

B.Ş.E.Ü. F.B.E. 02/2022	MELLEK NAZ	PCR-TABANLI ANALİZ YÖNTEMLERİYLE TEKSTİL SANAYİNDE KULLANILAN REACTIVE ORANGE 16 BOYASININ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ	YÜKSEK LİSANS TEZİ
--	-------------------	--	---------------------------

T.C.

BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**PCR-TABANLI ANALİZ YÖNTEMLERİYLE TEKSTİL SANAYİNDE
KULLANILAN REACTIVE ORANGE 16 BOYASININ GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MELEK NAZ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. İSMAİL POYRAZ

BİLECİK, 2022

10452474

T.C.

BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**PCR-TABANLI ANALİZ YÖNTEMLERİYLE TEKSTİL SANAYİNDE
KULLANILAN REACTIVE ORANGE 16 BOYASININ GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MELEK NAZ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. İSMAİL POYRAZ

BİLECİK, 2022

10452474

BEYAN

PCR tabanlı analiz yöntemleriyle tekstil sanayisinde kullanılan reactive orange 16 boyasının genotoksik etkilerinin incelenmesi adlı yüksek lisanstezinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik 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, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.	
DESTEK ALINMIŞTIR	DESTEK ALINMAMIŞTIR
Destek alındı ise;	
Destekleyen kurum;	
Desteğin Türü	Proje Numarası
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)	
2- TÜBİTAK	
Diğer;.....	
ETİK KURUL onayı var ise;	
ETİK KURUL karar tarih/sayı:/.....

Melek Naz

.../.../....

.....

ÖN SÖZ

Bu yüksek lisans çalışmasının yazılmasında bilgi birikimi ve deneyimleriyle yol gösteren, her koşulda desteğini eksik etmeyen çok değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. İsmail POYRAZ'a sabrı, anlayışı, güler yüzü ve bana kattı her şey için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yaşamım ve eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, varlıklarını her zaman yanımda hissettiren ailem ve dostlarıma teşekkürü borç bilirim.

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

**Melek Naz
2022**

ÖZET

PCR-TABANLI ANALİZ YÖNTEMLERİYLE TEKSTİL SANAYİNDE KULLANILAN REACTIVE ORANGE 16 BOYASININ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Tekstil sanayisi, makineleşme sürecine geçilmesiyle birlikte insanoğlunun temel yaşamsal ihtiyaçlarının sağlanmasında ve ülkelerin ekonomik olarak kalkınmasına destek olan bir sanayi kolu olmaktadır. Tekstil sanayisinde, üretim aşamalarında birçok kimyasal ve su kullanılmaktadır. Gerçekleştirilen işlemler sonucundaki açığa çıkan atık sular içerisinde yoğun miktarlarda toksik maddeler ve kimyasallar bulunmaktadır. Açığa çıkan tekstil atık suları genotoksik etkilere sebep olurken aynı zamanda sindirim, solunum ve bazı deri hastalıklarına neden olmaktadır. Tekstil atık suyu içerisindeki kimyasallar güneş ışığını bloke ederek biyolojik oksijen ihtiyacının artmasına neden olurken bu durumda fotosentez ve yeniden oksijenlenme sürecini engellenmesine yol açar. Yapılan bu çalışmada, tekstil sanayisinde kullanılan Reactive Orange 16 (RO16) boyası farklı periyodik zamanlarda (24,48 ve 72 saatlik sürede) *Allium cepa*'nın köklerine farklı konsantrasyonlarda (5ppm, 10ppm, 50ppm, 75ppm, 100ppm ve 150ppm) uygulanmıştır. RO16 boyasının oluşturduğu genotoksik etkiler polimeraz zincir reaksiyonu merkezli moleküler belirteç yöntemlerinden biri olan RAPD ve ISSR-PCR ile karşılaştırma yapılacak bir şekilde analiz edilmiştir. ISSR ve RAPD-PCR analizlerinden karşılaştırmalı olarak elde edilen analizler ve veriler doğrultusunda; reactive orange 16 boyasının *A. cepa* genomunda zamana ve konsantrasyona bağlı olarak, amplifikasyon bant profillerinde farklılığa ve dolayısıyla DNA hasarlarına neden olduğu ortaya çıkarılmıştır. Sonuç olarak endüstride yaygın olarak kullanılan RO16 boyasının farklı dozlarının, canlılarda DNA düzeyinde potansiyel genotoksik etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Reactive Orange 16, RAPD-PCR, ISSR-PCR, Genotoksisite, *Allium cepa*.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE GENOTOXIC EFFECTS OF REACTIVE ORANGE 16 DYE IN THE TEXTILE INDUSTRY USING PCR-BASED MOLECULAR METHODS

With the transition to the mechanization process, the textile industry has become an industry branch that supports the economic development of countries and providing the basic vital needs of human beings. In the textile industry, many chemicals and water are used in the production stages. There are heavy metals and chemical substances in large quantities in the wastewater that is released as a result of the processes carried out. While the textile wastewater that is released causes genotoxic effects, it also causes digestive, respiratory and some skin diseases. The chemicals in the textile wastewater block the sunlight, causing an increase in the biological oxygen demand, and in this case, it inhibits the photosynthesis and re-oxygenation processes. In this study, Reactive Orange 16 (RO16) dye used in the textile industry was applied at different concentrations (5ppm, 10ppm, 50ppm, 75ppm, 100ppm and 150ppm) to the roots of *Allium cepa* at different periodic times (24, 48 and 72 hours). The genotoxic effects of RO16 dye were analyzed in comparison with RAPD and ISSR-PCR, one of the molecular marker methods based on polymerase chain reaction. In line with the comparative analyzes and data obtained from ISSR and RAPD-PCR analyses; It was revealed that reactive orange 16 dye causes differences in amplification band profiles and thus DNA damages depending on time and concentration in the genome of *A. cepa*. As a result, it has been determined that different doses of RO16 dye, which is widely used in the industry, have potential genotoxic effects at the DNA level in living things.

Keywords: Reagent Orange 16, RAPD-PCR, ISSR-PCR, Genotoxicity, *Allium cepa*.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	ix
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Endüstride Tekstil Sektörünün Önemi.....	1
1.2. Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Boyarmadde Çeşitleri.....	4
1.2.1. Azo Boya Tiplerinden Reaktif Boyalar.....	6
1.3. Tekstil Sektöründe Suyun Önemi ve Atık Madde Bertarafı.....	8
1.3.1. Tekstil Atıklarının Çevre Üzerindeki Etkisi.....	9
1.4. Tekstil Atıklarının Arıtılması.....	11
1.5. Toksik Maddelerin Genom Üzerine Etkileri.....	11
1.6. Günümüzde Kullanılan Moleküler Markörler.....	13
1.6.1. Hibridizasyona Dayalı Moleküler Markörler.....	13
1.6.2. PCR Temelli Moleküler Markörler.....	14
1.7. <i>A. cepa</i> 'nın Toksikoloji Çalışmalarında Kullanımı.....	18
2.MATERYAL VE METOT.....	20
2.1. Materyal.....	20
2.1.2. Bitki Materyali.....	20
2.2. Metot.....	20
2.2.1. <i>A. cepa</i> Örneklerinin Çimlendirilme Süreci.....	20
2.2.2. <i>A. cepa</i> Kökünün Reactive Orange 16 ile Muamele Edilmesi.....	20
2.2.3. DNA İzolasyonu.....	21
2.2.4. DNA Konsantrasyonu, Saflık ve Kalite Tayininin Spektrofotometre ile Yapılması.....	23
2.2.5. RAPD-PCR ile ISSR-PCR İçin Hedef DNA'nın Hazırlanması.....	23
2.2.6. ISSR-PCR Analizleri.....	23
2.2.7. ISSR-PCR Hazırlığı ve Koşulları.....	23
2.2.8. ISSR-PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ve Fotoğraflanması.....	24
2.2.9. RAPD-PCR Analizleri.....	25

2.2.10. RAPD-PCR Hazırlığı ve Koşulları	25
2.2.11. RAPD-PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ve Fotoğraflanması	26
2.2.12. Jel Görüntülerinin Veri Analizi.....	27
3.BULGULAR	28
3.1. DNA Konsantrasyonu, Saflık ve Kalite Tayininin Spektrofotometre ile Yapılması	28
3.2. ISSR-PCR Sonuçları	28
4.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	42
KAYNAKÇA	45

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1.1. Kimyasal yapıyı temel alan boya sınıflandırması.	8
Tablo 1.2. Tekstilde arıtılmayan atık suların özellikleri.	10
Tablo 1.3. <i>A. cepa</i> 'nın taksonomisi	18
Tablo 2.1. Kullanılan RO16 konsantrasyonları.	21
Tablo 2.2. <i>A. cepa</i> köküne uygulanan RO16 konsantrasyonu, işlem saatleri ve tüp numaraları.	21
Tablo 2.3. Kullanılan ISSR primer bilgileri.	23
Tablo 2.4. ISSR-PCR bileşen ve miktarları.	24
Tablo 2.5. ISSR-PCR reaksiyon protokolü.	24
Tablo 2.6. Çalışmada kullanılan RAPD primer bilgileri.	25
Tablo 2.7. Kullanılan RAPD-PCR bileşenleri ve miktarları.	25
Tablo 2.8. RAPD-PCR reaksiyon protokolü.	26
Tablo 3.1. <i>A. cepa</i> DNA miktar ve saflık değerleri.	28
Tablo 3.2. ISSR markörlerine ait monomorfik/polimorfik bant sayıları ve polimorfizm oranları.	40
Tablo 3.3. RAPD markörlerine ait monomorfik ve polimorfik bant sayıları ve polimorfizm oranları.	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1.En fazla tekstil ihracatı yapan ülkeler	2
Şekil 1.2.Tekstilde kullanılan boya tipleri	5
Şekil 1.3.Tekstil sektöründe üretim süreçlerinde kullanılan boyarmadde türleri.	6
Şekil 1.4.Reactive Orange 16 (RO-16) kimyasal yapısı.	8
Şekil 1.5.Genotoksik maddelerin DNA üzerinde oluşturduğu etki mekanizmaları ve sonuçları.	12
Şekil 1.7.RAPD Reaksiyonunun şematik gösterimi.	16
Şekil 1.6.PCR reaksiyonu	15
Şekil 1.8.ISSR primerleri kullanılarak PCR amplifikasyon işlemi yapılması.	17
Şekil 2.1.Çimlendirilmiş <i>A. cepa</i>	20
Şekil 2.2.100 bç'lik DNA marker.	26
Şekil 3.1.ISSR-07 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.....	29
Şekil 3.2.ISSR-07 primeri bant profili	29
Şekil 3.3.ISSR-09 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.....	29
Şekil 3.4.ISSR-09 primeri bant profili	30
Şekil 3.5.ISSR-309 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu... 30	30
Şekil 3.6.ISSR-309 primeri bant profili	30
Şekil 3.7.ISSR-310 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu... 30	30
Şekil 3.8.ISSR-310 primeri bant profilleri.	31
Şekil 3.9.ISSR-847 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu... 31	31
Şekil 3.10.ISSR-847 primeri bant profili.	31
Şekil 3.11.ISSR primerlerine ait dendrogramlar a: ISSR-07, b: ISSR-09, c: ISSR-309, d: ISSR-310, e: ISSR-847.	32
Şekil 3.12.ISSR-PCR primer verilerinin tamamından elde edilen ortak Jaccard benzerlik matrixi.	33
Şekil 3.13.ISSR-PCR primerinden elde edilen ortak dendrogram görüntüsü.....	34
Şekil 3.14.RAPD-P5 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.35	35
Şekil 3.15.RAPD-P5 primeri bant profili.....	35
Şekil 3.16.RAPD-P11 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.....	35

Şekil 3.17. RAPD-P11 primeri bant profili.....	35
Şekil 3.18. RAPD-P13 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.....	36
Şekil 3.19. RAPD-P13 primeri bant profili.....	36
Şekil 3.20. RAPD-P17 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.....	36
Şekil 3.21. RAPD-P17 primeri bant profili.....	36
Şekil 3.22. RAPD-P23 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.....	37
Şekil 3.23. RAPD-P23 primeri bant profili.....	37
Şekil 3.24. RAPD primerlerine ait dendrogramlar a: RAPD-P5, b: RAPD-P11, c: RAPD-P13, d: RAPD-P17, e: RAPD-P23.	37
Şekil 3.25. RAPD-PCR primerinden elde edilen Jaccard benzerlik matrixi.....	38
Şekil 3.26. RAPD-PCR primeri sonucu elde edilen filogenetik dendogram.	39

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

A: Adenin

AFLP: Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi

Ar: Arsenik

B: Bor

BOİ: Biyokimyasal/Biyolojik Oksijen İhtiyacı

bp: Baz çifti

C: Karbon

C: Sitozin

Cr:Krom

Cu:Bakır

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksinükleotid Tri Fosfat

F: Flor

Fe: Demir

G: Guanin

Hg: Civa

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

K: Kontrol

KOİ: Kimyasal Oksijen İhtiyacı

L: Litre

Mg: Miligram

Mg⁺²: Magnezyum

MgCl₂: Magnezyum klorür

Mn: Manganez

N: Azot

Ni: Nikel

O: Oksijen

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

pH: Hidrojen Gücü

ppm: miligram/L (milyonda bir)

RAPD: Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi

T: Timin

Taq: Taq DNA Polimeraz

UNSD: Birleşmiş Milletler İstatistik Bölümü

UV: Ultraviyole

V: Vanadyum

V: Volt

Zn: Çinko

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µM: Mikr

1.GİRİŞ

1.1. Endüstride Tekstil Sektörünün Önemi

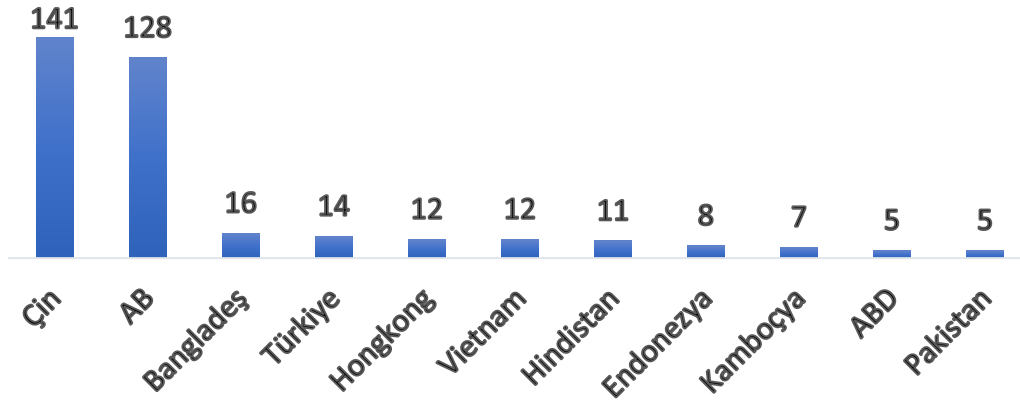
Hammaddenin işlenmesi, enerji kaynaklarının oluşturulması, bu kaynakların oluşturulmasında başvurulan araç ve yöntemlerin tamamına endüstri denilmektedir. Endüstri sanayi ile bağlantısı olan tanımdır. Sanayi, hammaddenin ya da yarı işlenmiş haldeki maddelerin kullanıma hazır hale getirilmesini sağlayan bir alandır. Bu iki tanımdan anlaşıldığı üzere sanayi ve endüstri alanları aynı amaca hizmet etmektedir. Ülkelerin gelişiminde endüstriler büyük rol oynar. Bu ülkeler zenginliklerinin büyük bir kısmını sanayileşme ile sağlar. On sekizinci yüzyılın ikinci yarısından itibaren gelişen sanayileşme; yüzyıllar boyunca hızlı bir büyüme gerçekleştirmiş ve insanların el emeğinin yerini, seri üretim almıştır. Endüstriler, günümüz ülkelerinin ekonomik düzeyini belirleyen en önemli faktörü haline gelmiştir. Yaygın sanayi türleri, genel anlamıyla gıda, inşaat, tekstil, kozmetik gibi alanlardaki ihtiyaç duyulan üretici mallarını kapsamaktadır (Madran ve ark., 1992).

Bu endüstri türleri içerisinde bulunan tekstil sektörü, Türkiye'de en önemli ve hızlı gelişen sanayi dallarından biri olarak kabul edilmektedir. Önemli ölçüde su tükettiği ve yüksek oranda kirli atık su boşalttığı için çevre üzerinde zararlı etkileri bulunmaktadır. Sonuç olarak, atık sular görsel olarak çevreyi kirletmenin yanı sıra temiz su kaynaklarına zarar vermekte ve su ekosisteminde yaşayan canlıları etkileyerek doğal ekosisteme de birçok genotoksik zararlar vermektedir (Madran ve ark., 1992).

Giyinme insanların temel ihtiyaçlarından biridir. Yaşamın birçok alanında farklı tekstil materyalleri kullanılmaktadır. Tekstil, elyaf vb. hammaddelerin elde edilmesiyle başlayıp, tüketicinin istediği özelliklere sahip ürünler haline gelinceye kadar geçirdiği süreç/aşamalarla ilgili bir terimdir. Belli uzunluk, incelik ve yumuşaklığa sahip; eğilip-bükülme ve sarılma işlemlerine uygun maddeye tekstil endüstrisinde "lif" adı verilir. Tekstil lifli atıklarının büyük bir çoğunluğunu pamuk ve poliester içerikli ürünler oluşturmaktadır. Tekstil endüstrisi, elyaf veya kumaş üretimi, boyama, ağartma vb. gibi çeşitli işlemlere sahiptir. Tekstil hammaddeleri doğal ve sentetik elyaflardır. Esas olarak, elyaf ipliğe dönüştürülür ve iplik, giysi, perde, havlu vb. gibi son ürünleri imal etmek için kullanılan bir kumaşa dönüştürülür. (Elliott ve ark., 1954).

Tekstil sanayii dünyanın en eski sanayilerinden birisidir. Tekstil sanayii, gelişme yolundaki ülkelerde gelişmiş ülkelere göre daha fazla olduğu göze çarpmaktadır. Nitekim, tekstilin imalat sanayi içindeki payı gelişmekte olan ülkelere %10'lara yaklaşırken bu oran, gelişmiş ülkeler için %4 tür. Konfeksiyon da içine alındığında sektörün imalat sanayii içindeki

payı gelişme yolundaki ülkelerde %25'e, gelişmiş ülkelerde de %10'a çıkmaktadır. Sektörde teknolojik atılım son 20-30 yılda gerçekleşmiştir. Geçmiş zamanlarda emek yoğun sanayi durumunda olan tekstil sektörü gerçekleştirilen teknolojik yeniliklerle bugün dünyanın sermaye yoğun 4. sanayi dalı haline geldiği görülmektedir (Kılıçkaya, 1993).



Şekil 1. 1. En fazla tekstil ihracatı yapan ülkeler

Tekstil sanayinde atık su miktarı ve içeriği düşünüldüğünde, endüstriyel kirliliğin oluşmasında ilk sırada yer alan alanlardan biri de tekstil atık suları olmaktadır. Tekstil endüstrisi, günümüzde sanayi kolları içerisinde doğaya en fazla atık su deşarjı yapan sektörlerden biri konumundadır (Vandevivere ve ark., 1998., Hussain and Wahab, 2018).

Bir tekstil malzemesinin kalıcı olarak renklendirilmesini sağlayan boyama, renklendirme yapan maddelere boyarmadde denilmektedir. Boyarmadde çözültisi içerisinde tekstil malzemesine boyarmaddenin göç etmesi sonucu boyama gerçekleşmektedir. İnsanlar doğal bir elyaf olarak bulunan yünü ve pamuğu ilk çağlarından beri boyamakta ve kullanmaktadır. Kullanılan bu boya maddeleri ise bitki, hayvan ve toprak gibi farklı kaynaklardan elde edilmektedir. Ayrıca bu boyama işlemleri sırasında kullanılan boya ve diğer kimyasal maddeler, çevreden gelebilecek etkilere karşı dayanıklı hale getirilmektedir (Hendrickx ve Boardman, 1995: 1). Boyama işlemlerindeki verimsizlikten kaynaklı olarak bu boyaların oluşturduğu tonlar atık sularda bulunabilir ve genellikle geleneksel işlemler kullanılarak arıtılması mümkün olmamaktadır (Chequer ve ark., 2013: 152).

Tekstil endüstrisinde kullanılan boyarmadde ve kullanılan kimyasalların cinsleri kullanılacak kumaşa göre değişiklik göstermektedir. Tekstil uygulamalarında kullanılan boyarmaddeler/renklendiriciler insan gözünün görebileceği ışığı (360-780 nm arası) emebilecek kimyasal yapılardan meydana gelmektedir. Boyarmaddeler kimyasal yapıları ve uygulama yöntemine göre farklı sınıflara ayrılmaktadır. Boyarmaddeler için üreticileri kimyasal yapısına göre sınıflandırma tercihi ederken, boyarmadde kullanıcıları uygulama yöntemine göre

sınıflandırma tercih etmektedir. Boyarmaddelere rengi veren kromofordur ve boyanın ipliğe bağlanmasını sağlayan fonksiyonel grup olmak üzere iki ana bileşenden oluşmaktadır. Boyarmaddeler içerisinde bulunan reaktif boyarmaddeler diğer bütün boyarmaddelere göre farklı şekilde lif makro-molekülleriyle reaksiyona girebilmekte, liflere gerçek kovalent bağlar ile bağlanarak yüksek oranda suda çözünen anyonik yapıda bulunmaktadır. Reaktif boyalar, pamuklu ürünlerin boyanmasında kullanılan, istenen özellikleri yeterli şekilde veren ve en yaygın kullanımı olan boyarmaddelerdir. Reaktif boyarmaddelerin liflere fikse olma oranları %60-90 seviyesinde olduğundan atık sularda aşırı renk oluşturur (Cooper, P., 1993). Düşük fiske olma oranlarının yanında, reaktif boyarmaddelerin pamuklu kumaşların boyanmasında en çok kullanılan boyarmadde sınıfı olması reaktif boyarmadde atık sularının renklerinin giderilmesini önemli hale getirmektedir. Reaktif, direkt, naftol ve indigo boyalar; selüloz liflerini boyamada kullanılırken, lansanet boya ve asit boyalar (antrakinon ve azo boya) protein liflerini boyamada kullanılmaktadır. Dispersiyon boya, direkt boya ve bazik boya tipleri ise sentetik lifleri boyamada kullanılmaktadır (Burch, 2020).

Tekstil endüstrisinde boyama işlemi yapılırken boyanın kumaşa tam olarak sabitlenmesi mümkün değildir dolayısıyla tekstil ürününe sabitlenmeden yıkanan bir miktar boya bulunmaktadır. Sabitlenemeyen bu boyalar atılan tekstil sularında yüksek konsantrasyonda bulunurken kumaşların cinslerine bağlı olarak tüketilen ve salınan su miktarı da değişiklik göstermektedir. Örneğin 1 kilogramlık kumaş üretmek için yaklaşık olarak 0,08-0,15 m³ su kullanılmakta ve her gün yaklaşık olarak 15-20 tonluk bir tekstil maddesinin işlenmesi sonucu ortalama 1000.000 metreküplük su boşaltılmaktadır. Tekstil endüstrisi birçok türde kimyasal boya kullanır ve kumaşların bu boyaları tutması küçük olduğundan, boyaların büyük çoğunluğu atık suları atmak için deşarj olduğundan büyük miktarlarda çok renkli atık su salmaktadır. Dünya Bankası tahminlerine göre sanayi kaynaklı su kirliliğinin %17-20'si tekstil endüstrisi tarafından sübvansede edilmektedir. Etkili bir önlem alınmadan bu tür akarsuların salınımının artması toprağı, nehirleri, gölleri ve çevreleri zararlı şekilde etkilemiştir (Kant, 2012). Oluşan tekstil atık suları biyolojik parçalanma işlemine uğramadığı ve uygun şekillerde işlenemediği durumlarda içerisinde boya ve kimyasal madde barındırdığı için canlılar ve ekosistem açısından kanserojen etkiler başta olmak üzere birçok sorunu beraberinde getirmektedir (Pagga ve Brown,2004)

Tekstil sanayisindeki açığa çıkan atık sular BOİ, KOİ, yüksek konsantrasyonlarda boya ve katı madde içermektedir. Yüksek oranda KOİ ve renk içeren maddeler atık suyu estetik

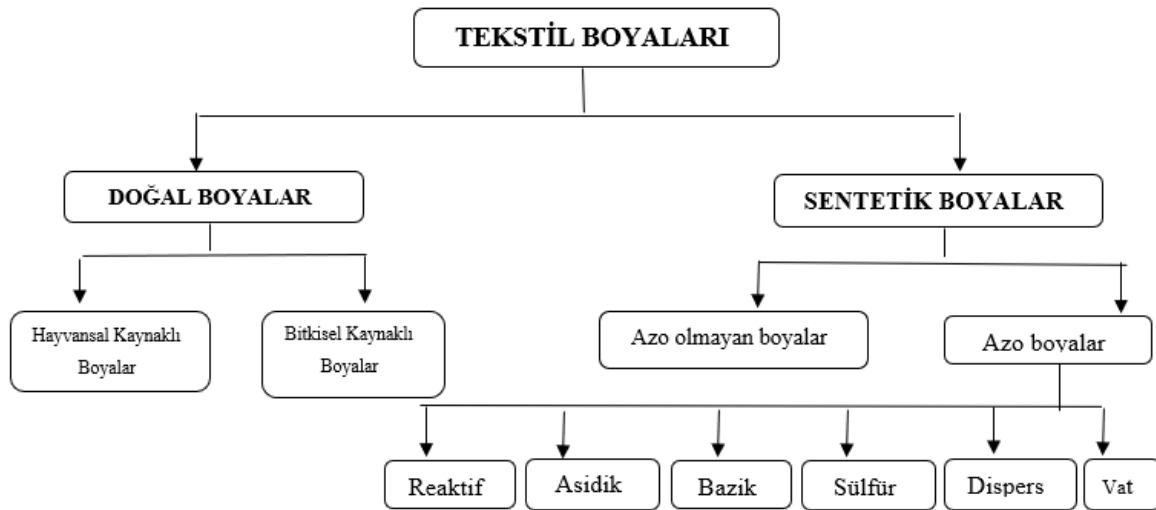
açından bozulmasına neden olarak normal hayat için gerekli olan çözünmüş oksijen miktarını azaltır ve atık suyun arıtımını daha zor bir hale getirmektedir. Çok küçük miktarlarda bile renkli tekstil atık suları yüksek dispersiyon oranlarına sahip olduğu için geniş su kütlelerine yayılabilme özelliğindedir. Renkli tekstil atık suları arıtılmadığı takdirde çevreyi tehdit etmektedir. Endüstride oluşan atık suların arıtılması için üç aşamalı bir arıtma işleminden geçmektedir. Yıllık yaklaşık olarak 7000-8000 ton üretilen boyarmaddelerin ortalama %12'si boyanma işlemlerinde boya banyosunda kalmakta ve atılacak sular içerisine karışmaktadır. Atık sulardaki bu boyarmaddeleri ise güneş ışığının girmesini önleyerek atık su ortamına oksijen girişine engel olmaktadır. Reaktif boyarmaddelerin suda çözünürlüğü yüksektir ve boyama işlemi esnasında boyarmaddelerin %30'u bulabilen bir kısmı hidrolize olmaktadır. Bu nedenle geleneksel arıtma sistemlerinden geçme eğilimi gösterirler ve tekstil atık sularında yüksek oranda renklilik oluşur (Mathew,2019; Giannakoudakis, 2016). Ayrıca reaktif boyarmaddelerin adsorblanabilme kapasitesinin düşük olduğu bilinmektedir. Açığa çıkan atık su içerisinde yoğun miktardaki boya dışında çeşitli kimyasal maddeler ve krom, arsenik, çinko, bakır, civa gibi ağır metallerde bulunmaktadır. Bu içeriğe sahip olan tekstil atık suyunun sindirim, solunum ve dermatolojik hastalıkları da beraberinde getirdiği tespit edilmiştir (Neşe ve ark., 2007).

1.2. Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Boyarmadde Çeşitleri

Tekstil sanayinde bir malzemenin kalıcı olarak renklendirilmesi olayına “boyama”, renk veren maddelere ise “boyarmadde” adı verilir. Boya ve boyarmadde birbirinden farklı terimlerdir. Boya, uygulandığı yüzeyleri kaplama ve yüzeyi renklendirme amacıyla yapılmaktadır. Yüzeylere sürülerek ya da yapıştırılarak uygulanır. Yıkama ve kazıma gibi işlemler sonucunda yüzeylerden çıkarılır ve yüzey eski haline dönebilmektedir. Boyarmaddeler ise uygulandıkları yüzeyde devamlılık ve kalıcılık sağlamakta, o yüzey ile kimyasal ya da fiziksel bağlar oluşturmaktadır. Tekstil sanayinde de durum benzerdir. Boyama işlemi, renklendirme sonucu tekstil malzemesinin yüzeyi ile bağ oluşturmakta ve oluşan renk yıkama, silme veya kazıma işlemleri ile çıkartılamamaktadır (Kohla 2008).

Canlı sağlığı için bir tehdit oluşturabilecek toksik, kansorejen ve zehirlenmelere sebep olan çok sayıda sentetik boya türü bulunmaktadır. Canlılardaki biyolojik ve kimyasal oksijen ihtiyaçları düşünüldüğünde çok küçük miktarları bile ciddi zararlı etkiler oluşturmaktadır. (Gergo, 2012). Boyaların toksik etkisi, mutasyonları, doğumsal kusurlar ve kalıtsal hastalık gibi durumları beraberinde getirmektedir (Yusuf ve ark., 2004).

Kimyasal yapılarına ve uygulandığı elyaf türlerine bağlı olarak sınıflandırılan yüzlerce boya bulunmaktadır. Bu yüzden, arıtma sistemlerinde olumsuz etkiye sahip çok çeşit ve sayıda kimyasal bulunmaktadır. Azo boyalar, kimyasal yapılarına göre; antrakinon, indigoid, metal kompleks, polimetin, kükürt, aril karbonyum, ftalosiyanın, ve nitro boyalar olarak sınıflandırılırken, boyama özelliklerine göre ise; reaktif, dispers, direkt, küp, asidik (anyonik), bazik (katyonik) boyarmaddeler ve optik beyazlatıcılar olarak sınıflandırılır. Boyarmaddeler; katyonik (bazik boyalar) anyonik (reaktif ve asit boyalar), ve iyonik halde olmayan (dispersiyon boyalar) olmak üzere üç ana sınıfa ayrılmaktadır. En yaygın kullanılan boyalar, selüloz lifler için orta-yüksek saflık sunan reaktif boyalar olarak öne çıkmaktadır. Dünyada, yıllık ortalama 10.000 çeşitte 700.000-800.000 tona sahip pigmentler ve boya maddesi üretilirken bu pigment ve boyaların büyük bir kısmı atık sular ile doğaya karışarak çevre kirliliği oluşturmaktadır.



Şekil 1. 2. Tekstilde kullanılan boya tipleri

Tekstil boyalarının çevre üzerinde oluşturduğu etkileri incelemek adına çok sayıda çalışma bulunmakta ve halen devam etmektedir. Reaktif boyalar, birçok organizma için toksik etki oluşturur ve güneş ışığını bloke etmelerine bağlı olarak canlılar için önemli olan fotosentez ile çözülmüş oksijenin konsantrasyonunu azaltmalarından dolayı çevre için ciddi bir tehdit niteliğindedirler (Moussavi ve ark., 2002). Birçok boyanın insanlarda; akciğer, mesane, cilt, karaciğer ve böbrek kanseri başta olmak üzere çoğu kansere sebep olmasından dolayı kanserojen etkisi vardır. Ayrıca, DNA yapısında bozulmalara neden olup; Down sendromu ve otizm gibi hastalıklara neden olan mutajenik etkilere sahiptirler (Sun, 2007; Ozer, 2005).

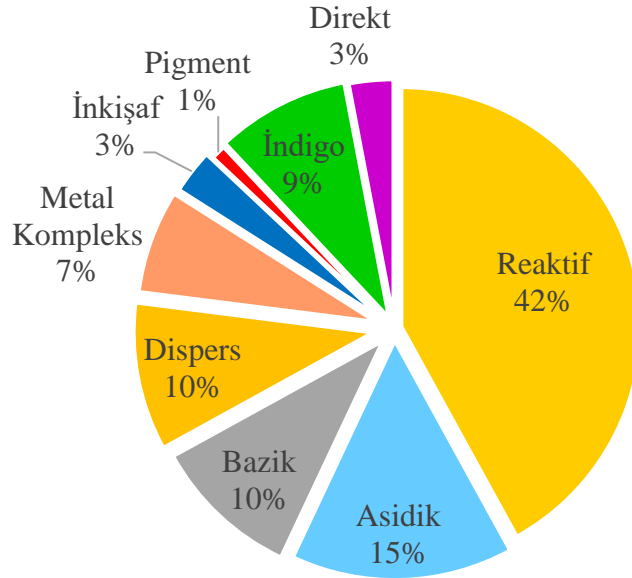
Dolayısıyla tekstil suyu uzaklaştırılmadan önce boyadan arındırılması önem arz etmektedir. Atık sulardan boyaların uzaklaştırılmasında; aktif karbon adsorpsiyonu,

koagülasyon fotokimyasal oksidasyon, ters ozmoz, ozon işleme ve membran filtrasyonu vb. birçok metodlar geliştirilmiştir. Bunun yanı sıra, parlak renklere sahip ve suda çözünebilen asit veya reaktif boyaların uzaklaştırılmasında bu yöntemler fazla etkili değildir (Yang ve ark., 1998).

1.2.1. Azo Boya Tiplerinden Reaktif Boyalar

Reaktif boya maddeleri 1953 yılında yün üzerinde uygulanabilecek bir boya maddesi araştırılırken tesadüfen keşfedilmiştir. Keşfedildiği yıla kadar selülozun bir kimyasal kullanarak yapısını bozarak kovalent bağ oluşturacağı zannediliyordu fakat araştırma sonucu reaktif boyalar selüloz ile kovalent bağ kurarak bağlandığı görülmüştür (Lewis, 2011).

Reaktif boyalar fiber reaktif boya olarakta adlandırılmaktadır. Reaktif boyalar selülozik lifler için en önemli boya sınıfı olurken ipek ve yün vb. protein lifli maddeleri boyarken de kullanılmaktadır. Reaktif boyalar, kovalent bağ yapısını fiberli moleküllerle oluşturabilir. Bu nedenle bu boyalar en etkili ve kalıcı özellikte boyalar olarak kabul edilmektedir. Bilinen en önemli 3 asit boyası, triarilmetan, antrakinin ve azo boyalarıdır (Valko ve ark., 1957).



Şekil 1. 3. Tekstil sektöründe üretim süreçlerinde kullanılan boyarmadde türleri.

Azo boyalar kromofor gruplarına göre ayrıldığında reaktif boyalar bütün boyaların %50-60'ını oluşturmakta ve diğer boyalara göre parlak ve yüksek yoğunlukta renkleri vermektedir (University of Bristol, 2012). Reaktif boyarmaddelerin en sık kullanılan çeşidi reaktif azo boyarmaddesidir. Bir boyaya rengini veren, boya maddesinin yoğunluk gibi özelliklerini belirleyen farklı moleküllerin elektronlarının orbitallerdeki geçişleri sayesinde sağlanmaktadır.

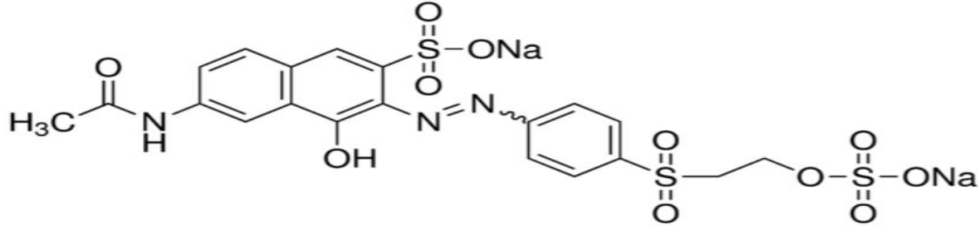
Boyalar iki farklı kısım içermektedir bunlar oksokram ($N=N$, $C=C$ ve $C=O$) ve kromofor kısımlarıdır ($-OH$, $-NH_2$ ve $-NR_2$) (Babu, 2007).

Genelde pamuktaki hidroksil grubunun varlığı nedeniyle; Acı (pikirik) asit veya anyon ya da kation haldeki boya ile iyi bir şekilde bağlanamadığı tespit edilmiştir. Bu yüzden, basit azo boyaların pamuğun boyanmasında çok fazla etkili olmadığı anlaşılmıştır (Arya D, Kohli P, 2009). Azo boyalar, bir ucunda aromatik ya da heterosiklik bir çekirdekteki bir kromofor azo grubu ($-N=N-$) ve karbosilik, heterosilik ya da alifatik halde doyamamış moleküller bulduranlar olarak tanımlanır. Boyaların, 10.000'den fazla Renk İndeksi (CI) ile boyaların en büyük sınıflandırması olduğu bulunmuştur (Davis S, Schlag S, Funada C, 2008). CI, renklerin ton, parlaklık ve doygunluklarına göre sistematik olarak düzenlenmesidir. Azo boyalar, merkezine bağlı azo gruplarının sayısına göre gruplara mono, di, tri, tetra vb. ayrılır. Azo boyalardan mono haldekiler bir tane $N=N$ bağına sahip iki ve üçlü haldeki azo grubu iki ya da üç tane $N=N$ bağı buldurmaktadır. Üçten daha fazla azo grubu bulduran boya ise poliazo boya şeklinde adlandırılmaktadır (Robert L ve ark., 2008).

Azo grupları genellikle naftalen halkası veya benzen halkasına bağlı bulunur ve fakat aromatik heterosiliklere ya da enoliz edilebilecek alifatik gruba da eklenebilmektedir. Bağlanacak yan grup, boyanın renginin oluşmasını sağlamaktadır. Boya renk indeksi, moleküle eklenecek azo grubunun sayısına göre değişmektedir (Ming, 2011).

Boyaya rengini veren kısım kromofor gruplarıdır. Birden çok kromoforun farklı kombinasyonları sonucu renkler oluşmaktadır. Azo, trifenodioksazinin, antrakininonun, fitalosiyaninin, ve formazonun yapıları reaktif boyalarda bulunan kromojenin yapılarıdır. Çözdüren grup boyanın su içerisinde çözünmesini sağlayan gruptur ayrıca reaktif boyanın yapısında bulunan en önemli çözdürücü gruplardan ait haldeki yapı sülfonik grubudur. Molekülün yapısında bulunan sülfonik asit grubunun sayısındaki artış sonucu reaktif boyanın çözünürlüğünde artma gözlenmiştir. RO16, sulu çözeltilerde anyon olan iki sülfonik asit grubuna sahiptir (Ming, 2011).

Tüm dünyada boyaların üretiminde büyük bir yüzde oluşturmuş reaktif boyalardan RO16 boyası, bir model boya olarak kullanılabilir. Şekil 1.4'de RO16 boyasının kimyasal görünümü verilmektedir.



Şekil 1. 4. Reactive Orange 16 (RO-16) kimyasal yapısı.

Kaynak: (Silah ve ark., 2020).

Tablo 1. 1. Kimyasal yapıyı temel alan boya sınıflandırması.

Sınıf	Örnek	Kromofor
Nitro boyalar	Acid Yellow 24 	
Azo boyalar	Fast Yellow AB 	$-N=N-$
Indigo boyalar	Acid Blue 71 	
Antrakinon boyalar	Reactive Blue 4 	
Triarilmetan boyalar	Basic red 9 	
Nitrozo boyalar	1-nitroso-2-naftol 	$-N=O$

Kaynak: (Rajabi, 2017, 7: 47083).

1.3. Tekstil Sektöründe Suyun Önemi ve Atık Madde Bertarafı

Son yıllarda dünya nüfusundaki artış ve yaşam standartlarındaki gelişme tekstil üretiminde ve tüketiminde de önemli bir artışa neden olmaktadır. Tekstil üretim ve tüketiminde

yaşanan bu artış, çevre kirliliğinin de her geçen gün artmasına yol açmaktadır. Atık miktarının çoğalmasıyla depolama alanlarının kapasitesi de hızla dolmaya başlamakta bu sebepten geri dönüşüm çevre ve canlı sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Tekstilde boya işlemlerinde su ile yıkama yapıldıktan sonra sabitlenemeyen boyanın bir bölümü tekstil maddesi üzerinde bulunmaktadır. Tekstil atık suyunda fikse edilmemiş boyaların konsantrasyonunda oldukça fazladır. Tüketici öncesi tekstil katı atıkları; henüz üretim aşamasında açığa çıkan atıklardır. Tekstil katı atığı genellikle kumaşların parçalarından ve paketlemedeki ambalaj ürünlerinden oluşmaktadır. Tekstildeki arıtma çamurları, çeşitli proseslerden gelen boyarmadde, metal iyonları, kimyasal madde, organik madde vb. içeriklerden kaynaklı olarak önemli atıklar arasında bulunmaktadır. Bu çamurların düzensiz bir şekilde depolanması ve uygun koşullarda elimine edilememesi canlı sağlığı açısından risk teşkil etmekte ayrıca toprak ve su kirliliğine de yol açmaktadır (Ran ve ark., 2019). Bu nedenle bu atıkların lisanslı atık bertaraf şirketlerince toplanarak bertaraf edilmesi gerekmektedir dolayısıyla boşaltma yapılan kimyasal kaplarında düşük seviyelerde tehlikeli maddeler içerebilmektedir (Fletcher, 2008).

Tekstilde açığa çıkan atıklar arasında tekstil atık suları, lifli atıklar vb. dışında önemli bir kirlilik kaynağı olan tekstil atık suyu arıtma çamurları da bulunmaktadır. Tekstil endüstrisinde içerisinde kimyasal, toksik maddeler, boyarmaddeler vb. içeren yüklü miktarda atık su oluşur. Bu atık suların doğaya salınmadan önce çeşitli yöntemler kullanılarak özenli bir arıtma işlemine tabi tutulması gerekmektedir (Goyal ve ark., 2019). Bu arıtma işlemi esnasında atık su içerisindeki yabancı maddelerin toplanması sonucu elde edilen maddelere tekstil arıtma çamuru denir. Tekstil Arıtma Çamuru (Zhang ve ark., 2017); toksik organik maddeler, kimyasal maddeler, katkı maddeleri, mikroorganizmalar, parazitler, boyarmaddeler, ağır metaller (alüminyum, demir, çinko, bakır, kurşun vb.) aromatik hidrokarbonlar vb. bileşimlerinden oluşmaktadır. Bu çamurların düzensiz bir şekilde depolanması ve uygun koşullarda bertaraf edilmemesi canlı sağlığı açısından risk teşkil etmekte ayrıca toprak ve su kirliliği de oluşturmaktadır. Bu nedenle bu atıkların lisanslı atık bertaraf şirketlerince toplanarak bertaraf edilmesi gerekirken bu işlemde uygulanan prosedür ise tekstil firmalarına fazladan maliyete yol açtığından tekstil şirketlerince genellikle tercih edilmemektedir (Ran ve ark., 2019).

1.3.1. Tekstil Atıklarının Çevre Üzerindeki Etkisi

Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA) 1990 yılında kabul ettiği Atık Önleme Yasası ile atıkların mümkün olduğunca önlenmesini ya da azaltılması gerektiğini belirtmiştir. Ayrıca, önlenemeyen atıkların çevreye zarar vermeyecek şekilde geri

dönüştürülmesi, geri dönüştürülemeyen atıkların ise çevreye zarar vermeden bertaraf edilmesi, doğaya salınımın ise son çare olması gerektiğini bildirmiştir. Tekstil atıkları içeriği üretilen tekstil ürününe ve kullanılacak kimyasal maddeye bağlıdır. Tekstildeki atık suları, askıda kalıp çözünen katıları, biyokimyasal oksijen ihtiyaçları (BOİ-KOİ) ve bazı kimyasal maddeler içerdiğinden çevreye ve insan sağlığına zarar veren etkenler oluşturmaktadır. BOİ/KOİ oranlarının çoğu, biyolojik olarak parçalanamayan maddelerin varlığını göstermektedir (Dörtüol, 2014). Tekstil atıklarının genel özellikleri Tablo 1.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 1. 2. Tekstilde arıtılmayan atık suların özellikleri.

Tanımlama	Kimyasal Maddeler
Tuzlar	NaCl veya Na ₂ SO ₄
Asitler	Asetik asit/Sülfürik asit
Bazlar	NaOH ya da Na ₂ CO ₃
Tampon maddeler	Fosfat
Kompleks oluşturuucu maddeler	Etildiamin, Tetra asetik asit
Dispergatörler ve yüzey aktif maddeler	Anyonik, katyonik, iyonik olmayan
Oksitleyici maddeler	Hidrojen peroksit
İndirgeyici maddeler	Sodyumditiyonit
Ağır metaller	Cu, Cr, Co
Harman yağlar	-
Pamuk vaksları	-
Boyalar	Çeşitli
Elyaf	Çeşitli

Kaynak: (Buckley, 1992).

Boyarmadde konsantrasyonlarının canlı ve çevre üzerindeki etkileri düşünüldüğünde bu boyarmadde ler biyolojik olarak parçalanamayan ve toksik yapılarından kaynaklanmaktadır. Tekstil atık maddeleri tohum çimlenmesinin ve lipid içeriğinin azalması, bitki büyümesinin ve enzim aktivitesinin azalması, fotosentezin inhibe edilmesi, tohum çimlenmesinin gecikmesi, klorofil üretimi ve bitki gelişiminin gerilemesi gibi bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerinden bazıları olarak görülmektedir. Aynı şekilde hayvanlar üzerinde de ciddi etkilere sahiptir örneğin büyüme ve gelişme oranında düşme, kanser, organ hasarı, sinir sistemi hasarı ve aşırı durumlarda ölüm gibi etkilere sahiptir. Bir kişinin tekstil boyası ile teması sonu, solunum yolu,

sindirim yolu hastalıkları baş ağrısı gibi rahatsızlıklara neden olmaktadır (Mathur, 2005). Tekstil boyasıyla uzun süre çalışan işçilerde karaciğer kanseri, böbrek rahatsızlıkları ve idrar yolu hastalıkları olduğu görülmüştür (Liman, 2007). Bu sebeple atık suları toksisitesinin olumsuz etkilerini önlemek için atık suların deşarj edilmeden önce yeterli miktarda arıtılması gerekir (Akpor ve ark. 2014).

1.4. Tekstil Atıklarının Arıtılması

Günümüzde atık sulardan kirleticilerin uzaklaştırılması genel olarak mekanik, kimyasal ve termal olmak üzere üç farklı yöntem ile gerçekleştirilmektedir. Kirleticilerin giderilmesindeki uygulanan prosedür incelendiğinde kimyasal veya fiziksel olarak yapılan arıtma işlemleri biyolojik işlemlere oranla maliyetli olmaktadır fakat zaman ve etki düzeyi biyolojik işlemlere göre dezavantajlara sahip olduğu görülmektedir. Fizikokimyasal arıtma işleminin dezavantajları çamurların oluşması ve uzaklaştırılması, biyolojik arıtmaların dezavantajı atık sudaki mikroorganizmaların gelişmesini etkileyerek toksik haldeki boyarmaddenin ekosistemde biyolojik parçalanma süreci geçirememesiyle birlikte bu işlem için gerekli zamanın uzun sürmesinden kaynaklanmaktadır (Joshi ve ark., 2004)

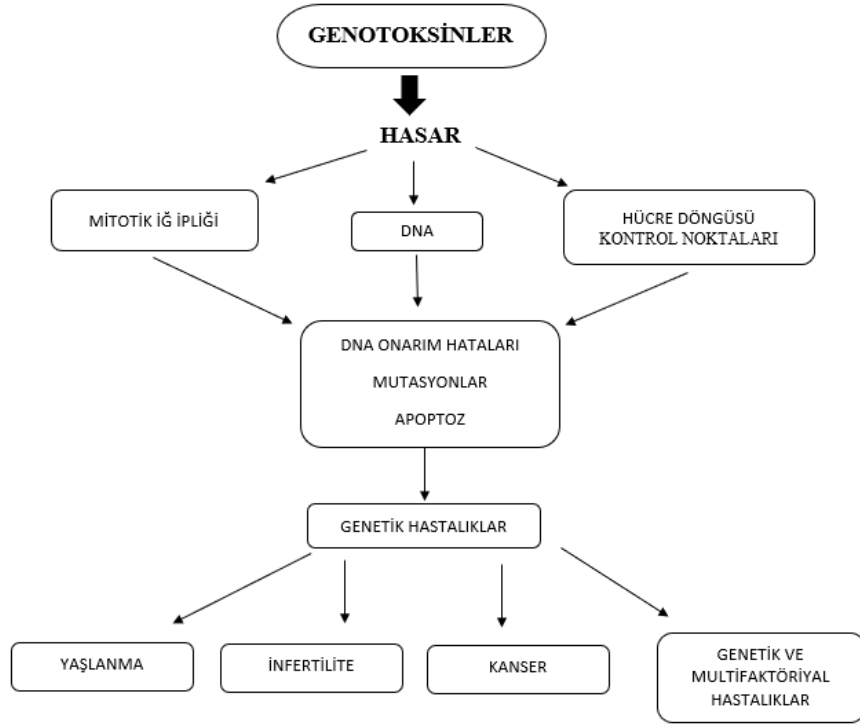
1.5. Toksik Maddelerin Genom Üzerine Etkileri

Genotoksisite bazı kimyasalların, fizyolojik ajanların veya radyasyonun deoksiribonükleik asit (DNA) yapısında değişimler oluşturması veya kırıklara sebep olması ile oluşan hücrelerde fonksiyon bozukluğu oluşturmasıdır. Bir veya birden çok DNA baz çiftinde, kromozom yapısında ya da sayılarındaki değişikliklere bağlı olarak meydana gelen farklılıklara “mutasyon” denilmektedir. Bu yönden mutasyonlarda “genotoksik etki” olarak adlandırılmaktadır (Brusick, 2001, Kaya 2002).

Genotoksisite, toksikolojinin alt dallarından biridir ve genotoksisite organizmaların biyolojik işleyişi esnasında kimyasal, fiziksel veya biyolojik etkenlerin DNA üstündeki oluşturduğu değişimleri incelemektedir (Aslantürk, 2010).

Mutajenler, organizmalardaki DNA, RNA gibi hücredeki yönetim merkezilerinin moleküler yapısının değiştirilmesinde ve bu organizmada doğal olarak tahmin edilen düzeyin çok üzerinde mutasyonlar oluşmasına neden olan kimyasal veya fiziksel maddelerdir.

DNA üzerinde değişime neden olan mutajenler, etkilerini direkt olarak veya protein yapısına bağlanıp indirekt şekilde de gösterebilir. Mutajenler DNA’ da ve dokularda hasarlar, farklı kanser türleri, kısırlık, yaşlanma ve bazı genetik bozukluklar gibi farklı hasarlara neden olmaktadır (Nagy ve ark., 2003: 110).



Şekil 1. 5. Genotoksik maddelerin DNA üzerinde oluşturduğu etki mekanizmaları ve sonuçları.

Kimyasallara karşı oluşan kanserler, endojenler ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimleri içererek oldukça karmaşık bir proses oluşturmaktadır. Bu mekanizmanın en önemli özelliği, vücut hücrelerin düzenli çoğalmasını etkileyerek sisteminin bozulmasıyla gerçekleşmektedir. Kimyasallar tümör gelişiminin başlangıç evresinde, kimyasalın DNA’da yapmış olduğu değişim geliştiricilerle karşılaşınca kadar sessiz kalmış olduğu evre; büyüme evresinde başlama evresindeki hücre geliştirici ile çoğalır, tümör oluşumu görülür ve ilerleme evresinde iyi huylu tümörün kötü huylu tümörlere dönüşümü ile gerçekleşmektedir. Genotoksik karsinogen maddeler DNA’da hasar oluşturmaktadır. Kontrolün kaybından bu fonksiyonların düzenlenmesinde yaşamsal önem arz eden belli bir gen grubunun anormal fonksiyonu sorumludur. Normal olmayan gen fonksiyonu genetik hasarla ilişkili olduğu için karsinogenezde ilk adım genetik hasar oluşturmaktır. Genomun muhtelif bölgelerinde oluşan hasarların birikmesi ile bozulabilecek kromozomların yapısı yine düzenlenebilir. Mitoz sonucu hasarlı DNA’nın kopyalanma işlemi devam eder, bozulmuş genlerin ürünü hücredeki metabolizmayı değiştirebilir ve sonuç olarak hücre değişime uğrayıp tümör hücrelerine dönüşür. Genotoksisite ve kanserojenlik arasındaki ilişki üzerine birçok çalışma yapılmakta ve organizma üzerinde kanserojen etkiye sahip olabilen çok sayıda bileşiğin genotoksik etkilerinin olduğu ve böylece mutajenik etkileri arasında büyük bir benzerlik olduğu tespit edilmiştir. Kimyasallar ve kanserojenlikleri, kimyasal maddelerin kanserojenliğini ortaya çıkarmak için çeşitli endüstriler tarafından yapılan genotoksisite testlerini gerekli hale getirmekte ve

genotoksisite için test edilecek maddelere; kromozom anormallik (KA) testi, ames testi, mikronükleus (MN) testi, comet testleri, ve kardeş kromatid değişimi (KKD) uygulanmaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011: 223)

1.6. Günümüzde Kullanılan Moleküler Markörler

Moleküler markörler, genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişki içindeki DNA parçasına denir. Moleküler markörler; akrabalık ilişkisi saptama, kalıtsal hastalıklar ve mutasyona uğrayan genleri belirleme gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Ayrıca moleküler markörler, canlı türlerinin genomik yapılarını anlamak için yapısal ve fonksiyonel açıdan önemlidir (Liu ve ark., 2014). Moleküler markörler DNA markörleri olarak da bilinirler. DNA markörleri farklı genotiplere ait DNA diziliş farklılığını ortaya çıkaran markörlerdir (Botstein ve ark., 1980). Moleküler belirteçler genom üzerindeki farklılığı belirlemeyi sağlayan DNA segmentidir. Moleküler markörler, özelliklerin fenotipte kendini ifade etmesi olarak ilişkilendirilebilir. Yöntem, DNA üzerindeki belirlenmiş yerler popülasyon içerisinde varyasyonların ve polimorfizmin belirlenmesi prensibine dayanır (Williams, 1991).

Bitki yetiştiriciliği yaparken, bitkinin istenen özelliklerini tespit etmek ve tanımlamak için moleküler belirteçler kullanılmaktadır. Bazı botanikçiler, genlerdeki polimorfizm ile birbiriyle ilişki biçimlerini göstermede markörler kullanılmaktadır. Moleküler markör teknikleri DNA molekülündeki polimorfik bölgelerin belirlenmesi prensibini temel almaktadır. Popülasyonda herhangi bir genin veya özelliğin birden fazla formu bulunuyorsa o gen ya da fenotipik özelliği polimorfik olarak kabul edilmektedir. Polimorfizm; DNA dizisi, amino asit dizisi, kromozomal yapı ya da fenotipik özellik varyasyonları gibi farklı durumlarda görülmektedir. DNA'daki polimorfizmleri belirlemede çeşitli moleküler markörler kullanılmaktadır. Belirtilen moleküler markörler; polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı ve hibridizasyon tabanlı olmak üzere iki sınıfta toplanmaktadır (Gupta ve ark., 1994).

Hibridizasyon tabanlı markör yöntemleri RFLP (Sınırlayıcı Enzim Parçaları Uzunluk Polimorfizmleri), PCR tabanındaki markör çeşitlerinden bazıları da ISSR (Kısa Bitişik Tekrarlar veya Mikrosatellit), RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA), AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi)'dir (Şahin ve ark., 2019)

1.6.1. Hibridizasyona Dayalı Moleküler Markörler

Hibridizasyona dayalı belirteçlerde DNA profili, restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA fragmanlarının oluşturularak tanınan sekansların elde edilmesi DNA segmentlerine özel bir probun bağlanarak hibridizasyona uğratılmasıyla görüntülenmesi prensibine dayanmaktadır.

Bu teknik RFLP (sınırlı parça uzunlukları polimorfizmi) analizi ile çok yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. RFLP analizi dokulardan izole edilen genomik DNA'nın nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince spesifik olarak kesilmesi ve prob DNA'nın melezlendiği DNA etrafındaki farklı kesim yapılarının saptanması prensibine dayanmaktadır. Genomik DNA'nın kesimi 4–6 nükleotid tanıyan enzimlerce yapılmaktadır. Kesim sonrasında DNA'ya jel elektroforezi uygulandığında taşıdığı negatif yüklerden dolayı pozitif yöne doğru hareket eder ve DNA'nın bu hareketi kütesinin logaritması ile ters orantılı olarak gerçekleşir. Kesilen parçalar agaroz jel elektroforezi sonucunda jel içinde büyüklüklerine göre sıralanırlar. Bu sıralama sonrası DNA jel ortamdan daha kullanışlı olan naylon filtrelere tek iplik halinde southern transfer metoduyla transfer edilmektedir. RFLP tekniği türler, cinsler hatta familyalar arasında transferi mümkün olması, farklı laboratuvarlarda ve farklı araştırmacılar tarafından aynı sonuçlara ulaşılabilmesi bakımından oldukça güvenilir olması, RFLP markörleri kodominant özellikte oldukları için heterozigotların belirlenmesinde ve karakterizasyonlarında kullanılmaları, orta düzeyde polimorfizm göstermeleri avantajları arasındadır. RFLP tekniğinin dezavantajları ise analizleri pahalı, fazla zaman alıcı ve çok fazla iş gücü gerektirmekte, çoğu durumlarda yaygın olarak radyoaktif etiketleme yöntemi kullanılmakta, kalitesi yüksek olan DNA'ya (10-20 µg) ihtiyaç duyulması, kopya sayısını az olması, edilen dizilişlerin genomlarda belli noktalarda yoğunlaşmasından dolayı RFLP belirteçleri genom üzerinde rastgele dağılım göstermemesidir. Bu şartlardaki haritalama olumsuz yönde etkiler ve RFLP belirteçleriyle elde edilen haritalamada genellikle büyük boşluk oluşması da olumsuz durumlara yol açar. (Yıldırım ve Kandemir, 2001)

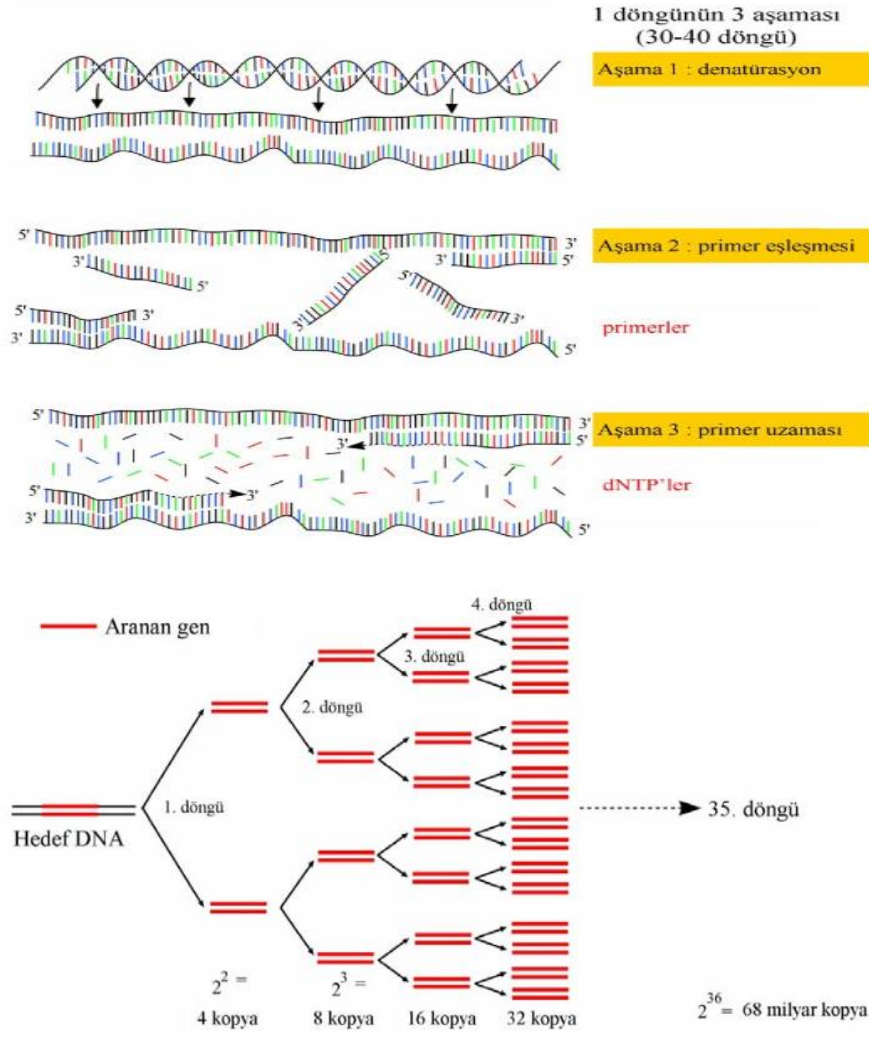
1.6.2. PCR Temelli Moleküler Markörler

Hedeflenen DNA'nın sentezlenmesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin bulunmasıyla yüksek başarı sağlaması sebebiyle PCR yöntemine dayalı moleküler markörlerin üretimi için fazlaca inceleme yapılmıştır (Mullis ve ark., 1987).

Polimeraz zincir reaksiyonu, hücre dışı ortamda DNA'nın enzim etkisi ile çoğaltılmasıdır (Zietkiewicz ve ark., 1994). PCR yöntemi geliştirilirken *Thermus aquaticus* bakterisinden yüksek sıcaklıklara dayanıklı polimeraz (Taq polimeraz) enziminin izole edilmesiyle önemli bir adım atılmıştır (Bornet ve Branchard, 2001).

PCR, çoğaltılmak istenen DNA parçasının her bir ucuna özel primerler kullanılarak, bu bölgedeki DNA dizisinin hücre dışı ortamda çoğaltılmasıyla gerçekleşir. PCR işlemleri

sırasında hedef DNA, primer, nükleotid (dNTP), DNA polimeraz enzimi, tampon çözeltisi ile magnezyum (MgCl₂ veya MgSO₄) içeriğine sahip bileşenler kullanılmaktadır (Şahin, 2019).



Şekil 1. 6. PCR reaksiyonu

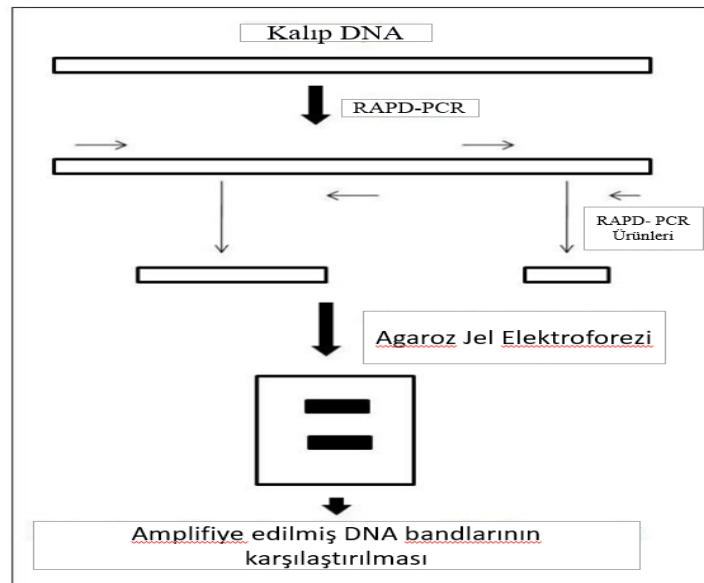
Kaynak: (Vierstraete, 1999).

Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi (RAPD)

Rastgele çoğaltılan polimorfik DNA (RAPD) 1990 yılında ilk kez rastgele seçilen primer dizilerinin kullanılarak ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nu baz alarak ortaya bir tekniktir. RAPD yönteminin temel prensibi ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanıp PCR yöntemini kullanarak hedef DNA parçasını çoğaltmasıdır. Kullanılan primer hem ileri hem geri görevi görürken çoğaltılacak DNA parçasının uzunluğu genellikle 0.5–5 kb aralığında olmaktadır (Kress ve ark. 2005). Polimorfizmleri, primerin bağlandığı bölgenin çeşitlilik durumu ve buna bağlı olarak oluşan farklı uzunluktaki DNA parçacıklarının analizi

ile belirlenir. Sonrasında çoğaltılan ürün agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılabilmekte ve etidyumbromür ya da gümüş nitrat boyası ile görüntüleme yapılmaktadır (Williams ve ark., 1990).

RAPD tekniğinin uygulamasının kolay oluşu, bileşik oligonükleotidlerin oldukça fazla sayıda bulunması ve rahat olması, RFLP'nin aksine küçük oranda DNA'ya ihtiyaç duyulması şeklinde nedenlerden ötürü çoğunlukla kullanılan bir markördür. Ayrıca PCR tabanlı teknikler şeklinde RAPD tekniğinin de harita oluşturma ve karakterize edilmesi çalışmalarda az vakit ve harcamaya ihtiyaç duyulması sebebiyle daha oldukça kullanılan bir teknik olmaktadır. RAPD belirteçleri vakit ve parasal yönden müspet bulunmasına rağmen, baskın belirteçler olmaları sebebiyle yorumlamanın zor olması, karmaşık olması ve rahatlıkla tekrarlanama olanağı sunmaması gibi dezavantajlarına sahiptir. Buna rağmen RAPD-PCR metodunun, genetik varyasyonun araştırılmasında, bitkilerin genetik haritaların çıkarılmasında ve markör sayesinde seleksiyonda yoğun olarak kullanılmasının nedeni, metodun öteki moleküler metotlara nazaran daha ucuz, daha az DNA gerektirmesi ve otomasyona elverişli olmasındandır. RAPD tekniği hızlı netice vermesi, daha ucuzdur ve iş gücü ihtiyacının azlığı, azca oranda DNA'ya ihtiyaç duyulması olması, polimorfizm oranının yüksek olması avantajları içinde yer alırken; RAPD tekniğinin dezavantajları güvenilirliği sınırlıdır, değişik laboratuvarlarda değişik sonuçlar elde edilebilir, hatta bir termocycler aletinden diğerine geçildiğinde bile değişik sonuçlar çıkabilmekte, baskın bir belirteç olması, bu yolla elde edilmiş markörlerin öteki haritalara aktarılmasında zorluklar çıkarabileceği görülmektedir (Kress ve ark. 2005).



Şekil 1. 7. RAPD Reaksiyonunun şematik gösterimi

Kaynak: (Vierstraete, 1999).

1.7. *A. cepa*'nın Toksikoloji Çalışmalarında Kullanımı

Arpacık soğan, soğan veya mısır soğanı gibi farklı geleneksel isimle bilinen Alliaceae familyasına ait olan *A. cepa*, diploit yapıda 16 kromozoma sahiptir. *A. cepa*, genotoksikoloji çalışmaları için kullanımının duyarlı olması, manipüle edilmesi kolay olması, hızlı yanıt biyoanalizör olması, ucuz olması gibi birçok avantaja sahiptir. Ayrıca, *A. cepa* ucuz, kullanımı kolay ve yetiştirilmesi zahmetsiz olan bir bitki türü gentoksiosite çalışmalarında tercih edilen bir yapıdadır. (Fenech ve ark. 2003). *A. cepa*'nın taksonomisi Tablo 1.3'te gösterilmektedir.

Tablo 1. 3. *A. cepa*'nın taksonomisi

Taksonomi Derecele	Taksonomi Adı
Sınıfı	Monocotyledons
Superorderı	Liliiflorae
Takımı	Asparagales
Ailesi	Alliaceae
Tribesi	Alliae
Cinsi	<i>Allium</i>
Türü	<i>Allium cepa</i>

Kaynak: (Uniprot, 2020).

Bu çalışmada, tekstil endüstrisinde kullanılan Reactive Orange 16 boyasının farklı periyot ve konsantrasyonlarda, *A. cepa* bitki DNA'sı üzerindeki genotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla; DNA tabanlı moleküler belirteçlerden olan ISSR ve RAPD primerleri kullanıldığı PCR yöntemi tercih edilmiştir. Reactive Orange 16 tekstil boyası uygulanan örnekler ile uygulanmayan kontrol grubuna ait PCR amplifikasyon ürünlerinin karşılaştırmalı analizi sonucu; bitki DNA örneklerinde boyaya bağlı olası değişimlerin tespiti amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçların, tekstil boyalarının canlı sağlığı ve evre üzerindeki potansiyel tehditlerinin belirlenmesi ve canlı sağlığının korunmasına katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

2.MATERYAL VE METOT

2.1.Materyal

2.1.2.Bitki Materyali

Yapılan bu araştırmada model organizma olarak ticari halde satılan soğan (*A. cepa*) bitkisi kullanılmıştır.

2.2.Metot

2.2.1. *A. cepa* Örneklerinin Çimlendirilme Süreci

A. cepa örnekleri suda çimlendirilmek üzere kök uçları bir iğne yardımıyla uyarılmıştır. Tüm örnekler 15 ml'lik falkon tüplere distile suyu konulup tüplerin etrafı alüminyum folyo ile sarılarak karanlık bir ortamda çimlendirilmiş ve 3. günde kök uzunlukları 3-4 cm olunca örnekler nazikçe toplanmıştır.



Şekil 2. 1 Çimlendirilmiş *A. cepa*

2.2.2. *A. cepa* Kökünün Reactive Orange 16 ile Muamele Edilmesi

Tekstil boyası olan reactive orange 16 Tablo 2.1'de gösterildiği üzere farklı konsantrasyonlarda 50 ml'lik stoklar hazırlanmıştır. DNA izolasyonu yapılması için bir test grubu ve üçlü gruplar halinde toplam 18 tane 50 ml'lik falkon tüpü hazırlanarak adlandırılmıştır. Hazırlanmış stoklardan öncesinde hazırlanıp ve numaralandırılmış 50 ml'lik tüplere Tablo 2.1.'deki konsantrasyonlar sırası ile dağıtılıp üzeri 50 ml' ye distile suyla tamamlanmıştır.

Tablo 2. 1. Kullanılan RO16 konsantrasyonları.

RO16 Konsantrasyonu
5 ppm
10 ppm
50 ppm
75 ppm
100 ppm
150 ppm

A. *cepa* köküyle muameleye tutulan RO16 boya konsantrasyonu, işlem saatleri ve tüp numaralandırması Tablo 2.2.'da gösterilmiştir.

Tablo 2. 2. A. *cepa* köküne uygulanan RO16 konsantrasyonu, işlem saatleri ve tüp numaraları.

Reactive Orange 16 konsantrasyonu	Örnek numarası ve saati
5 ppm	(2/24), (8/48), (14/72)
10 ppm	(3/24), (9/48), (15/72)
50 ppm	(4/24), (10/48), (16/72)
75 ppm	(5/24), (11/48), (17/72)
100 ppm	(6/24), (12/48), (18/72)
150 ppm	(7/24), (13/48), (19/72)

Örnekler RO16 konsantrasyonları dağıtılan falkon tüpe konulup tüplerin altına ışık gelemeyecek biçimlerde alüminyum folyo ile sarılıp 24,48 ve72 saatlik muamele işlemlerine bırakıldı. Örneklerin boya ile muamelesi yapılırken kontrol grubu yalnızca çeşme suyu ile muamele edildi. Muamelere işlemleri sonun A. *cepa*'nın kök kısımları DNA izolasyonları için alüminyum folyolara sarılarak bir sonraki çalışma için -20° C' de saklanmıştır.

2.2.3. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonları için ticari EURx Plant DNA Purification Kit'i kullanılmıştır. Kit Protokolünde:

- Kalıp DNA örneklerinin konulacağı ependorflar hazırlanıp numara verilmiştir.

- Çalışma öncesinde su banyosu 65 °C'ye gelecek şekilde ayarlanmıştır.
 - Çalışma kolonlarına 40 µl Buffer P konulup, *A. cepa* kökü -20° C'den çıkarılarak azotla öğütülür.
 - Sıvı azot yardımıyla öğütülen her kök için eppendorf tüpler hazırlanarak numaralandırılır.
 - Örnekleri dikkatlice hazırlanmış ependorflara konulur
 - Her bir örnek için kolonlar hazırlanıp numaralandırılır.
 - Sıvı azot ile öğütülmüş her bir örnek için 400 µl Lyse P konularak lizis yapılır.
 - 7µl proteinaz K ile 2,5µl RNase üstlerine sırayla eklenir.
 - Örnek maddeler su banyosuna konularak 65 °C'de 30 dk. bekletilir.
 - Örneklere 130 µl AC Buffer eklenip alt üst edilerek örnekler 5 dk buzda bekletilir ve 10 dk. 15000 g'de lizatlar santrifüj edilir.
 - Her bir örnek 400 µl süpernatantı yeni bir tüpe aktarılıp üzerine 350 µl Buffer Sol P'den örneklere eklenir.
 - 250 µl %96'lık etanolden her bir örneğe eklenip ardından tüpler birkaç defa alt üst edilerek 1 dk. boyunca 14000 g'de santrifüj yapılır.
 - Süpernatantlar'ın 600 µl'si spin kolonlarına konulup 1 dk. boyunca 14000 g'de santrifüjlenir.
 - Spin kolonu alınarak toplama tüpündeki sıvı boşaltılarak kolonlar yeniden tüplere yerleştirilir.
 - 500 µl Buffer Wash PX spin kolonuna her bir misal için eklendi ve 1 dk. 14000 g'de santrifüjlenir.
 - Spin kolonu çıkarılıp toplama tüplerindeki sıvı atılır ve kolonlar tekrar yerleştirilir.
 - 500 µl Buffer Wash PX spin kolonuna her bir misal için eklenir ve 14000 g'de 2 dk. santrifüjlenir.
 - Spin kolonundan alınarak çalışma başlangıcında hazırlanmış kalıp DNA'ların bulunması gereken tüplere konulup Elution Bufferdan 150 µl her bir örnek için kolonun orta kısmından eklenip örnekler oda sıcaklığında 3 dk. inkübasyon yapılır.
 - Örnekler 14000 g'de 1 dk. santrifüjlenerek spin kolonları atılır ve toplama tüplerinde kalan DNA bir sonraki aşama için için 4°C'ye alınır
- Yapılan çalışma için 18 RO16 ile 1 kontrol grubu kullanılıp *A. cepa* köklerinden toplamda 19 örnek izole edilmiştir.

2.2.4. DNA Konsantrasyonu, Saflık ve Kalite Tayininin Spektrofotometre ile Yapılması

İzole edilmiş olan genomik DNA materyali PCR aşamasına geçildikten sonra saflık derecesi ve kalite miktarı ölçmek için Nanodrop Spektrofotometre cihazında nanogram/mikrolitre cinsinden miktarları ile saflık dereceleri 260 ve 280 nm dalga boylarında okunması yapılarak, tespit edilmiştir. Yapılan ölçümden elde edilen DNA peletleri, DNA izolasyonu esnasında Elution Bufferla çözündürülmesinden dolayı kör olarak Elution Buffer kullanılmıştır. Ölçümlerde 260/280 nm dalga boyun oranı 1.8'den büyük 2'den küçük olan ölçümler PCR için uygunabilir olarak belirlenmiştir.

2.2.5. RAPD-PCR ile ISSR-PCR İçin Hedef DNA'nın Hazırlanması

Bitki genomik DNA'sından µl'de 2 ng DNA miktarı olacak biçimde steril deiyonize su ile seyreltme yapılmıştır.

2.2.6. ISSR-PCR Analizleri

Yapılan işlem için ISSR markör primerlerinden 5 adet kullanılıp her bir primerden tüm örneklerle PCR çalışması yapılmıştır.

2.2.7. ISSR-PCR Hazırlığı ve Koşulları

Kullanılacak ISSR primerleri PCR aşamasında uygun biçimde bağlanabilmesi için bağlanma sıcaklığı $(A+T \text{ sayısı}) \times 2 \text{ } ^\circ\text{C} + (G+C \text{ sayısı}) \times 4 \text{ } ^\circ\text{C} = T_A \text{ } ^\circ\text{C}$ formülüyle hesaplandı.

ISSR primerleri, ticari olarak sentezletilmiş ve bu çalışma için kullanılmıştır.

Tablo 2. 3. Kullanılan ISSR primer bilgileri.

Primer Kodu	Primer Dizisi	T _A °C	Sonuç
ISSR-7	GACAGACAGACAGACA	47,2	+
ISSR-9	GGATGGATGGATGGAT	47,2	+
ISSR-309	GAGAGAGAGAGAGAGAA	47,2	+
ISSR310	AGAGAGAGAGAGAGAGG	47,2	+
ISSR-847	CACACACACACACARC	53.7	+

ISSR-PCR reaksiyonları 25µl'lik hacimlerde yapılmıştır. Reaksiyon içeriği Tablo 2.4.'de verilmiştir

Tablo 2. 4. ISSR-PCR bileşen ve miktarları.

PCR İçeriği	Hacim/Final Konsantrasyonu
H ₂ O	14,8µl
10x Enzim Tamponu	2,5µl (fin. 1x)
25 mM MgCl ₂	1,5µl (fin. 2,5µM)
2,5 mM dNTP Mix	2µl (fin. 2,5µM)
2,5 mM Primer	2µl (fin. 2,5µM)
DNA	2µl (final 4ng)
Enzim (Taq Polimeraz)	0,2µl
Toplam	25µl

ISSR-PCR aşamaları Thermal Cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR için koşullar, Tablo 2.5.'de verilmiştir.

Tablo 2. 5. ISSR-PCR reaksiyon protokolü.

Aşamalar	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç DNA Denatürasyonu	1	95	4dk.
DNA Denatürasyonu		94	45 sn.
Annealing (Primer Oturma Isısı)	40	47.2-52.8	45 sn.
Fragment Uzama		72	90 sn.
Final Uzama		72	7 dk.

2.2.8. ISSR-PCR Ürünlerinin Agaroza Jel Elektrofrez ve Fotoğraflanması

5X TBE stok tamponunun seyreltilmesi agaroz jel elde edilip 0.5X TBE tamponu ile hazırlandı. % 1,2'lik agaroz ve 0.5X TBE tamponu içerisinde kaynatılıp jel katılmasından 10X'lik 2 µl etidyum bromid ile karıştırılarak jel tablasına döküldü. 100 bç'lik DNA ladder bant büyüklüğünü belirlemek için her jelin ilk kuyucuğuna yüklendi. PCR ürünleri her bir kuyucuğa 7 µl örnek 1 µl yükleme boyası olmak üzere 8 µl yüklenip ve 90 Voltta 90 dk. yürütülmüştür.

Yürütülen agaroz jellerin her biri Carestream Gel Logic 212 Pro jel dokümantasyon cihazı kullanılarak fotoğraflanmıştır.

2.2.9. RAPD-PCR Analizleri

RAPD primerlerinden seçilen 5 adet kullanılıp her bir primer için örneklerin hepsine PCRişlemi uygulanmıştır.

2.2.10. RAPD-PCR Hazırlığı ve Koşulları

Kullanılan RAPD primerlerinin genomik DNA'ya PCR sırasında uygun koşullarda bağlanabilmesi için bağlanma sıcaklıkları;

$(A+T \text{ baz sayıları}) \times 2 \text{ }^{\circ}\text{C} + (G+C \text{ baz sayıları}) \times 4 \text{ }^{\circ}\text{C} = T_A \text{ }^{\circ}\text{C}$ formülle hesaplanmıştır.

RAPD markör primerleri, ticari olarak sentezletilmiş ve bu çalışma için kullanılmıştır (Tablo 2.6.).

Tablo 2. 6. Çalışmada kullanılan RAPD primer bilgileri.

Primerin Adı	Primerin Baz Dizisi	T _A °C	Amplifikasyon
RAPD P5	CTGCGACGGT	32	+
RAPD P11	GGCCGATGAT	32	+
RAPD P13	ACCGGCTTGT	32	+
RAPD P17	TGGTGGCCTT	32	+
RAPD P23	CGCCCAAGCC	32	+

25 µl'lik hacimlerde hazırlanan RAPD-PCR reaksiyonları her örnek için uygulanmıştır. Reaksiyon içeriği Tablo 2.7.'de verilmiştir.

Tablo 2. 7. Kullanılan RAPD-PCR bileşenleri ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
H ₂ O	12,8µl
10x Enzim Tamponu	2,5µl (fin.1x)
25 mM MgCl ₂	1,5µl (fin. 2,5µM)
2,5 mM dNTP Mix	2µl (fin. 2,5µM)
2,5 mM Primer	4µl (fin. 2,5µM)
DNA	2 µl (final 8ng)
Taq Polimeraz	0.2µl
Toplam	25µl

RAPD-PCR reaksiyonlarında 96-Well Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. PCR reaksiyonunun koşulları Tablo 2.8.'te verilmiştir.

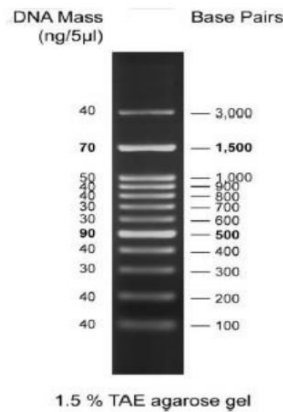
Tablo 2. 8. RAPD-PCR reaksiyon protokolü.

Aşamalar	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç DNA Denatürasyonu	1	95	5 sn
DNA Denatürasyonu		95	5sn
Annealing (Primer Oturma Isısı)	45	32	1 dk.
Fragment Uzama		72	2 dk.
Final Uzama	1	72	7dk.

2.2.11. RAPD-PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrez ve Fotoğraflanması

Amplifikasyon reaksiyonları sonucu RAPD-PCR ürünleri yatay jel elektrofrez sistemi (Thermo, Amerika) ile %1,23'lük agaroz jel'de yürütülmüştür.

5X TBE stok tampon solüsyonunun seyreltilmesi agaroz jel elde edilip 0.5X TBE tamponu ile hazırlandı. %1,2'lik agaroz ve 0.5X TBE tamponu içerisinde kaynatılıp jel katılaşmadan 10X'lik 2 µl etidyum bromid ile karıştırılarak jel tablasına döküldü. 100 bç'lik DNA ladder bant büyüklüğünü belirlemek için her jelin ilk kuyucuğuna yüklendi. PCR ürünleri her bir kuyucuğa 7 µl örnek 1 µl yükleme boyası olacak şekilde 8 µl yüklenip ve 90 Volta 90 dk. yürütülmüştür. Yürütülen agaroz jellerin her biri Carestream Gel Logic 212 Pro jel dokümantasyon cihazı kullanılarak fotoğraflanmıştır.



Şekil 2. 2. 100 bç'lik DNA marker.

2.2.12. Jel Görüntülerinin Veri Analizi

ISSR ve RAPD primerlerinin her biri için bant profilleri, bant sayımı ve boyut tespiti için, Phoretix 1D Pro yazılımı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Yazılımdan elde edilen ikili veriler (binary data), aritmetik ortalamalı ağırlıksız ikili grup yöntemi (UPGMA) analizi yöntemi ile, örnekler arasındaki genetik uzaklığın değerlendirilmesi ve bir dendrogram çizilmesi için kullanılmıştır. Elde edilen Jaccard Benzerlik Matrisi ile oluşturulan Newick formatındaki genetik benzerlik/farklılık verisinden MEGA 10.1 yazılımı kullanılarak bir dendrogram (genetik benzerlik ağacı) çizilmiştir.

3.BULGULAR

3.1. DNA Konsantrasyonu, Saflık ve Kalite Tayininin Spektrofotometre ile Yapılması

DNA izolasyonu için ticari DNA Purification Kit'i kullanılmıştır ve izole edilen genomik DNA; Nanodrop özellikli Shimadzu Marka Spektrofotometre cihazı kullanılarak 260 ve 280 nm dalga boylarında okunmuş, miktar ve olarak saflık değerleri belirlenmiştir (Tablo 3.1.).

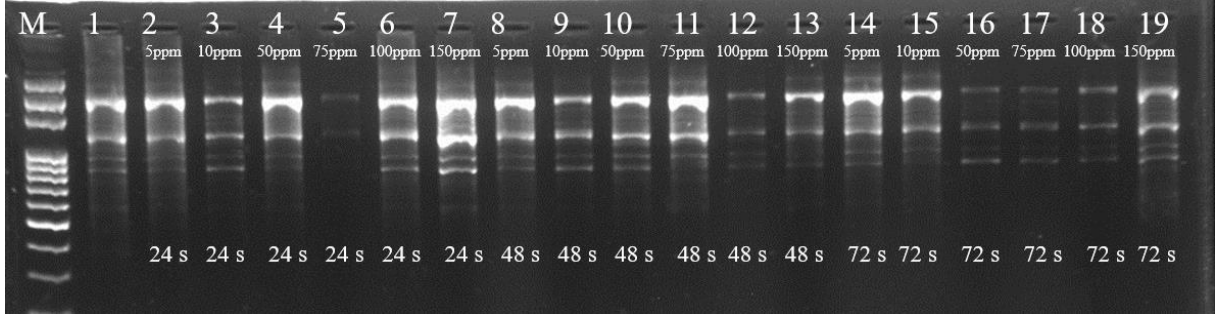
Tablo 3. 1. *A. cepa* DNA miktar ve saflık değerleri.

Örnek No.	Örnek Adı	DNA miktarı (ng/ml)	DNA saflığı OD _(060/280)
1	Kontrol	152,37	1,90
2	5 ppm 24 saat	139,21	1,89
3	10 ppm 24 saat	171,19	1,89
4	50 ppm 24 saat	141,85	1,89
5	75 ppm 24 saat	151,35	1,89
6	100 ppm 24 saat	220,72	1,92
7	150 ppm 24 saat	142,13	1,89
8	5 ppm 48 saat	113,65	1,90
9	10 ppm 48 saat	132,03	1,89
10	50 ppm 48 saat	214,35	1,92
11	75 ppm 48 saat	176,26	1,90
12	100 ppm 48 saat	165,27	1,89
13	150 ppm 48 saat	131,78	1,89
14	5 ppm 72 saat	108,01	1,90
15	10 ppm 72 saat	138,04	1,87
16	50 ppm 72 saat	283,38	1,92
17	75 ppm 72 saat	194,42	1,90
18	100 ppm 72saat	177,49	1,90
19	150 ppm 72 saat	199,76	1,87

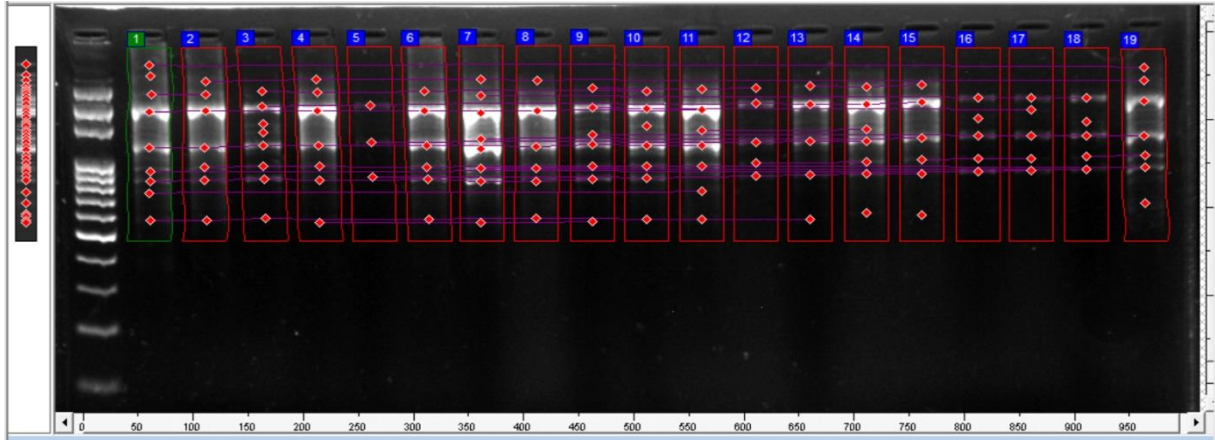
3.2. ISSR-PCR Sonuçları

A. cepa köklerinin farklı konsantrasyonlarda boya ile muamele edilen örneklerinin DNA izolasyonları yapılarak PCR çalışmaları tamamlanmış ve genotoksisite durumlarını araştırmak için yapılan ISSR-PCR çalışmalarındaki jel görüntüleri Şekil 3.1., 3.3., 3.5., 3.7. ve 3.9'da gösterilmiştir. ISSR-PCR sonucunda elde edilen bantların oluşturduğu profiller, Şekil

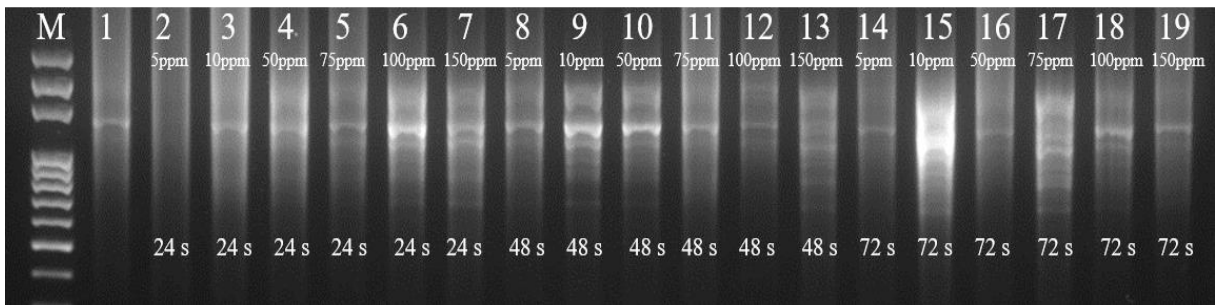
3.2., 3.4., 3.6., 3.8. ve 3.10'da verilmiştir. ISSR-PCR çalışmalarına bağlı olarak ISSR primerlerine ait dendrogramlar a: ISSR-07, b: ISSR-09, c: ISSR-309, d: ISSR-310, e: ISSR-847 Şekil3.11.'de bant profillerinden elde edilen dendrogramı Şekil 3.12.'de verilmiştir. ISSR-PCR çalışması sonucu Jaccard benzerlik matrixi ise Şekil 3.13.'de gösterilmiştir



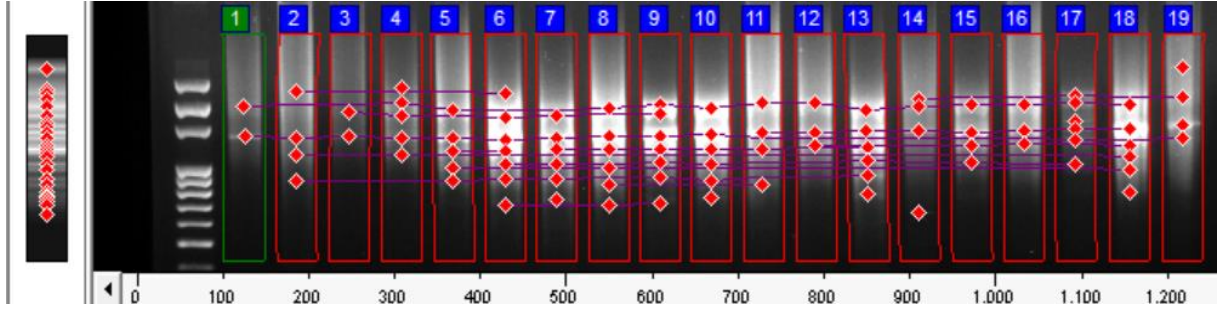
Şekil 3. 1. ISSR-07 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.



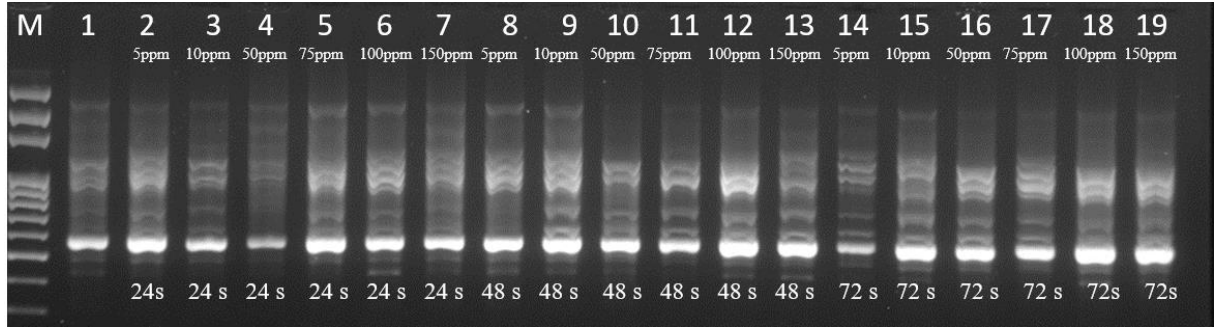
Şekil 3. 2. ISSR-07 primeri bant profili



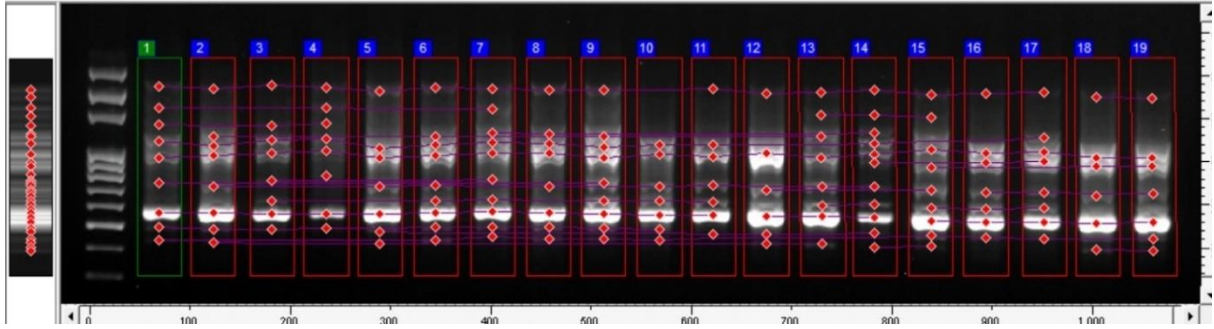
Şekil 3. 3. ISSR-09 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.



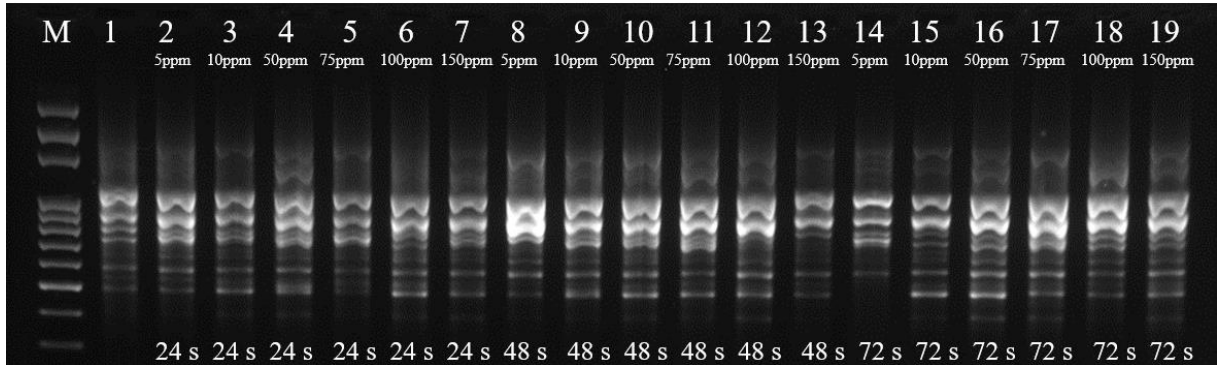
Şekil 3. 4. ISSR-09 primeri bant profili



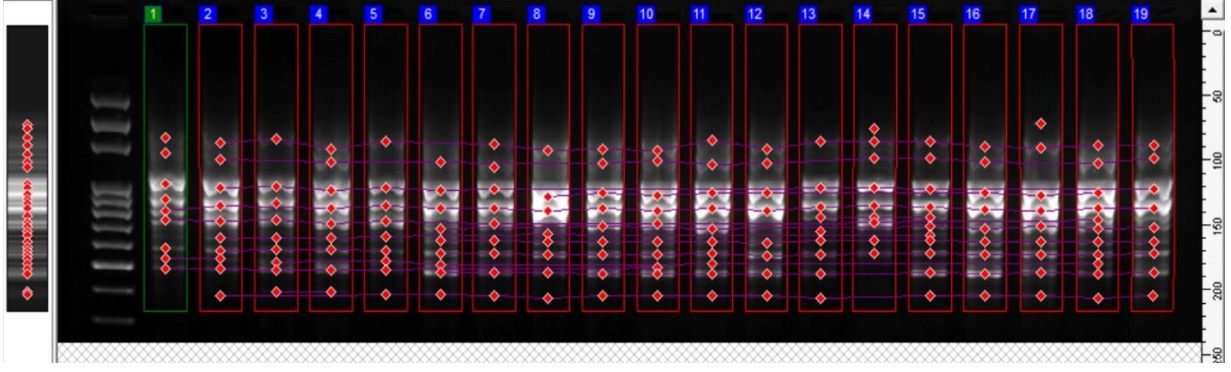
Şekil 3. 5. ISSR-309 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.



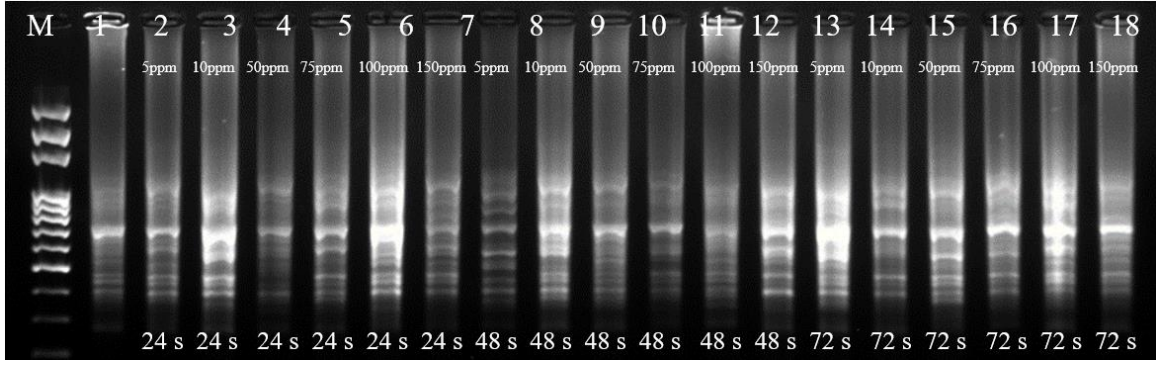
Şekil 3. 6. ISSR-309 primeri bant profili



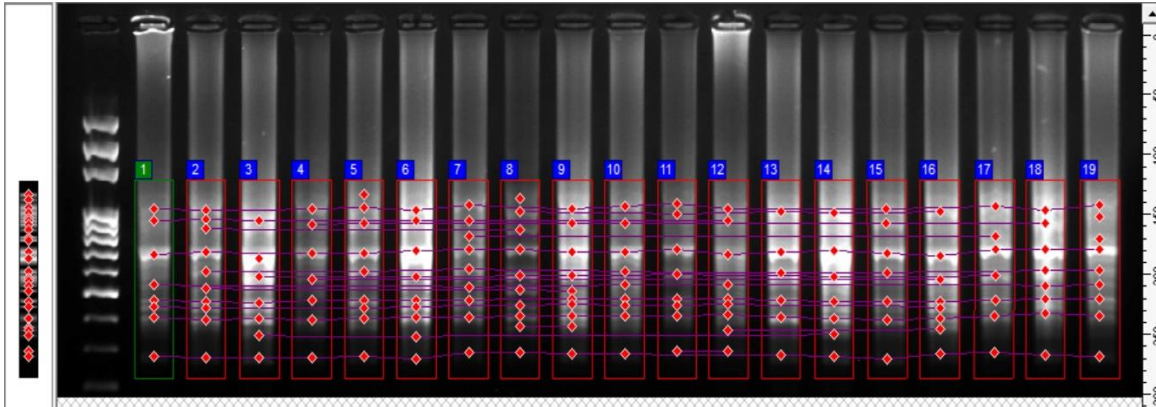
Şekil 3. 7. ISSR-310 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.



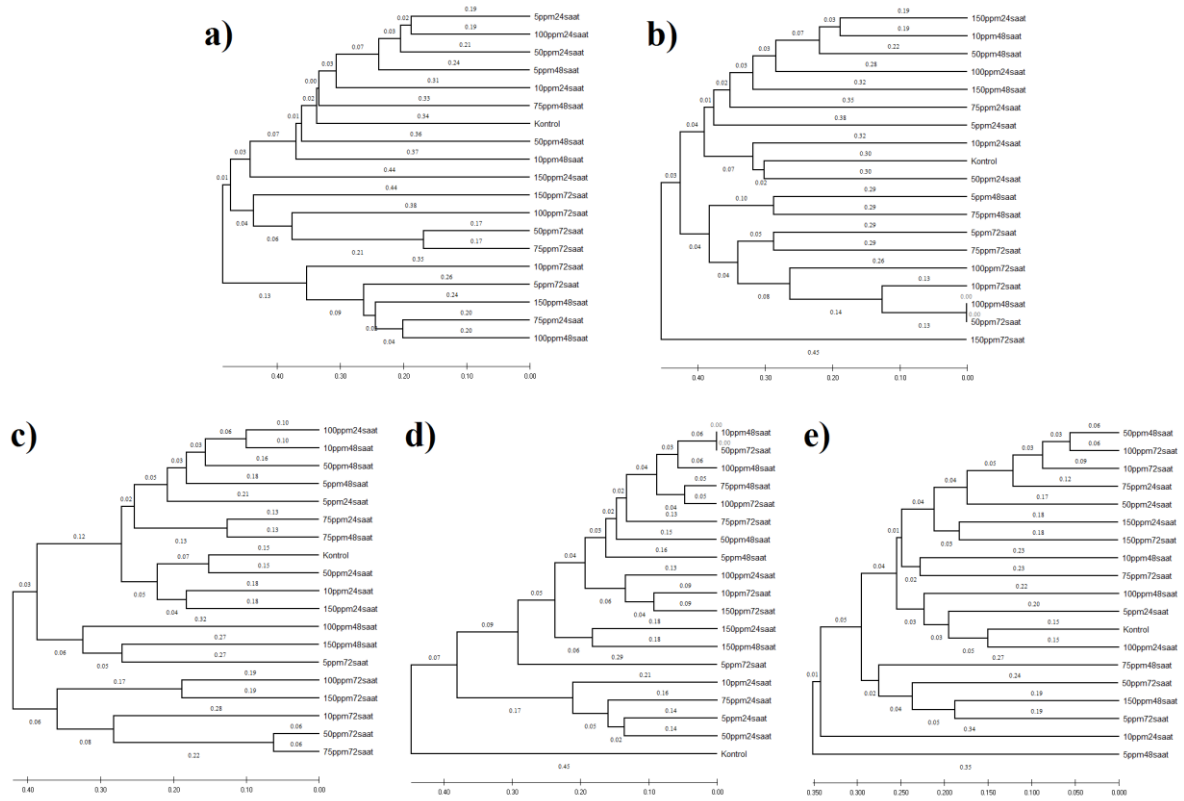
Şekil 3. 8. ISSR-310 primeri bant profilleri.



Şekil 3. 9. ISSR-847 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.



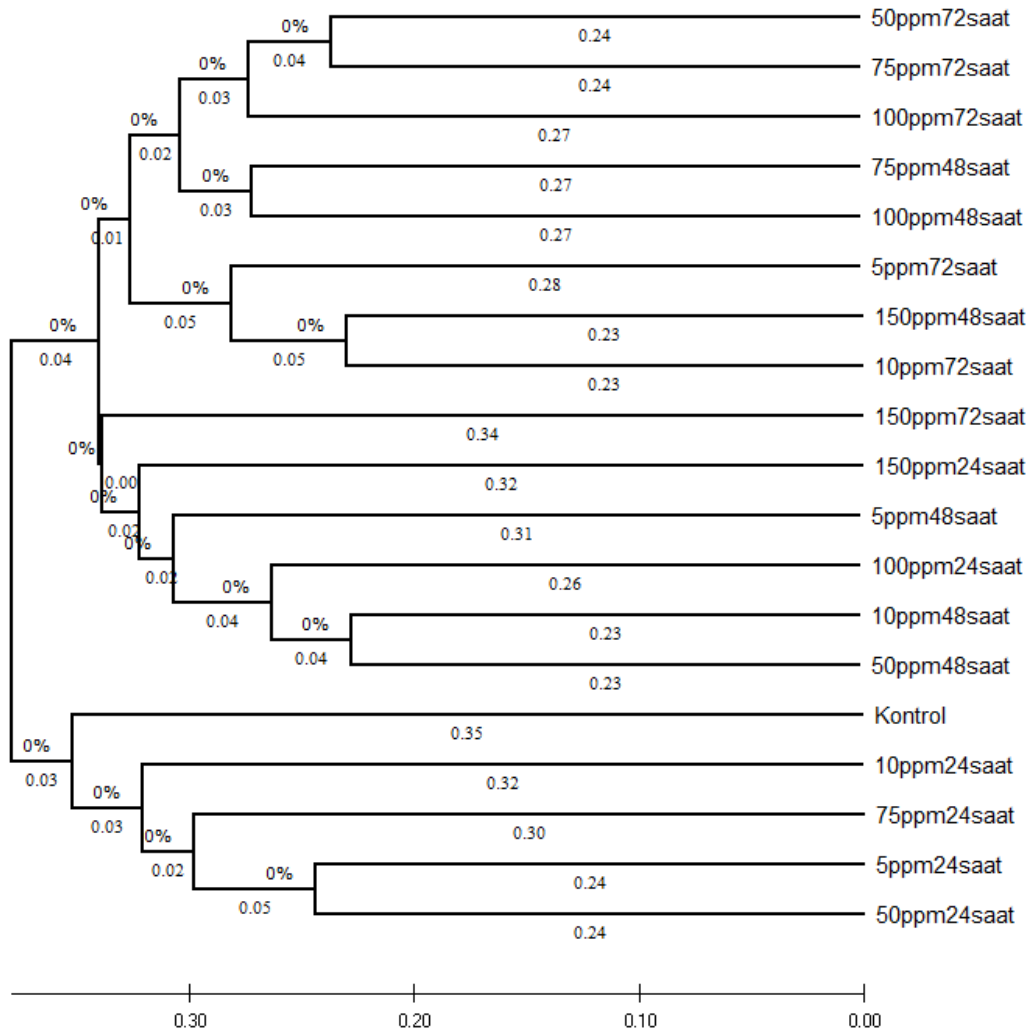
Şekil 3. 10. ISSR-847 primeri bant profili.



Şekil 3. 11. ISSR primerlerine ait dendrogramlar a: ISSR-07, b: ISSR-09, c: ISSR-309, d: ISSR-310, e: ISSR-847.

Kontrol	5ppm24saat	10ppm24saat	50ppm24saat	75ppm24saat	100ppm24saat	150ppm24saat	5ppm48saat	10ppm48saat	50ppm48saat	75ppm48saat									
100ppm48saat	150ppm48saat	5ppm72saat	10ppm72saat	50ppm72saat	75ppm72saat	100ppm72saat	150ppm72saat	150ppm72saat											
Kontrol	1	0.405	0.227	0.302	0.256	0.283	0.224	0.234	0.220	0.304	0.239	0.205	0.149	0.146	0.143	0.178	0.196	0.184	0.188
5ppm24saat		1	0.357	0.513	0.425	0.442	0.340	0.356	0.333	0.400	0.277	0.217	0.239	0.184	0.255	0.191	0.184	0.245	0.304
10ppm24saat			1	0.421	0.300	0.357	0.208	0.191	0.204	0.234	0.170	0.109	0.156	0.205	0.149	0.085	0.128	0.120	0.146
50ppm24saat				1	0.385	0.341	0.304	0.261	0.356	0.364	0.239	0.178	0.174	0.222	0.273	0.205	0.196	0.261	0.267
75ppm24saat					1	0.295	0.289	0.244	0.283	0.415	0.222	0.308	0.368	0.293	0.385	0.214	0.233	0.333	0.250
100ppm24saat						1	0.370	0.356	0.524	0.432	0.429	0.273	0.295	0.234	0.311	0.273	0.318	0.271	0.333
150ppm24saat							1	0.292	0.383	0.391	0.220	0.267	0.349	0.204	0.333	0.239	0.341	0.348	0.356
5ppm48saat								1	0.465	0.348	0.439	0.250	0.302	0.213	0.234	0.310	0.295	0.277	0.229
10ppm48saat									1	0.548	0.476	0.349	0.311	0.224	0.356	0.381	0.463	0.370	0.348
50ppm48saat										1	0.419	0.390	0.415	0.255	0.395	0.326	0.372	0.409	0.356
75ppm48saat											1	0.459	0.341	0.302	0.326	0.421	0.366	0.372	0.289
100ppm48saat												1	0.378	0.368	0.432	0.471	0.333	0.410	0.286
150ppm48saat													1	0.472	0.543	0.342	0.325	0.302	0.279
5ppm72saat														1	0.410	0.300	0.286	0.267	0.244
10ppm72saat															1	0.432	0.410	0.450	0.357
50ppm72saat																1	0.529	0.486	0.317
75ppm72saat																	1	0.425	0.366
100ppm72saat																		1	0.405
150ppm72saat																			1

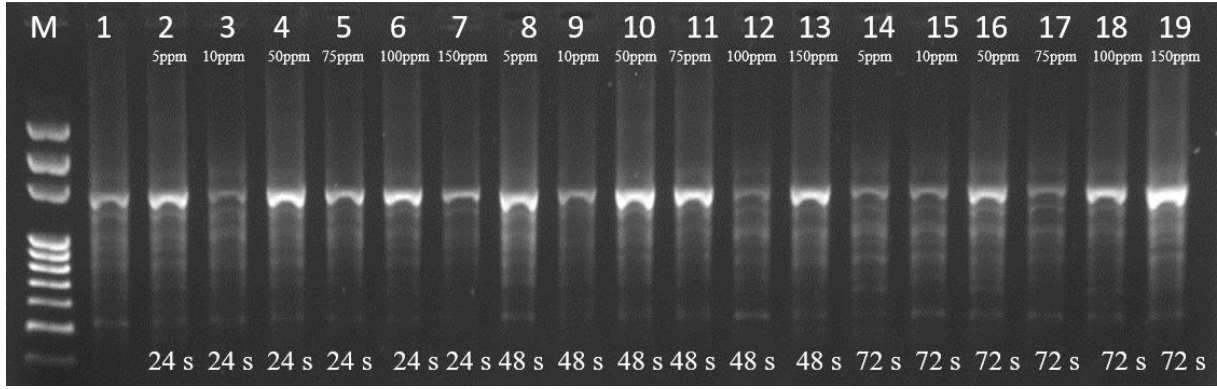
Şekil 3. 12. ISSR-PCR primer verilerinin tamamından elde edilen ortak Jaccard benzerlik matrixi.



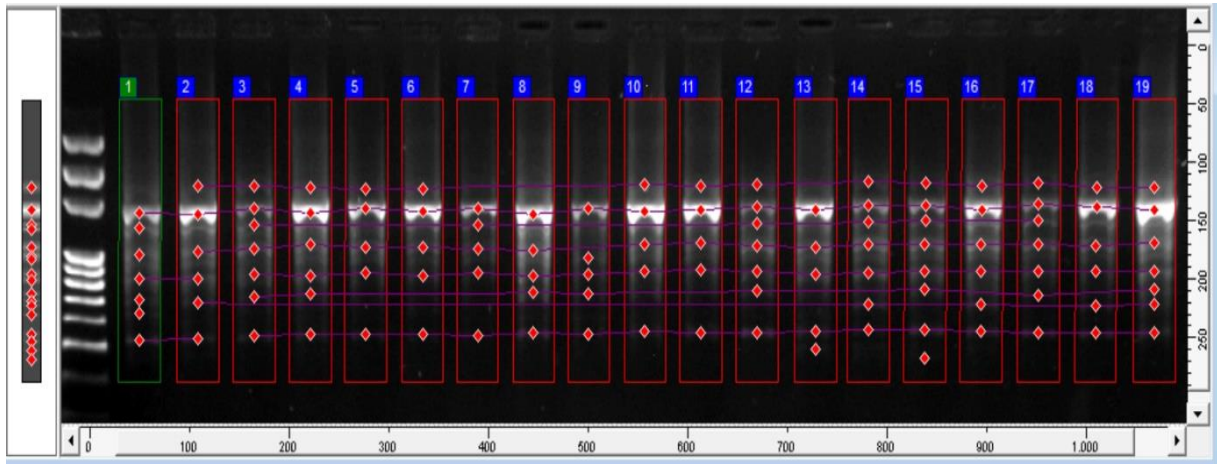
Şekil 3. 13. ISSR-PCR primerinden elde edilen ortak dendrogram görüntüsü.

3.3. RAPD-PCR Sonuçları

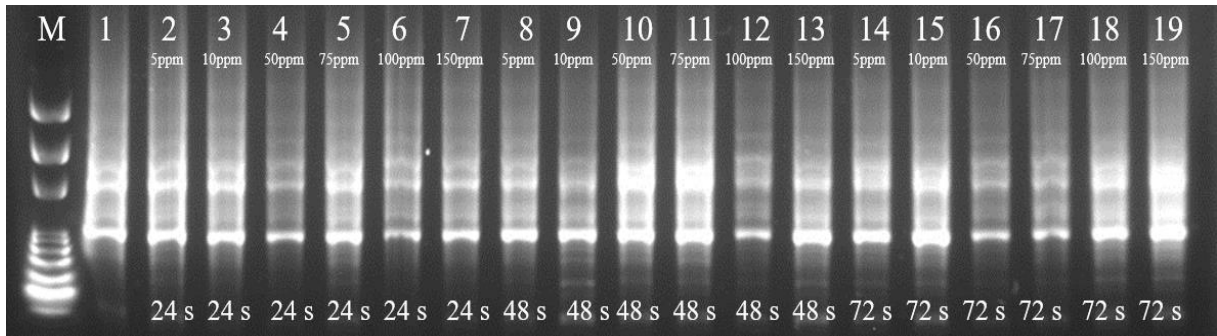
A. cepa köklerinin farklı konsantrasyonlarda boya ile muamele edilen örneklerinin DNA izolasyonları yapılarak PCR çalışmaları tamamlanmış ve genotoksisite durumlarını araştırmak için yapılan RAPD-PCR çalışmalarındaki jel görüntüleri Şekil 3.14., 3.16., 3.18., 3.20. ve 3.22’de gösterilmiştir. RAPD-PCR çalışmalarından elde edilen bant profilleri, Şekil 3.15., 3.17., 3.19., 3.21. ve 3.23’de; RAPD primerlerine ait dendrogramlar a: RAPD-P5, b: RAPD-P11, c: RAPD-P13, d: RAPD-P17 Şekil 3.24.’de, RAPD-P23.RAPD-PCR çalışmasındaki bant profiline göre elde edilen dendrogram, Şekil 3.25.’de ve RAPD-PCR çalışmaları sonucu jaccard benzerlik matrixi Şekil 3.26.’de verilmiştir.



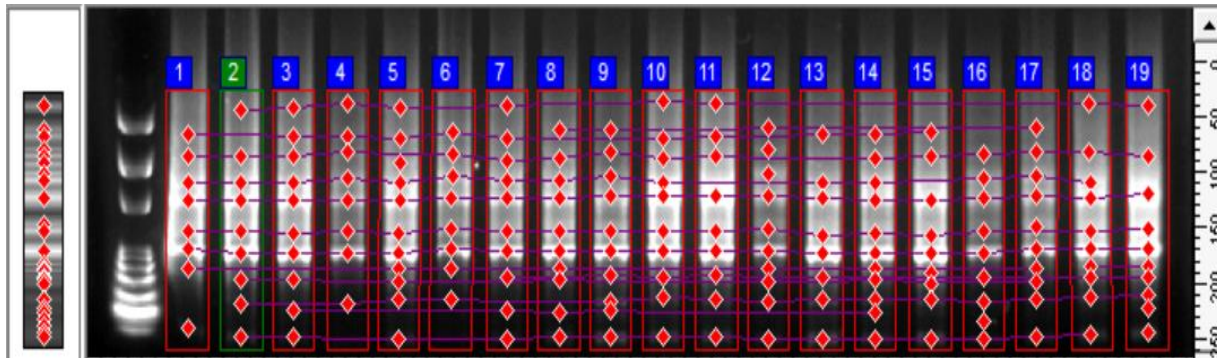
Şekil 3. 14. RAPD-P5 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.



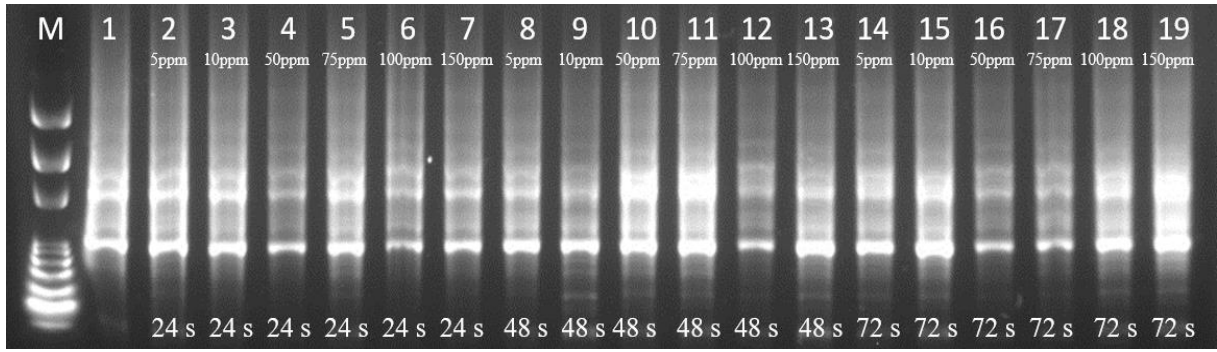
Şekil 3. 15. RAPD-P5 primeri bant profili.



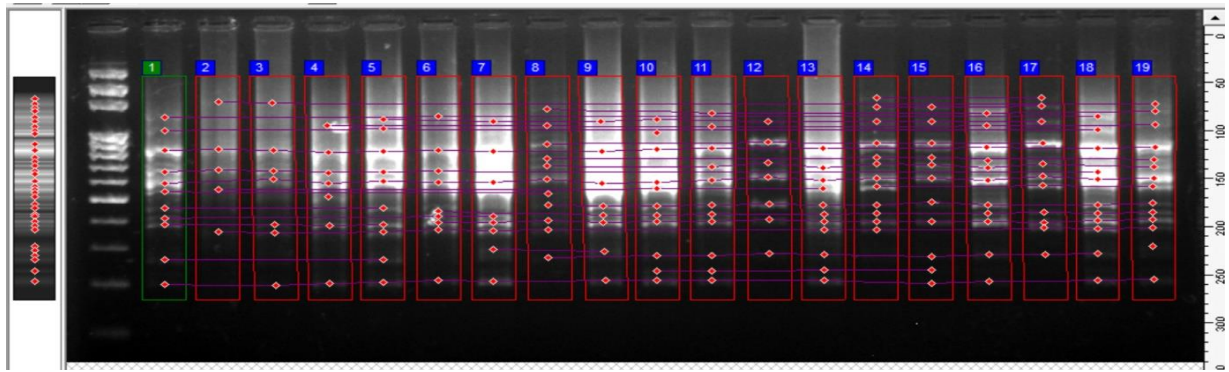
Şekil 3. 16. RAPD-P11 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.



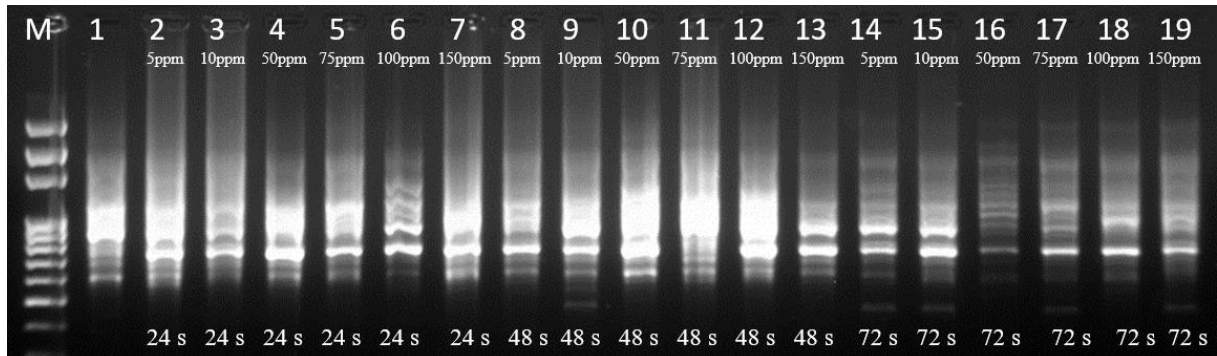
Şekil 3. 17. RAPD-P11 primeri bant profili.



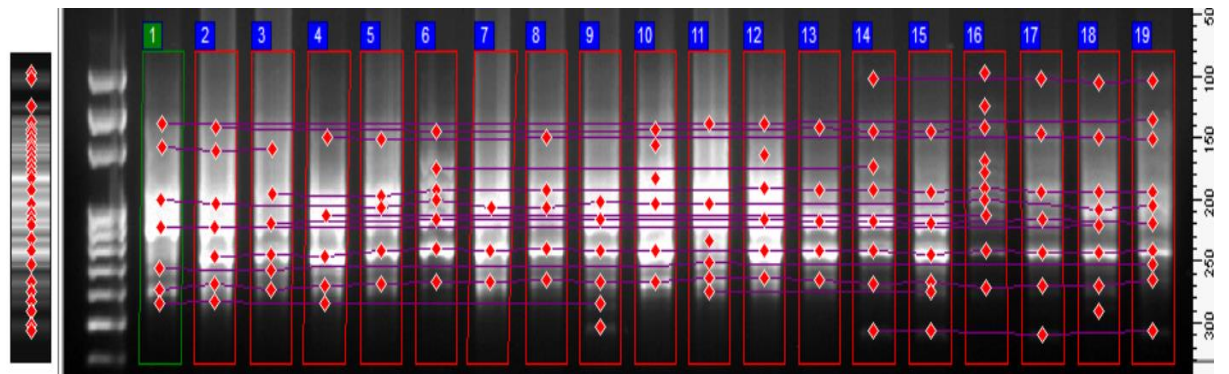
Şekil 3. 18. RAPD-P13 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.



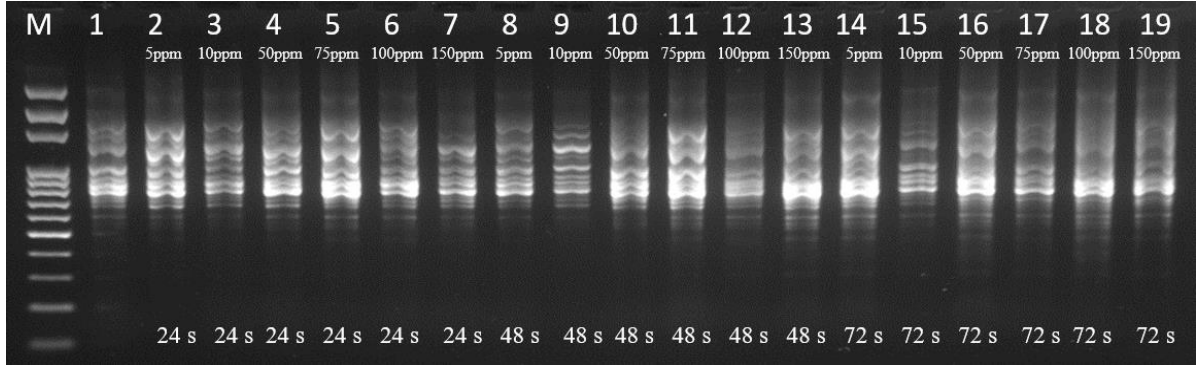
Şekil 3. 19. RAPD-P13 primeri bant profili.



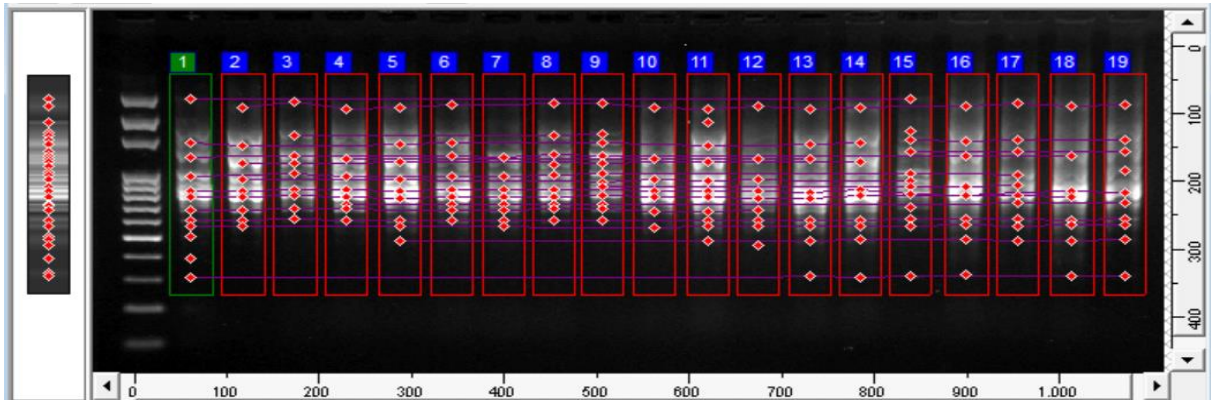
Şekil 3. 20. RAPD-P17 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.



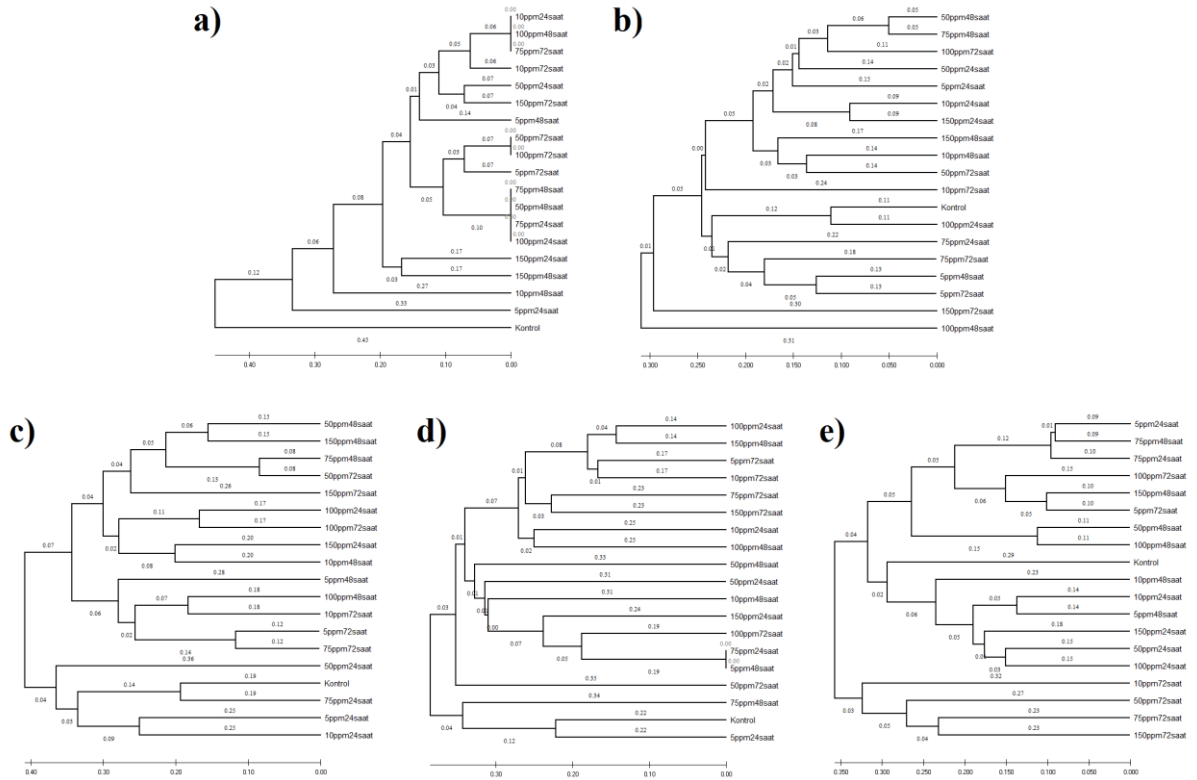
Şekil 3. 21. RAPD-P17 primeri bant profili.



Şekil 3. 22. RAPD-P23 primer agaroz jel görüntüsü. M: Markör, 1: Kontrol, 2-19: Test grubu.



Şekil 3. 23. RAPD-P23 primeri bant profili.

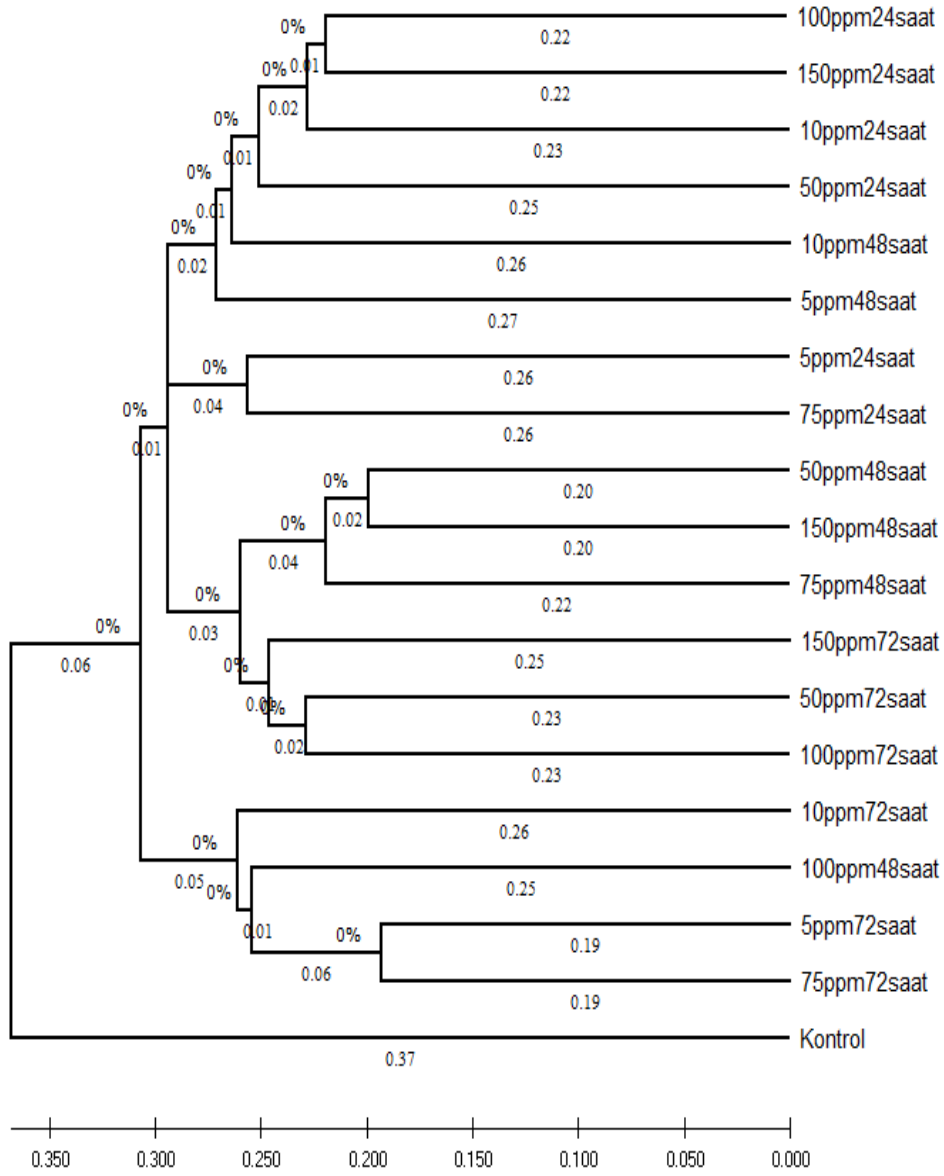


Şekil 3. 24. RAPD primerlerine ait dendrogramlar a: RAPD-P5, b: RAPD-P11, c: RAPD-P13, d: RAPD-P17, e: RAPD-P23.

Kontrol	5ppm24saat	10ppm24saat	50ppm24saat	75ppm24saat	100ppm24saat	150ppm24saat	5ppm48saat	10ppm48saat	50ppm48saat	75ppm48saat									
100ppm48saat	150ppm48saat	5ppm72saat	10ppm72saat	50ppm72saat	75ppm72saat	100ppm72saat	150ppm72saat												
Kontrol	1	0.350	0.333	0.295	0.349	0.383	0.339	0.246	0.265	0.235	0.279	0.183	0.239	0.211	0.195	0.200	0.154	0.313	0.200
5ppm24saat		1	0.471	0.373	0.490	0.423	0.373	0.305	0.351	0.442	0.393	0.316	0.370	0.383	0.239	0.328	0.266	0.436	0.299
10ppm24saat			1	0.521	0.519	0.540	0.553	0.481	0.455	0.393	0.397	0.393	0.400	0.433	0.344	0.333	0.377	0.439	0.364
50ppm24saat				1	0.451	0.500	0.478	0.415	0.415	0.460	0.407	0.352	0.385	0.306	0.306	0.362	0.317	0.400	0.371
75ppm24saat					1	0.500	0.451	0.373	0.373	0.463	0.464	0.411	0.472	0.475	0.318	0.371	0.371	0.537	0.358
100ppm24saat						1	0.565	0.463	0.491	0.481	0.429	0.375	0.520	0.491	0.349	0.431	0.407	0.528	0.391
150ppm24saat							1	0.471	0.531	0.521	0.434	0.352	0.440	0.397	0.350	0.386	0.362	0.481	0.349
5ppm48saat								1	0.464	0.356	0.383	0.481	0.386	0.443	0.354	0.410	0.458	0.424	0.394
10ppm48saat									1	0.455	0.431	0.379	0.411	0.375	0.333	0.387	0.387	0.400	0.333
50ppm48saat										1	0.588	0.444	0.604	0.410	0.410	0.474	0.333	0.519	0.364
75ppm48saat											1	0.421	0.538	0.413	0.391	0.500	0.318	0.491	0.476
100ppm48saat												1	0.453	0.483	0.458	0.355	0.500	0.367	0.343
150ppm48saat													1	0.545	0.441	0.509	0.407	0.558	0.435
5ppm72saat														1	0.492	0.415	0.614	0.475	0.463
10ppm72saat															1	0.394	0.484	0.343	0.400
50ppm72saat																1	0.385	0.544	0.477
75ppm72saat																	1	0.397	0.433
100ppm72saat																		1	0.541
150ppm72saat																			1

Şekil 3. 25. RAPD-PCR primerinden elde edilen Jaccard benzerlik matrisi.

Şekil 3.24. de her bir RAPD primerine ait karşılaştırmalı bant analizinden elde edilen verilerden ayrı ayrı oluşturulan dendrogramlar gösterilmektedir. Primerlere ait dendrogramlar karşılaştırıldığında RAPD-P5 ve RAPD-P17 primerlerine ait dendrogramlarda kontrol grubunun diğer test gruplarına göre dış grup gibi davrandığı, özellikle 24 saatlik uygulama periyodu ve düşük konsantrasyona sahip test gruplarıyla yakın dallanma yaptığı gözlenmiştir.



Şekil 3. 26. RAPD-PCR primeri sonucu elde edilen filogenetik dendogram.

Bu çalışmada, tekstil sanayisinde kullanılan boyalardan RO16'un genotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmış olup, bunun için PCR tabanlı RAPD ve ISSR markörleri tercih edilmiştir. *A. cepa* kök hücrelerine farklı konsantrasyonlardaki (5 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm ve 150 ppm) Reactive Orange 16 (RO16) boyası belirlenmiş zaman periyotlarında (24, 48 ve 72 saat) uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak, aynı zaman periyotlarının uygulandığı boya uygulanmamış bitki örneği kullanılmıştır. Kontrol grubu ile test grubuna ait PCR amplifikasyonlarının yürütülüp fotoğraflandığı jel örneklerinin karşılaştırmalı bant analizleri sonucunda; kontrol grubunda mevcut olup test grubunda bulunmayan ve kontrol

grubuna göre test grubunda yeni oluşmuş bant profillerini içeren varlık/yokluk verileri, binary (ikili *gösterim*) veri şeklinde elde edilmiştir. Kontrol grubu ile test grupları arasındaki bant profil farklılıkları ve her bir PCR markörüne ait polimorfizm oranı ISSR mrkörleri için Tablo 3.2.'de, RAPD markörleri için Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3. 2. ISSR markörlerine ait monomorfik/polimorfik bant sayıları ve polimorfizm oranları.

Primer Numarası	Toplam bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Monomorfik bant sayısı	Polimorfizm oranı (%)
ISSR-07	38	36	2	94,7
ISSR-09	24	21	3	87,5
ISSR-309	30	28	2	93,4
ISSR-310	28	23	5	82,1
ISSR-847	25	20	5	80
Toplam	140	123	17	

Tablo 3. 3. RAPD markörlerine ait monomorfik ve polimorfik bant sayıları ve polimorfizm oranları.

Primer Numarası	Toplam bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Monomorfik bant sayısı	Polimorfizm oranı (%)
RAPD-P5	17	13	4	76,5
RAPD-P11	25	21	4	84
RAPD-P13	34	31	3	91,2
RAPD-P17	28	24	4	85,7
RAPD-P23	29	24	5	82,8
Toplam	131	111	20	

PCR tabanlı markörlerin polimorfizm oranları incelendiğinde; ISSR markörleri arasında en yüksek polimorfizm ISSR-7 primerinde gözlenirken, en düşük polimorfizm oranı ise ISSR-847 primerinde gözlenmiştir. RAPD markörlerinde; en yüksek polimorfizm RAPD-P13 primerinde tespit edilirken, en düşük polimorfizm oranı ise RAPD-P5 primerinde belirlenmiştir.

Binary verilerinden UPGMA yöntemi ve Jaccard benzerlik analiziyle elde edilen Newick formatındaki dendogram, MEGA 10.1 ile hem ISSR hem de RAPD markörler için birer

dendrogram olarak görüntülenmiştir (Şekil 3.11 ve 3.25). Her iki dendrogram da incelendiğinde; test grubu örneklerinin kontrol grubuna göre, uygulama saatlerinin ve dozların artışına bağlı olarak uzaklaşan bir dallanma gösterdiği tespit edilmiştir. RAPD markörlerinden elde edilen dendrogramda (Şekil 3.24); kontrol grubunun DNA bant profilinin, test grubundan tamamen ayrılıp dış grup gibi dallanmaya neden olduğu gözlenmiştir. ISSR markörlerinden elde edilen dendrogramda; kontrol grubunun özellikle en düşük uygulama periyodu olan 24 saate ait düşük boya konsantrasyonlarıyla daha yakın/birlikte dallanma göstermiş olması, deneysel olarak anlamlı bulunmuştur. Düşük boya dozlarında bant profil farklılığı daha az görülüyor olsa da jel görüntüleri incelendiğinde ve özellikle ISSR markörleriyle oluşturulan dendrogramdaki kontrol grubundan ayrı dallanan gruplara bakıldığında; 50-75 ppm değerlerinden itibaren farklılaşmanın daha fazla arttığı gözlenmiştir.

Farklı azo boyların genotoksik ve sitotoksik etkileri üzerine yapılan önceki çalışmaların sonuçlarına paralel olarak, bu çalışmada da PCR tabanlı markörler olan ISSR ve RAPD primerleriyle gerçekleştirilen analizlerden elde edilen karşılaştırmalı veriler doğrultusunda; Reactive Orange16 boyasının *A. cepa* genomunda zamana ve konsantrasyona bağlı olarak DNA hasarlarının bir göstergesi olan amplifikasyon bant profillerinde farklılıklara neden olduğu ortaya çıkarılmıştır. Sonuç olarak, endüstride yaygın olarak kullanılan Reactive Orange 16 boyasının farklı dozlarının, canlılarda DNA düzeyinde potansiyel genotoksik etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Tekstil sektörü, Türkiye'de en önemli ve hızlı gelişen sanayi dallarından biri olarak kabul edilmektedir. Boyamalar sırasında verimsiz durum sebebiyle, kullanılan boyanın tonlarcası atık su içerisinde yer alır ve geleneksel yöntemlerle arıtmak mümkün değildir (Chequer ve ark., 2013). Tekstil boya ları, önemli ölçüde su tüketimine ve yüksek oranda kirli atık su boşaltımına sebep olduğu için, çevreye karşı ciddi zararlı etkileri bulunmaktadır. Endüstriyel atık sular, görsel olarak çevreyi kirletmenin yanı sıra temiz su kaynaklarına da zarar vermekte ve su ekosisteminde yaşayan canlıları etkileyerek doğal ekosistem üzerinde genotoksik zararlara yol açmaktadır (Madran ve ark., 1992).

Canlı sağlığı için bir tehdit oluşturabilecek kanserojenik, toksikolojik veya zehirlenmelere sebep olan birçok sentetik boya sınıfı bulunmaktadır. Düşük konsantrasyonlarında bile kimyasal ve biyolojik oksijen ihtiyacı açısından zararlı etkilere sahiptir (Gergo ve ark., 2012). Boyanın toksik etkisi, genetik mutasyonları, doğumdaki kusurların ve kalıtsal hastalıkları beraberinde getirmektedir (Yusuf ve ark., 2004).

Kimyasal yapılarına ve uygulandığı elyaf türlerine bağlı olarak sınıflandırılan yüzlerce boya bulunmaktadır. Bu yüzden de arıtma sistemlerini olumsuz etkileyen kimyasal çeşitliliği çok fazladır. DNA üzerinde değişime neden olan mutajenler, etkilerini direkt olarak veya protein yapısına bağlanıp indirekt şekilde de gösterebilir. Mutajenler DNA' da ve dokularda hasarlar, farklı kanser türleri, kısırlık, yaşlanma ve bazı genetik bozukluklar gibi farklı hasarlara neden olmaktadır (Nagy, 2003).

ISSR-PCR ve RAPD-PCR yöntemleri, DNA örneklerinin amplifikasyonu için yaygın olarak kullanılmakta ve çok sayıda örneğin hızlı analiz edilmesini sağlamaktadır. Bu PCR yöntemlerinde rastgele primerler kullanıldığı için, DNA hasarının veya organizmalardaki genom dizisinin spesifik ayrıntılarına ihtiyaç duyulmadan herhangi bir genotoksik etkinin tespitini gerçekleştirmek mümkündür (Atienzar ve ark., 1999: 2276).

Azo boya larının genotoksik etkilerini araştırmak amacıyla Hassan ve Yassein (2014)'in yaptığı bir çalışmada PCR tabanlı RAPD markörleri kullanılmış ve azo boyaya maruz bırakılan *A. cepa* bitki örneklerinden elde edilen amplifikasyon bant profillerinin, kontrol grubuna göre bazı bantların eksik olduğu ve yeni bant oluşumlarının da gözlemlendiği rapor edilmiştir. Kontrol grubuna göre gözlenen farklı bant profillerinin markör primerlerin bağlanma bölgelerinde oluşan DNA hasarı ya da buna bağlı olarak oluşan nokta mutasyonlardan kaynaklanmış olabileceği ifade edilmiştir (Hassan ve Yassein, 2014).

Gümüş ve Eroğlu (2020)'nin azo boyarmaddelerin *A. cepa* üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması üzerine yaptığı bir çalışmada; azo boyaların kimyasal yapısı, spektral tekniklerle (FTIR, ¹H NMR ve ¹³C NMR) karakterize edilmiş ve farklı konsantrasyonlardaki boyanın *A. cepa* üzerine sitogenetik etkilerini incelemişlerdir. Analizler sonucunda, azo boyaların *A. cepa* hücrelerinin bölünme sayısını önemli ölçüde azalttığı ve bölünen hücrelerde kromozomal anormalliklere neden olduğu rapor edilmiştir (Gümüş M., Eroğlu E., 2020).

Alkaya ve Poyraz (2021), reactive red 195 boyası ile PCR tabanlı bazı yöntemlerle *A. cepa* üzerinde genotoksikite etkilerini incelemiş, bu boyanın *A. cepa* kök hücrelerindeki DNA moleküllerini etkilediği ve DNA hasarına yol açarak genotoksik etkilere sebep olduğunu tespit etmişlerdir (Alkaya ve Poyraz, 2021).

Yine Eroğlu ve Gümüş (2021) yaptığı diğer bir çalışmada, bir azo boya olan sülfonamid-aldehit'in farklı konsantrasyonlarının *A. cepa* üzerindeki etkileri araştırılmış, konsantrasyon artışına bağlı olarak kullanılan azo boyanın hücre mitotik indeksini düşürdüğü ve nükleer lezyonları indükleyerek sitotoksik etkilere neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, C-mitoz, yapışkan metafaz ve anafaz köprüsü gibi farklı kromozomal anomalilere neden olan olaylar sonucunda mikronükleus'ların gözlemlendiği genotoksik etkilere neden olduğunu rapor etmişlerdir (Eroğlu, M., Gümüş, N., 2021).

Türkoğlu (2021), reactive blue 19 ve reactive black 5 adlı tekstil boyalarının farklı konsantrasyonlarını *A. cepa* üzerine uygulayarak genotoksik ve sitotoksik etkilerini incelemiş; her iki azo tekstil boyasının da yine mikronükleus oluşumuna neden olduğunu ve comet analizi sonucunda konsantrasyonlara bağlı olarak artan bir DNA hasarının olduğunu tespit etmiştir (Türkoğlu, 2021). Tekstil endüstrisinde kullanılan reaktif boyaların toksisitesi üzerine gerçekleştirilmiş örnek çalışmaların verileri doğrultusunda; bu çalışmadan elde edilen verilerin de önceki çalışmaları destekler nitelikte olduğu anlaşılmaktadır.

Bu çalışmadan elde edilen veriler benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında genel olarak tekstil sanayinde kullanılan reaktif boyaların canlı DNA'ları üzerinde genotoksik ve sitotoksik etkilerinin olduğu savını kuvvetlendirmektedir. Ayrıca bu çalışma diğer farklı moleküler ve kimyasal yöntem ve uygulamalar ile desteklenerek, reaktif boyaların genotoksik etkilerinin daha ayrıntılı bir şekilde tespit edileceği öngörülmektedir. Tüm dünyada yaygın olarak kullanılan reaktif boyaların toksisite potansiyelleri üzerine farklı yöntem ve teknikler kullanılarak gerçekleştirilecek çalışmaların artmasıyla; tekstil sektörüyle birlikte doğaya

bırakılan atık suların daha iyi arıtılmasının önemi daha iyi vurgulanmış olacaktır. Bu ve benzer çalışmaların sonuçlarının kamuoyuyla paylaşılması da endüstriyel atıkların ekosistemler üzerindeki olumsuz etkilerinin azaltılması ve doğa yaşamının korunmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

Akpor O B, Ohiobor G O, Olaolu T D (2014). Heavy Metal Pollutants in Wastewater Effluents: Sources, Effects and Remediation. *Advances in Bioscience and Bioengineering*, 2(4): 37-43.

Alkaya A., Poyraz İ., (2021). Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Reaktif Red 195 Boyasının PCR Tabanlı Moleküler Yöntemlerle Genotoksik Etkilerinin İncelenmesi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Bilecik.

Al-Kdasi A, Idris A, Saed K, Guan C (2004) Treatment of Textile Wastewater by Advanced Oxidation Processes-A Review. *Global Nest Int J* 6: 222-230.

Arya D, Kohli P (2009) Environmental Impact of Textile Wet Processing, India. *Dyes and Chemicals*.

Aslantürk ÖS., (2010). Aydın yöresi'nde kullanılan bazı bitkilerin antioksidan ve sitotoksik etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Aydın, Türkiye.

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.

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

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.

Bark, O. H., and Havey, M.J., (1995). ‘‘Similarities and relationship among population of the bulb onion as estimated by RFLPs.’’ *Theor. Appl. Genetics* 90:407-414.

Bornet, B. & Branchard, M., (2001). ‘‘Nonanchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markörs: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting.’’ *Plant Mol Biol Reporter* 19: 209–215.

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.

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.

Brusick D. Genetik Toksikoloji (2001). *Chapter 17. In: Hayes AW. (Eds). Principles and Methods of Toxicology. 4th Edition. London, England: Taylor and Francis;. 819-852.*

Buckley, C.A., (1992).‘‘Membrane Technology for the Treatment of Dyehouse Effluents’’, *Water Science Technology*, 25(10): 203-209.

Burch P (2013) Dyeing

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.

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.

Cooper, P., (1993).Removing Colour From Dyehouse Waste Waters – *A Critical Review of Technology Available, JSDC*, 109(3), 97-100.

Davis S, Schlag S, Funada C (2008) CHE Product Review Abstract. *Chemical Industries.*

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

Dörtkol M., (2014), ‘‘Doğal ve Modifiye Kil ile Sulu Çözeltilerden Boyarmadde Giderimi’’ Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 86s, Nevşehir.

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

Eroğlu, M., Gümüş, N., (2021). Allium cepa Kök Ucu Hücrelerinde Sülfonamid-Aldehit Türevinin Sitotoksik ve Genotoksik Etkileri, Yozgat Bozok Üniversitesi, Yozgat

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.

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

Fu, X., Ning, G., Gao, L., Bao, M., 2008. Genetic diversity of *Dianthus* accessions as assessed using two molecular marker systems (SRAPs and ISSRs) and morphological traits. *Scientia Horticulturae* 117: 263–270

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.

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

Goyal, S., Siddique, R., Jha, S., Sharma, D., (2019). Utilization of textile sludge in cement mortar and paste, *Construction and Building Materials*, 214, 169- 177.

Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J. ve Owen, J.L., (1994). ‘‘Amplification of DNA markörs from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats.’’ *Theor. Appl. Genetics*, 89: 998-1006.

Gümüş, M., Eroğlu, E., (2020). *Allium cepa* Kök Ucu Hücrelerinde Bazı Azo Boyarmaddelerin Sitotoksik ve Genotoksik Etkileri, Yozgat Bozok Üniversitesi, Yozgat.

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

Joshi, M., Bansal, R., Purwar, R., (2004). ‘‘Colour removal from textile effluents’’ *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 29, 239-259.

Kant R., (2012), "Textile dyeing industry an environmental hazard", *Natural Science*, 04 (01), 22–26.

Kaya S ve Ünsal A. (2002). İlaçların Etkileri. In: Kaya S, Pirinççi Đ, Bilgili A. (Eds). Veteriner Uygulamalı Farmakoloji. Cilt 1. Baskı 3. Ankara: *Medisan Yayınları*; p. 99-152

Kılıçkaya, Çiğdem, 1993, "Tekstil Sektörünün Yapısı ve Türkiye'de Tekstil Sektörü", *Hazine ve Dış Ticaret Dergisi*, sayı 16, s. 59

Kohla M, Marzinkowski J, Schafmeister C, Schwake M (2008). Effizienzsteigerung in der Textilindustrie. Erich Schmidt Verlag, Berlin

Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) “Use of DNA barcodes to identify flowering plants.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 8369–8374.

Kuusisto TK., Textile in Architecture (Unpublished Master's Thesis) (2010). 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>

Lewis, D.M. (2011), “The chemistry of reactive dyes and their application processes” Handbook of Textile and Industrial Dyeing Principles, *Processes and Types of Dyes Volume 1 in Woodhead Publishing Series in Textiles* Edited By M. Clark, 303–364.

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.

Liu JX, Shi LC, Han JP et al. (2014) “Identification of species in the angiosperm family Apiaceae using DNA barcodes.” *Molecular Ecology Resources*, 14, 1231–1238.

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

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

Madran, Tuğrul, (1992), "Tekstilin Dünü, Bugünü ve Yarını", *Tekstil İşveren*, sayı 178, Mart-Nisan, s. 16.

Mathew, M.L., Gopalakrishnan, A., Aravindakumar, C.T., Aravind, U.K., (2019), Low-cost multilayered green fiber for the treatment of textile industry waste water, *Journal of hazardous materials*, 365, 297-305.

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.

Ming, T.K., (2011), “Removal of reactive orange 16(ro16) using chemically modified pineapple peels Project report submitted in partial fulfilment of the requirements for the award of the degree of bachelor of engineering(hons.) Chemical Engineering, Faculty Of Engineering And Science University Tunku Abdul Rahman Kuala Lumpur, Malezya.

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. *DyesandChemicals*.<https://www.fibre2fashion.com/industryarticle/3771/processanalysisenvironmental-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.

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

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

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

Rajabi,M., Mahanpoora K. and Moradi O., (2017). “Removal of dye molecules from aqueous solution by carbon nanotubes and carbon nanotube functional groups: critical review”, *RSC Adv.*, 7: 47083.

Ran, C., Liu, Y., Siddiqui, A. R., Siyal, A. A., Mao, X., Kang, Q., Dai, J., (2019), Pyrolysis of textile dyeing sludge in fluidized bed: Analysis of products, and migration and distribution of heavy metals, *Journal of Cleaner Production*, 241, 118308.

Reddy, P., Shetty, V.T., Dutt, D., York, A., Dar, S., Mundle, S.D., Allampallam, K., Alvi, S., Galili, N., Saberwal, G.S., Anthwal, S., Shaikh, M., Suleman, S., Kamal, S.Y. & Raza, A. (2002) Increased incidence of mitochondrial C oxidase gene mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*, 116, 564– 575

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

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

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.

Silah H. Ve Başar M., (2020) Bazı Reaktif Boyaların Kinetik ve İzoterm Modellerinin Araştırılması p.7-9.

Şahin B., Poyraz İ. (2019). "DNA tabanlı moleküler yöntemler kullanarak Türkiye'de yetiştirilen fasulye Genotiplerinin Genetik Çeşitlilik Araştırılması, s. 12, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, BİLECİK

Türkoğlu, Ş., (2021). Genotoxic effect of two commonly used textile dyes Reactive Blue 19 and Reactive Black 5 using *Allium cepa* L. as an indicator, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas.

UluE., ark., (2020) PC tekniği

<https://www.urolojicerrahidernegi.org/siteDocuments/guncelSeri/2020-9-2.pdf#page=37>

University of Bristol (2012) Azo Dyes.

<http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/price/azo.htm>

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

Vandevivere, P.C., Bianchi, R., Verstraete, W., (1998) Treatment and reuse of wastewater from the textile wet- processing industry. Review of emerging Technologies, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process*, Environmental AND Clean Technology, 72(4), 289-302.

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

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., (1990). "DNA Polimorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markörs." *Nucl. Acids Res.*, 18, 6531-6535.

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

Yıldırım, A. ve Kandemir, N. (2001). Genetik Markörler ve Analiz Metodları. Bölüm 23. In., Özcan, S. Gürel, E., Babaoğlu, M. Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. (ed.). Selçuk Üniv. *Vakıf Yayınları*, Sayfa 112–159. ISBN 975- 6652-05-5. Konya.

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

Zhang, H., Gao, Z., Ao, W., Li, J., Liu, G., Fu, J., Dai, J., (2017), Microwaveassisted pyrolysis of textile dyeing sludge using different additives, *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 127, 140-149.

Zietkiewicz, E., Rafalski, J.A. & Labuda, D., (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.

B.Ş.E.Ü. F.B.E. 02/2022	MELLEK NAZ	PCR-TABANLI ANALİZ YÖNTEMLERİYLE TEKSTİL SANAYİNDE KULLANILAN REACTIVE ORANGE 16 BOYASININ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ	YÜKSEK LİSANS TEZİ
--	-------------------	--	-------------------------------