kodu	Primer Dizisi	T _A °C	Sonuç
RAPD-P5	CTGCGACGGT	32	+
RAPD-P11	GGCCGATGAT	32	+
RAPD-P13	ACCGGCTTGT	32	-
RAPD-P14	CAGCACTGAC	32	+
RAPD-P16	TGGTGGCCTT	32	+
RAPD-P17	GTAGCACTCC	32	-

RAPD-PCR reaksiyonları her örnek için 25 µl'lik hacimde yapılmıştır. Reaksiyon içeriği Çizelge 2.5.'te verilmiştir.

Çizelge 2.5. Kullanılan RAPD-PCR bileşenleri ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
H ₂ O	12.3µl
10x Taq Buffer	2.5µl (1x)
25mM MgCl ₂	1.5µl (2.5µM)
2.5mM dNTP	2µl (2.5µM)
2.5mM Primer	2µl (2.5µM)
Kalıp DNA	4µl (4ng)
Taq Polimeraz	0.2µl
Toplam	25µl

RAPD-PCR reaksiyonları için 96-Well Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. PCR reaksiyonunun koşulları Çizelge 2.6.'te verilmiştir.

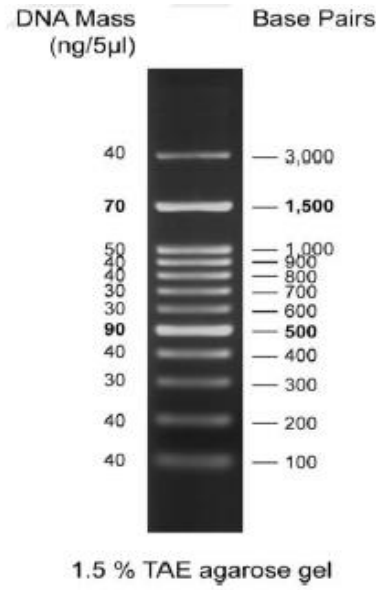
Çizelge 2.6. RAPD-PCR reaksiyon protokolü.

Aşamalar	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	1	95	4 dk.
Denatürasyon		94	45 sn.
Bağlanma	45	32	45 sn.
Uzama		72	90 sn.
Final Uzaması		72	7 dk.

2.2.11. Agaroz jel elektroforezi ile RAPD-PCR ürünlerinin yürütülmesi

Elde edilen RAPD-PCR ürünleri yatay jel elektroforezi (Thermo, Midicell Promo) ile %1,2'lik agaroz jel'de yürütülmüştür.

Agaroz jeller 5X TBE stok tamponunun seyreltilmesi ile elde edilen 0.5X TBE tamponu ile hazırlanmıştır. Erlen içersinde 0.5X TBE tampon ve %1,2'lik agaroz kaynatıldı. Jel katılaşmadan önce 10X'lik 7 µl etidyum bromid ilave edilerek karıştırıldı ve jel tablasına nazıkçe döküldü. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi için her jelde ilk kuyucuklara 100 bç'lik DNA ladder yüklenmiştir Şekil 2.8. PCR ürünleri her bir kuyucuğa 9 µl örnek 1 µl yükleme tamponu olmak üzere 10 µl yüklenmiş ve 90 V'ta 70 dk. yürütülmüştür.



Şekil 2.6. 100bp plus DNA ladder marker

2.2.12. Mitotik İndeks

Mitotik indeks analizi için farklı boya dozlarına maruz bırakılan kök ucu örneklerinde bölünen ve bölünmeyen hücrelerden her bir örnek için 500 hücre sayılmıştır. Hücre sayımları 10X'lik ve 40X'lik objektiflerde yapılmıştır. Mitotik indeksin belirlenmesi için; Mitotik indeks (%) = (Bölünen hücre sayısı / Toplam hücre sayısı) x 100 (Kanev vd., 2017: 113) formülü kullanılmıştır.

- ❖ Mitotik indeks için fikse edilen kök ucu örnekleri hücre çekirdeklerinin boyanması amacıyla, ayrı ayrı lameller üzerinde 15 dk aseto-orcein boyasına ve 5 dk ısıya maruz bırakıldı ve ezme preparat hazırlandı.

2.2.13. İstatistiksel Analiz

Mitotik indeks verilerinin istatistiksel analizi için 5 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm ve 150 ppm dozlarına maruz bırakılan *A. cepa* kök ucu örnekleri, bu doz farklılıklarına göre gruplandırılmış ve bu grupların ortalama ve standart sapmaları elde edilmiştir. Ortalamalar arasındaki istatistiksel anlamlılık Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak Excel programında gerçekleştirilmiş ve istatistiksel olarak ($p < 0.05$) değeri anlamlı kabul edilmiştir (Basu vd., 2019).

3. BULGULAR

3.1. DNA İzolasyonu Sonucu Spektrofotometre ile DNA Konsantrasyonu, Saflık ve Kalite Tayini

Bu çalışmada DNA izolasyonu için EURx DNA Purification Kit'i kullanılmıştır. Elde edilen genomik DNA materyallerinin Nanodrop Spektrofotometre cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarında okuması yapılmış, nanogram veya mikrogram cinsinden saflık ve miktarları tespit edilmiştir. Elde edilen konsantrasyonlar Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *A. cepa* köklerinden elde edilen DNA miktarı ve saflıkları.

Örnekler	DNA miktarı (ng/ml)	DNA saflığı (Od260/280)
K	94,31	1,88
A1	91,92	1,81
A2	101,55	1,90
A3	86,63	1,85
B1	145,20	1,93
B2	87,32	1,92
B3	123,23	1,96
C1	125,27	1,82
C2	108,98	1,93
C3	95,19	1,92
D1	111,67	1,90
D2	91,56	1,89
D3	67,62	1,92
E1	52,59	2,01
E2	88,52	1,95
E3	47,00	2,07
F1	68,11	2,00
F2	27,40	2,07
F3	59,67	2,02

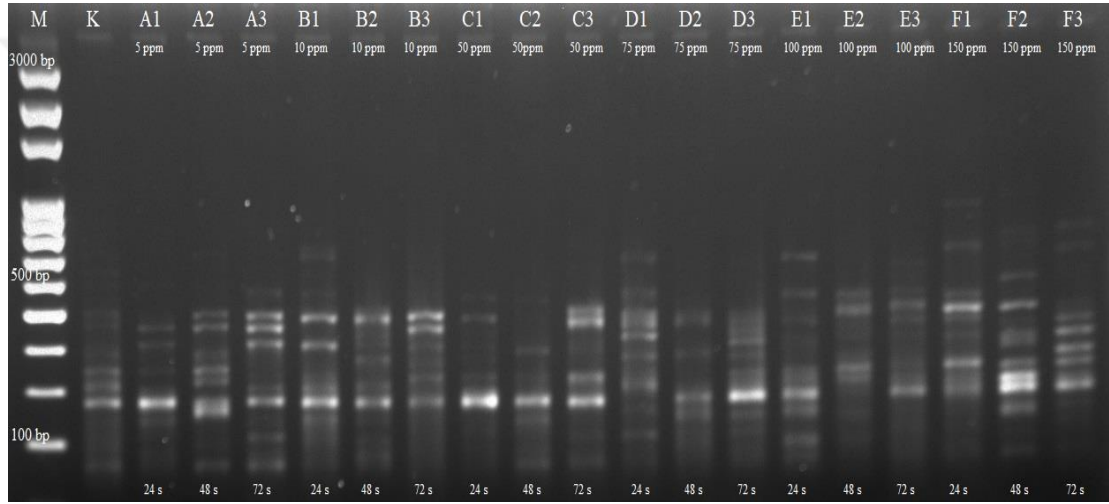
3.2. ISSR-PCR Sonuçları

Farklı dozlara maruz bırakılan *A. cepa* köklerinin genotoksik etkilerini görebilmek için yapılan ISSR-PCR çalışmalarının jel görüntüleri Şekil 3.1., Şekil 3.3., Şekil 3.5. ve Şekil 3.7.'de verilmiştir.

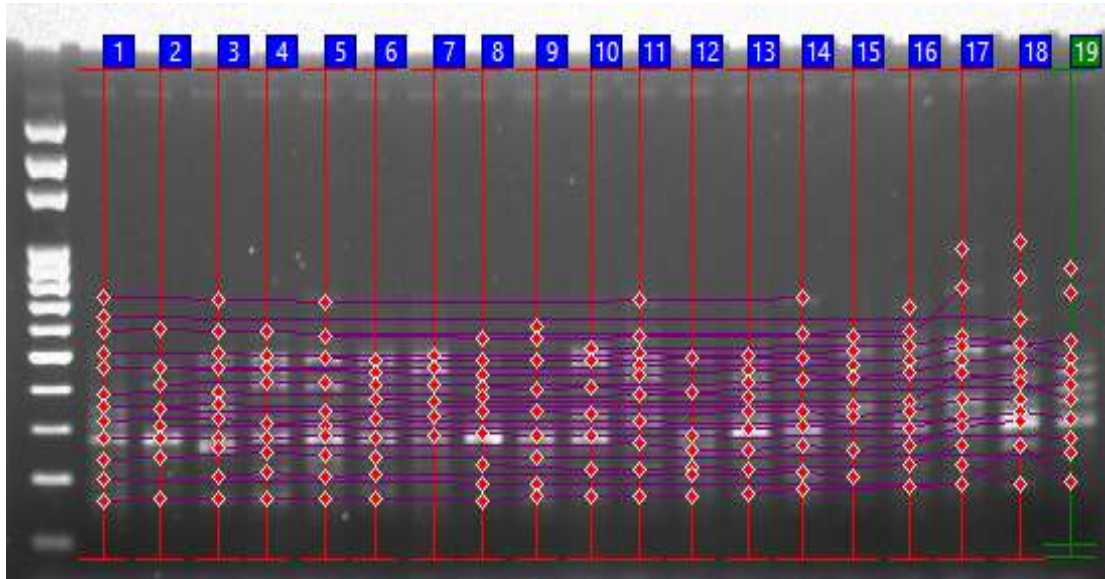
ISSR-PCR çalışmalarının bant profilleri, Şekil 3.2., Şekil 3.4., Şekil 3.6. ve Şekil 3.8.'de verilmiştir.

ISSR-PCR çalışmalarının bant profillerine bağlı olarak elde edilen dendogram, Şekil 3.9.'da verilmiştir.

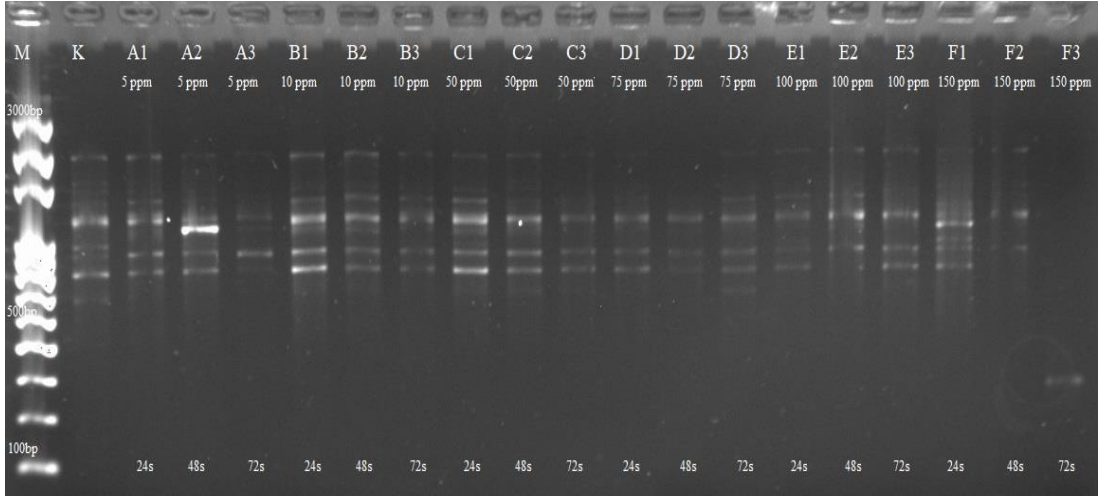
ISSR-PCR çalışmalarının Jaccard benzerlik matrix'i Şekil 3.10.'da verilmiştir.



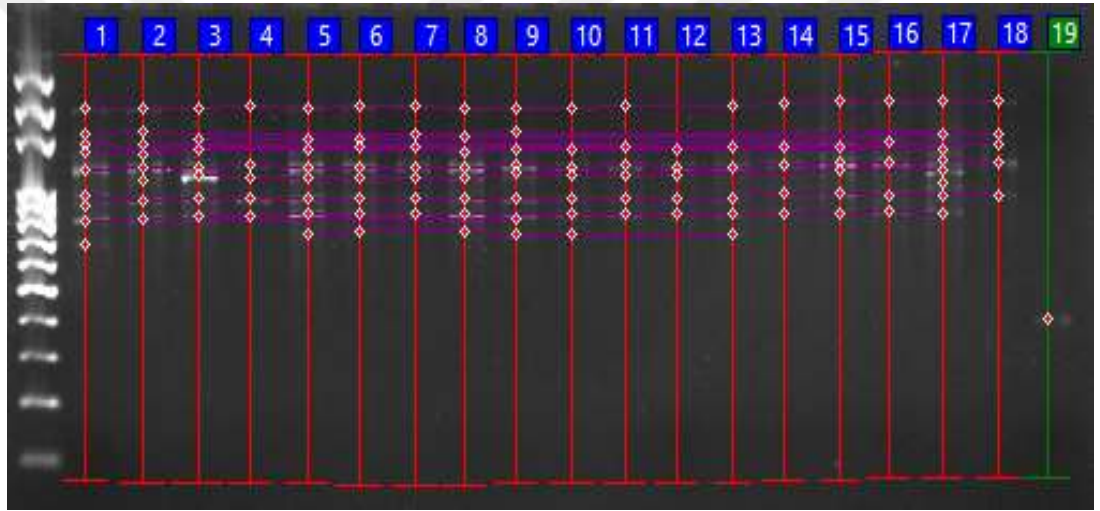
Şekil 3.1. ISSR-01 primerinin jel görüntüsü. M: Markör, K: Kontrol.



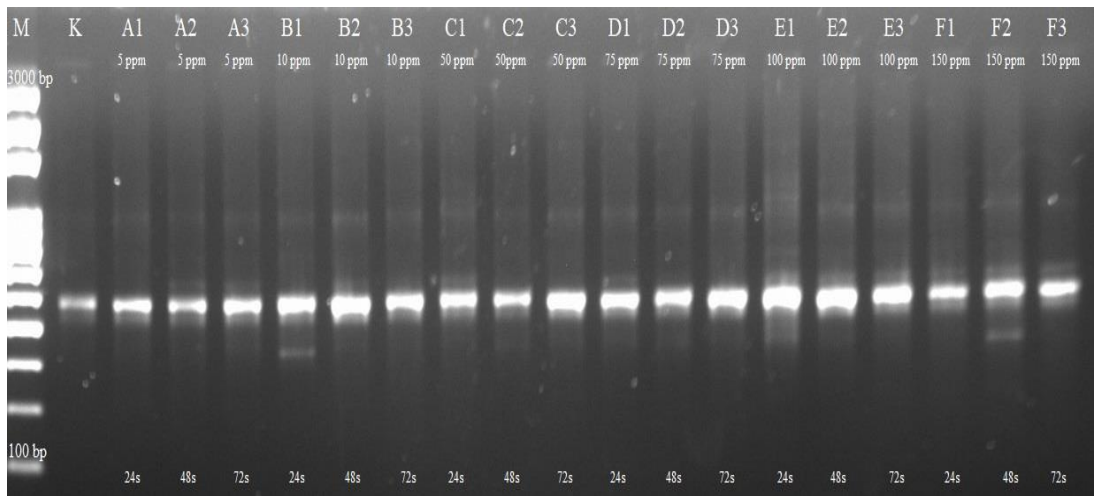
Şekil 3.2. ISSR-01 primerinden oluşan bant profilleri.



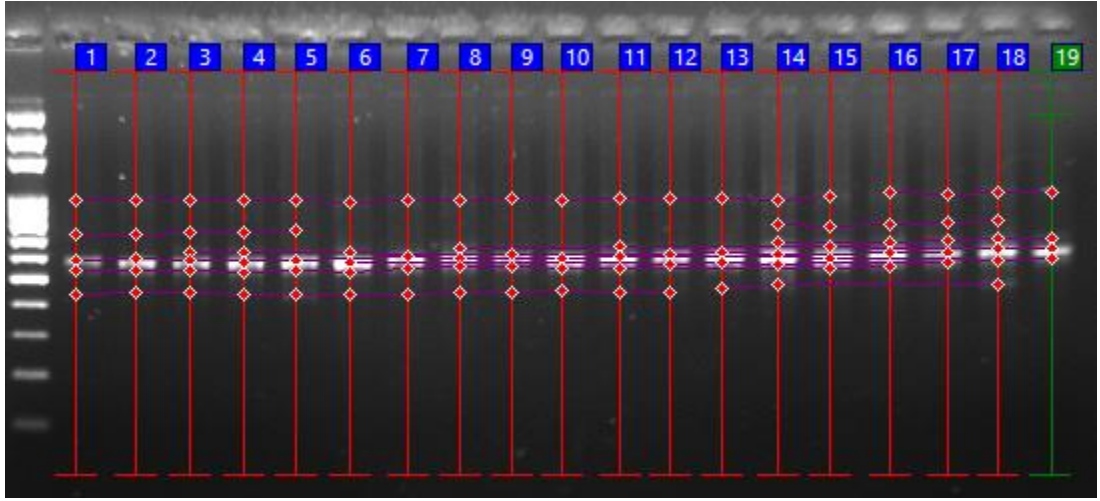
Şekil 3.3. ISSR-07 primerinin jel görüntüsü. M: Markör, K: Kontrol.



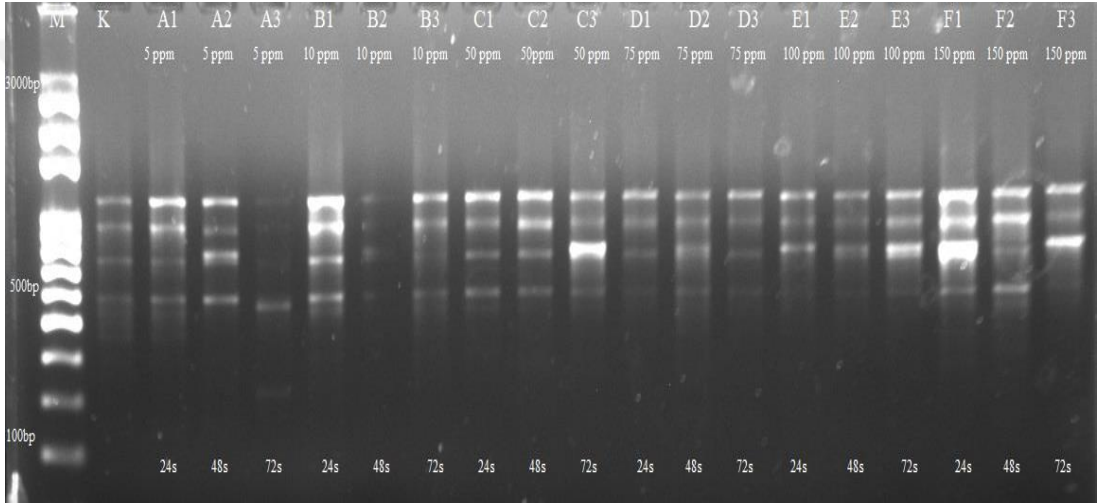
Şekil 3.4. ISSR-07 primerinden oluşan bant profilleri.



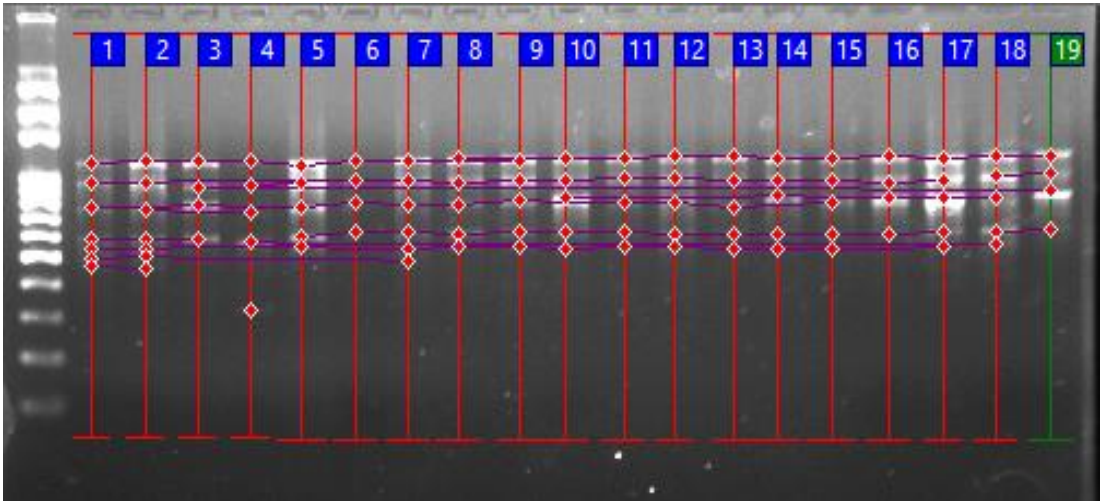
Şekil 3.5. ISSR-309 primerinin jel görüntüsü. M: Markör, K: Kontrol.



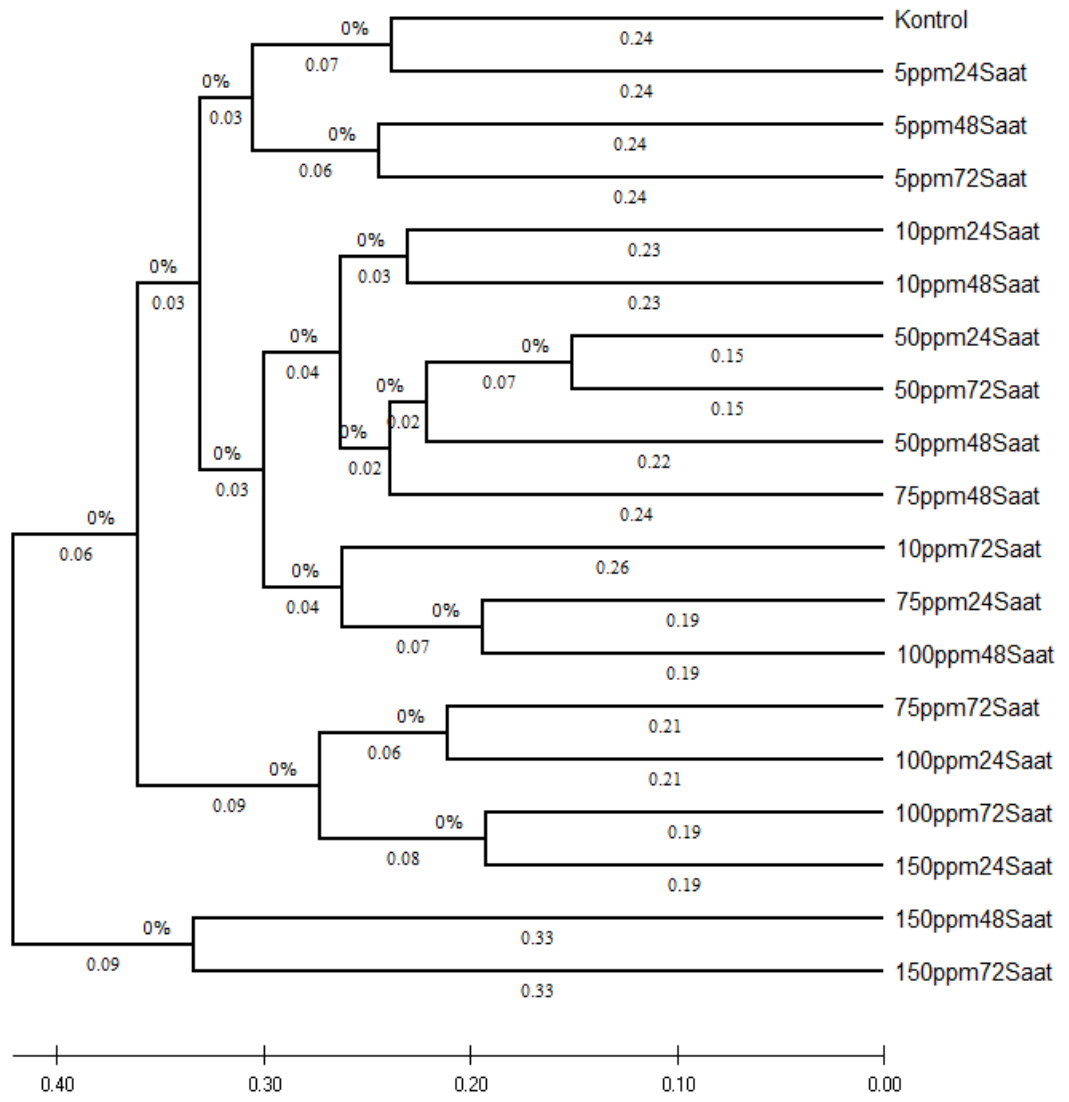
Şekil 3.6. ISSR-309 primerinden oluşan bant profilleri.



Şekil 3.7. ISSR-310 primerinin jel görüntüsü. M: Markör, K: Kontrol.



Şekil 3.8. ISSR-310 primerinden oluşan bant profilleri.



Şekil 3.9. ISSR-PCR primerinden oluşan dendrogram

Kontrol	5ppm24Saat	5ppm48Saat	5ppm72Saat	10ppm24Saat	10ppm48Saat	10ppm72Saat	50ppm24Saat	50ppm48Saat	50ppm72Saat	75ppm24Saat									
75ppm48Saat	75ppm72Saat	100ppm24Saat	100ppm48Saat	100ppm72Saat	150ppm24Saat	150ppm48Saat	150ppm72Saat												
Kontrol	1	0.525	0.525	0.349	0.356	0.311	0.436	0.326	0.405	0.273	0.405	0.227	0.213	0.184	0.267	0.115	0.105	0.173	0.104
5ppm24Saat	1	0.333	0.359	0.436	0.317	0.417	0.333	0.421	0.342	0.256	0.225	0.238	0.233	0.209	0.233	0.184	0.167	0.091	
5ppm48Saat		1	0.514	0.474	0.421	0.378	0.366	0.317	0.308	0.459	0.361	0.238	0.233	0.333	0.178	0.184	0.120	0.091	
5ppm72Saat			1	0.432	0.457	0.371	0.233	0.308	0.263	0.308	0.278	0.195	0.220	0.225	0.163	0.122	0.128	0.071	
10ppm24Saat				1	0.543	0.457	0.556	0.543	0.500	0.385	0.400	0.300	0.325	0.333	0.205	0.289	0.143	0.091	
10ppm48Saat					1	0.485	0.459	0.486	0.400	0.405	0.469	0.389	0.342	0.316	0.275	0.302	0.200	0.150	
10ppm72Saat						1	0.417	0.441	0.438	0.485	0.333	0.382	0.297	0.469	0.231	0.233	0.214	0.075	
50ppm24Saat							1	0.588	0.700	0.588	0.531	0.405	0.262	0.444	0.293	0.381	0.217	0.200	
50ppm48Saat								1	0.531	0.333	0.469	0.282	0.244	0.282	0.214	0.273	0.149	0.122	
50ppm72Saat									1	0.441	0.571	0.343	0.333	0.343	0.371	0.395	0.186	0.162	
75ppm24Saat										1	0.424	0.471	0.308	0.613	0.275	0.302	0.227	0.122	
75ppm48Saat											1	0.406	0.394	0.364	0.278	0.378	0.114	0.108	
75ppm72Saat												1	0.581	0.412	0.400	0.421	0.238	0.048	
100ppm24Saat													1	0.361	0.515	0.486	0.325	0.071	
100ppm48Saat														1	0.289	0.317	0.238	0.100	
100ppm72Saat															1	0.618	0.325	0.184	
150ppm24Saat																1	0.318	0.163	
150ppm48Saat																	1	0.333	
150ppm72Saat																		1	

Şekil 3.10. ISSR-PCR primerinden oluşan Jaccard benzerlik matrix'i.

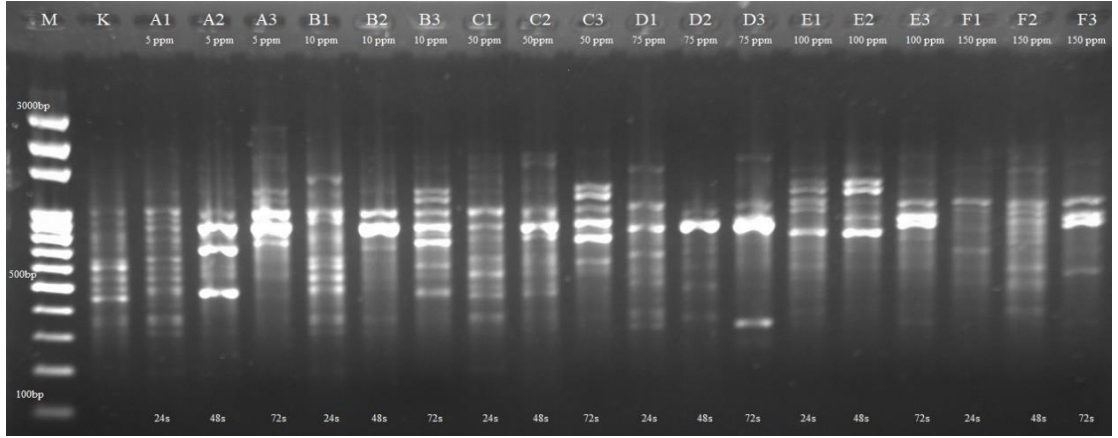
3.3. RAPD-PCR Sonuçları

Farklı dozlara maruz bırakılan *A. cepa* köklerinin genotoksik etkilerini görebilmek için yapılan RAPD-PCR çalışmalarının jel görüntüleri Şekil 3.11., Şekil 3.13., Şekil 3.15. ve Şekil 3.17.'da verilmiştir.

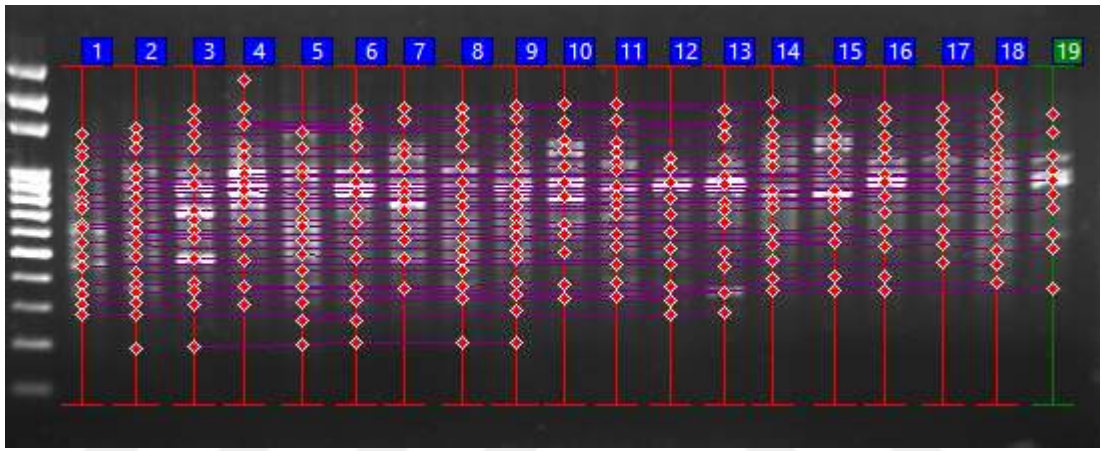
RAPD-PCR çalışmalarının bant profilleri, Şekil 3.12., Şekil 3.14., Şekil 3.16. ve Şekil 3.18.'de verilmiştir.

RAPD-PCR çalışmalarının bant profillerine bağlı olarak elde edilen dendogram, Şekil 3.19.'da verilmiştir.

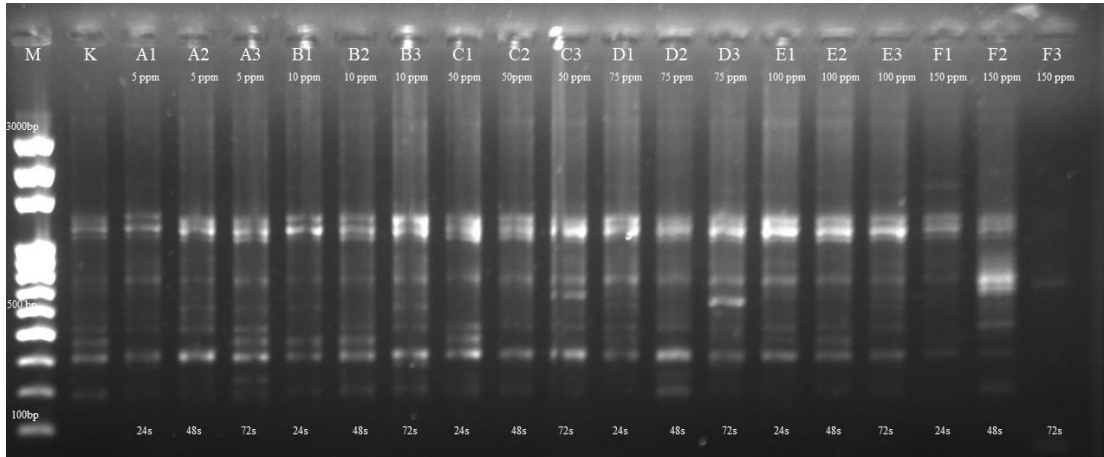
RAPD-PCR çalışmalarının jaccard benzerlik matrix'i Şekil 3.20.'de verilmiştir.



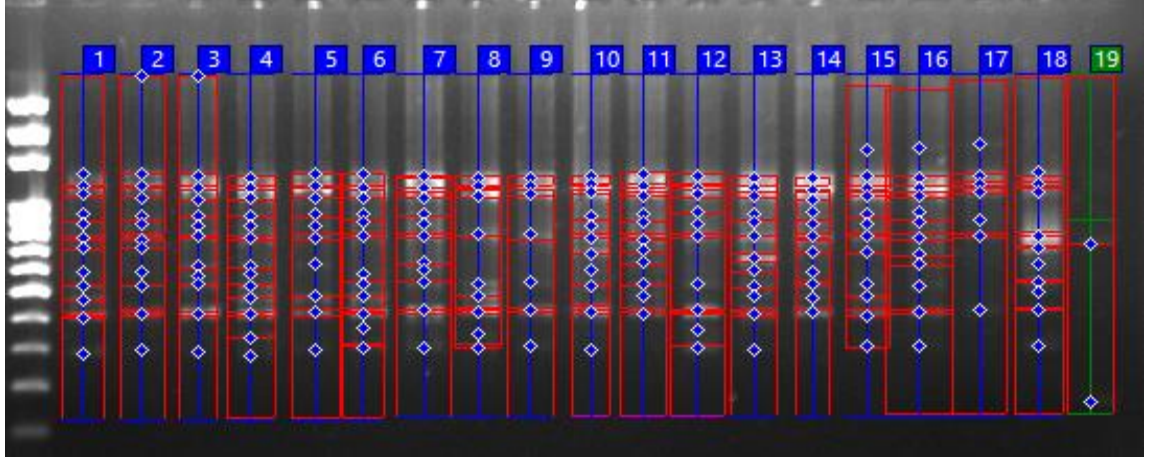
Şekil 3.11. RAPD-P5 primerinin jel görüntüsü. M: Markör, K: Kontrol.



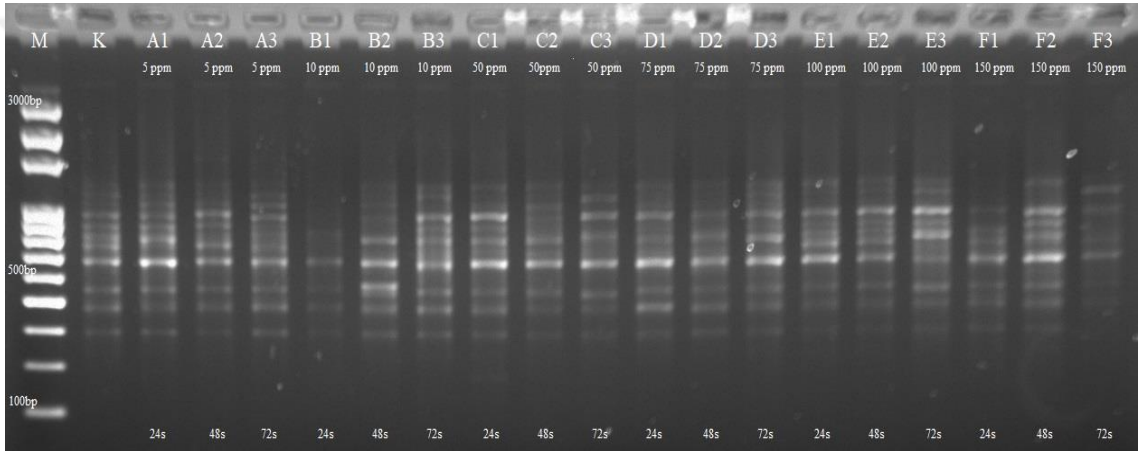
Şekil 3.12. RAPD-P5 primerinden oluşan bant profilleri.



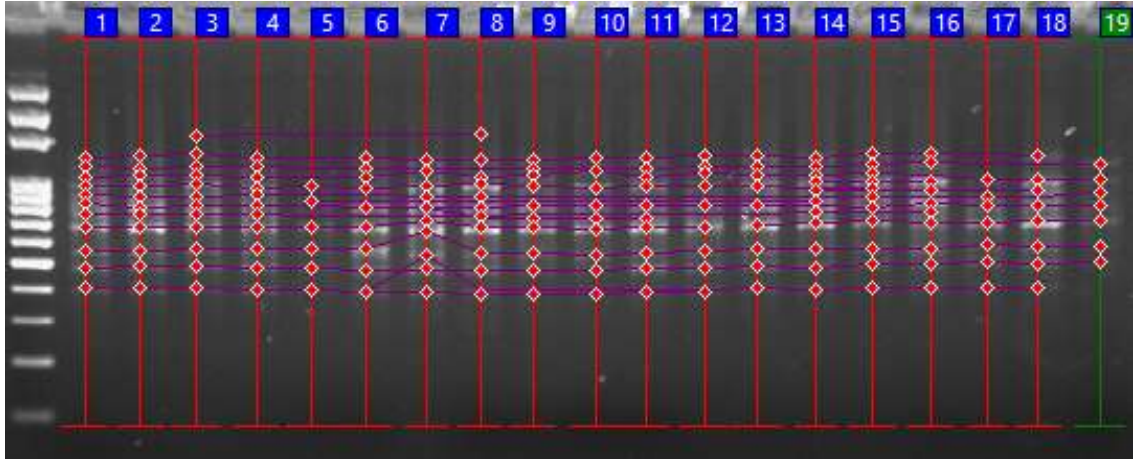
Şekil 3.13. RAPD-P11 primerinin jel görüntüsü. M: Markör, K: Kontrol.



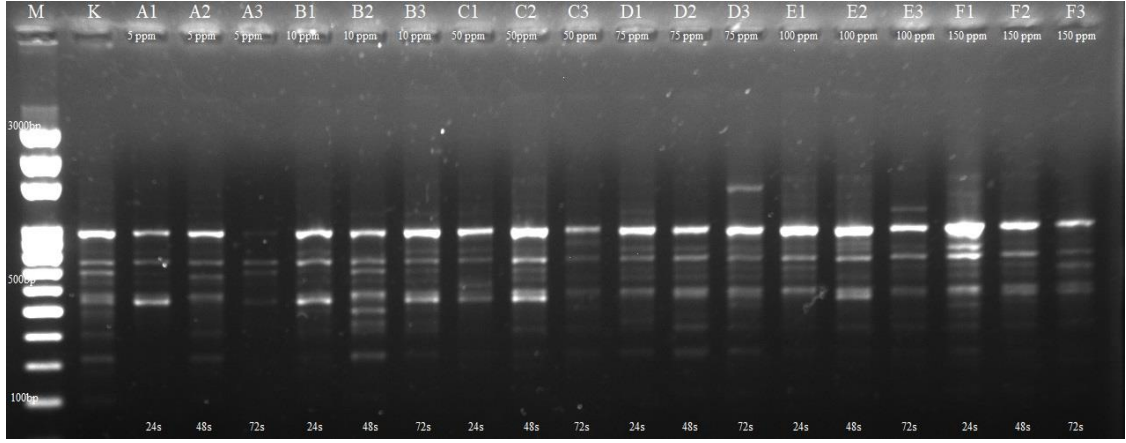
Şekil 3.14. RAPD-P11 primerinden oluşan bant profilleri.



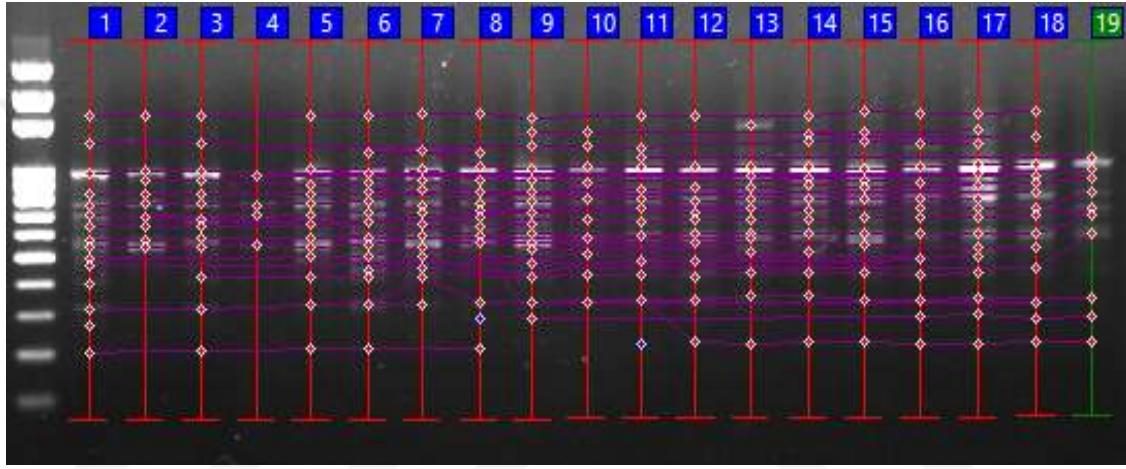
Şekil 3.15. RAPD-P14 primerinin jel görüntüsü. M: Markör, K: Kontrol.



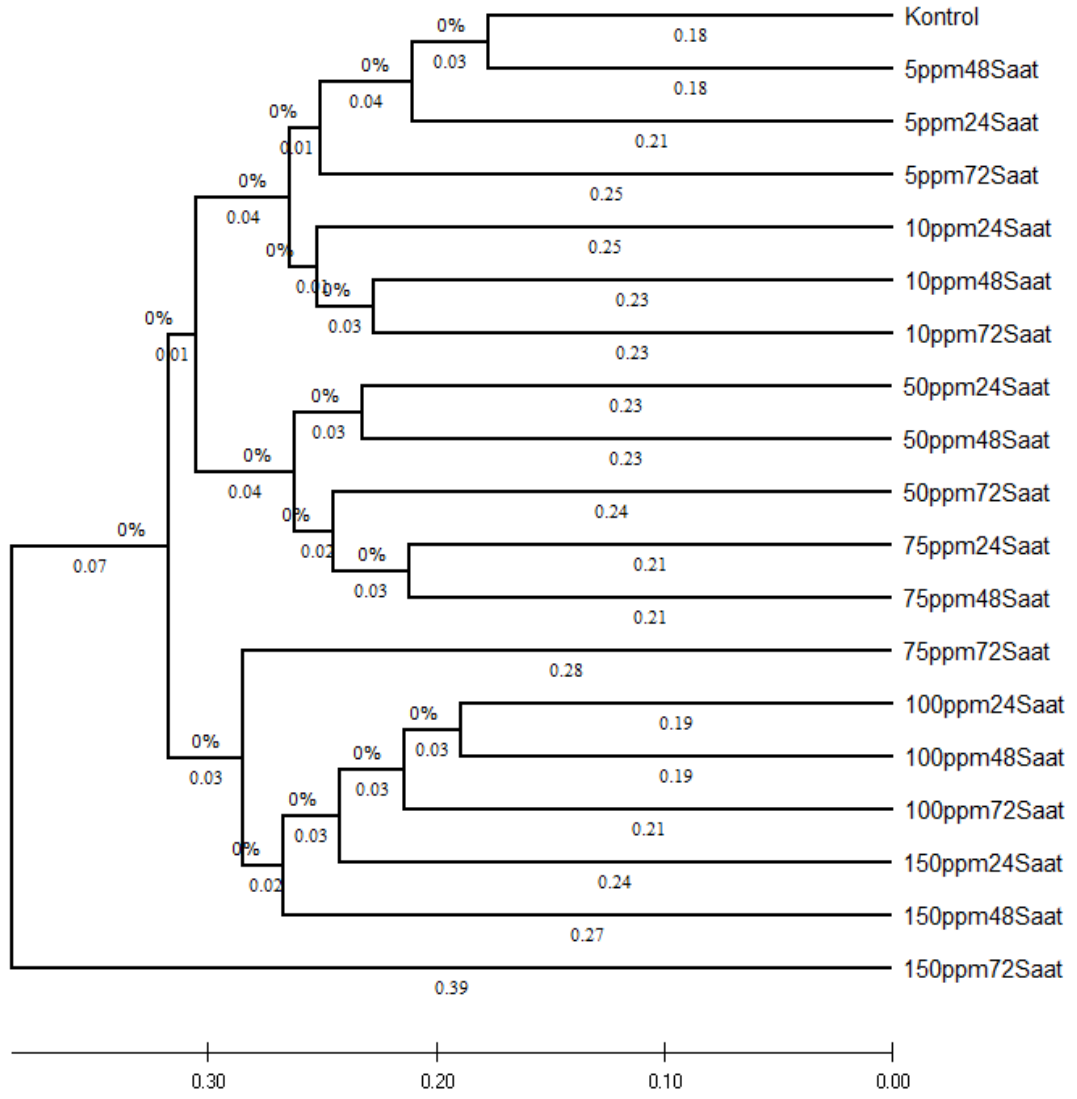
Şekil 3.16. RAPD-P14 primerinden oluşan bant profilleri.



Şekil 3.17. RAPD-P16 primerinin jel görüntüsü. M: Markör, K: Kontrol.



Şekil 3.18. RAPD-P16 primerinden oluşan bant profilleri.



Şekil 3.19. RAPD-PCR primerinden oluşan filogenetik ağaç.

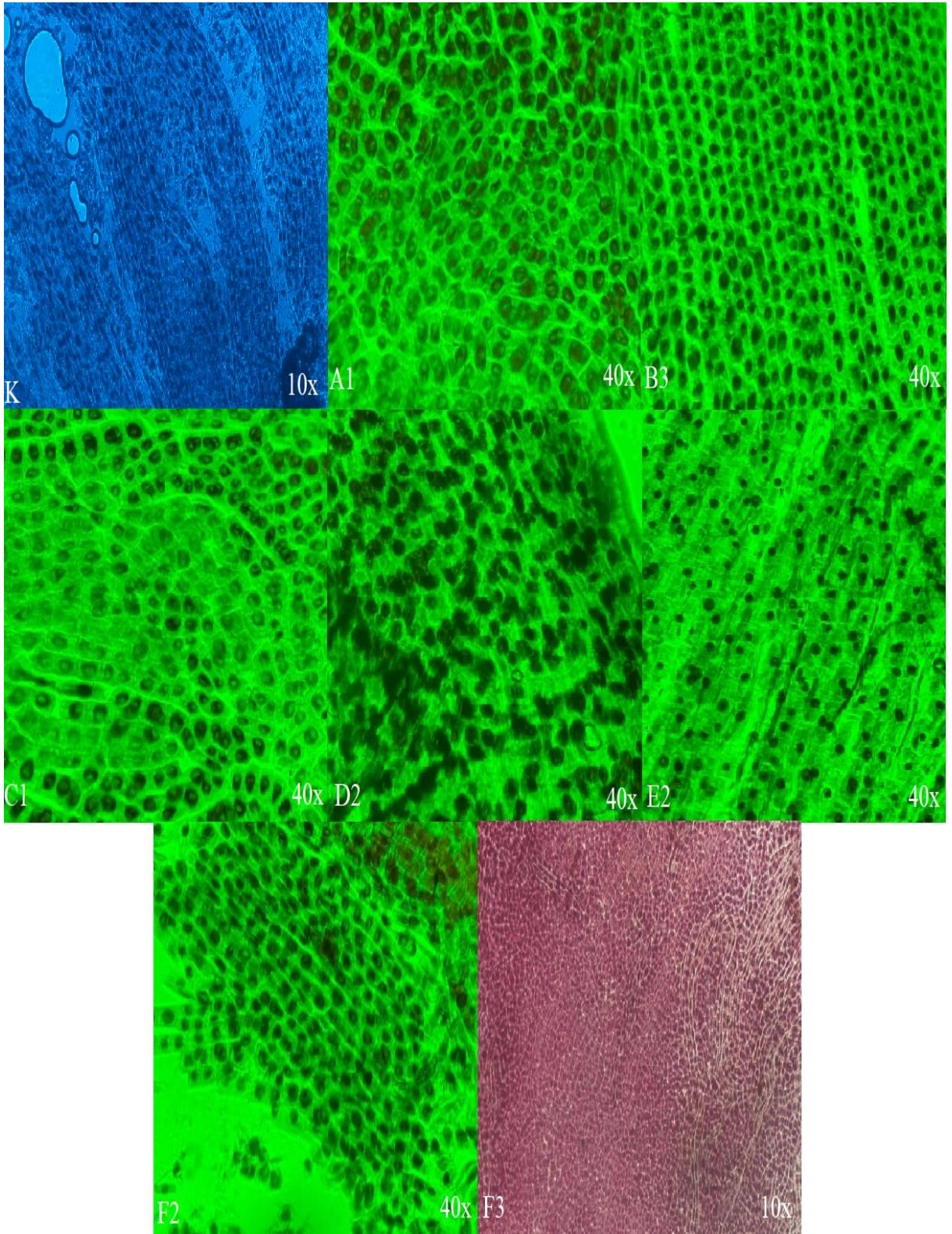
Kontrol	5ppm24Saat	5ppm48Saat		5ppm72Saat		10ppm24Saat		10ppm48Saat		10ppm72Saat		50ppm24Saat		50ppm48Saat		50ppm72Saat		75ppm24Saat	
	75ppm48Saat	75ppm72Saat	100ppm24Saat	100ppm48Saat	100ppm72Saat	150ppm24Saat	150ppm48Saat	150ppm72Saat											
Kontrol	1	0.567	0.646	0.556	0.500	0.493	0.471	0.368	0.413	0.347	0.321	0.386	0.397	0.382	0.405	0.304	0.347	0.325	0.200
5ppm24Saat		1	0.594	0.431	0.446	0.464	0.361	0.435	0.423	0.438	0.361	0.415	0.366	0.370	0.356	0.324	0.333	0.347	0.234
5ppm48Saat			1	0.508	0.524	0.561	0.515	0.485	0.431	0.424	0.333	0.343	0.356	0.417	0.443	0.408	0.382	0.356	0.209
5ppm72Saat				1	0.403	0.469	0.468	0.373	0.343	0.349	0.300	0.371	0.385	0.348	0.394	0.300	0.288	0.324	0.161
10ppm24Saat					1	0.484	0.508	0.409	0.397	0.323	0.278	0.323	0.282	0.362	0.388	0.314	0.323	0.358	0.123
10ppm48Saat						1	0.547	0.515	0.437	0.525	0.356	0.453	0.342	0.365	0.408	0.303	0.329	0.342	0.194
10ppm72Saat							1	0.406	0.456	0.429	0.333	0.406	0.319	0.441	0.492	0.371	0.385	0.418	0.185
50ppm24Saat								1	0.538	0.444	0.406	0.444	0.315	0.338	0.361	0.366	0.358	0.371	0.219
50ppm48Saat									1	0.525	0.500	0.550	0.342	0.443	0.429	0.414	0.409	0.361	0.231
50ppm72Saat										1	0.525	0.500	0.328	0.373	0.379	0.343	0.333	0.328	0.164
75ppm24Saat											1	0.579	0.377	0.420	0.386	0.371	0.385	0.338	0.203
75ppm48Saat												1	0.435	0.394	0.422	0.406	0.400	0.348	0.246
75ppm72Saat													1	0.448	0.433	0.462	0.435	0.382	0.267
100ppm24Saat														1	0.623	0.556	0.484	0.448	0.254
100ppm48Saat															1	0.590	0.542	0.477	0.279
100ppm72Saat																1	0.525	0.462	0.305
150ppm24Saat																	1	0.483	0.340
150ppm48Saat																		1	0.310
150ppm72Saat																			1

Şekil 3.19. RAPD-PCR primerinden oluşan Jaccard benzerlik matrix'i.

3.4. Mitotik İndeks ve İstatistiksel Analiz

Mitotik indeks analizi için farklı boya dozlarına maruz bırakılan kök ucu örneklerinden elde edilen preparatların görüntüleri Şekil 3.21.'de verilmiştir. Mitotik indeks yüzdeleri Tablo 3.1.'de verilmiştir.

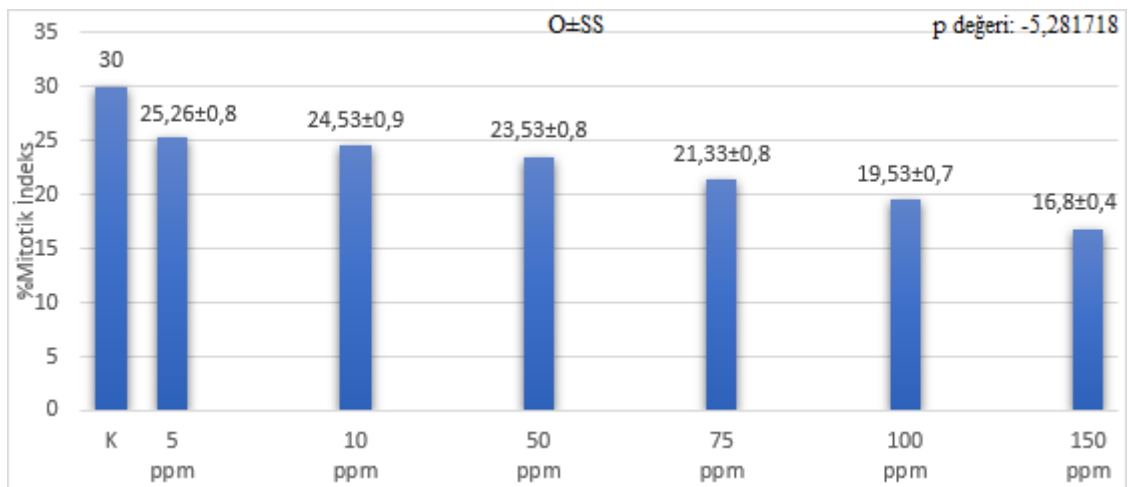
Her bir dozun zamana göre ortalamasıyla standart sapmaları Şekil 3.22.'de verilmiştir.



Şekil 3.20. 10x ve 40x’lik objektifte incelenen *A. cepa* kök ucu preparatlarının görüntüsü. (K: Kontrol)

Tablo 3.1. *A. cepa* kök ucu örneklerinin mitotik indeks oranı

Örnekler, Maruz Bırakılan Doz ve saat	Mitotik İndeks Oranı (%)
Kontrol	30
A1-5ppm-24s	26
A2-5ppm-48s	25,4
A3-5ppm-72s	24,4
B1-10ppm-24s	25,6
B2-10ppm-48s	24,2
B3-10ppm-72s	23,8
C1-50ppm-24s	24,4
C2-50ppm-48s	23,4
C3-50ppm-72s	22,8
D1-75ppm-24s	22
D2-75ppm-48s	21,6
D3-75ppm-72s	20,4
E1-100ppm-24s	20,2
E2-100ppm-48s	19,6
E3-100ppm-72s	18,8
F1-150ppm-24s	17,2
F2-150ppm-48s	16,8
F3-150ppm-72s	16,4



Grafik 3.1. Farklı dozlara maruz kalan örneklerin istatistiksel analizi. O: Ortalama, SS: Standart Sapma. $P<0,05$ değeri anlamlıdır.

4.TARTIŞMA ve SONUÇ

Tekstil endüstrisi, özel beceriler gerektirmeden istihdam sağlayan ve birçok ülkenin ekonomisinde önemli bir rol oynayan dünyanın en büyük endüstrilerinden biridir. Öte yandan atık su hacmi ve içeriği düşünüldüğünde, tekstil endüstrisinden kaynaklanan atık sular, endüstriyel kirliliğin birinci sırada yer alan kaynağı olarak sınıflandırılabilir. Tekstil endüstrisinde kullanılan boyalar, çevreden gelen etkilere dayanıklı olarak geliştirilmektedir (Hendrickx ve Boardman, 1995: 1). Bu nedenle ve boyama işlemindeki verimsizlik nedeniyle, bu boyaların tonları atık sularda bulunur ve çoğu zaman geleneksel işlemlerle arıtılması mümkün değildir (Chequer vd., 2013: 152).

İnsan ve hayvan sağlığı için tehlikeli bir tehdit oluşturan son derece toksik, kanserojen ve zehirlenmeye neden olan birçok sentetik boya sınıfı vardır. Boyaların toksisitesinin etkileri, genetik mutasyonlar, doğum kusurları ve kalıtsal hastalıklar yoluyla daha ileri nesillere taşınabilmektedir (Yagub vd., 2014: 172).

Bu boyaların çevre üzerinde olumsuz etkileri hakkında birçok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir. Örneğin, reaktif boyalar organizmaların birçoğu için toksik etki yapmaktadır ve esas olarak güneş ışığını bloke etmeleri ve dolayısıyla canlılar için son derece önemli olan fotosentezi ve çözünmüş oksijen konsantrasyonunu azaltmaları nedeniyle ekosistemler için büyük bir tehdit oluşturur (Moussavi ve Mahmoudi, 2009: 807- Mahony vd., 2002: 457). Ayrıca, birçok boya veya metabolitinin insanlar ve diğer yaşam formları üzerinde kanserojen, teratojenik ve mutajenik etkileri vardır (Sun vd., 2007:648-Ozer vd., 2005: 120).

ISSR-PCR ve RAPD-PCR, yeterli kalitede herhangi bir DNA için uygundur ve çok sayıda örneğin hızlı analizine izin verir. Rasgele primerler kullanıldığı için, DNA hasarının veya organizmalardaki genom dizisinin spesifik ayrıntılarına ihtiyaç duyulmaz. Ayrıca, analizden önce PCR ürünlerinin radyoaktivite veya enzimatik bozunması gerekmez (Atienzar vd, 1999: 2276).

Bu çalışmada tekstil endüstrisinde kullanılan RR195 boyası kullanılmış olup, PCR tabanlı markörler kullanılarak genotoksik etkileri ve mitotik indeks testi uygulanarak sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

ISSR-PCR çalışmalarında 10 adet primer kullanılmış olup, bunlardan 4 tanesi tüm örnekler için verimli amplifikasyon sonucu vermiştir. RAPD-PCR çalışmalarında 6 adet primer kullanılmış olup, bunlardan 4 tanesinde tüm örnekler için verimli amplifikasyon sonucu elde edilmiştir. ISSR primerleri arasında en fazla polimorfizm gösteren primer ISSR-01 primeri'dir.

ISSR primerlerinden elde edilen bant sayıları ve polimorfizm oranları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. ISSR primerlerinin bant sayıları ve polimorfizm oranları

Primer Numarası	Toplam bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Monomorfik bant sayısı	Polimorfizm oranı (%)
ISSR-01	33	33	0	100
ISSR-07	18	16	2	88,9
ISSR-309	13	12	1	92,3
ISSR-310	17	14	3	82,4
Toplam	81	76	5	

RAPD-P5 primeri ile yapılan PCR sonucunda RAPD-P5 ve RAPD-P11 primerlerinin en yüksek polimorfizme sahip oldukları görülmüştür. RAPD primerleri ile yapılan PCR sonucu elde edilen bantlar ve polimorfizm oranları Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. RAPD primerlerinin bant sayıları ve polimorfizm oranları

Primer Numarası	Toplam bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Monomorfik bant sayısı	Polimorfizm oranı (%)
RAPD-P5	44	44	0	100
RAPD-P11	26	26	0	100
RAPD-P14	19	16	3	84,2
RAPD-P16	35	32	3	91,4
Toplam	124	118	6	

RR195'e maruz bırakılan örneklerden yapılan ISSR ve RAPD primerinin kullanıldığı çalışmaların tamamında, kontrol grubuna göre test örneklerinin her birinin bant profillerinde önemli değişimlerin bulunduğu görülmüştür. Bu değişimler, kontrol grubunda gözlenen belli bantların test örneklerinde gözlenmediği veya kontrol grubunda gözlenmediği halde test örneklerinde yeni bant oluşumlarının ortaya çıkması şeklinde gözlenmiştir. Her iki PCR tabanlı yöntemden elde edilen amplifikasyon sonuçları incelendiğinde; kontrol grubuna göre bant

farklılıkları, her bir primer jelinde açıkça görülebilmektedir. RAPD ve ISSR primerlerden amplifikasyon sonucu elde edilen tüm bantların karşılaştırmalı analiziyle çizilmiş dendrogramlar incelendiğinde; kontrol grubuna en yakın bant profillerinin 5ppm doz uygulamasına maruz bırakılan örnekler olduğu görülmektedir (Şekil 3.9 ve Şekil 3.20). Her iki yöntemin tüm primer verileri ile oluşturulan iki dendrogramda da kontrol grubundan en uzak bant profillerinin ise 150ppm dozuna maruz bırakılan örnekler olduğu anlaşılmaktadır. Kontrol grubuna göre test örneklerinin bant profillerindeki bu farklılıkların, kullanılan dozlar ve sürelerin artışıyla doğru orantılı olduğu görülmektedir. Amplifikasyonlar sonucunda yeni bant oluşumlarının ortaya çıkması ya da kontrol grubuna göre mevcut bantların kaybolması durumu; DNA dizinde meydana gelen delesyon ya da DNA kırıklarına bağlı olarak gelişen yapısal değişiklikler sonucu oligonükleotid primerleri için erişilebilirlik durumlarının değişmesine bağlı olduğu öngörülmektedir.

İki farklı yöntem olan ISSR-PCR ve RAPD-PCR bant profillerinden yararlanılarak oluşturulan dendrogramlar karşılaştırmalı olarak incelendiğinde; birbirini doğrular nitelikte, uygulanan doz ve sürelerin olarak kontrol grubuna göre dallanma profillerinin yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Özellikle RAPD-PCR dendrogramında kontrol grubuna en yakın dallanma gösteren örneklerin 5ppm dozuna maruz kalan örnekler olduğu ve sistematik olarak diğer doz uygulamalarının da kontrol örneğinden doz artışına bağlı olarak uzaklaşan dallanma profili gösterdikleri belirlenmiştir. Aynı durum ISSR-PCR dendrogramında da ufak farklılıklar dışında yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Bu durum, doz artışına bağlı olarak RR195 boyasının *A. cepa* kök hücrelerindeki DNA moleküllerinin yapısına etki ederek, sistematik hasara yol açtığına işaret etmektedir. Dolayısıyla, RR195 tekstil boyasının *A. cepa* DNA'sıyla etkileşime girdiği ve genotoksik etkilere sebep olduğu öngörülmektedir. Hassan ve Yassein (2014)'in yaptığı bir çalışmada azo boyalarının genotoksik etkilerini araştırmak amacıyla RAPD-PCR tekniğinden yararlanılmış ve bu boyalara maruz bırakılan *A. cepa* örneklerinin, kontrol grubuna göre bazı eksik ve fazla bantlar olduğu gözlemlenmiştir. Önemli ölçüde oluşan bu bant farklılıklarının, DNA hasarı ve buna bağlı olarak primer bağlanma bölgelerinde oluşan nokta mutasyonlardan kaynaklandığı yorumlanmıştır.

RR195 boyasının sitotoksik etkilerini araştırmak amacıyla boyanın maruz bırakıldığı 18 örneğe ve kontrol grubuna mitotik indeks testi yapılmıştır. Mitotik indeks (MI) sonuçlarında en yüksek değer %30 ile kontrol grubunda hesaplanmıştır. Mitotik indeks sonuçlarında en düşük değer ise 150 ppm'de 72 saat RR195 boyasına maruz kalan F3 örneğinde %16,4 olarak belirlenmiştir. Kök büyümesinin %45'in üzerinde azalması, bitkiler üzerinde ölümcül olmayan

etkilere sahip maddelerin toksik doğasının varlığını göstermektedir (Wierzbicka, 1999). Elde edilen bu sonuçlarda mitotik indeksin doz ve süre artışıyla ters orantılı olarak azaldığı görülmektedir. Farklı dozlara maruz kalan örnekler için yapılan ANOVA analizinde mitotik indeks yüzdelilerindeki farklılıkların anlamlı olduğu görülmüştür. Bu durum RR195 boyasının, *A. cepa* kök ucu hücrelerinde mitozu baskıladığını göstermektedir. Yine, Hassan ve Yassein (2014)'in yaptığı çalışmada tekstil azo boyasının konsantrasyonunun artmasıyla köklerin ortalama sayısı ve büyümesinin azaldığını gösterilmiştir. Aynı çalışmada, kullanılan azo boyaların doz artışına bağlı olarak MI yüzdelilerinin oldukça azaldığı görülmüştür. Mitotik indeks yüzdelilerindeki bu azalış toksik etkinin varlığı ve bu etkinin hücre ölümlerine sebep olduğunu düşündürmüştür (Hassan ve Yassein, 2014). Benzer bir çalışmada, Sudhakar vd., (2001), MI'daki azalmanın, DNA sentezinin inhibisyonundan veya hücre döngüsünün G2 fazındaki bloke olmasından kaynaklanabileceğini bildirmektedir (Sudhakar vd., 2001). Hem PCR tabanlı yöntemler hem de sitotoksik etkiyi gösteren MI verileri değerlendirildiğinde bu çalışmanın sonuçları, azo boyaların genotoksik etkileri üzerinde yapılan önceki çalışmaların sonuçlarına benzer ve doğrular niteliktedir.

Dutta ve Ahmed (2016)'da yaptığı benzer bir çalışmada azo boyası olan Reaktif red 120 boyası kullanılmış ve *A. cepa* kökleri farklı doz ve saatlerde maruz bırakılmıştır. Yapılan MI testi sonucunda doz miktarı ve muamele süresi artışına bağlı olarak MI yüzdelilerinin azaldığı gözlenmiş olup, 100ppm-72 saat uygulanan örnekte maksimum mitotik depresyonun gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre *A. cepa* meristematik hücrelerinin mitotik indeksindeki azalma, hücre ölüm olarak yorumlanmış ve Reaktif red 120 boyasının ekosistemler için sitotoksik etkilerinin olduğu bildirilmiştir.

Yine, Basu ve arkadaşlarının (2019) yaptığı benzer bir çalışmada azo boyası olan metanil sarısı kullanılmış ve *A. cepa* kökleri farklı doz ve saatlerde mağruz bırakılmıştır. Yapılan MI testi sonucunda doz miktarı ve muamele süresi artışına bağlı olarak MI yüzdelilerinin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. MI oranındaki bu azalma metanil sarısının, ATP üretiminin azalmasının bir sonucu olarak DNA sentezinin ve haliyle hücre döngüsünün baskılanmasına neden olabileceğini düşündürmüştür. Bu veriler ışığında Metanil sarısı boyasının ekosistemler için sitotoksik etkilerinin olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler RR195 reaktif azo boyasının; *A. cepa* kök hücrelerinde uygulanan en düşük doz olan 5 ppm'den en yüksek doz 150 ppm'e kadar minimum 24 saat olmak üzere 72 saat içindeki uygulamalar için genotoksik ve sitotoksik etkilere sahip olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, tekstil endüstrisinde faaliyet gösteren fabrikaların atık boyar

maddelerinden biri olan RR195 boyasının, ekosistem ve canlılar için genotoksik ve sitotoksik etkilerinin olacağı öngörülmektedir.



KAYNAKLAR

- A. Ozer, G. Akkaya, M. Turabik,** (2005) Biosorption of Acid Red 274 (AR 274) on *Enteromorpha prolifera* in a Batch System, J. Hazard. Mater. B126 (2005) 119–127.
- Adin A, Asano T,** (1998) The Role of Physical-Chemical Treatment in Wastewater Reclamation and Reuse. Wat Sci Tech 37: 79-90.
- Alan H. Schulman,** (2007) Molecular Markers to Assess Genetic Diversity. *Euphytica* (2007) 158:313–321
- Al-Kdasi A, Idris A, Saed K, Guan C** (2004) Treatment of Textile Wastewater by Advanced Oxidation Processes-A Review. Global Nest IntJ 6: 222-230.
- Althoff DM, Gitzendanner MA, Segraves KA.,** (2007). The Utility of Amplified Fragment Length Polymorphisms in Phylogenetics: a Comparison of Homology Within and Between Genomes. Syst Biol. 2007; 56:477-484.
- Arya D, Kohli P,** (2009) Environmental Impact of Textile Wet Processing, India. Dyes and Chemicals.
- Atienzar, F. A., B. Cordi and A. J. Evenden.,** (1999). Qualitative Assessment of Genotoxicity Using Random Amplified Polymorphic DNA: Comparison of Genomic Template Stability with Key Fitness Parameters in *Daphnia Magna* Exposed to Benzo[a]pyrene, Environ, Toxicol. Chem., 18: 2275-2282.
- Atif S,** (2002) Impact of Environmental Regulations on the Textile Sector of Pakistan, Geneva.
- Babu RB, Parande AK, Raghu S, Kumar PT,** (2007) Textile Technology-Cotton Textile Processing: Waste Generation and Effluent Treatment. The Journal of Cotton Science 11: 141-153.
- Basu, S., A.K. Datta, A. Pramanik, S. Gupta, D. Das, R. Karmakar and B. Ghosh.,** (2019). Assessment of Cytotoxicity Induced by Heavy Metal Arsenic Trioxide and Azo-Dye Metanil Yellow in *Allium cepa* Assay and Aqueous Plant Extracts Mediated Amelioration. Cytologia, (Accepted).
- Bishop MD, Hawkins GA, Keeler CL.,** (1995) Use of DNA Markers in Animal Selection. *Ther.* 1995; 43:61-70.

Botstein, D., White, R., Skolnick, M. and Davis, R.W., (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms, *Am. J. Of Human Genetic*, 32; 314-331.

Brooks SA, Gabreski N, Miller D, Brisbin A, Brown HE, Streeter C et al., (2010) Whole-Genome SNP Association in the Horse: Identification of a Deletion in Myosin Va Responsible for Lavender Foal Syndrome. *PLoS Genet.* 2010; 6: e1000909.

Brown B, Epifanio J., (2003) Nuclear DNA. In: Hallermann, E.M. (Ed.), *Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists*. American Fisheries Society, Bethesda, MD, 2003, 458.

Burch P (2020) Dyeing. <http://www.pburch.net/dyeing/aboutdyes.shtml>

Burkinshaw S, (1995) *Chemical Principles of Synthetic Fibre Dyeing*. Blackie Academic & Professional.

Chakraborty R., (1981) The Distribution of the Number of Heterozygous Loci in an Individual in Natural Populations. *Genetics*. 1981; 98:461-466.

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

Chauhan, L. K. S., T. S. S. Dilkshith and V. Sandararaman, (1986). Effect of Deltamethrin on Plant Cells 1- Cytological Effects on the Root Meristems of *A. cepa*. *Mutation Res.*, 171:26-30.

Chequer, F. M. D., Oliveira, G. A. R. De, Ferraz, E. R. A., Cardoso, J. C., Zanoni, M. V. B., & Oliveira, D. P. De. (2013). *Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact. Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing*, 151–176.

Chipasa K, (2001) Limits of Physicochemical Treatment of Wastewater in the Vegetable Oil Refining Industry. *Polish Journal of Enviro Studies* 10: 141-147.

Chow S, Clarke ME, Walsh PJ., (1993) PCR-RFLP Analysis on Thirteen Western Atlantic Snappers (Subfamily *Lutjaninae*): a Simple Method for Species and Stock Identification. *Fish Bull.* 1993; 91:619-627.

Cooke, R.J. (1984). “The Characterization and Identification of Crop Cultivars by Electrophoresis.” *Elect* 5: 59-72.

Crawford MK, Grimes CB, Buroker NE., (1989) Stock Identification of Weakfish, *Cynoscion Regalis*, in the Middle Atlantic Region. Fish Bull. 1989; 87:205-211

Daniela Morais Leme, Maria Aparecida Marin-Morales., (2009) *Allium cepa* Test in Environmental Monitoring: A Review on its Application. Mutation Research/Reviews in Mutation Research Volume 682, Issue 1, July–August 2009, Pages 71-81

Davis S, Schlag S, Funada C, (2008) CHE Product Review Abstract. Chemical Industries. <https://ihsmarkit.com/industry/chemical.html>

Dooley W, (2008) Textiles. Revised Edition. Biblio Bazaar. Chapter VI, Weaving 59-67.

Dutta, J. and Ahmed, A., (2016) A Study of Azo Dye Reactive Red 120 Induced Genotoxicity on *Allium cepa* L. J. Chem. Pharm. Res. 8: 93–97.

Elliott, A., Hanby, W., & Malcolm, B., (1954). The Near Infra-Red Absorption Spectra of Natural and Synthetic Fibres. *British Journal of Applied Physics* 5(11):377

EPA (Environmental Protection Agency), (2003) Wastewater Technology Fact Sheet: Screening and Grit Removal.

Eswaramoorthi S, Dhanapal K, Chauhan D, (2008) Advanced in Textile Waste Water Treatment: The Case for UV-Ozonation and Membrane Bioreactor for Common Effluent Treatment Plants in Tirupur, Tamil Nadu, India. Environment with People's Involvement & Co-ordination in India. Coimbatore, India.

Etter B, Tilley E, Khadka R, Udert KM, (2011) Low-cost Struvite Production Using Source-Separated Urine in Nepal. Water Res 45: 852-862

Fletcher K, (2008) Sustainable Fashion and Textiles: Design Journeys. Earthscan Publishing 98-114.

Fritz, U., Kiroký, P., Kami, H. & Wink, M. (2005). Environmentally Caused Dwarfism or a Valid Species - Is *Testudo Weissingeri* Bour, 1996 a Distinct Evolutionary Lineage? New Evidence from Mitochondrial and Nuclear Genomic Markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(2): 389-401.

G. M. Hassan, A. A. M. Yassein., (2014) Cytogenotoxicity Evaluation of Water Contaminated with some Textile Azo Dyes Using RAPD Markers and Chromosomal Aberrations of Onion (*Allium cepa*) Root Cells. Genetics Department, Faculty of Agriculture, Fayoum University, Egypt, 39-58.

G. Moussavi, M. Mahmoudi, (2009) Removal of Azo and Anthraquinone Reactive Dyes from Industrial Wastewaters Using MgO Nanoparticles, J. Hazard Mater. 168 (2009) 806–812.

Georgiou D, Aivazidis A, Hatiras J, Gimouhopoulos K, (2003) Treatment of Cotton Textile Wastewater Using Lime and Ferrous Sulfate. Water Res 37: 2248-2250.

Hendrickx, I., & Boardman, G. D. (1995). Pollution Prevention Studies in the Textile Wet Processing Industry (Unpublished Master's Thesis). Blacksburg, Virginia.

Holme I, (2000) Coloration of Technical Textiles, In: Horrocks AR and Anand SC, Handbook of Technical Textiles. The Textile Institute, Woodhead Publishing Limited, CRC Press, New York

J.H. Sun, S.P. Sun, G.L. Wang, L.P. Qiao, (2007) Degradation of Azo Dye Amido Black 10B in Aqueous Solutions by Fenton Oxidation Process, Dyes Pigments 74 (2007) 647–652.

Jain R, Bhargava M, Sharma N, (2003) Electrochemical Studies on a Pharmaceutical Azo Dye: Tartrazine. Ind Eng Chem Res 42: 243-247.

K. Mortelmans, S.D. Rupa., (2004) “Current Issues in Genetic Toxicology Testing for Microbiologists”, Adv Appl Microbiol, 56: 379-401, (2004).

Kirk ve Othmer, (2007) Encyclopedia of Chemical Technology. 3, 4th edn, John Wiley and Sons, Inc.

Kuusisto TK., (2010) Textile in Architecture (Unpublished Master's Thesis). Tampere University of Technology Master’s Degree Programme In Architecture, Finland.

Laxman M (2009) Pollution and its Control in Textile Industry. Dyes and Chemicals. <https://www.fibre2fashion.com/industry-article/4434/pollution-and-its-control-in-textile-industry>

Lima ROA, Bazo A, Salvadori DMF, Rech CM, Oliveira DP, et al. (2007) Mutagenic and Carcinogenic Potential of a Textile Azo Dye Processing Plant Effluent that Impacts a Drinking Water Source. Mutation Research/Genetic Toxicology and Envi Mutagenesis 626: 53-60.

Litt M, Luty JA., (1989) A Hypervariable Microsatellite Revealed by *in vitro* Amplification of a Dinucleotide Repeat Within the Cardiac Muscle Actin Gene. Am J Hum Genet, 1989; 44:397-401.

Lorimer J, Mason TJ, Plattes M, Phull SS, Walton DJ (2001) Degradation of Dye Effluent. Pure Appl Chem 73: 1957-1968.

- M. Kirsch-Volders, A. Vanhauwaert, U. Eichenlaub-Ritter, I. Decordier.,** (2003) “Indirect Mechanisms of Genotoxicity”, *Toxicol Lett*, 140-141: 63-74, (2003).
- M.T. Yagub, T.K. Sen, S. Afroze, H.M. Ang,** (2014) Dye and its Removal from Aqueous Solution by Adsorption: A review *Adv. Colloid Interface Sci.* 209 (2014) 172.
- Mathur N, Bhatnagar P, Bakre P,** (2005) Assessing Mutagenicity of Textile Dyes from Pali (Rajasthan) using AMES Bioassay. *Envi Toxicology Unit, Dept of Zoology, Univ of Rajasthan, Jaipur, India.*
- Mohamed A. Hassaan, Ahmed El Nemr** (2017) Health and Environmental Impacts of Dyes: Mini Review *American Journal of Environmental Science and Engineering* 2017; 1(3): 64-67
- Moustafa S_**(2008) Process Analysis & Environmental Impacts of Textile Manufacturing. Dyes and Chemicals. <https://www.fibre2fashion.com/industry-article/3771/process-analysis-environmental-impacts-of-textile-manufacturing>
- Mullis KB, Faloona F.,** (1987) Specific Synthesis of DNA *in vitro* Via Polymerase Chain Reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155:350-355.
- N. Vural.,** (2005) “Toksikoloji”, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 115-129, (2005).
- Nagy, Z.T., Joger, U., Guicking, D. & Wink, M.,** (2003). Phylogeography of the European Whip Snake *Coluber (Hierophis) viridiflavus* as Inferred from Nucleotide Sequences of the Mitochondrial Cytochrome-b Gene and ISSR Genomic Fingerprinting. *Biota*, 3: 109-118.
- Nandani KN, Thakur SK.,** (2014) Randomly Amplified Polymorphic DNA- a Brief Review. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences.* 2014; 9(1):6-13.
- Nese T, Sivri N, Toroz I** (2007) Pollutants of Textile Industry Wastewater and Assessment of its Discharge Limits by Water Quality Standards. *Turkish J Fisheries Aquatic Sciences* 7: 97-103.
- Nilsson R, Nordlinder R, Wass U, Meding B, Belin L,** (1993) Asthma, Rhinitis, and Dermatitis in Workers Exposed to Reactive Dyes. *Br J Ind Med* 50: 65-70.
- Ntuli F, Omoregbe I, Kuipa P, Muzenda E, Belaid M,** (2009) Characterization of Effluent From Textile Wet Finishing Operations. *WCECS* 1. ISBN:978-988-17012-6-8
- OAo Moyeni.,** (2013) PhD Diss University of the Western Cape, 2013, 241.

Ozkan Aksakal, Handan Ucun, (2010) Equilibrium, Kinetic and Thermodynamic Studies of the Biosorption of Textile Dye (Reactive Red 195) Onto *Pinus sylvestris* L. Journal of Hazardous Materials 181 (2010) 666–672

Pagga U, Brown D (1986) The Degradability of Dyestuffs: Part II Behaviour of Dyestuffs in Aerobic Biodegradation Tests. Chemosphere 15: 479-491. 20.

R.Shyamala Gowri1, R.Vijayaraghavan, P.Meenambigai (2014) Microbial Degradation of Reactive Dyes- A Review *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2014) 3(3): 421-436.

Reife A, Freeman H, (1996) Environmental Chemistry of Dyes and Pigments. John Wiley & Sons, Inc, NY 295-301.

RK Saiki, DH Gelfand, S Stoffel, SJ Scharf, R Higuchi, GT Horn, KB Mullis, HA Erlich, (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA With a Thermostable DNA Polymerase, Vol. 239, Issue 4839, pp. 487-491

Robert L, Joseph F, Alexander A (2008) Fisher's Contact Dermatitis in: Textiles and Shoes. BC Decker Inc, Ontario 339-401.

Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., & Nigam, P. (2001). Remediation of Dyes in Textile Effluent: A Critical Review on Current Treatment Technologies with a Proposed Alternative. *Bioresource Technology*, 77(3), 247–255.

S. Sadettin, G. Donmez, (2006) Bioaccumulation of Reactive Dyes by Thermophilic Cyanobacteria, *Process Biochem.* 41 (2006) 836–841.

S. Sen, G.N. Demirer, (2003) Anaerobic Treatment of Real Textile Wastewater with a Fluidized Bed Reactor, *Water Res.* 37 (2003) 1868–1878.

Schmidt A, Bach E, Schollmeyer E (2002) The Dyeing of Natural Fibres with Reactive Disperse Dyes in Supercritical Carbon Dioxide. *Dyes and Pigments* 56: 27-35.

Shishoo, R., (2012). The Global Textile and Clothing Industry. The Global Textile and Clothing Industry, 1-5. Saxion Universities, The Netherlands.

Sidharth Prasad Mishra, Subhash Taraphder and Chinmoy Mishra., (2019). Improvement of Molecular Markers in Animal Science Rohini, Delhi-110085, India Toll Free (India) – 18001234070. Chapter 7, 93-129.

Sudhakar, R., N. Gowda and G. Venu., (2001). Mitotic Abnormalities Induced by Silk Dyeing Industry Effluents in the Cells of *Allium cepa*. *Cytologia*, 66: 235-239.

T. Deveci, A. Unyayar, M.A. Mazmanci, (2004) Production of Remazol Brilliant Blue R Decolourising Oxygenase from the Culture Filtrate of *Funalia troglia* ATCC 200800, J. Mol. Catal. B: Enzyme. 30 (2004) 25–32.

T.O. Mahony, E. Guibal, J.M. Tobin, (2002) Reactive Dye Biosorption by *Rhizopus arrhizus* Biomass, Enzyme Microbial Technol. 31 (2002) 456–463.

Tholoana M, (2007) Water Management at a Textile Industry: A Case Study in Lesotho. University of Pretoria. <https://repository.up.ac.za/handle/2263/24062>

UniProt, (2020) Taxonomy-*Allium cepa* var. *aggregatum* (Shallot) (*Allium ascalonicum*) (uniprot.org/taxonomy/28911).

University of Bristol (2012) Azo Dyes. <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/price/azo.htm>

UNSD (2013) United Nations Statistics Division <https://unstats.un.org/home/>

Valko E, (1957) The Theory of Dyeing Cellulosic Fibres. Onyx Oil and Chemical Company, Jersey City, NJ.

Vierstraete, A., (1999) Principle of the PCR. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html, 1999>.

Wamburguh D, Chianelli R, (2008) Indigo Dye Waste Recovery from Blue Denim Textile Effluent: A By Product Synergy approach. New J Chem 32: 2189-2194.

Wei L. Ng, and S.G Tan., (2015) Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right? 16 November 2015. ASM Sci. J., 9(1), 30–39

Wierzbicka, A. (1999) Emotions Across Languages and Cultures. Cambridge: Cambridge University Press.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV., (1991) DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Res.* 1991; 18:6531-6535.

worldometers (2020). World Population. <https://www.worldometers.info/>

Y. Fu, T. Viraraghavan, (2001) Fungal Decolourization of Wastewaters: a Review, Bioresour. Technol. 79 (2001) 251–262.

Y. Yang, D.T. Wyatt, M. Bahorshky, (1998), Decolorization of Dyes Using UV/H₂O₂ Photochemical Oxidation, Text. Chem. Colour 30 (1998) 27–35.

Yusuf R, Sonibare J, (2004) Characterization of Textile Industries ‘Effluents in Kaduna, Nigeria and Pollution Implications. Global nest Int J 6: 212-221

Zietkiewicz, E., Rafalski, J.A. & Labuda, D., (1994). ‘‘Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification.’’ Genomics 20: 176–183.

Zlal Atl ekeroęlu, Vedat ekeroęlu., (2011) Genetik toksisite testleri. Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ordu Üniversitesi, ORDU. Yıl: 2011, Cilt:4, Sayı:3, Sayfa:221-229

