

Gıda Endüstrisi Atık Suyunun Genotoksitesinin Belirlenmesi

Ayşe Gül Ketencioğlu

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz 2023



Genotoxicity of Food Industry Wastwater

Ayşe Gül Ketencioğlu

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

July 2023

Gıda Endüstrisi Atık Suyunun Genotoksisitesinin Belirlenmesi

Ayşe Gül Ketencioğlu

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ferhan Korkmaz

İkinci Danışman: Arş. Gör. Dr. Belma Nural Yaman

Temmuz 2023

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ayşe Gül Ketencioğlu' nun YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Gıda Endüstrisi Atık Suyunun Genotoksisitesinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek “oybirliği” ile kabul edilmiştir

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ferhan Korkmaz

İkinci Danışman : Arş. Gör. Dr. Belma Nural Yaman

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ferhan Korkmaz

Üye: Prof. Dr. Ahmet Çabuk

Üye: Doç. Dr. Zerrin Cantürk

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nuntarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Dr. Öğr. Üyesi Ferhan KORKMAZ ve Arş. Gör. Dr. Belma Nural YAMAN danışmanlıklarında hazırlamış olduğum “Gıda Endüstrisi Atık Suyunun Genotoksitesinin Belirlenmesi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara göre elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi, bilgi , belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.

05/07/2023

Ayşe Gül KETENCİOĞLU

ÖZET

Endüstriyel üretimlerin sonucunda atık su meydana gelmektedir. Atıksular içeriğinde çeşitli hastalıklara sebep olan mikroorganizmalar taşımaktadır. Ayrıca zararlı kimyasallar ve ağır metaller içerebildiklerinden dolayı çevre ve sağlık sorunları oluşturabilirler.

Bu tez çalışmasında gıda endüstrisi arıtım öncesi ve arıtım sonrası atık sularının RAPD yöntemi ile *Klebsiella pneumoniae* DNA' sını üzerindeki genotoksik etkileri belirlenmiştir. *Vibrio fischeri*' nin biyoluminesans özelliğinin kullanıldığı Mikrotoks yöntemi ile akut toksisite etkileri, *Allium* test yönteminde ise *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde mitotik indeks değerleri ile atık suların sitotoksitesisi, kromozomal aberasyon indeks değerleri ile genotoksitesisi değerlendirilmiştir. RAPD-PCR yönteminde GKS değerleri arıtılmış suyun konsantrasyonlarının hepsinde % 100'e çıktığı gözlemlenmiştir. Mikrotoks yönteminde 5 dk ve 15 dk da gerçekleştirilen ölçümlerde arıtım öncesi ve arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yakın değerler elde edilmiş, atık su örnekleri arasında belirgin bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. *Allium* testi analizinde 24 ve 48 saat uygulamalarında arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında mitotik indeks ve kromozomal aberasyon indeks değerlerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır. Arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında ise mitotik indeks ve kromozomal aberasyon indeks değerlerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar karşılaştırılacak olursa *Allium* testinde elde edilen sonuçlar RAPD yönteminde elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Analiz sonuçlarına göre atık su arıtılmasının sonucunda toksik etkisinde azalma gözlemlenmektedir. Deney sonuçları göz önünde bulundurulduğunda gıda endüstrisi atık suyunun arıtma işlemi gerçekleştirilmeden doğaya salıverilmemesi gerektiği önemle vurgulanabilir.

Anahtar Kelimeler: Gıda endüstrisi atık suyu, Genotoksikoloji, RAPD-PCR, *Allium* test, Mikrotoks, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio fischeri*

SUMMARY

Wastewater occurs because of industrial production. Wastewaters contain microorganisms that can cause various diseases within their content. Furthermore, they can give rise to environmental and health issues due to their potential inclusion of harmful chemicals and heavy metals.

In this study, the genotoxic effects of untreated and treated wastewater from the food industry on *Klebsiella pneumoniae* DNA were determined using the RAPD method. The acute toxicity effects were evaluated using the Microtox method, which utilizes the bioluminescent property of *Vibrio fischeri*. In addition, the cytotoxicity of the wastewater was assessed through the mitotic index values of *Allium cepa* root tip cells using the *Allium* test method, while its genotoxicity was evaluated using chromosomal aberration index values. In the RAPD-PCR method, the Genomic Template Stability (GTS) values were observed to reach 100 % in all the treated water concentrations. Measurements performed at 5 minutes and 15 minutes using the Microtox method revealed that closely similar values were obtained for both pre-treated and post-treated wastewater concentrations, indicating no significant difference among the wastewater samples. In the *Allium* test analysis, there was a statistically significant difference in mitotic index and chromosomal aberration index values of pre-treated wastewater concentrations compared to the control at 24 and 48-hour applications. On the other hand, no statistically significant difference was found in post-treated wastewater concentrations in terms of mitotic index and chromosomal aberration index values compared to the control.

When comparing the obtained results, it can be observed that the results from the *Allium* test are in line with the results obtained in the RAPD method. Results of the analysis indicate a decrease in toxic effects following wastewater treatment. Considering the experimental results, it can strongly be emphasized that food industry wastewater should not be released to nature without treatment.

Keywords: *Allium* test, Food industry wastewater, Genotoxicology, *Klebsiella pneumoniae*, Microtox, RAPD-PCR, *Vibrio fischeri*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen, bilgisiyle ve tecrübeleriyle her türlü desteği sağlayan yüksek desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ferhan KORKMAZ' a, laboratuvar çalışmaları sırasında her zaman desteğini gördüğüm ikinci danışman hocam Arş. Gör. Dr. Belma NURAL YAMAN' a;

Tezim süresince bilgi ve yardımları ile destek sağlayan Biyoteknoloji ve Moleküler Genetik Laboratuvarının değerli çalışanlarına, özellikle Dilan BARUT, Denizhan Özer ŞAHİN ve Burak AVCILAR' a;

Son olarak hayatım boyunca her zaman yanımda olarak yolumu bulmamı sağlayan, moralim düştüğünde bana ışık olan ve emeklerini hiç eksik etmeyen canım aileme;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayşe Gül KETENCİOĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	vi
SUMMARY.....	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Atık Suların Genel Özellikleri.....	3
2.1.1. Endüstriyel atıklar.....	4
2.1.2. Evsel atıklar.....	4
2.1.3. Tıbbi atıklar.....	5
2.1.4. Tehlikeli atıklar.....	5
2.1.5. Elektronik atıklar.....	5
2.1.6. İnşaat ve maden atıkları.....	6
2.2. Atık Su Arıtım Yöntemleri.....	6
2.3. Gıda Endüstrisi.....	8
2.3.1. Gıda endüstrisi' nin sınıflandırılması ve oluşan atıkların değerlendirilmesi.....	9
2.4. Gen Yapısı.....	11
2.4.1. Prokaryotik hücrelerde gen yapısı.....	11
2.4.2. Kromozom yapısı.....	12
2.4.3. Mitoz bölünme.....	13
2.4.3.1. <u>İnterfaz</u>	13
2.4.3.2. <u>Profaz</u>	14
2.4.3.3. <u>Prometafaz ve metafaz</u>	15
2.4.3.4. <u>Anafaz</u>	15
2.4.3.5. <u>Telofaz</u>	15
2.4.4. Kromozom anomalileri.....	17
2.4.4.1. <u>Yapışıklık</u>	17

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
2.4.4.2. <u>Köprüler</u>	17
2.4.4.3. <u>C-mitoz</u>	18
2.4.4.4. <u>Multipolarlık</u>	18
2.4.4.5. <u>Mikronükleus</u>	18
2.5. Toksikoloji.....	19
2.5.1. Toksikoloji hakkında genel bilgiler.....	19
2.5.2. Toksik maddelerin sınıflandırılması.....	20
2.5.3. Toksikite oluşumunu etkileyen faktörler.....	20
2.6. Genetik Toksikoloji.....	21
2.7. Mikrotoks Testi.....	22
2.8. <i>Allium</i> Testi.....	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	24
3.2.Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Çözeltiler ve Besiyerleri.....	26
3.2.1. Çözeltiler ve kimyasal maddeler.....	26
3.2.1.1. <u>Genomik DNA izolasyonunda kullanılan maddeler</u>	26
3.2.1.2. <u>RAPD-PCR işlemlerinde kullanılan kimyasallar ve reaktifler</u>	26
3.2.1.3. <u>Allium Testi için gereken kimyasallar ve çözeltiler</u>	27
3.2.1.4. <u>Mikrotoks yöntemi için kullanılan çözeltiler</u>	27
3.2.2. Kullanılan besiyerleri.....	28
3.2.2.1. <u>Nutrient agar (NA)</u>	28
3.2.2.2. <u>Nutrient broth (NB)</u>	28
3.2.2.3. <u>Eozin metilen blue agar (EMB Agar)</u>	29
3.3. Çalışmada Kullanılan Atık Su Örneklerinin Alınması.....	29
3.4. Gıda Atık Suyu Konsantrasyonları.....	30
3.5. RAPD (Rasgele Arttırılmış Polimorfik DNA) Tekniği.....	30
3.5.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ‘nin genel özellikleri.....	30
3.5.2. Stok <i>Klebsiella pneumoniae</i> ‘nin çoğaltılması.....	30

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
3.5.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin farklı atık su konsantrasyonlarında çoğaltılması.....	31
3.5.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ' den DNA izolasyonu.....	31
3.5.5. PCR işlemi.....	33
3.5.6. Jel görüntülerinin alınması.....	34
3.5.7. RAPD-PCR yönteminde verilerin analizi.....	34
3.6. Mikrotoks Testi.....	35
3.6.1. Mikrotoks testinde verilerin analizi.....	36
3.7. <i>Allium</i> Testi.....	36
3.7.1. Materyalin elde edilmesi.....	36
3.7.2. Materyalin tespiti.....	38
3.7.3. Hidroliz.....	38
3.7.4. Materyalin boyanması.....	38
3.7.5. Preparat yapımı.....	39
3.7.6. Preparatların daimi hale getirilmesi.....	39
3.7.7. Sitotoksisite ve genotoksisite analizi.....	40
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	42
4.1. Gıda Atık Suyu Analiz Sonuçları.....	42
4.2. Arıtım Öncesi ve Arıtım Sonrası Atık Su Konsantrasyonlarında Büyütülen <i>Klebsiella pneumoniae</i> ' den Genomik DNA İzolasyonu.....	44
4.3. Arıtım Öncesi Atık Su Konsantrasyonlarında RAPD-PCR Verileri.....	45
4.4. Arıtım Öncesi RAPD-PCR Görüntülerinin Analizleri.....	48
4.5. Arıtım Sonrası Atık Su Konsantrasyonlarında RAPD-PCR Verileri.....	57
4.6. Arıtım Sonrası RAPD-PCR Görüntülerinin Analizi.....	59
4.7. Arıtım Öncesi ve Arıtım Sonrası GKS Değerlerinin Karşılaştırılması.....	67
4.8. Mikrotoks Analizi Sonuçları.....	68
4.9. <i>Allium</i> Test Analizi Sonuçları.....	69
4.9.1. Arıtım öncesi atık suyun <i>Allium</i> test analizleri.....	70
4.9.2. Arıtım sonrası atık suyun <i>Allium</i> test analizleri.....	75
4.9.3. <i>Allium</i> test normal ve anomali hücreleri.....	79
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	86
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Mitoz evreleri.....	16
3.1. Saf suda köklenen soğanlar.....	37
3.2. Belirlenen konsantrasyonlarda köklenen soğanlar.....	37
4.1. Arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında büyütülen <i>Klebsiella pneumoniae</i> gDNA profilleri.....	45
4.2. Arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında büyütülen <i>Klebsiella pneumoniae</i> gDNA profilleri.....	45
4.3. RAPD PCR işleminde OPAR3 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan profiller	46
4.4. RAPD PCR işleminde OPAR8 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan profiller	46
4.5. RAPD PCR işleminde AP4 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan profiller	47
4.6. RAPD PCR işleminde Primer 640 kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan profiller	47
4.7. RAPD PCR işleminde OPAR3 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın kümeleme analizi sonucunda ulaşılan dendogramlar	52
4.8. RAPD PCR işleminde OPAR8 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın kümeleme analizi sonucunda ulaşılan dendogramlar	53
4.9. RAPD PCR işleminde AP4 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın kümeleme analizi sonucunda ulaşılan dendogramlar	54
4.10. RAPD PCR işleminde Primer 640 kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın kümeleme analizi sonucunda ulaşılan dendogramlar	55
4.11. RAPD PCR işleminde OPAR3 primeri kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan profiller	57
4.12. RAPD PCR işleminde OPAR8 primeri kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan profiller	58
4.13. RAPD PCR işleminde AP4 primeri kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan profiller	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.14. RAPD PCR işleminde Primer 640 kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan profiller	59
4.15. RAPD PCR işleminde OPAR3 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın kümeleme analizi sonucunda ulaşılan dendogramlar.....	63
4.16. RAPD PCR işleminde OPAR8 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın kümeleme analizi sonucunda ulaşılan dendogramlar.....	64
4.17. RAPD PCR işleminde AP4 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın kümeleme analizi sonucunda ulaşılan dendogramlar.....	65
4.18. RAPD PCR işleminde Primer 640 kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın kümeleme analizi sonucunda ulaşılan dendogramlar.....	66
4.19. Gıda atık suyu konsantrasyonlarındaki normal mitoz safhaları.....	79
4.20. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 1 konsantrasyonu 24 saat uygulamasında düzensiz profaz.....	80
4.21. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 50 konsantrasyonu 48 saat uygulamasında dağınık metafaz.....	80
4.22. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 50 konsantrasyonu 24 saat uygulamasında dağınık anafaz.	81
4.23. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 1 konsantrasyonu 48 saat uygulamasında sıkışık metafaz.	81
4.24. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 25 konsantrasyonu 24 saat uygulamasında c-metafaz.	82
4.25. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 50 konsantrasyonu 48 saat uygulamasında metafazda dışarda kalmış kromozom.....	82
4.26. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 75 konsantrasyonu 24 saat uygulamasında anafaz köprü.	83
4.27. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 1 konsantrasyonu 24 saat uygulamasında multipolar anafaz.	83
4.28. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 100 konsantrasyonu 48 saat uygulamasında anafazda dışarda kalmış kromozom.....	84
4.29. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 100 konsantrasyonu 24 saat uygulamasında telofaz köprü.....	84
4.30. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 1 konsantrasyonu 48 saat uygulamasında mikronükleüs.	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar ve cihazların markaları.....	25
3.2. PCR karışımı için gerekli bileşenler ve miktarları.....	33
4.1. Gıda atık suyu analiz sonuçları.....	42
4.2. RAPD PCR işleminde OPAR3 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan matrisler	48
4.3. . RAPD PCR işleminde OPAR8 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan matrisler	49
4.4. . RAPD PCR işleminde AP4 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan matrisler	49
4.5. . RAPD PCR işleminde Primer 640 kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan matrisler	50
4.6. Arıtım öncesi atık suyun yapılan üç farklı denemesinde GKS analizleri için elde edilen n ve a değerlerinin ortalamaları	51
4.7. RAPD PCR işleminde OPAR3 primeri kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan matrisler	60
4.8. RAPD PCR işleminde OPAR8 primeri kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan matrisler	60
4.9. RAPD PCR işleminde AP4 primeri kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan matrisler	61
4.10. RAPD PCR işleminde Primer 640 kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan matrisler	61
4.11. Arıtım sonrası atık suyun yapılan üç farklı denemesinde GKS analizleri için elde edilen n ve a değerlerinin ortalamaları	62
4.12. Arıtım öncesi ve arıtım sonrası atık sularının GKS yüzdeleri.....	67
4.13. Mikrotoks analizi sonucunda elde edilen toksisite değerleri.....	68
4.14. <i>Allium cepa</i> kök uçlarının arıtım öncesi atık suyunun farklı konsantrasyonlarında muamelesinden sonra toplam olarak sayılan hücre sayıları, toplam mitoz hücre sayıları, mitotik fazların toplam ve anormal hücre sayılarının yüzdesi ve mitotik indeks.....	70
4.15. <i>Allium cepa</i> kök uçlarının arıtım sonrası atık suyunun farklı konsantrasyonlarında muamelesinden sonra toplam olarak sayılan hücre sayıları, toplam mitoz hücre sayıları, mitotik fazların toplam ve anormal hücre sayılarının yüzdesi ve mitotik indeks.....	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C	Santigrat derece
μ	Mikron
%	Yüzde

Açıklama

Kısaltmalar

μm	Mikrometre
AKM	Askıda Katı Madde
DEV	Deutsche Einheitsverfahren
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotik trifosfat
EC ₅₀	Deney hayvanlarının % 50' sini öldüren konsantrasyon değeri
g	Gram
gDNA	Genomik DNA
GKS	Genomik Kalıp Stabilitesi
ICP	Endüktif Olarak Eşleşmiş Plazma
ISO	International Organization for Standardization,
KOİ	Kimyasal Oksijen İhtiyacı
LD ₅₀	Test popülasyonunun % 50' sini öldüren konsantrasyon
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı RNA
nm	Nanometre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ppm	Milyonda bir konsantrasyon, derişim birimi
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RNA	Ribonükleik asit
TAE	Tris-asetat-EDTA
TS	Türk Standardı
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde insan nüfusu hızla artmaya devam etmektedir. Beslenme, insanların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gereken temel ihtiyaçtır (Akın; 2012). İnsan nüfusunun artması ile gıda üretim hızı da artmaktadır. Bu hızlı artışın sonucunda ise tarımsal atık miktarlarında artma, doğal kaynakların tükenmesi ve kirlenmesi sorunuyla karşı karşıya kalınmaktadır (Özkan, 2022).

Nüfusun artmasıyla birlikte su tüketimi de artmaktadır. Su kıtlığı 21.yüzyılın ciddi sorunlarından biridir. Temiz su kaynakları, giderek artan nüfusun içme ve kullanmak için gerekli olan su ihtiyacını karşılamakta yetersiz kalmaktadır. Su kullanımının artması, atık su oluşumunu artırmaktadır. (Pescod, 1992; Toze, 2006; Kukul vd., 2007)

Endüstriyel atık suların toksik etkiye sahip inorganik maddeler içerdiği bildirilmiştir. Toksik etkiye sahip kimyasalların düşük konsantrasyonları insan sağlığını etkilemese bile, bitkiler üzerinde toksik etkiye sahip olabilir. Atık sular içeriğinde çok sayıda mikroorganizma bulundurmaktadır. Atık sular arıtılma işlemi gerçekleşmeden kullanıldığında ya da arıtılan suların gereken sağlık koşullarını sağlamadığında atık sularda bulunan bazı mikroorganizmalar enfeksiyona neden olabilmektedir (Üçüncü, 2019).

Bu çalışmanın amacı gıda endüstrisi atık suyunun sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılmasıdır. *Klebsiella pneumoniae* DNA' sı üzerindeki genotoksik etkisinin araştırılması için gıda üretim tesislerinde üretim sonrasında oluşan atık suyun arıtım öncesi ve arıtım sonrası 6 farklı (% 100, % 75, % 50, % 25, % 10 ve % 1) konsantrasyonu kullanılmıştır. *Klebsiella pneumoniae* her bir konsantrasyondaki atık su ile 16 saat boyunca 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından DNA izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA' lara RAPD-PCR işlemi uygulanmıştır. PCR işleminde 4 farklı primer (OPAR3, OPAR8, AP4 ve Primer 640) kullanılmıştır. Ardından elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen görüntülerde DNA bant profillerinin değişmesinden gıda endüstrisi atık suyunun genotoksik etkisi araştırılmıştır.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında Eskişehir’ de bulunan bir gıda üretim fabrikasından üretimin sonucunda açığa çıkan atık suyun neden olabileceği toksik etkiler araştırılmıştır. Gıda atık suyunun; RAPD-PCR yöntemi ile *Klebsiella pneumoniae* DNA’ sında meydana getirdiği değişiklikler ile genotoksitesisi, Mikrotoks yöntemi ile *Vibrio fischeri*’ de akut toksikolojik etkileri ve *Allium* testi kullanılarak sitogenetik ve genotoksik etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. RAPD yönteminde GKS (Genomik Kalıp Stabilitesi) değerleri hesaplanarak elde edilen veriler yorumlanmıştır. Mikrotoks yönteminde kullanılan cihazın programı aracılığıyla sonuçlar yüzde olarak hesaplanarak değerlendirilmiştir. *Allium* testi sonucunda mitotik indeks ve kromozomal aberasyon indeksi hesaplanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

RAPD yöntemi, 9-10 bç uzunluğundaki oligonükleotidin belirlenen primerin DNA molekülüne bağlanıp PCR kullanılarak çoğaltılması ile elde edilen ürünlerin jel elektroforezinde görüntülerin analiz edilmesi şeklinde uygulanmaktadır. RAPD yöntemi ucuz, tekrarlanabilir ve hızlı olmasından dolayı birçok çalışmada sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Neilan, 1995, Nishihara, vd., 1997, Shalini, vd., 2007, Praveen Kumar, vd., 2009, Prabakaran, vd., 2011, Afaf, vd., 2012; Karaca, vd., 2020). Mikrotoks testi, biyoluminesans bakterisi (*Vibrio fischeri*) kullanılarak gerçekleştirilen, maliyeti diğer testlere göre daha uygun ve hassasiyeti sayesinde deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılan akut toksisite testidir (Ma, vd., 2014; Sönmez ve Sivri, 2016). Mikrotoks testinde pozitif ve negatif kontroller kullanılmaktadır (Blaise ve Férard, 2005; Sönmez ve Sivri, 2016). *Allium* testi deneysel çalışmalarda bitkisel test sistemi olarak hücrelerdeki kromozomal aberasyonları ve mitotik hücre bölünmelerini kolay bir şekilde gözlemlenebildiği için sıklıkla kullanılmaktadır (Soykan, vd., 2014; Acar, 2020).

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Atık Suların Genel Özellikleri

Yaşam kaynağının temeli sudur (Direk, vd., 2022). Hızla artan dünya nüfusu, plansız sanayileşme ve gelişen teknolojiler sonucunda su tüketimi artmıştır (Chen, vd., 2021; Kavurucu vd., 2022). Nüfusun artmasıyla özellikle kurak ve yarı kurak iklime sahip ülkelerde içme ve kullanmak için gereken ihtiyacı temiz su kaynakları karşılayamamaktadır. Temiz su kaynaklarının kullanımının artması sonucunda çok miktarda atık su açığa çıkmaktadır. (Pescod, 1992; Toze, 2006; Kukul, vd., 2007). Temiz su kaynaklarının hızla tükenip kirlenmesi sonucunda su kıtlığı sorunuyla karşılaşmaktadır. Su kıtlığı sorunu, 21. yüzyılda birçok toplumun en hassas çevre konularından biri olmuştur. Bu nedenle suların tekrar kullanımı önem arz etmektedir (Asan, 2013; Demir, vd., 2017).

Atık su, temiz su kaynaklarının çeşitli nedenlerle kullanımı sonucunda kirlenmiş “Gri su” ya da “Siyah su” olarak isimlendirilen kirli su olarak tanımlanmaktadır. Atıksular içeriğinde çeşitli hastalıklara sebep olan mikroorganizmalar (patojenler) taşımaktadır. Ayrıca zararlı kimyasallar ve ağır metaller içerebileceğinden dolayı atıksu kaynaklı hastalıklar, çevre ve sağlık sorunlarının nedeni olabilir (Üçüncü, 2019).

Atıklar kaynağına göre, içeriğine göre ve özelliğine göre olmak üzere 3 grupta sınıflandırılmaktadırlar. En çok kullanılan sınıflandırma kaynaklarına göre yapılan sınıflandırmadır (Koca, 2020).

Kaynaklarına göre atıklar:

1. Endüstriyel atıklar,
2. Evsel atıklar,
3. Tıbbi atıklar,
4. Tehlikeli atıklar,
5. Elektronik atıklar,
6. İnşaat ve maden atıkları

olmak üzere altı gruba ayrılmaktadır.

2.1.1. Endüstriyel atıklar

Genel olarak tehlikeli olan ve tehlikeli olmayan atıklar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Tehlikeli olmayan atıklar, endüstriden kaynaklanan fakat içeriğinde zararlı bir madde bulunmamaktadır. Tehlikeli olmayan evsel nitelikli atıklardan oluşmaktadır. Tehlikeli atıklar ise patlayıcı ve kendiliğinden yanabilen etkisi bulunmaktadır. Suyu temas ettiğinde toksik gaz çıkartabilirler. Toksik veya ekotoksik özellik taşıyan zararlı etkileri bulunmaktadır. Bu tür atıklar metal işleme ve kaplama, kimya, ilaç, petrol, boya, deri, cam işleme, kâğıt, tekstil, otomotiv ve elektronik sanayilerden kaynaklanmaktadır (Koca, 2020).

2.1.2. Evsel atıklar

İçeriğinde tehlikeli, zararlı madde içermeyen, konutlarda veya işyerlerinde ortaya çıkan atıklar “Evsel atıklar” olarak adlandırılmaktadır. Evsel atıklara; yiyecek atıkları, meşrubat şişeleri, şampuan ambalajları, metal konserve kutuları örnek verilebilir (Koca, 2020).

2.1.3. Tıbbi atıklar

Genel olarak hastanelerden, sağlık kuruluşlarından, laboratuvarlardan ve veteriner kliniklerinden ortaya çıkan atıklardır. Toksik, patolojik, enfeksiyonlarla ilgili, radyoaktif, yanıcı, kesici vb. özelliklere sahiptirler. Tıbbi atık türlerine örnek olarak kan ve kan ürünleri, kullanılmış ameliyat giysileri, hasta ile temas etmiş enjektör iğneleri, pansuman malzemeleri, kullanılmış lam, lamel ve bisturi verilebilir (Koca, 2020).

2.1.4. Tehlikeli atıklar

Yanıcı, yakıcı, tahriş ve tahrip edici, patlayıcı, zehirli atıklara genel olarak tehlikeli atıklar denmektedir. Tehlikeli atıklara örnek olarak, kullanılmış kimyasal madde atıkları, tehlikeli madde ile kirlenmiş eldiven vb., floresan lambalar, tarım ve ziraat ilaçları, eski piller ve aküler, atık yağlar, boya ve vernik kalıntıları gösterilebilir (Koca, 2020).

2.1.5. Elektronik atıklar

Kısaca E-atık olarak adlandırılır. Genel olarak atık konumunda olan elektronik cihazlardır. Bu atıklar, cam, metal ve plastik içermektedir. Elektronik atıklar yakıldıklarında veya tekrar kullanım için parçalandıklarında tehlikeli maddeler açığa çıkabilmektedir. Bu atıklara örnek olarak; Televizyon, PC, telefon, yazıcı, fotokopi makinası, fax, ekranlar, DVD, mp3, entegre devreler, baskılı devreler, yarı iletkenler, kablolar ve tıbbi cihazlar gibi alet ve ekipmanlar verilebilir (Koca, 2020).

2.1.6. İnşaat ve maden atıkları

İnşaat atıkları; binaların ve diğer yapıların inşa edilmesi ve tamiri sırasında oluşan atıklardır. Bu tür atıklara örnek olarak; taş, tuğla, beton, alçı, demir ve kâğıt gibi maddeler verilebilir (Koca, 2020).

2.2. Atık su arıtım yöntemleri

1800' lü yıllarda artan sanayileşmeyle birlikte sanayide oluşan atıklar çevreye atılmaya başlanmıştır (Yıldız, vd., 2013). İngiltere' de 1830- 1850 yılları arasında artış gösteren kolera salgınlarının ardından atıkların yönetilmesi ve sanitasyonu için acil ihtiyaç oluşturulmuştur (Tzanakakis, vd., 2007; Yıldız, vd., 2013). Toplum sağlığını korumak ve su kirliliğini kontrol altına almak amacıyla ilk olarak “Kanalizasyon Tarımı” yapılmıştır. İngiltere' de 1874 yılının sonrasında çim arazilerde toprak üzerinde akış sistemi uygulanarak AKM ve nutrient giderimi sağlanmıştır. 1887 yılında ise canlı mikroorganizmalar tarafından organik maddenin ve azotun okside edilebildiği keşfedilmiştir (Tzanakakis, vd., 2007; Yıldız, vd., 2013). 1887 yılında ilk biyolojik arıtma prosesi olarak bilinen kesikli kum filtresi denemesi gerçekleştirilmiştir (Vesilind, 2003; Silverstein, 2001; Yıldız, vd., 2013).

19. yüzyılın ortalarında içilebilir su kaynakları sık sık salgın hastalıkların çıkması, yerel su kaynaklarının kontamine olması, sokakları sulama ve yangınları söndürme amacıyla borularla taşınmaya başlanmıştır (Brian, vd., 2000; Yıldız, vd., 2013). 1865 yılında İngiltere Parlamentosu ilk kez akarsuların kirlenmesiyle ilgilenmek amacıyla bir komisyon kurmuştur. Komisyon üyeleri yasa ve yönetmelikler hazırlayarak akarsuların kirlenmesini kesinlikle yasaklamış ve akarsuların arıtılmasıyla ilgili yasa çıkarmıştır. Çıkarılan yasa ile arıtma teknolojileri geliştirilmiştir (Yıldız, vd., 2013).

Kırsal yerleşim yerlerinde geleneksel arıtma yöntemlerinin uygulanması sırasında bazı problemlerle karşılaşmıştır. Karşılaşılan problemlere yatırım maliyetlerinin çok yüksek olması, köylülerin karşılayamayacağından daha fazla elektrik enerjisine ihtiyaç

duyması, yurt dışından bazı ekipmanların ithal ediliyor olması ve bakım-onarımın pahalı olması verilebilir. Karşılaşılan problemlere çözüm olarak ekoteknolojiler geliştirilmiştir (Kılıç ve Kestioğlu, 2008; Yıldız, vd., 2013).

Doğal arıtma, atık suların arıtılması amacıyla kullanılmaktadır. Maliyeti en düşük ve çevre dostu arıtma şeklidir (Eremektar, vd., 2005; Yıldız, vd., 2013). 1940' lı yıllarda atık suların arıtılması amacıyla aktif çamur yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Toprak, 2006; Yıldız, vd., 2013). Aktif çamur, mikroorganizmaların oksijeni kullanarak organik maddenin ayrıştırması sırasında kullanılan aerobik bir biyolojik arıtım sistemidir (Eremektar, vd., 2005; Yıldız, vd., 2013). Aktif çamur prosesi 1920' li yıllarda gelişmeye başlamıştır. 1970' lerin sonlarına doğru piston akımlı reaktörler daha fazla kullanılmıştır. Fakat piston akımlı reaktörlerin kullanılması sırasında atık suların toksik etkilerinden dolayı çeşitli problemlerle karşılaşmıştır. Aktif çamur prosesinde karşılaşılan en büyük problemin amonyak azotunun oksidasyonu olduğu bildirilmiştir (Cooper, 2001; Yıldız, vd., 2013). Oluşan problemlerin ardından çözüm olarak tam karışımli reaktörler (CMAS) kullanılmaya başlanmıştır (Öztür, 1999; Yıldız, vd., 2013).

Basit arıtma sistemlerinin kullanılmasının ardından 1890 yılında Frankland isimli bilim insanı tarafından kanalizasyondaki organik maddelerin oksidasyonu için damlatmalı filtre sistemi bulunmuştur (Cooper, 2001; Yıldız, vd., 2013).

Döner biyolojik diskler, biyofilm sistemlerinin kullanımında damlatmalı filtre sisteminin yanında yaygın kullanılmıştır. Biyodisklerin bakım ve işletme masrafları, damlatmalı filtre sistemleri ve aktif çamur prosesine oranla çok düşüktür (Samsunlu, 2011; Yıldız, vd., 2013).

Anaerobik arıtma, oksijenin bulunmadığı ortamlarda gerçekleşir. Organik atıkların biyolojik prosesler ile parçalanmasının sonucunda CO₂,(karbondioksit), NH₃,(amonyak), CH₄ (metan gazı), ve H₂S (hidrojen sülfür) gibi son ürünlere dönüştürülmesidir (Türker, 2008; Yıldız, vd., 2013). Anaerobik arıtma, ilk olarak sadece çamurların çürütülmesi için kullanılmıştır. Atık suların arıtılmasında aerobik arıtmaya göre avantajlarının bulunmasının ardından yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Debik, vd., 2008; Yıldız, vd., 2013).

Son yıllarda atık su arıtımı için uygulanan girişimlerin birçoğu anaerobik proseslerdir. Tarım ve sanayi atık suların arıtılması amacıyla 1970' li yıllarda Hollanda' da UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) reaktörler kullanılmış ve atık suların sıcak veya konsantre organik atıklar içermesinden dolayı büyük ölçüde başarı elde edilmiştir. Evsel atık suların arıtılmasında anaerobik arıtımın kullanılması sonucunda kayda değer bir başarı yoktur (Cooper, 2001; Yıldız, vd., 2013). Aerobik arıtma sistemlerinin tükettiği enerji maliyetlerinin artmasının sonucunda anaerobik arıtma sistemleri geliştirilmiştir (Samsunlu, 2011; Yıldız, vd., 2013).

Günümüzde ise su ve atıksuların arıtılmasında alternatif bir teknoloji olarak membranlar kullanılmaktadır. 18. Yüzyılın sonlarında osmoz kavramının açıklanması birlikte membranların ortaya çıktığı bildirilmiştir. Daha sonra membran sistemleri 19. ve 20. yüzyılın başlarında, sadece laboratuvar ölçekli çalışmalarda kullanılmıştır. 20.yüzyılın sonlarından itibaren de büyük ölçekli sistemlere geçilmiştir (Taşyıcı, 2009; Yıldız, vd., 2013). Fick tarafından nitro selülozdan ilk sentetik membran üretilmiştir (Türker, 2003; Yıldız, vd., 2013).

2.3. Gıda Endüstrisi

Bireyler, yaşamlarını sürdürmek, zihinsel ve fizyolojik gelişimlerini karşılamak amacıyla beslenmeye gereksinim duymaktadırlar. Beslenme ihtiyaçları ise besin elementleri aracılığıyla karşılanmaktadır. Gıda kelime anlamı olarak besin elementlerini içeren işlenmiş veya doğal halde bulunan bitkisel, hayvansal ve sentetik kökenli yenilebilen maddelere verilen isimdir (Akın; 2012).

Gıda endüstrisi, beslenme ihtiyacının karşılanmasını sağlayan gıda maddelerinin üretilmesini sağlamaktadır. Bulu, Eraslan ve Barca (2007)' ye göre gıda sektörü, tarım sektöründen sağladığı hammaddeleri birden çok üretim süreci sonucunda tüketime hazır, belirli bir süre saklanabilen ürünlere dönüştüren sanayi kolu olarak tanımlanmaktadır. (Akın; 2012).

Gıda fabrikalarında üretimin ardından büyük miktarlarda atıklar çıkmaktadır. Oluşan bu atıklar çevre kirliliğine yol açmaktadır. Ancak teknolojiler kullanılarak üretim sonucunda oluşan atıklardan gübre, hayvan yemi, vb. ekonomik değeri az olan ürünler üretilmektedir. Nüfusun artması sonucunda gıda fabrikalarının sayısında artış meydana geleceği öngörülmektedir. Gıda fabrika sayılarının artması ile gıda atık miktarının ve atık problemlerin de artış göstereceği düşünülmektedir. Bunun sonucunda atıkların toplanması ya da atıklardan yeni ürünler üretilerek kullanılması ile insan sağlığının korunmasında ve ülke ekonomisi açısından önemli katkılar sağlayacaktır (Yağcı, vd., 2006).

2.3.1. Gıda endüstrisi' nin sınıflandırılması ve oluşan atıkların değerlendirilmesi

Gıda endüstrisi;

- Meyve ve sebze işleme
- Bitkisel yağ ve margarin
- Şekerli mamulleri
- Un ve unlu mamulleri
- Et mamulleri
- Süt ve süt mamulleri
- Su ürünleri
- Alkollü- alkolsüz içecekler
- Diğer gıda üretimi

yapan işletmelerden oluşmaktadır (Özdemir, vd., 2001; Şener ve Ünal, 2008).

Gıda endüstrisinin değişik kollarında oluşan ürünlerin özellikleri ve biyodönüşümle değerlendirilebilme yolları aşağıdaki gibidir:

Meyve ve sebze işleme endüstrisinde üretim sonucunda oluşan atıkların beslenme açısından önem arz eden diyet lifi, antioksidanlar, vitaminler, pektin, yağ asitleri gibi faydalı maddelerin kayıplarına neden olmaktadır (Yağcı, vd., 2006). Genel olarak bu atıklar çok miktarda biyolojik oksijen gereksinimi (BOD) ve süspanse katı atık içermektedir. Oluşan

atıklardan yüzey kültür fermantasyon tekniği kullanılarak etil alkol(C_2H_6O), metan (CH_4), laktik asit($C_3H_6O_3$), sülfektan, sitrik asit($C_6H_8O_7$), gıda bileşenleri, enzimler ve aroma maddeleri üretilmektedir (Thassitou ve Arvanitoyannis, 2001; Şener ve Ünal, 2008).

Zeytinyağı işleme endüstrisinde yılda 30 milyon m^3 atık su üretilmektedir. Kara su olarak adlandırılan bu atıklar organik asitler, şekerler, pektinler, polialkoller, kolloidler, tanen ve lipidleri içermektedir (Thassitou ve Arvanitoyannis, 2001; Şener ve Ünal, 2008). Oluşan atıklardan biyoteknolojik dönüşüm yolu ile *Moniliella suaveolens*, *Trichoderma harzianum*, *Pityrosporum oval* ile ve δ - ve γ -dekalakton üretilmektedir (Laufenberg, vd., 2003; Şener ve Ünal, 2008).

Şeker fabrikalarında üretim esnasında kristalleşmeyen şurup, melas oluşur. Melas, kristalize olmayan, her zaman bulunabilen ve ucuz olmasının yanında şeker fabrikalarının en önemli atıklarından birisidir. Melastan biyoteknolojik yolla endüstriyel etil alkol üretilmektedir (Kim ve Dale, 2004; Şener ve Ünal, 2008). Aynı zamanda melas ekmek mayası üretiminde, etanol üretiminde, laktik asit üretiminde ve tek hücre proteini üretiminde kullanılmaktadır (Altan, 2000; Şener ve Ünal, 2008).

Tahıl endüstrisinde genellikle üretim sonucunda oluşan atıklar nişasta içeren atıklardır. Biyoteknolojik yollar kullanılarak oluşan atıklardan etil alkol, laktik asit ve tek hücre proteini üretilmektedir. Gıda endüstrisi içerisinde tahıl endüstri önemli bir yere sahiptir (Hofvendahl ve Hahn-Hagerdal, 2000; Şener ve Ünal, 2008). İrmik altı unu, makarnalık buğdayların işlenmesi sırasında veya buğdayın öğütülme işleminde ortaya çıkan bir yan üründür. Bu ürün genel olarak çavdar, yulaf gibi gluten içeriği düşük ürünlerin gluten miktarını artırmak için unlu mamullerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Yağcı, vd., 2006).

Süt endüstrisinde üretim sonucunda oluşan atıklar protein, tuz, yağ ve laktoz içermektedir. Biyoteknolojik yolla oluşan atıklardan değerli ürünler elde edilmektedir. Üretim sonucunda oluşan peynir altı suyundan laktik asit, , *Lactobacillus* cinsi bakteriler kullanılarak biosülfektan madde ve *Penicillium cyclopilum* kullanılarak tek hücre proteini üretilmektedir (Hofvendahl ve Hahn-Hagerdal, 2000; Şener ve Ünal, 2008). Peynir altı suyu genel olarak toz haline getirilip, dondurma, çikolata ve bisküvi üretimi sırasında katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Kavas ve Karagözlü, 2001; Yağcı, vd., 2006).

Su ürünleri endüstrisi üretim sonrasında gıda endüstrisi içerisinde çok fazla atık madde üretmektedir. Oluşan atıklar ile biyoteknolojik yöntemler kullanılarak önemli ürünler elde edilmektedir (Çalkı ve Kılınç, 2004; Şener ve Ünal, 2008).

Balık sanayi atıklarında yengeç ve karides kabukları atıklarından doğal, toksik olmayan kitin ve kitosan üretilmektedir. Üretilen bu polimerler tek hücre proteini üretimi ve gıda endüstrisinde içeceklerde asitlendirici, renk sabitleştirici gibi katkı maddesi olarak birçok alanda kullanılmaktadır (Çalkı ve Kılınç, 2004; Yağcı, vd., 2006).

2.4. Gen Yapısı

Önceki yıllarda fenotipi belirleyen kromozom parçası gen olarak adlandırılıyordu. Araştırmacılar, yaptıkları gözlemler sonucunda bir gen bir enzim hipotezini ileri sürerek bir enzim sentezinden bir genin sorumlu olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Fakat daha sonradan genlerin sentezlediği proteinlerin tamamının enzim olmadığı anlaşılmıştır. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bilgiler ışığında genin tanımı değişikliğe uğramıştır. DNA, üzerinde belirli bir baz dizisi uzunluğundan meydana gelmiş, bir RNA zincirinin veya bir polipeptit zincirinin sentezlenmesinde görevli olan ve bu sentezleri düzenleyen bir regülatör ve operatör bölge bulunduran DNA parçasığı “Gen” olarak adlandırılmaktadır (Gözükara, 1989). Gen tanım olarak da belirtildiği üzere bir proteini ya da RNA’yı şifreleyen anlamlı dizilerdir. Genler, gerekli proteinleri kodlayarak canlılardaki karakterlerin ortaya çıkmasını sağlarlar. Mendel, 1866 yılında bezelye bitkisini kullanarak yaptığı deneylerinde genlerin varlığını ve nesilden nesile aktarıldığını kanıtlanmıştır (Karataş, 2012).

2.4.1. Prokaryotik hücrelerde gen yapısı

Prokaryot, Yunanca “Önce” anlamına gelen (pro) ile “Çekirdek” anlamına gelen (karyon) sözcüklerinin bir araya gelmesiyle oluşturulan bir terimdir. Prokaryotlar; bakteriler,

riketsiyalar, mavi-yeşil algler, aktinomisetler ve mikoplazma gruplarının bulunduğu canlılar alemidir. Prokaryotlarda gerçek çekirdek zarı ve membrana bağlı organeller bulunmamaktadır. Hücre içerisinde serbest halde dolaşan tek sarmallı DNA molekülü bulunmaktadır (Karataş, 2012).

Prokaryotik ve ökaryotik hücreler gen yapısı bakımından karşılaştırıldığında birtakım farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Bu farklılıkların en başında prokaryotik hücrelerin genlerinin içerisinde intron ve ekzon bölgelerin bulunmamasıdır. Prokaryotik hücrelerde transkripsiyon ve translasyon hücre içerisinde aynı yerde gerçekleşmektedir. Prokaryotik hücrelerde gen yapısının en iyi anlaşıldığı grup bakterilerdir. Bakteri kromozomları ökaryot hücrelere göre daha basit yapıdadır. Bakterilerin çalışma mekanizmasında birden fazla geni taşıyan operon sistemleri bulunmaktadır. Örnek olarak *E. coli*' de ki β -galaktosidaz, permeaz ve transetilaz genlerini şifreleyen lac operon sistemi verilebilir (Karataş, 2012).

2.4.2. Kromozom yapısı

Kromatin, kalıtsal maddenin hücre çekirdeğinin interfaz aşamasında meydana getirdiği yapıya verilen isimdir. Kalıtsal materyal olan DNA molekülünün oluşturduğu kromatin iplikçiklerinden oluşmaktadır. Hücre bölünmesi başladığında kromatin iplikçikleri kıvrılıp kalınlaşarak kromozomları oluşturmaktadır (Temizkan, 1994; Korkmaz, 2003). Kromozomlar iki koldan oluşmaktadır. Bu iki kol arasında açı bulunmaktadır ve kollar "Sentromer" olarak adlandırılan primer boğumla birbirinden ayrılmaktadır. Kromozomlar kollarının boy uzunluklarına göre metasentrik, submetasentrik ve akrosentrik olarak isimlendirilmektedir. Metasentrik kromozom, kollarının boyları birbirine eşit olan kromozomlara denilmektedir. Submetasentrik kromozom olarak adlandırılan kromozomların kollarının boyları birbirine eşit değildir. Akrosentrik kromozomun sentromeri kromozomun uç kısmında bulunmaktadır. Sentromerler, kromozomların iğ ipliğine tutunmasında görevlidir. Kromozomların uç kısımları "Telomer" olarak isimlendirilmektedir (Demirsoy, 1988; Korkmaz, 2003).

2.4.3. Mitoz bölünme

Mitoz bölünme, algler, bazı mantarlar, protozoa gibi birçok organizmanın eşeysiz üremesini sağlamaktadır. Zigot ve zigottan oluşan çok hücreli organizmalarda ise organizmanın gelişip büyümesi, yaraların iyileşmesi gibi hücre bölünmesi ile bağlantılı mitotik aktivitelerde önemli bir faktördür.

Mitoz bölünmede ilk olarak “Karyokinez” olarak adlandırılan çekirdek bölünmesi gerçekleşir. Bu aşamada kromozomlar tam olarak eşlenip ayrılarak ana hücre ile aynı olan iki kardeş çekirdek oluşmaktadır. Karyokinezin ardından sitokinez gerçekleştirilir. Bu bölünme karyokinez bölünmeden daha az karmaşıktır. Sitokinez, sitoplazmik bölünmedir. Bu aşamada, sitoplazmik organeller kendini eşler ya da her bir hücrede yeniden sentezlenir. Genel olarak hücre bölünmesinde oluşan yeni hücrelerin boyutu ana hücrenin boyutunun yaklaşık yarısı kadarken, çekirdekleri ana hücrenin çekirdeği ile aynı büyüklüktedir (Klug and Cummings, 2000; Korkmaz, 2003).

2.4.3.1. İnterfaz

Bir hücrede bölünmenin tamamlanmasının ardından bir sonraki bölünmeye kadar geçen olaylar “Hücre döngüsü” olarak adlandırılmaktadır. İnterfaz, döngünün başlangıç evresidir. Bu evrede hücre mitoz bölünmeye hazırlanmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda interfaz aşamasında S evresinden önce ve sonra DNA sentezinin gerçekleşmediği iki dönemin daha olduğu belirlenmiştir. İnterfaz aşaması G1(gap 1), S evresi ve G2 (gap 2) olmak üzere üç dönemden oluşmaktadır. S evresinde, hücrenin mitoz bölünmeye hazırlanma aşamasında DNA sentezlenmektedir. G1 ve G2 evrelerinde ise S evresindeki kadar yoğun metabolik aktivite, hücre büyümesi ve başkalaşımı görülmemektedir. G2 döneminin sonuna doğru hücrenin hacmi yaklaşık iki katına çıkmış, DNA replike edilmiş ve mitoz bölünme başlatılmıştır. G1 evresi, hücrenin çoğalması ve bunun kontrolü ile ilgili çalışmalarda önem arz etmektedir. G1 evresinde hücreler ya G0 evresine geçerek dinlenme evresine girerler ya da DNA sentezini başlatarak döngüyü tamamlarlar. G0 evresinde hücreler canlı ve metabolik

olarak aktif olmalarına rağmen çoğalmazlar. Hücreler G0 evresine geçerek hücre döngüsüne katılmayarak dinlenme halinde kalabilirken kanser hücreleri G0 evresine girmezler (Klug and Cummings, 2000; Korkmaz, 2003).

İnterfazda, sitolojik olarak kromozomlar görünmez hale gelmektedir. Görünmez hale gelen kromozomların yerine kromatin ile dolu belirgin bir çekirdek yapısı gözlenmektedir. G1, S ve G2 evreleri tamamlanmasının ardından mitoz bölünme başlatılmaktadır. Mitoz, interfazdan sonra oluş sırasına göre profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evreleri ile gerçekleşmektedir. Her evrede kendine özgü olaylar gerçekleşmektedir (Klug and Cummings, 2000; Korkmaz, 2003).

2.4.3.2. Profaz

Mitoz bölünmenin önemli bir bölümü profaz evresinde gerçekleşmektedir. Hayvan hücrelerin tümünde profazın erken evresinde iki çift sentriol hücrenin zıt uçlarında bulunan iki kutba doğru hareket etmektedir. Sentrozom adı verilen yapılar farklılaşmış bir sitoplazma bölgesinde, çekirdek zarının hemen dışında bulunmakta ve biri büyük (olgun) diğeri küçük (yeni oluşmuş) sentriolden oluştuğu düşünülmektedir. Sentriollerin hareket yönü hücrenin iki zıt kutbuna doğru gerçekleşmektedir. Zıt kutuplara giden sentriollerin ardından çekirdek zarı yıkılmaya başlar ve giderek kaybolur. Çekirdek zarının kaybolmasının ardından çekirdekçik de benzer şekilde çekirdek içerisine dağılıp ayrılmaktadır. Bu esnada, interfaz sırasında çözülmüş genetik materyalin karakteristik şekli olan dağılmış kromatin yoğunlaşmaya başlamaktadır. Yoğunlaşmanın sonunda kromozomların görünür hale gelmektedir. Bu yoğunlaşma, profaz boyunca devam etmektedir. Evrenin tamamlanmasına kadar her bir kromozom, sentromer adı verilen tek bir boğum noktası hariç boylu boyunca ayrılmış bir çift yapı olarak görülmektedir (Klug and Cummings, 2000; Korkmaz, 2003).

2.4.3.3. Prometafaz ve metafaz

Mitoz bölünmede profaz evresinden sonra metafaz evresi görülmektedir. Bu evrede her bir kromozom kendi sentromerik bölgesinden ekvatorial düzleme doğru hareket etmektedir. Prometafaz terimi, kromozomların sentromerik bölgesinden ekvatorial düzleme geçişi sırasında hareket ettiği süreyi belirtmektedir. Metafaz ise tam anlamıyla bu hareketi izleyen kromozom konfigürasyonuna denilmektedir. Metafaz evresinde kromozomlar “Metafaz plağı” olarak adlandırılan ekvatorial düzleme hücrenin iki yarısı arasındaki bölgeye iğ iplikleriyle oluşturulan eksene dik bir alan şeklinde uzanmaktadırlar. Metafaz evresinin sonunda kromozomlar, her birinin sentromeri metafaz plağı boyunca dizilerek kromozom kolları dışa doğru uzanmış şekilde rastgele sıralanmışlardır (Klug and Cummings, 2000; Korkmaz, 2003).

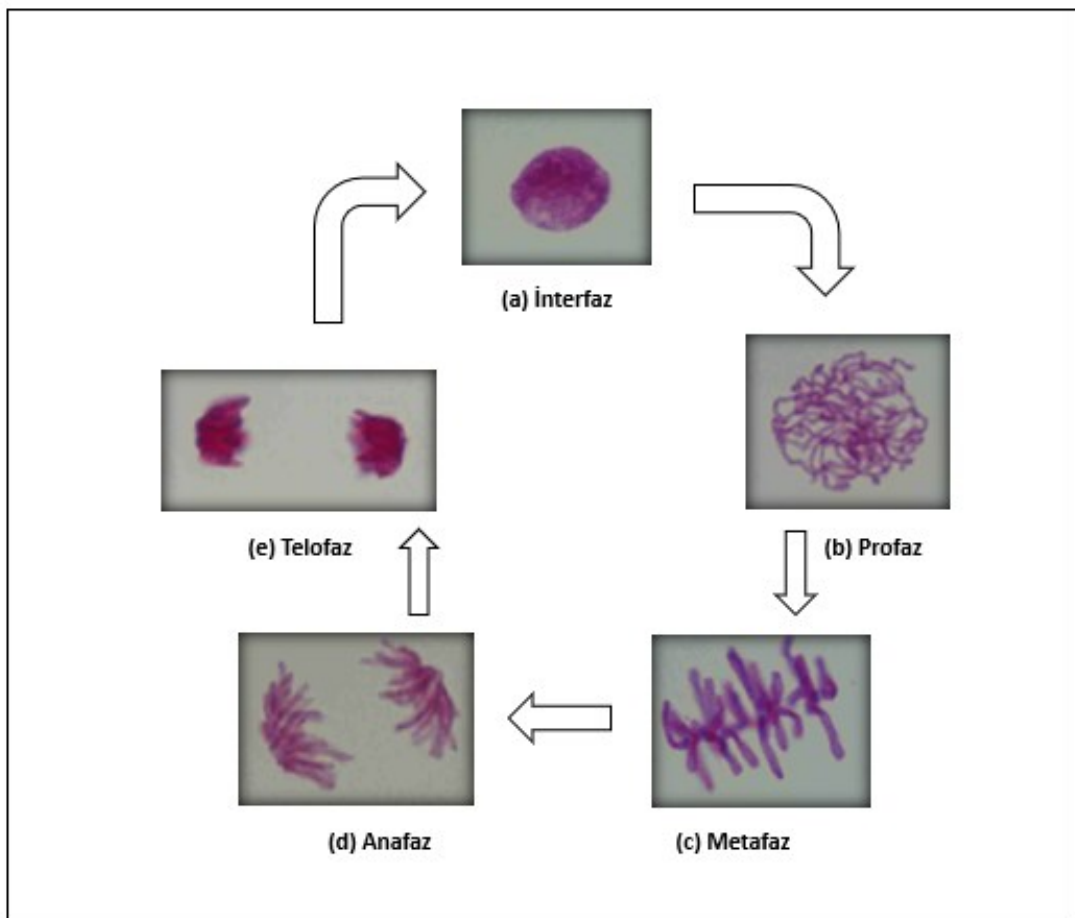
2.4.3.4. Anafaz

Anafaz evresi, mitoz bölünmenin en kısa evresidir. Kromozom dağılımındaki kritik olaylar bu evrede gerçekleşmektedir. Anafaz evresinde, her bir çift kromozomal yapıdaki kardeş kromatitler birbirinden ayrılırlar. Ayrılan kromatitler hücrenin zıt kutuplarına doğru hareket etmektedirler. Her sentromerik bölgenin ikiye ayrılması ile metafaz evresinin sona erdiğini ve anafaz evresinin başladığını işaret etmektedir. Bu olay oluşmasının ardından her bir kromatit yavru kromozom olarak adlandırılmaktadır. Anafaz evresinin süresince gerçekleşen aşamalar, daha sonra oluşacak yavru hücrelere ve aynı kromozom takımının sağlanması yönünden önem arz etmektedir (Klug and Cummings, 2000; Korkmaz, 2003).

2.4.3.5. Telofaz

Telofaz evresi, mitoz bölünmenin son aşamasıdır. Evrenin başlangıcında her bir kutupta, tam olarak iki kromozom takımı bulunmaktadır. Bu evrenin en önemli olayı

sitokinezdür. Sitokinez, sitoplazmanın bölünmesi veya ayrılması anlamına gelmektedir. Telofaz evresi, bitki ve hayvan hücrelerinde farklı gerçekleşmektedir. Bitki hücrelerinde bir hücre plağı sentezlenmektedir. Bu plak, metafaz plağı bölgesinde bölünmekte olan hücre boyunca uzanmaktadır. Hayvan hücrelerinde ise bir balonun orta bölgesinden çepeçevre bir ilmik atılarak boğum oluşturması gibi sitoplazma ortadan ikiye bölünmektedir. İki hücrede de bölünme aşaması farklı ama sonuç aynıdır. Telofaz evresinin tamamlanmasının ardından hücre interfaz evresine girmektedir. Şekil 2.1.' de mitoz evreleri şematik olarak gösterilmektedir (Klug and Cummings, 2000; Korkmaz, 2003).



Şekil 2.1. Mitoz evreleri

2.4.4. Kromozom anomalileri

2.4.4.1. Yapışıklık

Kimyasalların toksik etkilerini yansıtmaktadır. Yapışık kromozomların geri dönüşümü olmaz ve hücrenin ölmesine sebep olabilir (Liu vd., 1992; Yıldız ve Arıkan, 2007). Yapışıklığı, Darlington ve Mc Leish (1951) kromozomal DNA' nın parçalanması ya da depolimerizasyon sonucundan kaynaklanabileceğini ileri sürmüştür. Birçok çevresel kimyasalların toksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda en sık görülen kromozom anomalisinin yapışıklık olduğu belirlenmiştir (Chauhan vd., 1999; El-Ghamery vd., 2000; Ateeq vd., 2002; Amin, 2002; Rank vd., 2002; Chandra vd., 2005; Saxena vd., 2005; Arıkan, 2006; Yıldız ve Arıkan, 2007).

2.4.4.2. Köprüler

Kromozomların yapışması kromatidlerin birbirinden ayrılmasını engellemektedir. Bunun sonucunda köprüler oluşmaktadır (Kabarity vd., 1974; Badr vd., 1992; Yıldız ve Arıkan, 2007). Soliman (2001), kromozomların kırılması ve yeniden bir araya gelerek köprülerin oluştuğunu bildirmiştir. Köprüler, replikasyon enzimlerinin hatalı olması ya da aktivasyonunun yetersiz olması sebebiyle kromozomlarda tamamlanmamış replikasyonun (Sinha, 1979), ya da telomerik heterokromatinin DNA sekanslarının geç replikasyonunun bir sonucudur (De- Faria ve Jaworska, 1972; Bennet, 1977; Yıldız ve Arıkan, 2007). İkili veya üçlü köprüler, eşit olmayan kutuplaşma ya da disentrik kromozomların sonucunda kromozom kırıkları oluşmaktadır (Prakash vd, 1988; Yıldız ve Arıkan, 2007).

2.4.4.3. C-mitoz

C- mitoz, c-metafaz ya da c-anafaz' ı içermektedir. Hücrede iğ ipliklerinin inaktivasyonunun ardından yoğunlaşan kromozomların rastgele dağılmış kolsişin mitozudur. (Levan, 1938; Yıldız ve Arıkan, 2007). Yapılan birçok araştırmada çevresel kimyasalların, hücrenin bölünmesi sırasında iğ ipliklerinin oluşmasını engelleyebilmektedir. Bunun sonucunda c-mitoz görüldüğü belirlenmiştir (Liu vd., 1992; Kovalchuk vd., 1998; Chauhan vd., 1999; Amin, 2002; Rank vd., 2002; Saxena vd., 2005; Yıldız ve Arıkan, 2007).

2.4.4.4. Multipolarlık

Sentriolün birden çok bölünmesinin ardından ikiden daha çok kutbun oluşmasıdır (Jain ve Sarbhoy, 1987; Yıldız ve Arıkan, 2007). Kutupların sayısı ve pozisyonuna bakılarak belirlenmektedir (Kumar vd, 1978; Yıldız ve Arıkan, 2007).

2.4.4.5. Mikronükleus

Mikronükleus, vagrant kromozomların veya fragmentlerin yavaş yavaş kümeleşmelerinin ardından nüklear membranla çevrilerek oluşmaktadır (El-Ghamery vd., 2003; Yıldız ve Arıkan, 2007). Mikronükleusun mutasyon etkisinin göstergesi olduğu düşünülmektedir (Auerbach, 1962; Yıldız ve Arıkan, 2007).

2.5. Toksikoloji

2.5.1. Toksikoloji hakkında genel bilgiler

Toksikolojinin kelime anlamı “Zehir bilimi” olduğu bildirilmiştir. Bu tanımlama 20.yüzyılın başlarında yeterli olarak görülüyordu. Günümüzde hızla gelişen teknolojiler sayesinde toksikoloji, biyolojik sistemler ile kimyasal maddeler arasında meydana gelen etkileşimler sonucunda biyolojik sistemlerde oluşan hasarları inceleyen bilim dalı olarak tanımlanabilmektedir. Zehir ya da toksin olarak adlandırılan, materyallerin vücuda girişi sonrasında biyolojik sistemlerde oluşan zarara ve hatta yüksek konsantrasyonlarının alımlarında ölümlere neden olabilecek etkilerini ve etki mekanizmalarını inceleyen bilim dalı toksikoloji olarak isimlendirilmektedir. Toksikoloji kendi içerisinde alt dallara ayrılmaktadır (Vural, 2005).

Zehirler canlı organizmasına deri, akciğerler, gastrointestinal sistem ve enjeksiyon yolları ile girmektedir. Toksikoloji organizmanın normal metabolizmasında gerekmeyen yabancı kimyasal maddeler ile ilgilenmektedir. Özellikle II. Dünya savaşının ardından sentetik kimyasal maddelerin üretimi ve sayısında büyük gelişmeler gözlenmiştir. Son yıllarda çeşitli alanlarda kullanılan kimyasal maddelerin miktar ve sayılarının hızla artması nedeniyle birçok "Toksikolojik olaylar" ortaya çıkmıştır. Oluşan zararlı etkilerden sadece insanlar değil tüm biyoekosistem etkilenmektedir (Vural, 2005).

Toksikoloji, multidisipliner bir bilim dalıdır. Aynı zamanda fizik, kimya, biyoloji, matematik, istatistik, biyokimya, farmakoloji, patoloji, immünoloji, fizyoloji, mühendislik, epidermiyoloji, ekoloji, halk sağlığı ve mikrobiyoloji ve genetik gibi birçok bilim dalları ile yakından ilgilidir (Vural, 2005).

Toksikolojinin alt dallarında ise besin toksikolojisi, klinik toksikoloji, adli toksikoloji, çevre toksikolojisi (Ekotoksikoloji), endüstriyel toksikoloji, biyokimyasal toksikoloji ve analitik toksikoloji yer almaktadır (Vural, 2005).

Toksikoloji biliminin hedefleri arasında; faktörlere bağımlı toksik etkileri tanımlamak, bilimsel çalışmalar yaparak toksik etki hakkında bilgi edinmek, günlük yaşantıda maruz kalınan kimyasalların toksik etki potansiyelini belirleyerek zararlı etkilerin kontrolünü sağlamak amacıyla çalışmalar yapmak sayılabilir (Güner, 2014).

2.5.2. Toksik maddelerin sınıflandırılması

Toksik maddeler; gösterdikleri etkiye göre genel, lokal ve hem genel hem lokal etki olmak üzere üç grupta, orijinlerine göre organik, inorganik ve organo-metalik olmak üzere üç grupta, fiziksel durumları ve şekillerine göre katı, sıvı ve gaz halinde olmak üzere üç grupta sınıflandırılmaktadır (Güner, 2014).

2.5.3. Toksikite oluşumunu etkileyen faktörler

Toksikiteyi etkileyen faktörler; konsantrasyon miktarı, temas şekli, temas süresi ve sıklık derecesidir (Vural, 2005). Temas şekli 5 çeşittir. Bunlar; oral, dermal, inhalasyon, intramuskuler ve intravenözdür. Toksik etki en hızlı intravenöz yol ile vücuda girdiğinde görülmektedir. Temas süresi ve sıklığa bağlı olarak 4 farklı toksisite çeşidi bulunmaktadır. Bunlar; akut, subakut, kronik ve subkroniktir. Toksikiteyi belirleyen en önemli faktör ise konsantrasyon miktarıdır. Akut toksisite, toksik etki gösteren konsantrasyon miktarına 24 saatten az veya bir kez maruz kalınması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Subakut toksisite ise, toksik etki gösteren konsantrasyon miktarına 1 ay veya daha kısa süre içerisinde toksik etki oluşturabilecek miktarda maruz kalınması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Kronik toksisite, toksik maddeye 3 ay veya daha fazla süre maruz kalınması ile ortaya çıkan toksisite çeşididir. Subkronik toksisite ise toksik maddeye maruz kalma süresinin subakut toksisite ile kronik toksisite süreleri arasında maruz kalınması ile ortaya çıkan toksisite çeşididir. Bir materyalin toksik olduğunu belirlemek ya da ne derecede toksik olduğunu belirlemek amacıyla LC_{50} , LD_{50} ve EC_{50} terimleri kullanılmaktadır (Vural, 2005).

- Letal Konsantrasyon 50 (LD₅₀): İnhalasyonun haricinde diğer temas yollarından vücuda alınıp etki gösteren, deneyde kullanılan hayvanların % 50' sini öldüren konsantrasyonu ifade etmek için kullanılmaktadır. Letal konsantrasyon birimi ppm (mg/kg) olarak ifade edilmektedir.
- Letal Konsantrasyon 50 (LC₅₀): Bu terim, materyallerin inhalasyon yolu ile vücuda alınarak etkisini gösteren akut toksisite değerlerini tanımlamaktadır. Bir deney grubunda yer alan deneklerin % 50' sini öldüren konsantrasyon olarak ifade edilmektedir. Letal konsantrasyon birimi ppm veya mg/mm³ olarak ifade edilmektedir. (Vural, 2005)
- Etkili Konsantrasyon 50 (EC₅₀): Bu terim, konsantrasyon-etki eğri grafiğinde maksimum etkinin yarısına denk gelen, maksimum yanıtın % 50' sini oluşturan konsantrasyon olarak ifade edilmektedir. Birimi mol/L olarak belirtilmektedir (Akkan, 2014).

2.6. Genetik Toksikoloji

Organizmada gamet hücrelerini etkileyerek kalıtsal bir farklılaşma oluşturan maddeler “Genetik zehir” olarak adlandırılmaktadır. Genetik zehirler, etkilerine göre sitostatik, sitotoksik ve mutajenik etkenler olmak üzere üç sınıfta sınıflandırılabilir. Sitotoksik maddeler, hücrelerde anoksi veya protein koagülasyon olayını artırarak hücrelerin ölmelerine neden olmaktadır. Sitostatik etki, kromozomların yapısında ve sayısında meydana gelen değişikliği göstermektedir. Mutajenik etken ise kimyasal maddeler, virüsler veya fiziksel etkenlerin sonucunda genlerde DNA üzerinde değişimler meydana gelerek nokta mutasyonuna neden olmaktadır. Genotipte meydana gelen değişim “Mutasyon”, mutasyona neden olan etkenler ise “Mutajen” olarak adlandırılmaktadır. Mutasyonlar somatik doku hücrelerinde meydana geldiğinde gelecek nesillere aktarılmaz. Mutasyon, değişen çevreye uyum sağlayan bir gelişme olduğu için her mutasyon zararlı değildir. (Vural, 2005).

Genetik toksikolojide kullanılan testler gen mutasyon testleri, kromozom değişimleri, primer DNA hasarı ve morfolojik dönüşümler olmak üzere dört grupta toplanmaktadır (Vural, 2005).

Genetik materyaldeki değişmeler nokta mutasyonlar ve kromozomda oluşan değişmeler olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir. Nokta mutasyonları, DNA molekülü üzerinde meydana gelen değişikliklerdir ve genetik değişimlere yol açmaktadır. Kromozomal değişimler (kromozom aberasyonu), kromozomlara katılma, eksilme ya da sıralamada oluşan farklılıklar sonucunda oluşmaktadır. Kromozomların eşit bölünmemesi sonucunda hücrelerde kromozom sayısının normale göre artması ya da eksilmesi sonucunda birçok genetik hastalıklar görülmektedir. Embriyo ölümü, kısırlık ya da genetik hastalıklar sonucunda anormal çocukların doğması gibi zararlara neden olmaktadır (Vural, 2005).

2.7. Mikrotoks Testi

Mikrotoks testi, çevresel örneklerde ve saf bileşiklerde biyoluminesans özelliği olan bakterinin ışık üretimi üzerindeki etkisini ölçmede kullanılan hızlı bir toksisite testidir. Testte kullanılan bakterinin saldığı ışığın miktarına bağlı olarak toksisite değeri belirlenmektedir. Ortamda bulunan ışımaya miktarının % 50 inhibisyonuna bağlı olarak “İnhibe Edici Konsantrasyon (IC₅₀)” ya da “Etkili Konsantrasyon 50 (EC₅₀)” değeri ile gösterilmektedir (Onorati, 2004; Özmen, 2008). Testte sonuçlar 5 dk ve 15 dk’ da alınmaktadır (Özmen, 2008).

Mikrotoks analizinde bir biyoişıma (bioluminesans) özelliğe sahip olan patojenik olmayan donmuş deniz bakterisi (*Vibrio fischeri-Photobacterium phosphoreum*) kullanılmaktadır. *Vibrio fischeri*’ de, metabolik işleyişe bağlı olarak ışık üretme mekanizması çalışmaktadır. Bakterinin metabolik işleyişi toksik maddelerce bozulur ya da işleyişinde değişiklikler oluşursa bakterinin ürettiği ışıkta azalma meydana gelmektedir ve lüminesansta yüzde bir değişiklik doğrudan toksisite ile ilişkili olabilmektedir (Özmen, 2008). *Vibrio fischeri*, çeşitli toksik maddelere karşı hassas olması sebebiyle biyoanalitik testlerde kullanılmaktadır (Özmen, 2008). Mikrotoks testi hızlı, basit, diğer kimyasal analizlerden daha ucuz ve tekrarlanabilir bir test olması sebebiyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Özmen, 2008).

2.8. *Allium* Testi

Endüstriyel atık suların arıtılmadan kullanılması, çeşitli toksik metallerin biyolojik olarak birikmesine ve birikim sonucunda gıda mahsullerinde genetik değişikliklere neden olabilmektedir (Sabeen vd., 2020). Tatlı su kıtlığı ve ekonomik talepleri karşılamaması sonucunda özellikle dünyanın kurak bölgelerinde atık suların sulama uygulamalarında kullanılması zorunlu hale gelmektedir (Hamilton, vd., 2007; Wiener, vd., 2016; Sabeen vd., 2020). Küresel insan nüfusunun onda biri, atık su sulamasından elde edilen gıda ile beslenmektedir (Corcoran, 2010; Sabeen vd., 2020). Uzun süre atık su kullanılarak yapılan sulama işlemleri sonucunda potansiyel sağlık tehlikelerine sebep olan metal birikimi gözlemlenebilir (Christou, vd., 2017; Farahat, Linderholm, 2015; Sabeen vd., 2020). Metal birikmesinin bir sonucu olarak kromozomal anormallikler, ploidi ve nokta mutasyonları gibi genetik materyalde değişiklikler gözlemlenmektedir (Haq, vd., 2017; Silveira vd., 2017; Sabeen vd., 2020). Önceki yıllarda çevresel kirleticilerin ekotoksikolojik etkilerini değerlendirmek amacıyla farklı teknikler geliştirilmiştir (Baderna, vd., 2011; Sabeen vd., 2020). Bitkiler, toksik elementlere maruz bırakılmasının ardından ortaya çıkan kromozomal ölçekteki genetik değişiklikleri değerlendirmek için kullanışlıdır. Düşük kromozom sayısına ($2n=16$) sahiptirler (Sabeen vd., 2020).

Allium testi, düşük maliyetli, uygulama alanı geniş, kullanımı kolay ve kısa vadede sonuç alınabilen bir testtir (Fiskesjö, 1985). *Allium* testi, besinlerin atık su ile sulanmasından kaynaklanan metal birikimi sonucunda neler olabileceğini soğan kök uçlarındaki kromozomal anormallikleri değerlendirerek bir sonuca ulaşabilmek amacıyla yaygın olarak kullanılan çok hassas bir testtir (Sabeen vd., 2020). Hassas bir test olması nedeniyle, testteki pozitif sonuçlar insan sağlığı ve çevremiz için risk oluşturabilecek bir uyarı olarak değerlendirilmelidir (Fiskesjö, 1985).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Gıda üretim tesislerinde üretim sonrasında oluşan atık suyunun arıtım öncesi ve arıtım sonrası 6 farklı konsantrasyonu (% 100, % 75, % 50, % 25, % 10 ve % 1) RAPD-PCR ve Mikrotoks testinde, 5 farklı konsantrasyonları ise (% 100, % 75, % 50, % 25 ve %1) *Allium* testinde kullanılmıştır. RAPD-PCR testinde *Klebsiella pneumoniae* bakterisi her bir konsantrasyondaki atık su ile 16 saat boyunca 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından DNA izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA' lara 4 farklı primer (OPAR3, OPAR8, AP4 ve Primer 640) kullanılarak elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen görüntülerde DNA bant profillerinin değişmesi değerlendirilmiştir. Mikrotoks testinde *Vibrio fischeri* bakterisinin ışığa özelliği kullanılarak akut toksisitesi belirlenmiştir. *Allium* testinde *Allium cepa* kullanılmıştır. Soğanlar 48 saat saf suda köklendirilmeye bırakılmıştır. Süre sonunda iyi köklenen soğanlar belirlenen konsantrasyonlara alınarak köklendirilmiştir. 24 saatin sonunda köklerin yarısı, 48 saatin sonunda kalan kökler fiksatife alınmıştır. Preparatlardan mikroskopta görüntü alınarak sayım yapılmış, mitotik indeks hesaplanarak sitotoksitesisi, kromozomal aberasyon indeksi hesaplanarak genotoksitesisi belirlenmiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışma esnasında yararlanılan cihazlar ve cihazların markaları çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar ve cihazların markaları

Cihazın adı	Cihazın Markası
Analitik Terazı	OHAUS ADVENTURER- PRO
Çalkalamalı Su Banyosu	MEMMERT
Manyetik Karıştırıcı	HEILDOPH MR 3001
Spektrofotometre	SCHIMADZU UV-VIS SPECTROPHOTOMETER UV 2550
Etüv	BINDER
PCR	VERİTİ™
Çalkalamalı İnkubator	LAB COMPANION SI 600R
Mikrodalga fırın	ARÇELİK
Jel Elektroferez Sistemi	CLIEVER SCIENTIFIC
Jel Görüntüleme Cihazı	BIO-RAD
Derin Dondurucu	ARÇELİK
Buzdolabı	ARÇELİK
Saf Su Cihazı	MES
Elektron Mikroskobu	NİKON ECLIPSE 80i
Mikrotox	SDI M 500
Vorteks	STUART
pH Metre	WTW PH/COND 3320
Pipet	GİLSON
Otoklav	HİRAYAMA HG-80

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Çözeltiler ve Besiyerleri

3.2.1. Çözeltiler ve kimyasal maddeler

3.2.1.1. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan maddeler

Genomik DNA'nın izolasyon işleminde, ticari DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. gDNA'nın izolasyonu esnasında kullanılan kimyasallar ve reaktifler şunlardır:

- a. Digestion Solution: Pelet olarak çökmüş hücreleri çözmek amacıyla kullanılır.
- b. Lysis Solution: DNA'nın hücre zarının parçalanması amacıyla kullanılmıştır.
- c. % 50 Etil alkol: DNA'nın sulu çözeltide çökmesi amacıyla kullanılmıştır.
- d. Wash Buffer I: DNA'nın ilk yıkamasında kullanılmış solüsyondur.
- e. Proteinaz K: Proteinleri parçalamakta kullanılan bir enzimdir
- f. RNase A Solüsyonu: RNA kalıntılarının parçalanması için kullanılmıştır.
- g. Wash Buffer II: DNA'nın ikinci kez yıkamasında kullanılmış solüsyondur.

3.2.1.2. RAPD-PCR işlemlerinde kullanılan kimyasallar ve reaktifler

- a) Genomik DNA (gDNA)
- b) 1X TAE Tampon
- c) dNTP
- d) Primerler (OPAR3, OPAR8, AP4 ve Primer 640)
- e) GoT aq® G2 Hot Start Green Master Mix
- f) Nuclease Free Water
- g) Moleküler Grade Su
- h) Taq Polimeraz Enzimi
- i) Agaroz
- j) Etidyum Bromür (EtBr)

3.2.1.3. Allium testi için gereken kimyasallar ve çözeltiler

Farmer çözeltilisinin hazırlanması: Farmer çözeltisi, 3 kısım absolü alkol (etil alkol – C_2H_5OH) ile 1 kısım glisial asetik asit ($CH_3 - COOH$) karıştırılarak hazırlanmıştır. Soğanların atık sular ile muamelesinin ardından, soğan kök uçları hidroliz aşamasından önce hazırlanan Farmer çözeltilisine alınarak bir gece buzdolabında bekletilmiştir.

Feulgen boyasının hazırlanması: Feulgen boyası kromozomları boyamak amacıyla kullanılmıştır. Boyanın hazırlama aşamasında; 1 g kristal haldeki fuksin bazik havan içerisinde ezilmiştir. Toz haline gelen fuksin bazik kabın etrafına bulaştırmadan 500 cm^3 lük bir erlenmayerin dip kısmına konulmuştur. Diğer taraftan başka bir erlenmayerde 200 cm^3 lük saf su kaynatılmıştır. Kaynamış saf su yavaşça toz halindeki fuksin bazik üzerine ilave edilmiştir. Cam çubuk ile boya $50\text{ }^\circ\text{C}$ ' ye soğuyuncaya kadar devamlı karıştırılmıştır. Soğuyan boyaya 20 cm^3 1N HCl ilave edilerek süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından 10 g potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$) ilave edilerek kahverengi bir şişeye alınarak ağzı hava almayacak şekilde kapatılmıştır. Boya 24 saat karanlık bir yerde (buzdolabında) bekletilmiştir. Boya 24 saatin ardından vişne çürüğü renginden açık çay rengine dönmüş ve kullanıma hazır hale gelmiştir.

3.2.1.4. Mikrotoks yöntemi için kullanılan çözeltiler

- a) **Dilüsyon (Diluent):** Seyrelticidir. Özel olarak hazırlanmış % 2' lik NaCl çözeltilisidir. Numuneyi seyreltmek amacıyla kullanılmıştır. Toksik değildir.
- b) **Ozmotik ayarlama sıvısı (OAS):** Özel olarak hazırlanmış % 22 NaCl çözeltilisidir. Numunenin ozmotik basıncını yaklaşık % 2 NaCl' ye ayarlamak amacıyla kullanılmıştır. Toksik değildir.
- c) **Sulandırma sıvısı:** Toksik değildir. Ultra Saf Su için alternatiftir. Özel olarak hazırlanmaktadır. Deney reaktifinin sulandırılması amacıyla kullanılmıştır. Raf ömrü oda sıcaklığında bir yıl olarak bildirilmiştir. (Microtox® Acute Toxicity Basic Test Procedure)

3.2.2. Kullanılan besiyerleri

3.2.2.1. Nutrient agar (NA)

Katı bir besiyeridir. In vitro yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde genellikle kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde üretim sonrası açığa çıkan atık suyun genotoksisitesini belirlemek amacıyla *Klebsiella pneumoniae*' nin çoğaltılmasında ve stok kültürün oluşturulmasında kullanılmıştır.

Saf Su	1000 mL
Nutrient Agar	20 g

Bir erlenin içerisine nutrient agar konularak üzerine belirtilen miktarda saf su eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Steril edilmesi amacıyla 121 °C' de 15 dk otoklavlanmıştır.

3.2.2.2. Nutrient broth (NB)

In vitro yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde mikroorganizmaların gelişimi amacıyla kullanılan genel sıvı besiyeridir DNA izolasyonu gerçekleştirilecek. *Klebsiella pneumoniae*' nin çoğaltılmasında ve toksisite testlerinde nutrient broth kullanılmıştır.

Saf Su	1000 mL
Nutrient Broth	8g

Bir erlenin içerisine nutrient broth konularak üzerine belirlenen miktarda saf su eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Steril edilmesi amacıyla 121 °C' de 15 dk otoklavlanmıştır.

3.2.2.3. Eozin metilen blue agar (EMB Agar)

In vitro yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde seçici katı besiyeri olarak kullanılmaktadır. Enterobacteriaceae familyasının koliform grup bakterileri ve patojen üyelerinin çoğaltılmasında kullanılmaktadır. *Klebsiella pneumoniae*' nin identifikasyon işleminde selektif besiyeri olarak kullanılmaktadır.

Distile Su	1000 ml
Metilen Mavisi	0,07 g
Eozn Y Yellowish	0,4 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Sükroz	5 g
Laktoz	5 g
Peptone	10 g
Agar Agar	13,5 g

Eozin metilen blue agar erlenin içerisine eklenmiştir. Üzerine 1 l distile su eklenmiştir. Steril edilmesi amacıyla 121 °C' de 15 dk otoklavlanmıştır.

3.3. Çalışmada Kullanılan Atık Su Örneklerinin Alınması

Çalışmada genotoksisitesi/sitotoksisitesi araştırılan arıtım öncesi ve arıtım sonrası atık su örnekleri Eskişehir ilinin Organize Sanayi Bölgesinde faaliyet gösteren gıda üretim işletmesinden Kasım, 2021 tarihinde gerekli izinler alınarak ve gizlilik sözleşmesi yapılarak alınmıştır.

3.4. Gıda Atık Suyu Konsantrasyonları

Çalışmada gıda endüstrisi atık suyunun % 100, % 75, % 50, % 25, % 10 ve % 1 olmak üzere altı farklı konsantrasyonu hazırlanmıştır.

3.5. RAPD (Rasgele Arttırılmış Polimorfik DNA) Tekniği

3.5.1. *Klebsiella pneumoniae*' nin genel özellikleri

RAPD-PCR yönteminde organizma olarak *Klebsiella* sınıfının Enterobacteriaceae şubesinin üyesi olan *Klebsiella pneumoniae* kullanılmıştır. *Klebsiella pneumoniae*, gram negatif, kapsüllü, hareketsiz, fakültatif anaerobik, laktozu fermente eden çubuk şeklinde bir bakteridir. Normal olarak toprakta bulunmaktadır. *K. pneumoniae*' nin % 30' u azot fiksasyonu yaparak aneorob şekilde yaşamlarını sürdürmektedir. Azot fiksasyonunda çok önemli olan *K. pneumoniae*, diazotrof olarak serbest yaşar. Tarım ürünlerinin verimliğinde çok önemli bir rol üstlenmektedir.

3.5.2. Stok *Klebsiella pneumoniae* ' nin çoğaltılması

Hazırlanan EMB Agar seçici besiyerlerine aseptik koşullarda +4 °C' de muhafaza edilen *Klebsiella pneumoniae* kültüründen inokülasyon yapılmıştır. İnokülasyon işleminin ardından petriler 24 saat boyunca 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası ticari izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.5.3. *Klebsiella pneumoniae*' nin farklı atık su konsantrasyonlarında çoğaltılması

Mikroorganizmanın % 100, % 75, % 50, % 25, % 10 ve % 1 olmak üzere 6 farklı arıtım öncesi ve arıtım sonrası atık su konsantrasyonları ile hazırlanmış nutrient broth besiyerlerine aseptik şartlarda inokülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüpler 16 saat boyunca 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından DNA izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.5.4. *Klebsiella pneumoniae*' den DNA izolasyonu

Arıtım öncesi ve arıtım sonrası atık sulardan hazırlanan 6 farklı konsantrasyon ile hazırlanan sıvı besiyerlerinde (Nutrient Broth) üretimi gerçekleştirilen *Klebsiella pneumoniae*' nin gDNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon ticari DNA izolasyon kiti “Invitrogen by Thermo Fisher Scientific PureLink Microbiome DNA Purification Kit” ile gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak saf su kullanılarak hazırlanmış sıvı besiyerlerinde üretimi gerçekleşen *Klebsiella pneumoniae*' den elde edilen genomik DNA (gDNA) kullanılmıştır.

İzolasyon işleminin başarılı olup olmadığını kontrol etmek amacıyla elde edilen genomik DNA' lar jel elektroforezinde yürütülmüştür. “Invitrogen by Thermo Fisher Scientific PureLink Microbiome DNA Purification Kit” prosedürüne uygun gerçekleştirilen DNA izolasyon yönteminin aşamaları aşağıda verilmiştir.

1. Santrifüj tüpüne 180 µL Digestion Solution eklenmiştir.
2. Petri kaplarından öze ile alınan bakteriler santrifüj tüplerine aktarılmıştır. (Katı besiyerinden izolasyon gerçekleştirdiğimiz için ilk iki aşama bu şekilde gerçekleştirilmiştir.)
3. 20 µL Proteinaz K eklenerek pipetaj ile karıştırılmıştır.
4. Tüplerin ağız kısmı parafin kâğıdı ile kapatılarak sıcak su banyosunda 30 dakika bekletilmiştir.

5. Su banyosunun ardından her bir tüpe 20 μ L RNAase eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.
6. 200 μ L lysis solution eklenerek her bir tüp 15 saniye vortekslenmiştir.
7. 400 μ L % 50 etanol eklenmiş ve pipetaj yapılarak karıştırmıştır.
8. Santrifüj tüpündeki karışımın tamamı (toplam 820 μ L) Purification colum' a aktarılmıştır. Ardından 1 dakika 6000g' de santrifüj yapılmış, alttaki tüp atılarak filtreli kısım yeni toplama tüpüne konulmuştur.
9. 500 μ L Wash Buffer I eklenerek 1 dakika 8000 g' de santrifüj yapılmıştır. Ardından süpernataant atılarak aynı tüpe devam edilmiştir.
10. 500 μ L Wash Buffer II eklenerek. 3 dakika 12000 g' de santrifüj yapılmıştır. Alttaki tüp atılarak yeni ependorf tüpüne filtreli kısım konulmuştur.
11. 200 μ L elüsyon buffer filtrenin tam orta kısmına dikkatlice eklenerek oda sıcaklığında 2 dakika bekletilmiştir. Ardından 1 dakika 8000 g' de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir.
12. Filtreli kolon atılarak altta kalan tüpte DNA' nın varlığı elektroforez işlemi gerçekleştirilerek kontrol edilmiştir.

Arıtım öncesi ve arıtım sonrası DNA izolasyonları kitte belirtilen prosedüre göre yapılmıştır. DNA izolasyon işleminin ardından % 1' lik jel elektroforezinde yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından jel görüntüleme cihazı ile genomik DNA' nın varlığı kontrol edilmiştir. Elde edilen genomik DNA örnekleri -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

1 gram Agaroz 100 ml TAE 1X tampon çözelti içerisine eklenerek mikrodalga fırın içerisinde çözdürülmüştür. Çözünen agaroz' un ısısı elle tutulabilecek düzeye geldiğinde içerisine 5 μ L EtBr eklenerek karıştırılmıştır. Tarakları takılan tankın içerisine dökülmüştür. Elektroforez işleminde kullanılacak jel kullanıma hazır hale getirilmiştir. Jel kuyucuklarına Marker 2 μ L, gDNA 5 μ L (jel yükleme boyası (2 μ L) + genomik DNA(3 μ L)) olacak şekilde yüklenmiştir.

3.5.5. PCR işlemi

Bu çalışmada toplam 10 bp oligonükleotitik primerler kullanılmıştır. İzole edilen genomik DNA' lar kullanılarak OPAR3, OPAR8, AP4 ve Primer 640 primerlerinin optimize edilmiş sıcaklıklarda PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

PCR işlemi için 15 reaksiyonluk PCR karışımı hazırlanmıştır. PCR karışımı, gDNA ve primerlerin miktarları çizelge 3.4' de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 3.2. PCR karışımı için gerekli bileşenler ve miktarları

	Bileşen Adı	1 reaksiyon için gereken miktarlar (µL)	15 reaksiyon için gereken miktarlar (µL)
PCR Karışımı	Nuclease Free Water	1,875 µL	28,125 µL
	MgCl ₂	2,5 µL	37,5 µL
	Tampon (5X Go Taq Flexi)	5 µL	75 µL
	dNTP	2,5 µL	37,5 µL
	Tag polymerase	0,125 µL	1,875 µL
	Primer	Her bir primer için 10 µL	150 µL
	gDNA	3 µL	3 µL

Toplamda bir PCR tüpünün içerisinde 25 µL olması gerekmektedir. Bu nedenle her tüpün içerisine 12 µL hazırlanan PCR karışımından, 3 µL genomik DNA ve 10 µL primer olacak şekilde eklenerek tüpün içeriği 25 µL' ye tamamlanmaktadır. PCR işlemi için Veriti™ (Thermo Fischer Scientific, ABD) marka cihaz kullanılmıştır.

PCR koşulları aşağıdaki gibi ayarlanarak gerçekleştirilmiştir:

- 4 dk 94 °C’de ön denatürasyon (DNA zincirlerinin ayrılması)
 - 15 sn 94 °C’de denatürasyon
 - 1 dk 33 °C’de bağlanma (primerlerin bağlanması)
 - 1 dk 72 °C’de polimerizasyon (zincirlerin uzaması)
 - 9 dk 72°C’de polimerizasyon son döngüsü
- } 30 döngü

% 1’ lik agaroz jelin hazırlanmasında gerekli olan 1X TAE çözeltisi, balon jöjeye 100 ml 50X TAE çözeltisi alınarak üzerine 4900 ml saf su eklenerek elde edilmiştir. PCR işleminin ardından örnekler bekletilmeden. % 1’ lik agaroz jelde yürütülerek görüntü elde edilmiştir. Agaroz jeli hazırlamak amacıyla hassas terazide 2 g toz haldeki agaroz tartılarak erlene aktarılmıştır. Ardından erlenin içerisine 200 ml hazırlanan 1X TAE çözeltisinden eklenerek mikrodalga fırında agaroz tamamen çözülene kadar kaynatılmıştır. El yakmayacak sıcaklığa ulaşınca jelin içerisine 5 µL EtBr eklenerek karıştırılmıştır. Ardından elektroforez içerisinde yer alan yatakta bulunan tarak yerleştirilmiş tanka dökülmüştür. 30 dk jelin donması için beklenmiştir. Örnekler bekletilmeden jele yüklenmiş ve yürütülmüştür.

3.5.6. Jel görüntülerinin alınması

PCR sonrasında elde edilen jel görüntüleri Image Lab ve PyElph bilgisayar programları kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz edilmek amacıyla elde edilen jel görüntüleri, BIO-RAD marka jel görüntüleme cihazı kullanılarak fotoğrafları çekilmiş ve bilgisayara “.tif, .jpeg, ve .scn” formatlarında kaydedilmiştir.

3.5.7. RAPD-PCR yönteminde verilerin analizi

RAPD-PCR yönteminden elde edilen görüntüler PyElph programı kullanılarak analizi gerçekleştirilmiştir. PyElph programı kullanılarak, bantların varlık/yokluk durumuna

göre dendrogramlar oluşturulmuş ve filogenetik ağaç yapılmıştır. Kontrol gruplarına göre atık su ile muamele edilmiş kültürlerin genetik olarak DNA'ya yakınlık, benzerlik ve kararlılık bakımından ne kadar yakın olduğu belirlenmiştir.

Çalışma sonrası elde edilen jel görüntülerinde bantların bulunduğu yerler 1 (bir) ve bantların bulunmadığı yerler ise 0 (sıfır) olarak kodlanmıştır. Böylelikle yapılan çalışmada kontrol gruplarına göre atık su ile muamelesi sonucunda oluşan değişimler belirlenmiş ve aşağıda verilen denklem kullanılarak matematiksel hesaplamaları yapılmıştır.

GKS % (Genomik Kalıp Stabilitesi) hesaplamalarında aşağıdaki denklem kullanılmıştır:

$$GKS \% = 100 \cdot \left(1 - \frac{a}{n} \right) \text{ (Atienzar vd., 1999)}$$

a= analiz edilen atık su örneklerinde görünen ya da kaybolan polimorfik DNA bant sayısı

n= kontrolde toplam bant sayısı

3.6.Mikrotoks Testi

Mikrotoks testi -20 °C' de saklanmakta olan *Vibrio fischeri* kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu testte (% 100, % 75, % 50, % 25, % 10 ve % 1) atık su konsantrasyonları kullanılmıştır. Atık suların akut toksisitesi absorbans değerlerindeki değişiklikler baz alınarak belirlenmiştir.

Bu test Microtox Analyzer 500 cihazı kullanılarak "Microtox® Acute Toxicity Basic Test Procedure" yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar excel formatında kaydedilerek değerlendirilmiştir.

3.6.1. Mikrotoks testinde verilerin analizi

Farklı atık su konsantrasyonlarına uygulanan mikrotoks testinin sonunda kaydedilen Excel dosyalarında % ekti olarak belirlenen değerler, atık suların *Vibrio fischeri* biyoluminesans' ını etkileme miktarını göstermektedir.

3.7. *Allium* Testi

Bu testte farklı atık su konsantrasyonlar ile muamele edilen soğanlardan somatik kromozomlar elde edilmiştir. Çalışmada ticari arpacık soğan (*Allium cepa*) kullanılmıştır. Yöntem Fiskeşjö (1985)' e göre yapılmıştır. Çalışmada kullanılan soğanlar yaklaşık olarak eşit büyüklükte ve hasar görmemiş şekilde seçilmiştir. 100 adet soğan saf su içerisinde köklenene kadar bekletilmiş (24 saat), iyi köklenen soğanlar deney materyali olarak kullanılmıştır. Her konsantrasyon için 6 adet soğan kullanılmıştır. Soğanlar gıda endüstrisi arıtım öncesi ve arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında 24 saat 25 °C' de köklendirilmiştir. 24 saatin sonunda soğan köklerinin yarısı kesilerek Farmer çözeltisi içerisine alınmış, kalan kökler 48 saatin sonunda yine Farmer çözeltisi içerisine alınmıştır. Kökler Farmer çözeltisi içerisinde bir gece +4 °C' de bekletilmiştir. Farmer çözeltisi hazırlanışı bölüm 3.2.1.3.' de anlatılmıştır.

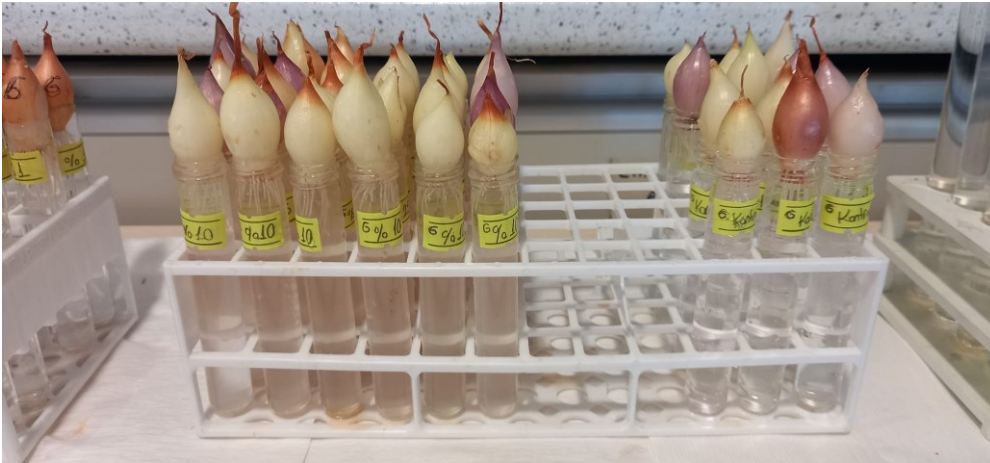
3.7.1. Materyalin elde edilmesi

Testte kullanılması amacıyla yaklaşık aynı boy ve büyüklükte soğanlar seçilmiştir. Seçilen 100 adet soğan tartılarak tablalarının çapları ölçülmüştür. Kullanılan soğanlar ortalama ağırlıkları 3,436 g' dır. Soğanlar ilk olarak saf su bulunan cam tüplerde oda sıcaklığında (25 °C) 48 saat köklendirilmiştir. (Şekil 3.2.) Testte kullanılacak atık suların % 100, % 75, % 50, % 25 ve % 1 konsantrasyonları hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon için altı adet tüp etiketlenerek hazırlanmıştır. Aynı işlem kontrol grubu için de tekrar edilmiştir. 48 saat saf suda köklenen soğanlardan iyi köklere sahip olan soğanlar seçilmiştir. Seçilen

soğanlardan kontrol ve hazırlanan konsantrasyonlar için altışar adet tüplere yerleştirilmiştir. (Şekil 3.3.) Konsantrasyonlarda bekletilen her soğandan 24 ve 48 saat sonunda kökler kesilerek tespit çözeltisi (Farmer) içeren tüplere konulmuştur. Tüpler konsantrasyon ve saati yazılarak etiketlenmiştir Kökler bir gece tespit çözeltisinde bekletilmiştir.



Şekil 3.1. Saf suda köklenen soğanlar



Şekil 3.2. Atık su konsantrasyonlarında köklenen soğanlar

3.7.2. Materyalin tespiti

Bu çalışmada asetik alkol ya da Farmer adıyla bilinen tespit çözeltilisi kullanılmıştır. Tespit çözeltilisinin hazırlanışı bölüm 3.2.1.3.' de verilmiştir.

Tespit çözeltilisi, kromozomların canlılık hayattaki en yakın durumunda tespit edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Tespit çözeltilisi, hücrenin canlılıkta sahip olduğu durumunu bozmadan tespit edebilmesi için çözeltilinin dokulara hızla girmesi gerekmektedir (Korkmaz, 2003).

3.7.3. Hidroliz

Farmer çözeltilisinden alınan kökler, içinde 1N HCl bulunan tüplere konularak ağzı tıpa ile sıkıca kapatılmıştır. Kökler, 60 °C' lik su banyosunda 12 dakika hidroliz edilmiştir. Süre sonunda kökler vakit kaybetmeden Feulgen boya içerisine aktarılmıştır.

Materyaldeki hücrelerin birbirlerinden ayrılarak daha iyi gözlenebilmesi amacıyla hidroliz yapılmaktadır. Kullanılan kök ucu hücreleri hidrolizle birbirinden ayrılmaktadır. Hidroliz için kullanılan HCl' nin konsantrasyonu, hidroliz süresi ve sıcaklık derecesi önemli parametrelerdir. Kromozomların iyi boyanması için hidroliz süresini doğru ayarlamak çok önemlidir (Korkmaz, 2003).

3.7.4. Materyalin boyanması

Kromozomların daha net görülebilmeleri amacıyla Feulgen boya kullanılarak boyanmıştır. Feulgen boyanın hazırlanışı 3.2.1.3.' de verilmiştir. Hidrolizden çıkarılan kök uçları Feulgen içerisinde oda sıcaklığında bir saat bekletilmiştir. Süre sonunda preparat yapımına geçilmiştir (Korkmaz, 2003).

3.7.5. Preparat yapımı

Feulgen boyasından çıkarılan kökler saf suda 10 dakika bekletilmiştir. Boyama işleminin sonucunda kökler kırmızı viyole renginde boyanırken meristem hücrelerinin bulunduğu kök ucu daha koyu kırmızı bir renkte boyanmıştır. Preparat yapımında kökün daha koyu kırmızı boyanan kısmı kullanılmıştır.

Preparat yapılacak lamın üzerine bir damla % 45' lik asetik asit damlatılmıştır. Boyadan çıkarılıp 10 dakika saf suda yıkanan kök pens yardımı ile lam üzerine konulmuş ardından keskin bir jilet yardımıyla daha koyu kırmızıya boyanan uç kısmı kesilerek çok küçük parçalara bölünmüştür. Preparatta hücrelerin daha iyi dağılabilmesi için kök ucu çok küçük parçalara bölünmesi gerekmektedir. Bölünen kök ucu parçacıkları lamın üzerindeki bir damla % 45' lik asetik asit ile karıştırılarak üzerine lamel kapatılmıştır. Lamel oynamaması için bir elin baş parmağı ile tutarak kurşun kalemin arkası ile lamele hafifçe vurulmuştur. Lamel' e hafifçe vurulmasının amacı hücrelerin yassılaşıp, hepsinin bir düzlem üzerine gelerek daha iyi dağılmasının sağlanmasıdır. Lamel' in dışına taşan % 45' lik asetik asit kurutma kağıdı ile alınmıştır (Korkmaz, 2003).

3.7.6. Preparatların daimî hale getirilmesi

Hazırlanan preparatları bozulmadan saklayabilmek amacıyla daimî hale getirmek gerekmektedir. Daimî hale getirilmesi için alkol buharı değiş-tokuş yöntemi kullanılmıştır.

Alkol buharı değiş-tokuş yönteminde, lam ve lamel arasına alkol buharının girmesi gerekmektedir. Bu amaçla 5,5 cm x 5,5 cm x 10 cm ölçülerinde olan kapaklı bir şale kullanılmıştır. Şale'nin iki kenarına ve kapağının iç kısmına kurutma kâğıdı yerleştirilerek kurutma kağıtları absöü alkol ile nemlendirilmiştir. Kabın alt kısmına 4-5 mm yükseklikte absöü alkol konulmuştur. Preparatlar bu kaba dizilmiş ardından kapağa vazelin sürülerek kapatılmıştır. Bu kaplar buzdolabında bir gece 0 – 4 °C' de bekletilmiştir. Süre sonunda petri kutusunun içine ve kapağına kurutma kâğıdı konularak absöü alkol ile nemlendirilmiştir.

Ardından şalelerden alınan preparatlar petri kutularına alınmıştır. Petri kabı içerisine konulan preparatların iki kenarına karşılıklı bir damla Kanada balsamı damlatılarak lamel kenarı boyunca dağıtılmıştır. Petri kabının kapağı kapatılarak 4 veya 5 gün oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sürenin sonunda preparatlar daimî hale gelmiştir. Ksilol kullanılarak preparatların üzerine bulaşan fazla Kanada balsamı temizlenmiştir. Temizlenmesinin ardından preparatlar mikroskopta incelenmek üzere hazır hale getirilmiştir (Korkmaz, 2003).

3.7.7. Sitotoksosite ve genotoksosite analizi

Allium Testi' nde Mitotik indeks (% MI) ile sitotoksosite, kromozomal aberasyon indeksi (% CAI) ile de genotoksitesi değerlendirilmektedir (Kaya, 2022). Mitotik indeksin hücre bölünme frekansının tahmin edilmesini sağlamaktadır (Marcano vd., 2004; Yıldız ve Arıkan, 2007). Kök büyüme oranı ile mitotik indeksin arasında ilişki olduğu düşünülmektedir (Liu vd., 1992; Yıldız ve Arıkan, 2007). Mitotik indeks, test organizmalarında kontrole göre % 22' sinin altına düştüğünde letal etkiye neden olmaktadır (Antonsie- wicz, 1990; Yıldız ve Arıkan, 2007). % 50' nin altına düştüğünde ise subletal etki görülmektedir (Panda ve Sahu, 1985; Yıldız ve Arıkan, 2007). % 50' nin altına düştüğü değere sitotoksik sınır değeri denilmektedir (Sharma, 1983; Yıldız ve Arıkan, 2007). Mitotik indeks aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Mitotik indeks} = \frac{\text{Mitoz safhasındaki hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100 \text{ (Kaya, 2022)}$$

(Mitoz safhasındaki hücre sayısı: profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve anomalileri,
Toplam hücre sayısı: interfaz + mitoz safhasındaki normal ve anomali hücreleri)

Kromozomda meydana gelen anormaliler, DNA' da meydana gelen zararın bir sonucudur (Savage, 1993; Albertini, vd., 2000; Akyıl ve Özkara, 2015). Bitkiler ve hayvanlarda, kimyasalların DNA ile etkileşime girerek hasara neden olmasının sonucunda kromozom aberasyonları görülmektedir (Saxena, vd., 2005; Akyıl ve Özkara, 2015). Son

yıllarda yapılan çalışmalarda genotoksisitenin değerlendirilmesinde kromozom aberasyonlarının son derece güvenilir analizler olduğu bildirilmiştir (Rieger, vd., 1990; Angelis, vd., 2000; Panda, vd., 2002; Akyıl ve Özkara, 2015).

Kromozomal aberasyon indeksi aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Kromozomal aberasyon indeksi} = \frac{\text{Kromozomal aberasyona sahip hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100 \text{ (Kaya, 2022)}$$

(Kromozomal aberasyona sahip hücre sayısı: profaz, metafaz, anafaz, telofaz anomalileri,
Toplam hücre sayısı: interfaz + mitoz safhasındaki normal ve anomali hücreleri)



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada gıda endüstrisi atık suyunun RAPD-PCR yöntemi ile *Klebsiella pneumoniae* DNA' sını üzerindeki genotoksik etkisi, *Vibrio fischeri* kullanılarak yapılan Mikrotoks Testi ile akut toksisitesi ve *Allium cepa* kök ucu hücreleri kullanılarak yapılan *Allium* Testi ile sitotoksik ve genotoksik etkisi belirlenmiştir. Deneyleerde gıda endüstrisi üretim tesislerinden üretim sonucunda oluşan atık suyun 6 farklı konsantrasyonu (% 1, % 10, % 25, % 50, % 75 ve % 100) kullanılmıştır.

4.1. Gıda Atık Suyu Analiz Sonuçları

Çalışmada kullanılan atık suyun gıda fabrikası' nın yapmış olduğu analiz sonuçları Çizelge 4.1.' de verilmiştir. Analizde BOİ₅, bulanıklık, amonyum, askıda katı madde, iletkenlik (25°C), KOİ, koku, permanganat indeksi (oksitlenebilirlik), renk, toplam organik karbon, yağ ve gres, alüminyum, demir, nitrit, Fekal Streptokok (Enterokok) sayısı, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, toplam koliform bakteri sayısı, toplam koloni sayısı (22 °C), toplam koloni sayısı (37 °C) ve uçucu yağ asitleri parametreleri incelenmiştir.

Çizelge 4.1. Gıda atık suyu analiz sonuçları

Parametre	Birim	Ek-1	Ölçülen değer	Kullanılan analiz/Ölçüm Metodu	Bilgi
BOİ ₅	mg/L	-	11.8	TS 4957-2 EN 1899-2	-
Bulanıklık	NTU	Tüketicilerce kabul edilebilir herhangi bir anormal değişim olmamalı	3.5	SM 2130 B	-

Amonyum	mg/L	≤0.5	3.804	SM 4500-NH ₃ : B,F	1
Askıda Katı Madde	mg/L	-	<10	SM 2540:D	-
İletkenlik (25°C)	µS/cm	-	30	SM 2510:B	11
KOİ	mgO ₂ /L	-	49	SM 5220:B	1
Koku	-	Tüketicilerce kabul edilebilir herhangi bir anormal değişim olmamalı	Kokusuz	DEV B1/2	-
Permanganat İndeksi (Oksitlenebilirlik)	mgO ₂ /L	≤5	2.86	TS 6288 EN ISO 8467	-
pH 25°C	-	6.5- 9.5	7.06	SM 4500- H:B	
Renk (Pt-Co)	Pt-Co	Tüketicilerce kabul edilebilir herhangi bir anormal değişim olmamalı	<5	SM 2120:C	8
Toplam Organik Karbon	mg/L	Anormal değişim yok	13	TS 8195 EN 1484	1
Yağ ve Gres	mg/L	-	<10	SM 5520:B	1
Aluminyum	mg/L	-	<0.01	TS EN ISO 17294-2 (ICP- MS)	1
Demir	mg/L	-	0.02	TS EN ISO 17294-2 (ICP- MS)	1
Nitrit	mg/L	≤0.5	<0.05	SM 4110:B (IC)	1,8
<i>Escherichia coli</i>	kob/250m L	Tespit Edilmemeli	Tespit Edilemedi	SM 9222:H	30

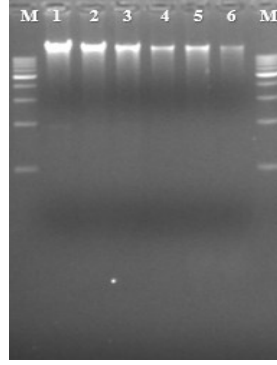
Fekal Streptokok (Enterokok) Sayısı	kob/250m L	Tespit Edilmemeli	Tespit Edilemedi	SM 9230:C	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	kob/250m L	Tespit Edilmemeli	Tespit Edilemedi	ISO 16266	30
Toplam Koliform Bakteri Sayısı	kob/250m L	Tespit Edilmemeli	Tespit Edilemedi	SM 9222:B	30
Toplam Koloni Sayısı (22 °C)	kob/mL	-	Tespit Edilemedi	ISO 6222	30
Toplam Koloni Sayısı (37 °C)	kob/mL	-	Tespit Edilemedi	ISO 6222	30
Uçucu Yağ Asitleri	mg/L	-	19.2	Damıtma sonrası titrasyon yoluyla uçucu yağ asidi	47

(**Metot:** TS- Türk Standardı, SM- Standard Methods for the Examination of Water and Wastwater (WEF, AWWA, APHA) 21st Ed., EN- European Standard, ISO- International Organization for Standardization, DEV- Deutsche Einheitsverfahren,

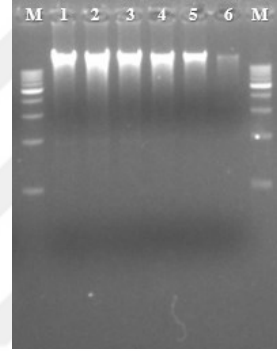
Bilgi: 11: Analiz laboratuvarında yapılmıştır., 8: Örnek 0.45 µm gözenekli membran filtreden süzölmüştür., 1: ISO 5667-3 standardına uygun olarak koruma yapılmıştır. 47: İlgili analiz onaylı iş birliği yaptığımız laboratuvarımıza yaptırılmıştır. 30: ISO 19458 standardına uygun olarak Sodyum Tiyosülfat ilave edilmiştir.)

4.2. Arıtım Öncesi ve Arıtım Sonrası Atık Su Konsantrasyonlarında Büyütölen *Klebsiella pneumoniae*' den Genomik DNA İzolasyonu

Kontrol olarak saf suda, arıtım öncesi ve sonrası 6 farklı konsantrasyonda büyütölen *Klebsiella pneumoniae* kültüründen DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen genomik DNA' lar Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.' de gösterilmektedir.



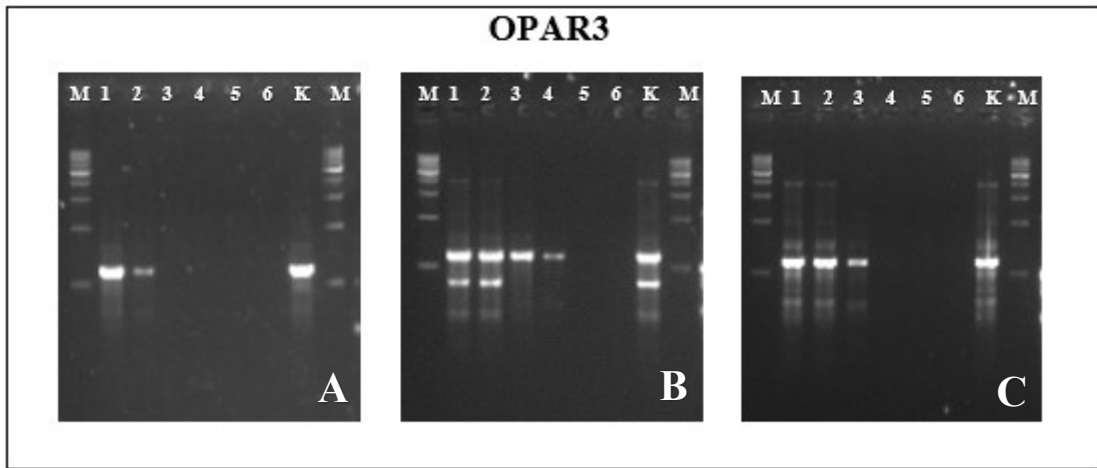
Şekil 4.1. Arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında büyütülen *Klebsiella pneumoniae* gDNA profilleri (**M:** Marker, **1:** % 1 Atık Su Konsantrasyonu, **2:** % 10 Atık Su Konsantrasyonu, **3:** % 25 Atık Su Konsantrasyonu, **4:** % 50 Atık Su Konsantrasyonu, **5:** % 75 Atık Su Konsantrasyonu, **6:** % 100 Atık Su Konsantrasyonu)



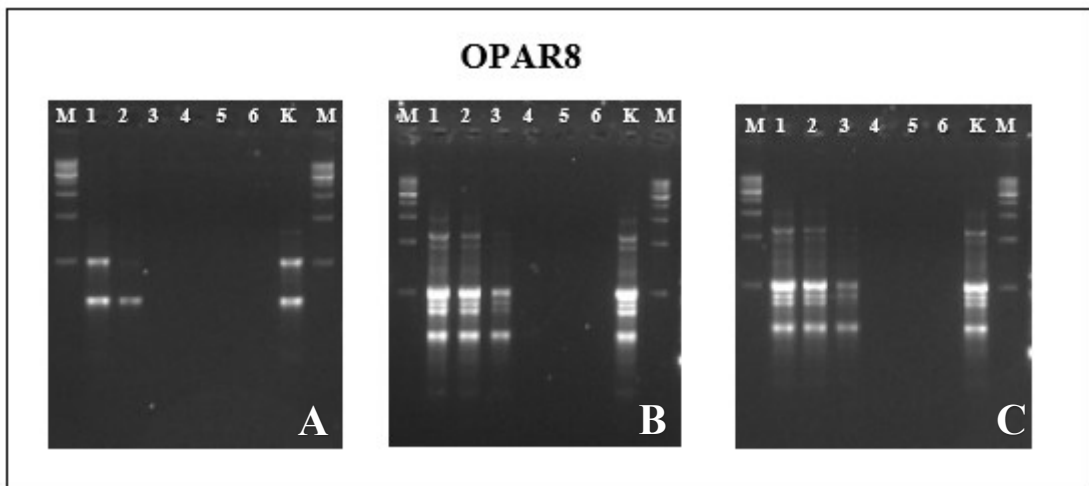
Şekil 4.2. Arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında büyütülen *Klebsiella pneumoniae* gDNA profilleri (**M:** Marker, **1:** % 1 Atık Su Konsantrasyonu, **2:** % 10 Atık Su Konsantrasyonu, **3:** % 25 Atık Su Konsantrasyonu, **4:** % 50 Atık Su Konsantrasyonu, **5:** % 75 Atık Su Konsantrasyonu, **6:** % 100 Atık Su Konsantrasyonu)

4.3. Arıtım Öncesi Atık Su Konsantrasyonlarında RAPD-PCR Verileri

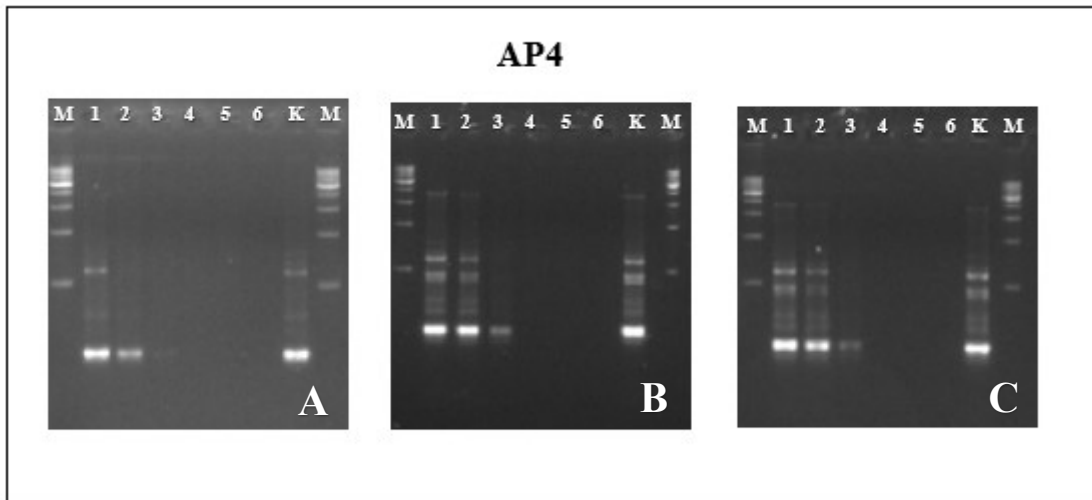
Saf su ve atık su ile hazırlanan besiyerlerinde üretilen *Klebsiella pneumoniae* DNA'ları ile 4 farklı primer (OPAR3, OPAR8, AP4 ve Primer 640) kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Kontrol DNA'sı için saf su kullanılarak hazırlanan besiyerinde üretilen *Klebsiella pneumoniae* DNA'sı kullanılmıştır. PCR işlemi sonrasında jel elektroforezinden elde edilen görüntüler Şekil 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6' te verilmiştir.



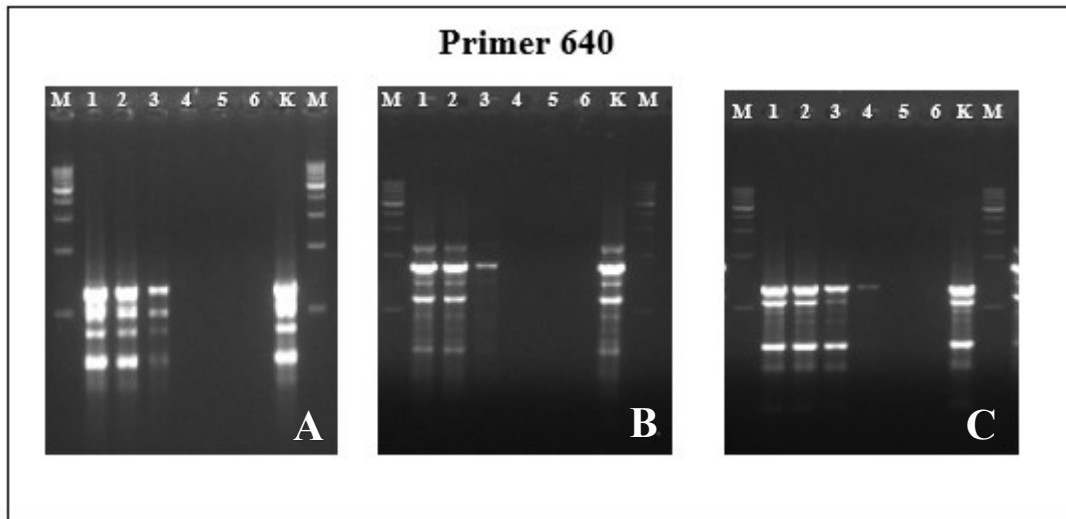
Şekil 4.3. RAPD PCR işleminde OPAR3 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan profiller (A: Yapılan 1. Deneme, B: Yapılan 2. Deneme, C: Yapılan 3. Deneme. M: Marker, 1: % 1 atık su konsantrasyonu, 2: % 10 atık su konsantrasyonu, 3: % 25 atık su konsantrasyonu, 4: % 50 atık su konsantrasyonu, 5: % 75 atık su konsantrasyonu, 6: % 100 atık su konsantrasyonu, K: Kontrol)



Şekil 4.4. RAPD PCR işleminde OPAR8 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan profiller (A: Yapılan 1. Deneme, B: Yapılan 2. Deneme, C: Yapılan 3. Deneme. M: Marker, 1: % 1 atık su konsantrasyonu, 2: % 10 atık su konsantrasyonu, 3: % 25 atık su konsantrasyonu, 4: % 50 atık su konsantrasyonu, 5: % 75 atık su konsantrasyonu, 6: % 100 atık su konsantrasyonu, K: Kontrol)



Şekil 4.5. RAPD PCR işleminde AP4 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan profiller (A: Yapılan 1. Deneme, B: Yapılan 2. Deneme, C: Yapılan 3. Deneme. M: Marker, 1: % 1 atık su konsantrasyonu, 2: % 10 atık su konsantrasyonu, 3: % 25 atık su konsantrasyonu, 4: % 50 atık su konsantrasyonu, 5: % 75 atık su konsantrasyonu, 6: % 100 atık su konsantrasyonu, K: Kontrol)



Şekil 4.6. RAPD PCR işleminde Primer 640 kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan profiller (A: Yapılan 1. Deneme, B: Yapılan 2. Deneme, C: Yapılan 3. Deneme. M: Marker, 1: % 1 atık su konsantrasyonu, 2: % 10 atık su konsantrasyonu, 3: % 25 atık su konsantrasyonu, 4: % 50 atık su konsantrasyonu, 5: % 75 atık su konsantrasyonu, 6: % 100 atık su konsantrasyonu, K: Kontrol)

4.4. Arıtım Öncesi RAPD-PCR Görüntülerinin Analizleri

RAPD-PCR çalışması 3 tekrar olacak şekilde farklı zamanlarda yapılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen jel görüntüleri Image Lab 5.0 ve PyElph 1.4 programları kullanılarak analiz edilmiştir (Pavel ve Vasile, 2012). PyElph 1.4 programı kullanılarak matris oluşturulmuştur. Bantların bulunduğu yerler 1 (bir), bantların bulunmadığı yerler ise 0 (sıfır) olarak kodlanmıştır. 4 farklı primer kullanılarak gerçekleştirilen 3 kez tekrarlanan RAPD-PCR denemeleri sonucunda çıkarılan matrisler Çizelge 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5’ te gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. RAPD PCR işleminde OPAR3 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan matrisler (A: Yapılan 1. Deneme, B: Yapılan 2. Deneme, C: Yapılan 3. Deneme.

a: % 1 atık su konsantrasyonu, b: % 10 atık su konsantrasyonu, c: % 25 atık su konsantrasyonu, d: % 50 atık su konsantrasyonu, e: % 75 atık su konsantrasyonu, f: % 100 atık su konsantrasyonu, K: Kontrol)

A							B							C						
a	b	c	d	e	f	K	a	b	c	d	e	f	K	a	b	c	d	e	f	K
1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.3. RAPD PCR işleminde OPAR8 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan matrisler (A: Yapılan 1. Deneme, B: Yapılan 2. Deneme, C: Yapılan 3. Deneme.

a: % 1 atık su, b: % 10 atık su, c: % 25 atık su, d: % 50 atık su, e: % 75 atık su, f: % 100 atık su, K: Kontrol)

A							B							C						
a	b	c	d	e	f	K	a	b	c	d	e	f	K	a	b	c	d	e	f	K
1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	
0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	
1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	
1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	
0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	

Çizelge 4.4. RAPD PCR işleminde AP4 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan matrisler (A: Yapılan 1. Deneme, B: Yapılan 2. Deneme, C: Yapılan 3. Deneme.

a: % 1 atık su, b: % 10 atık su, c: % 25 atık su, d: % 50 atık su, e: % 75 atık su, f: % 100 atık su, K: Kontrol)

A							B							C						
a	b	c	d	e	f	K	a	b	c	d	e	f	K	a	b	c	d	e	f	K
1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	
1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	
1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	
1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	
1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	
1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	

Çizelge 4.5. RAPD PCR işleminde Primer 640 kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan matrisler (A: Yapılan 1. Deneme, B: Yapılan 2. Deneme, C: Yapılan 3. Deneme).

a: % 1 atık su konsantrasyonu, b: % 10 atık su konsantrasyonu, c: % 25 atık su konsantrasyonu, d: % 50 atık su konsantrasyonu, e: % 75 atık su konsantrasyonu, f: % 100 atık su konsantrasyonu, K: Kontrol)

A							B							C						
a	b	c	d	e	f	K	a	b	c	d	e	f	K	a	b	c	d	e	f	K
1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1
1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

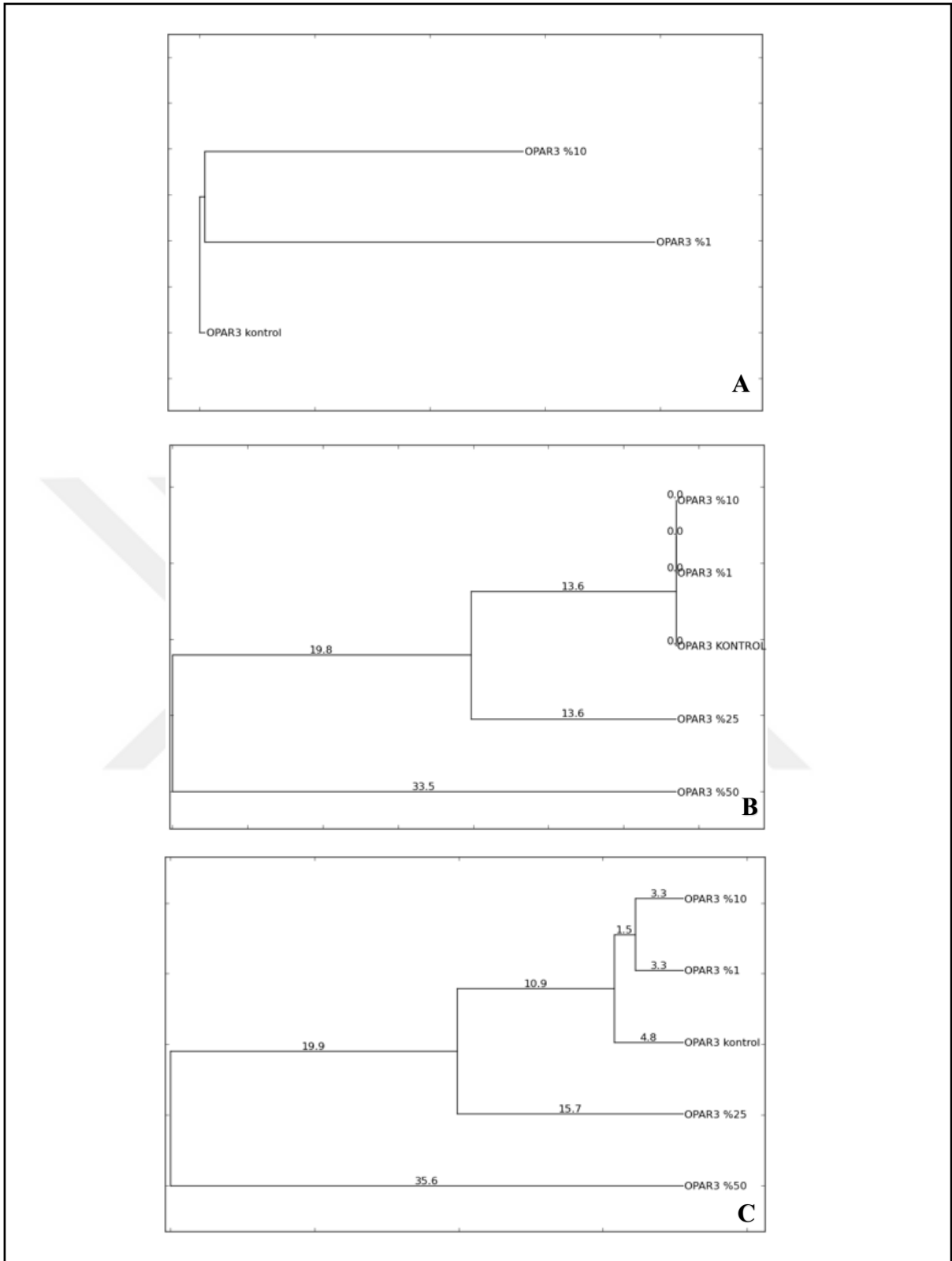
Tabloda belirtilen matrislerden yararlanarak ilgili primerler ve arıtım öncesi atık su konsantrasyonları için GKS hesaplamaları yapılmıştır. GKS analizleri için yapılan denemelerde elde edilen polimorfik bant sayısı ve kontrolde yer alan toplam bant sayısı değerlerinin ortalamaları Çizelge 4.6' da verilmiştir. Hesaplamaların sonucunda elde edilen GKS değerleri yorumlanarak gıda endüstrisi atık suyunun genotoksik etkisi değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.6. Arıtım öncesi atık suyun yapılan üç farklı denemesinde GKS analizleri için elde edilen n ve a değerlerinin ortalamaları

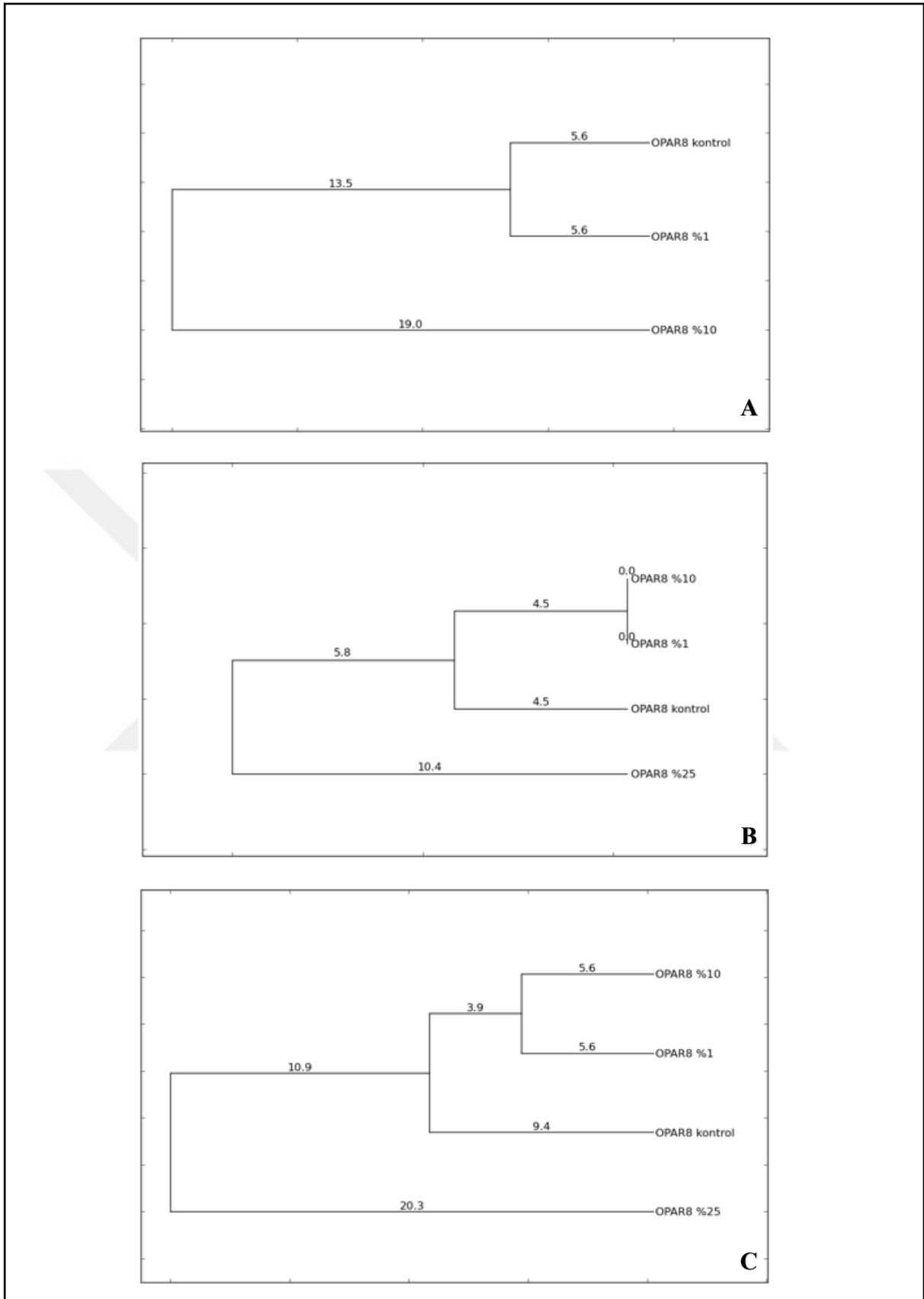
Konsantrasyonlar	OPAR3		OPAR8		AP4		Primer640	
	n _{ort}	a _{ort}	n _{ort}	a _{ort}	n _{ort}	a _{ort}	n _{ort}	a _{ort}
% 1	6,00	1,33	7,33	2,00	6,66	2,66	7,66	0,66
% 10	6,00	0,66	7,33	2,66	6,66	2,66	7,66	0,66
% 25	6,00	3,66	7,33	4,66	6,66	6,33	7,66	1,33
% 50	6,00	5,33	7,33	7,33	6,66	6,66	7,66	6,66
% 75	6,00	6,00	7,33	7,33	6,66	6,66	7,66	7,66
% 100	6,00	6,00	7,33	7,33	6,66	6,66	7,66	7,66

n: Kontrolde bulunan toplam bant sayısı, **a:** Polimorfik bant sayısı

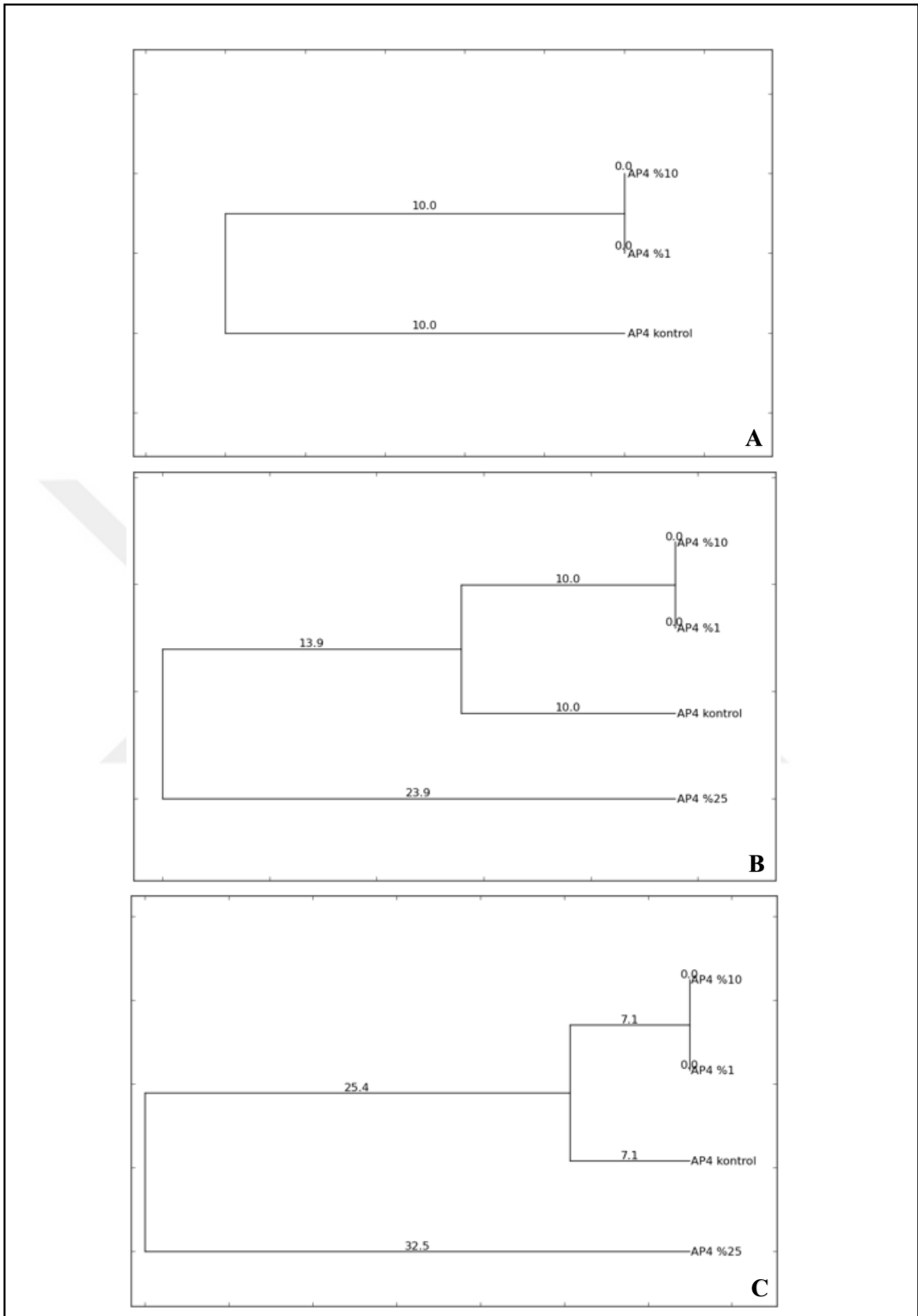
Şekil 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6' da yer alan jel elektroforez işleminin ardından elde edilen görüntüler analiz edilerek filogenetik ağaç (Dendrogram) oluşturulmuştur. Gıda endüstrisi atık suyundan hazırlanan farklı konsantrasyonların *Klebsiella pneumoniae* bakterisinin genetik materyalinde göstermiş olduğu etkinin kontrole göre meydana gelen değişimleri gösteren dendogramlar Şekil 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10' da verilmiştir.



Şekil 4.7 RAPD PCR işleminde OPAR3 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın kümeleme analizi sonucunda ulaşılan dendrogramlar (A: Yapılan 1. Deneme, B: Yapılan 2. Deneme, C: Yapılan 3. Deneme.)



Şekil 4.8. RAPD PCR işleminde OPAR8 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın kümeleme analizi sonucunda ulaşılan dendrogramlar (A: Yapılan 1. Deneme, B: Yapılan 2. Deneme, C: Yapılan 3. Deneme.)



Şekil 4.9. RAPD PCR işleminde AP4 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın kümeleme analizi sonucunda ulaşılan dendrogramlar (A: Yapılan 1. Deneme, B: Yapılan 2. Deneme, C: Yapılan 3. Deneme.)

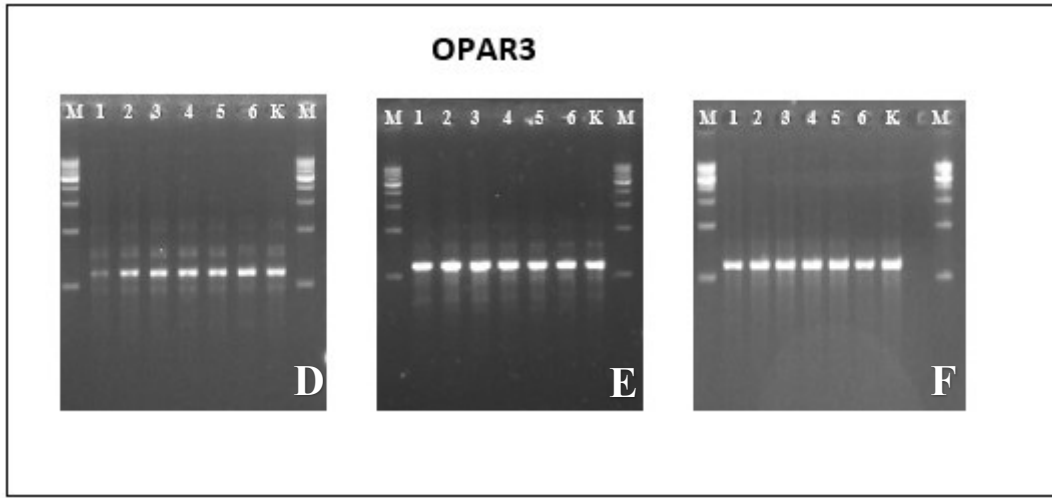


Şekil 4.10. RAPD PCR işleminde Primer 640 kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın kümeleme analizi sonucunda ulaşılan dendrogramlar (A: Yapılan 1. Deneme, B: Yapılan 2. Deneme, C: Yapılan 3. Deneme.)

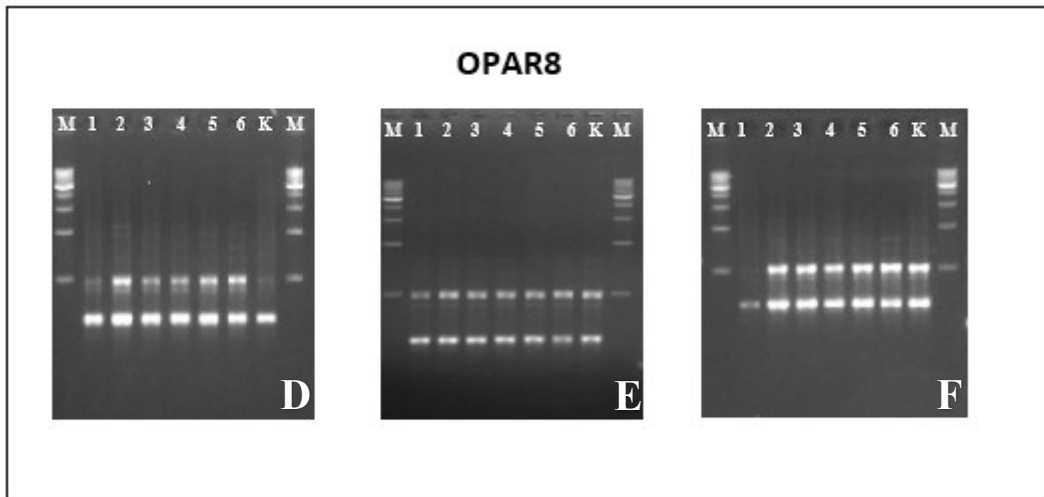
Dendrogramlar incelendiğinde, OPAR3 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında gerçekleştirilen ilk denemede kontrole oranla en fazla farklılığı % 10 konsantrasyonu göstermektedir. % 25, % 50, % 75 ve % 100 konsantrasyonlarında bant elde edilmemiştir. Gerçekleştirilen ikinci denemede kontrole oranla en fazla farklılığı % 50 konsantrasyonu göstermektedir. % 75 ve % 100 konsantrasyonlarında bant elde edilememiştir. Yapılan üçüncü denemede kontrole göre en fazla farklılık gösteren konsantrasyon % 50' dir. % 75 ve % 100 konsantrasyonlarında bant elde edilememiştir. OPAR8 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında gerçekleştirilen ilk denemede kontrole oranla en fazla farklılığı % 10 konsantrasyonu göstermektedir. % 25, % 50, % 75 ve % 100 konsantrasyonlarında bant elde edilememiştir. Yapılan ikinci denemede kontrole göre en fazla farklılık gösteren konsantrasyon % 25' tir. % 50, % 75 ve % 100 konsantrasyonlarında bant elde edilememiştir. Yapılan üçüncü denemede kontrole göre en fazla farklılık gösteren konsantrasyonlar % 25' tir. % 50, % 75 ve % 100 konsantrasyonlarında bant elde edilememiştir. AP4 primeri kullanılarak arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarında gerçekleştirilen ilk denemede kontrole oranla en fazla %1 ve % 10 konsantrasyonları farklılık göstermektedir. % 25, % 50, % 75 ve % 100 konsantrasyonlarında bant elde edilememiştir. Yapılan ikinci denemede kontrole göre en fazla farklılık gösteren konsantrasyon % 25' tir. % 50, % 75 ve % 100 konsantrasyonlarında bant elde edilememiştir. Yapılan üçüncü denemede kontrole göre en fazla farklılık gösteren konsantrasyon % 25' tir. % 50, % 75 ve % 100 konsantrasyonlarında bant elde edilememiştir. Arıtım öncesi Primer 640 ile yapılan ilk denemede kontrole göre en fazla farklılık gösteren konsantrasyon % 25' tir. % 50, % 75 ve % 100 konsantrasyonlarında bant elde edilememiştir. Yapılan ikinci denemede kontrole göre en fazla farklılık gösteren konsantrasyon % 25' tir. % 50, % 75 ve % 100 konsantrasyonlarında bant elde edilememiştir. Yapılan üçüncü denemede kontrole göre en fazla farklılık gösteren konsantrasyon % 50' dir. % 75 ve % 100 konsantrasyonlarında bant elde edilememiştir.

4.5. Arıtım Sonrası Atık Su Konsantrasyonlarında RAPD-PCR Verileri

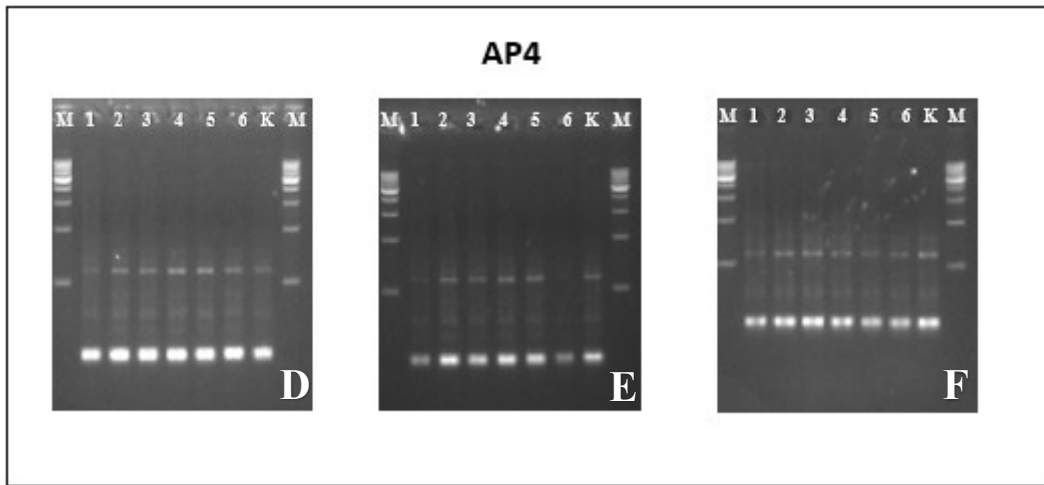
Arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan RAPD-PCR yöntemi arıtım öncesindeki gibi yapılmıştır. Çalışma koşulları ve kullanılan primerler aynıdır. PCR işlemi sonrasında jel elektroforezinden elde edilen görüntüler Şekil 4.11, 4.12, 4.13 ve 4.14' te verilmiştir.



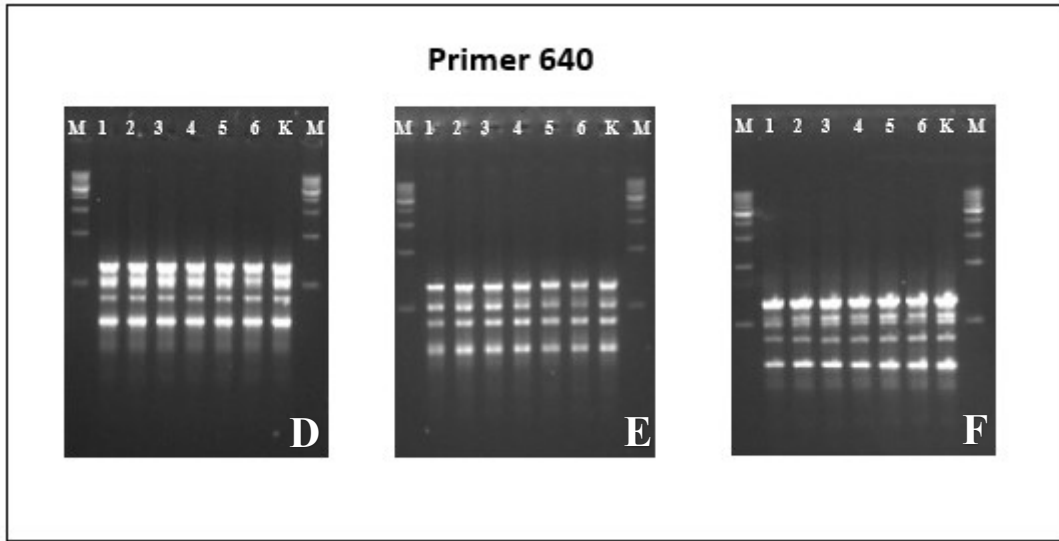
Şekil 4.11. RAPD PCR işleminde OPAR3 primeri kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan profiller (D: Yapılan 1. Deneme, E: Yapılan 2. Deneme, F: Yapılan 3. Deneme. M: Marker, 1: % 1 atık su konsantrasyonu, 2: % 10 atık su konsantrasyonu, 3: % 25 atık su konsantrasyonu, 4: % 50 atık su konsantrasyonu, 5: % 75 atık su konsantrasyonu, 6: % 100 atık su konsantrasyonu, K: Kontrol)



Şekil 4.12. RAPD PCR işleminde OPAR8 primeri kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan profiller (D: Yapılan 1. Deneme, E: Yapılan 2. Deneme, F: Yapılan 3. Deneme. M: Marker, 1: % 1 atık su konsantrasyonu, 2: % 10 atık su konsantrasyonu, 3: % 25 atık su konsantrasyonu, 4: % 50 atık su konsantrasyonu, 5: % 75 atık su konsantrasyonu, 6: % 100 atık su konsantrasyonu, K: Kontrol)



Şekil 4.13. RAPD PCR işleminde AP4 primeri kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan profiller (D: Yapılan 1. Deneme, E: Yapılan 2. Deneme, F: Yapılan 3. Deneme. M: Marker, 1: % 1 atık su konsantrasyonu, 2: % 10 atık su konsantrasyonu, 3: % 25 atık su konsantrasyonu, 4: % 50 atık su konsantrasyonu, 5: % 75 atık su konsantrasyonu, 6: % 100 atık su konsantrasyonu, K: Kontrol)



Şekil 4.14. RAPD PCR işleminde Primer 640 kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan profiller (D: Yapılan 1. Deneme, E: Yapılan 2. Deneme, F: Yapılan 3. Deneme. M: Marker, 1: % 1 atık su konsantrasyonu, 2: % 10 atık su konsantrasyonu, 3: % 25 atık su konsantrasyonu, 4: % 50 atık su konsantrasyonu, 5: % 75 atık su konsantrasyonu, 6: % 100 atık su konsantrasyonu, K: Kontrol)

4.6. Arıtım Sonrası RAPD-PCR Görüntülerinin Analizi

Üç farklı zamanda gerçekleştirilen arıtım sonrası RAPD-PCR işleminde arıtım öncesinde uygulanan işlemler tekrar edilmiştir. Çalışma koşulları, kullanılan primerler ve analiz için kullanılan programlar aynıdır. Bantların bulunduğu yerler 1 (bir), bantların bulunmadığı yerler ise 0 (sıfır) olarak kodlanmıştır. 4 farklı primer için gerçekleştirilen RAPD-PCR denemeleri sonucunda çıkarılan matrisler Çizelge 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10' te gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. RAPD PCR işleminde AP4 primeri kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan matrisler (D: Yapılan 1. Deneme, E: Yapılan 2. Deneme, F: Yapılan 3. Deneme.

a: % 1 atık su, b: % 10 atık su, c: % 25 atık su, d: % 50 atık su, e: % 75 atık su, f: % 100 atık su, K: Kontrol)

D							E							F						
a	b	c	d	e	f	K	a	b	c	d	e	f	K	a	b	c	d	e	f	K
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.10. RAPD PCR işleminde Primer 640 kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın sonucunda ulaşılan matrisler (D: Yapılan 1. Deneme, E: Yapılan 2. Deneme, F: Yapılan 3. Deneme.

a: % 1 atık su konsantrasyonu, b: % 10 atık su konsantrasyonu, c: % 25 atık su konsantrasyonu, d: % 50 atık su konsantrasyonu, e: % 75 atık su konsantrasyonu, f: % 100 atık su konsantrasyonu, K: Kontrol)

D							E							F						
a	b	c	d	e	f	K	a	b	c	d	e	f	K	a	b	c	d	e	f	K
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

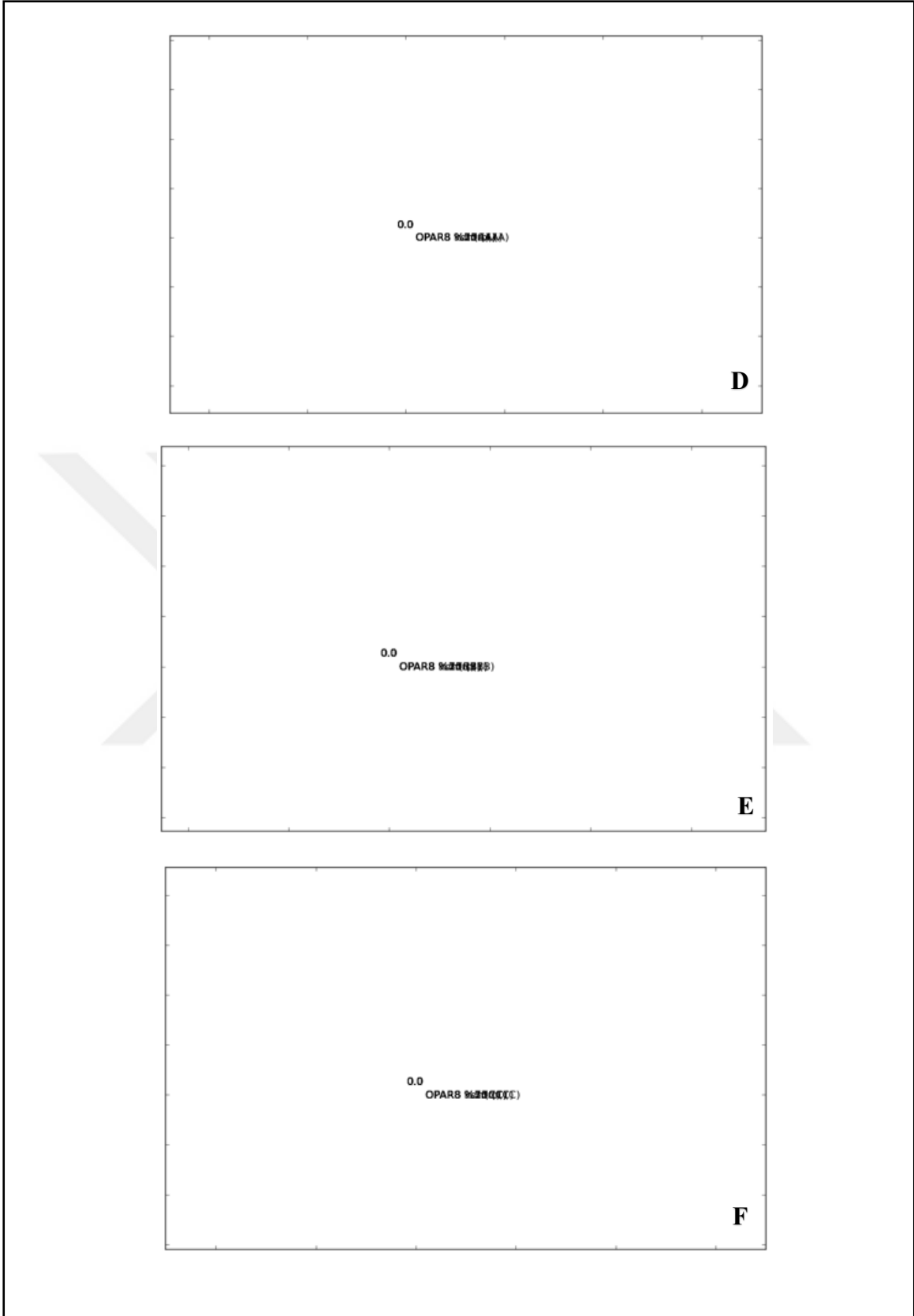
Tabloda belirtilen matrislerden yararlanarak ilgili primerler ve arıtım sonrası atık su konsantrasyonları için GKS hesaplamaları yapılmıştır. GKS analizleri için yapılan denemelerde elde edilen polimorfik bant sayısı ve kontrolde yer alan toplam bant sayısı

değerlerinin ortalamaları Çizelge 4.11’ da verilmiştir. Hesaplamaların sonucunda elde edilen gıda endüstrisi atık suyunun GKS değerleri yorumlanarak genotoksik etkisi değerlendirilmiştir.

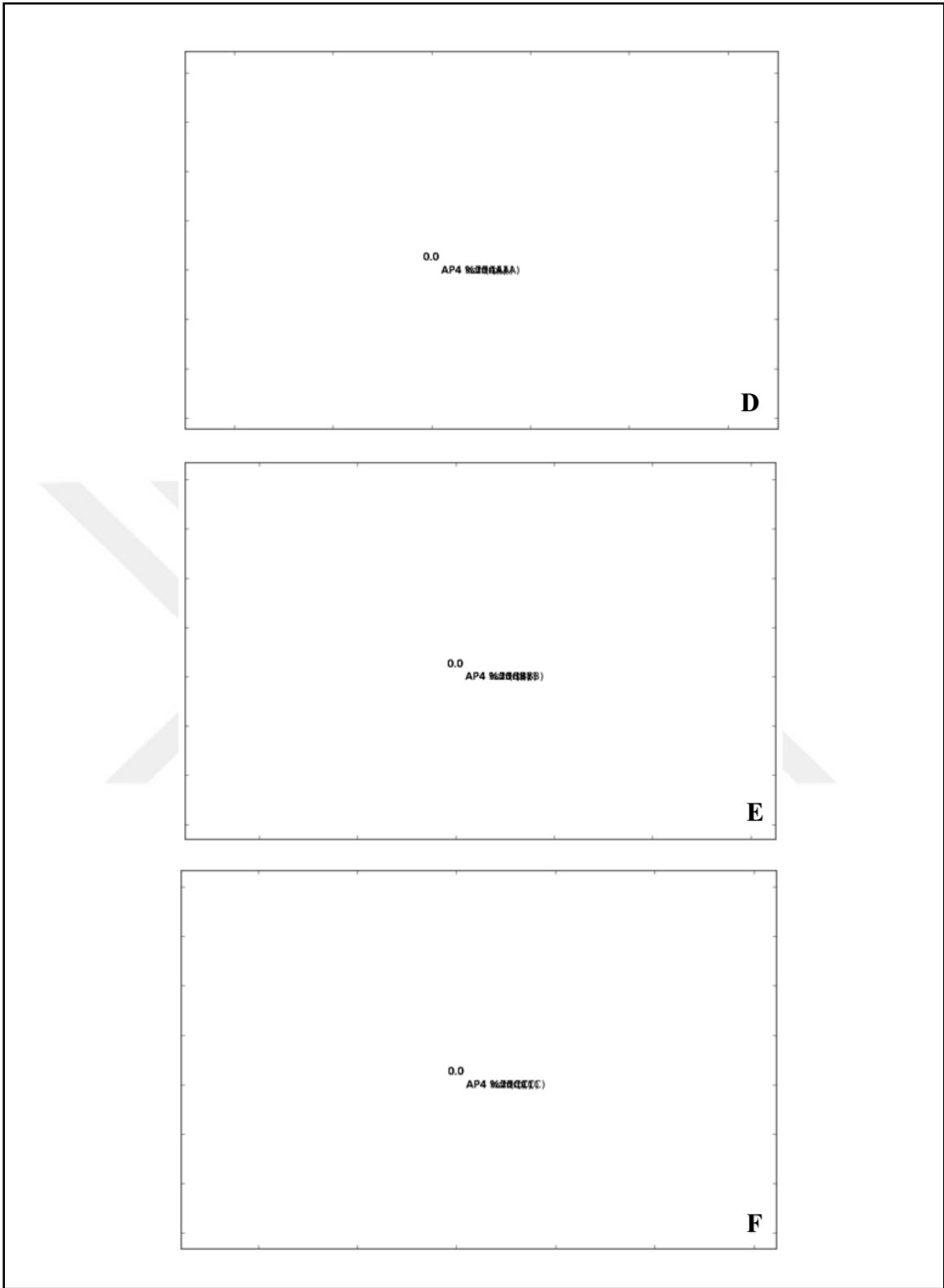
Çizelge 4.11. Arıtım sonrası atık suyun yapılan üç farklı denemesinde GKS analizleri için elde edilen n ve a değerlerinin ortalamaları

Konsantrasyonlar	OPAR3		OPAR8		AP4		Primer640	
	n _{ort}	a _{ort}	n _{ort}	a _{ort}	n _{ort}	a _{ort}	n _{ort}	a _{ort}
% 1	5,33	0	5,66	0	5,66	0	6,33	0
% 10	5,33	0	5,66	0	5,66	0	6,33	0
% 25	5,33	0	5,66	0	5,66	0	6,33	0
% 50	5,33	0	5,66	0	5,66	0	6,33	0
% 75	5,33	0	5,66	0	5,66	0	6,33	0
% 100	5,33	0	5,66	0	5,66	0	6,33	0

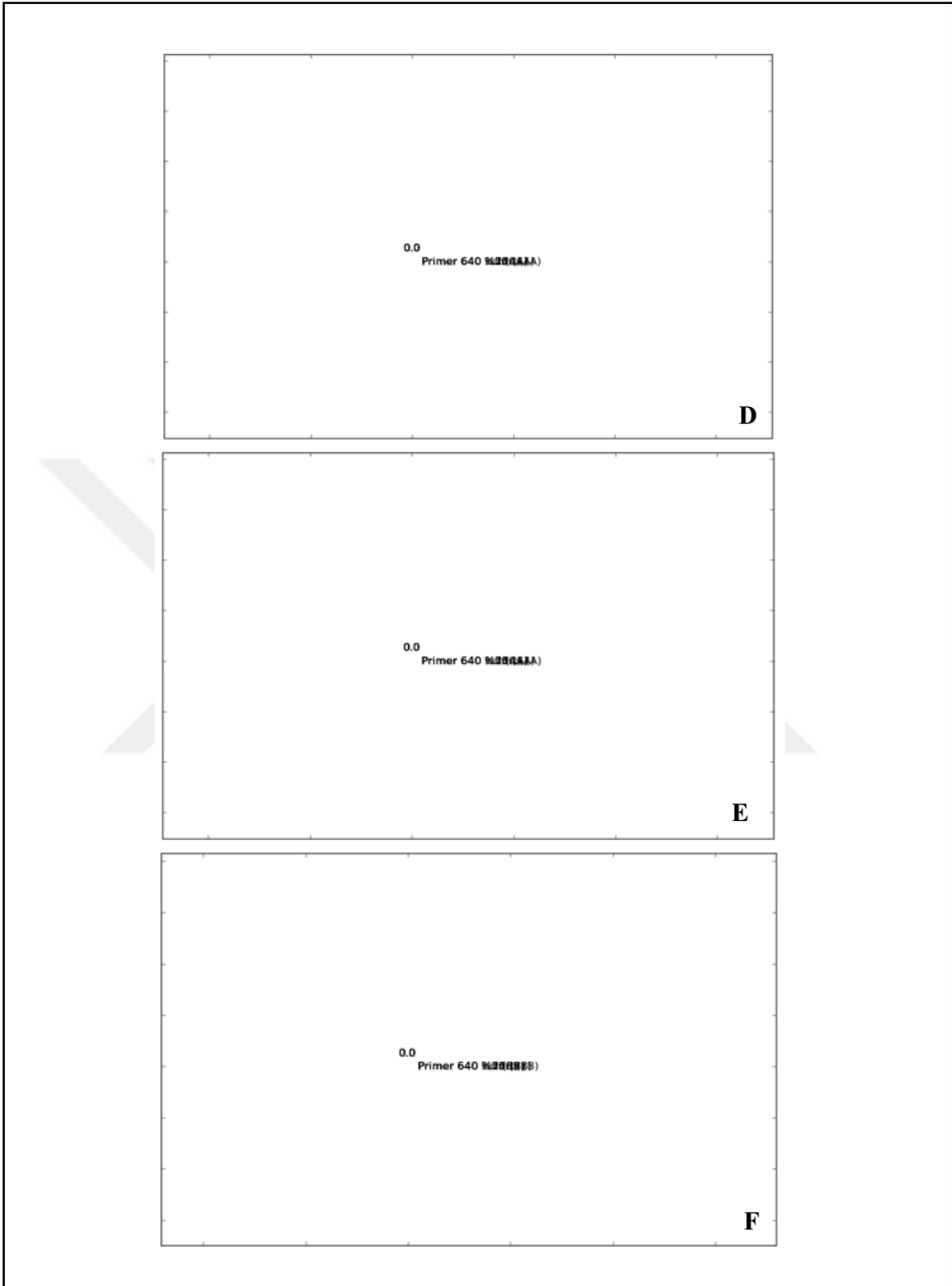
n: Kontrolde bulunan toplam bant sayısı, **a:** Polimorfik bant sayısı



Şekil 4.16. RAPD PCR işleminde OPAR8 primeri kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın kümeleme analizi sonucunda ulaşılan dendrogramlar (D: Yapılan 1. Deneme, E: Yapılan 2. Deneme, F: Yapılan 3. Deneme.)



Şekil 4.17. RAPD PCR işleminde AP4 primeri kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın kümeleme analizi sonucunda ulaşılan dendogramlar (D: Yapılan 1. Deneme, E: Yapılan 2. Deneme, F: Yapılan 3. Deneme.)



Şekil 4.18. RAPD PCR işleminde Primer 640 kullanılarak arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında yapılan üç farklı çalışmanın kümeleme analizi sonucunda ulaşılan dendrogramlar (D: Yapılan 1. Deneme, E: Yapılan 2. Deneme, F: Yapılan 3. Deneme.)

Gıda endüstrisi atık suyunun arıtıldıktan sonra atık su konsantrasyonları için üç farklı RAPD-PCR denemesi sonucunda elde edilen dendrogramlar incelendiğinde kontrole göre bantlarda farklılık görülmemiştir. Atık su arıtıldıktan sonra DNA materyali üzerinde hiçbir etki gözlemlenmemiştir.

4.7. Arıtım Öncesi ve Arıtım Sonrası GKS Değerlerinin Karşılaştırılması

Çizelge 4.12' de arıtım öncesi ve arıtım sonrası atık sularının GKS yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 4.12. Arıtım öncesi ve arıtım sonrası atık sularının GKS yüzdeleri

Kons.	<u>OPAR3</u> GKS (%)		<u>OPAR8</u> GKS (%)		<u>AP4</u> GKS (%)		<u>Primer640</u> GKS (%)	
	AÖ	AS	AÖ	AS	AÖ	AS	AÖ	AS
% 1	77,78	100 ^a	72,73	100 ^a	60	100 ^a	91,31	100 ^a
% 10	88,89	100 ^a	63,64	100 ^a	60	100 ^a	91,31	100 ^a
% 25	38,89	100 ^a	36,37	100 ^a	5	100 ^a	82,61	100 ^a
% 50	11,12	100 ^a	100	100	100	100	13,05	100 ^a
% 75	100	100	100	100	100	100	100	100
% 100	100	100	100	100	100	100	100	100

AÖ: Arıtım öncesi atık su, AS: Arıtım sonrası atık su, ^a: Arıtmıdan sonra artan GKS değerleri

Çizelge 4.12' de yer alan genomik kalıp stabilitesi değerleri incelendiğinde, arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarının RAPD-PCR işleminin OPAR3 primeri kullanılarak yapılan sonucunda elde edilen GKS değerlerine bakıldığında % 1 konsantrasyonunda % 77.78, % 10 konsantrasyonunda % 88.89, % 25 konsantrasyonunda % 38.89 ve % 50

konsantrasyonunda % 11.12 olarak hesaplanmıştır. Arıtım sonrasında ise GKS değerleri % 100' e çıkmıştır. OPAR8 primeri ile yapılan çalışmada GKS değerleri % 1 konsantrasyonunda % 72.73, % 10 konsantrasyonunda % 63.64, % 25 konsantrasyonunda % 36.37 olarak hesaplanmıştır. Arıtım sonrasında ise GKS değerleri % 100' e çıkmıştır. AP4 primeri ile yapılan çalışmada GKS değerleri % 1 konsantrasyonunda % 60, % 10 konsantrasyonunda % 60, % 25 konsantrasyonunda % 5 olarak hesaplanmıştır. Arıtım sonrasında ise GKS değerleri % 100' e çıkmıştır. Primer 640 ile yapılan RAPD-PCR sonucunda elde edilen GKS değerleri ise % 1 konsantrasyonunda % 91.31, % 10 konsantrasyonunda % 91.31, % 25 konsantrasyonunda % 82.61 ve % 50 konsantrasyonunda % 13.05 olarak hesaplanmıştır. Arıtım sonrasında ise GKS değerleri % 100' e çıkmıştır.

4.8. Mikrotoks Analizi Sonuçları

Bu testte 5 dk ve 15 dk' ya göre ölçümler gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda belirlenen arıtım öncesi ve arıtım sonrası toksisite değerleri Çizelge 4.13' de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Mikrotoks analizi sonucunda elde edilen toksisite değerleri

Atık Su Konsantrasyonları	Akut Toksikite Değeri (%) 5 dk		Akut Toksikite Değeri (%) 15 dk	
	AÖ	AS	AÖ	AS
% 1	0	85	11	86
% 10	16	18	20	19
% 25	39	17	28	18
% 50	56	13	70	25
% 75	12	92	20	63
% 100	12	51	24	52

AÖ: Arıtım öncesi, AS: Arıtım sonrası

Mikrotoks analizi sonucunda çizelge 4.13.'deki değerler incelendiğinde, % 1 konsantrasyonda arıtım öncesi atık suda 5 dk' da % 0 olan değer 15 dk' da % 11' e çıktığı, arıtım sonrası atık suda ise 5 dk' da % 85 olan değer 15 dk' da % 86' ya çıktığı görülmektedir. % 10 konsantrasyonda arıtım öncesi atık suda 5 dk' da % 16 olan değer 15 dk' da % 20' ye çıktığı, arıtım sonrası atık suda ise 5 dk' da % 18 olan değer 15 dk' da % 19' a çıktığı görülmektedir. % 25 konsantrasyonda arıtım öncesi atık suda 5 dk' da % 39 olan değer 15 dk' da % 28' e düştüğü, arıtım sonrası atık suda ise 5 dk' da % 17 olan değer 15 dk' da % 18' e çıktığı görülmektedir. % 50 konsantrasyonda arıtım öncesi atık suda 5 dk' da % 56 olan değer 15 dk' da % 70' e çıktığı, arıtım sonrası atık suda ise 5 dk' da % 13 olan değer 15 dk' da % 25' e çıktığı görülmektedir. % 75 konsantrasyonda arıtım öncesi atık suda 5 dk' da % 12 olan değer 15 dk' da % 20' ye çıktığı, arıtım sonrası atık suda ise 5 dk' da % 92 olan değer 15 dk' da % 63' e düştüğü görülmektedir. % 100 konsantrasyonda arıtım öncesi atık suda 5 dk' da % 12 olan değer 15 dk' da % 24' e çıktığı, arıtım sonrası atık suda ise 5 dk' da % 51 olan değer 15 dk' da % 52' ye çıktığı görülmektedir. Testte, 5 ve 15 dakikalık periyodlar içerisinde arıtım öncesi ve arıtım sonrası değerler incelendiğinde 15 dakikada gözlemlenen değerlerin daha yüksek çıktığı görülmektedir. Her bir konsantrasyon için yapılan uygulamalarda arıtım öncesi ve arıtım sonrası atık sular karşılaştırıldığında belirgin bir farklılık olmadığı belirlenmiş, dolayısıyla akut toksik etki gözlenmemiştir.

4.9. *Allium* Test Analizi Sonuçları

Allium testinde, her bir konsantrasyon ve kontrol grubu için 6 adet soğan kullanılmıştır. Her bir soğandan 3 adet preparat yapılmış ardından daimi hale getirilmiştir. Daimi hale getirilen preparatlar mikroskopta incelenerek rastgele iki bölgeden fotoğraf çekilmiştir. Çekilen fotoğraflar .jpg formatında kaydedilmiştir. Elde edilen görüntülerdeki hücreler sayılarak mitotik indeks ve kromozomal aberasyon indeks hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.14. ve 4.15.'ye kaydedilmiştir.

4.9.1. Arıtım öncesi atık suyun *Allium Test* analizleri

Çizelge 4.14. *Allium cepa* kök uçlarının arıtım öncesi atık suyunun farklı konsantrasyonlarında muamelesinden sonra toplam olarak sayılan hücre sayıları, toplam mitoz hücre sayıları, mitotik fazların toplam ve anormal hücre sayılarının yüzdesi ve mitotik indeks

Süre (saat)	Kons.	Toplam Hücre Sayısı	Toplam Mitoz Sayısı	Mitotik Evreler (%)				MI Ort±SS	Kromozom Aberasyon Tipleri (%)										CAI Ort±SS		
				Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz		Düzensiz profaz	Dağınık metafaz	Dağınık anafaz	Sıkışık metafaz	C-metafaz	Met. Dış. Kalmış kromozom	Anafaz Köprü	Multipolar anafaz	Ana.. Dış. Kalmış kromozom	Telofaz Köprü		Mikronükleus	
24	Kontrol	5933	253	59,09	21,49	8,68	10,74	4,56±2,23	0,02	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,04 ± 0,06
	% 1	6249	301	58,14	21,93	12,62	7,31	4,87±1,45	0,08	0,08	0	0	0	0	0,02	0,02	0	0	0	0	0,20 ± 0,22
	% 25	4837	296	56,04	25,50	4,36	14,09	6,11±1,05	0,33	0,33	0,04	0,04	0,02	0	0	0	0	0,04	0	0	0,80 ± 0,54
	% 50	5002	307	50,80	26,54	7,44	15,21	6,24±1,46	0,12	0,38	0,06	0,04	0,06	0	0,06	0	0	0	0	0	0,76 ± 0,41
	% 75	4826	334	54,05	21,92	13,51	10,51	6,87±1,55	0,27	0,23	0,08	0,06	0	0,06	0,06	0	0,02	0	0	0	0,82 ± 0,33
	% 100	5172	387	44,95	28,03	12,12	14,65	7,57±1,25*	0,33	0,39	0,10	0,21	0,02	0	0,10	0,02	0	0,02	0	0	1,25 ± 0,82*
48	Kontrol	5257	168	70,12	15,85	7,31	6,71	3,77±1,85	0,13	0,04	0	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0,23 ± 0,17
	% 1	4411	236	52,79	24,46	11,59	10,73	5,66±2,67	0,09	0,14	0,07	0,04	0	0,02	0,02	0	0	0	0,02	0	0,44 ± 0,25
	% 25	5100	422	57,82	26,78	8,06	7,35	8,43±1,78*	0,10	0,39	0,02	0	0,02	0,08	0,02	0	0	0,02	0	0	0,68 ± 0,33
	% 50	4679	341	48,02	29,48	10,94	9,42	7,4±1,37*	0,09	0,31	0	0,11	0,15	0,04	0,09	0	0,07	0,02	0	0	1,17 ± 0,17*
	% 75	4132	333	48,35	27,63	12,61	10,81	8,07±1,72*	0,22	0,36	0,12	0,17	0	0,17	0,19	0	0,07	0	0	0	1,37 ± 0,43*
	% 100	3890	299	43,81	29,43	14,72	12,04	7,71±1,50*	0,23	0,51	0,08	0,20	0	0,15	0,08	0	0,08	0	0	0	1,38 ± 0,58*

*: MI ve CAI' da kontrole göre artış olduğunu ifade etmektedir. p<0.05

Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyunun gösterebileceği etkileri *Allium* test kullanılarak 24 ve 48 saat uygulamalarında kromozomlar üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmiştir. Sonuçlara SPSS 28.0.0.0 programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi ANOVA, Tukey post hoc testi uygulanmıştır. Çalışmanın sonuçlarını aşağıdaki şekilde değerlendirebiliriz.

Her bir konsantrasyonda en az 3800 hücre sayılmıştır. En çok anomali profaz ve metafaz safhalarında gözlemlenmiştir. Telofaz safhasında ise çok az sayıda anomaliye rastlanmıştır. Maruz bırakma süresinin artması ile toplam hücre sayısında azalma meydana gelmiştir. Pozitif kontrol grubunda 24 saat uygulamasında sadece profaz safhasında anomali rastlarken, 48 saat uygulamasında profaz ve metafaz safhalarında anomaliye rastlanmaktadır. En çok rastlanan metafaz anomalisi dağınık metafazdır.

Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15 incelenecek olursa deneyde düzensiz profaz, dağınık metafaz, dağınık anafaz, sıkışık metafaz, c-metafaz, metafazda dışarda kalmış kromozom, multipolar anafaz, anafazda dışarda kalmış kromozom, telofaz köprü ve mikronükleus anomalilerine rastlanmıştır.

Çizelge 4.14 incelendiğinde kontrol olarak saf suda 24 saat köklendirilen soğanlarda toplam 5933 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 253' dir. Mitotik evreler ve kromozom aberasyon tipleri toplam hücre sayısına göre (%) oranları hesaplanarak tabloya eklenmiştir. 24 saat kontrol grubunda % 59,09 profaz, % 21,49 metafaz, % 8,68 anafaz ve % 10,74 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 4,56 ve standart sapması 2,23 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu için saf suda 24 saat köklendirilen soğanlarda % 0,02 düzensiz profaz ve % 0,02 dağınık anafaz anomalisi gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 0,04 ve standart sapması 0,06 olarak hesaplanmıştır. Arıtım öncesi atık suyun % 1 konsantrasyonunda 24 saat köklendirilen soğanlarda toplam 6249 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 301' dir. % 58,14 profaz, % 21,93 metafaz, % 12,62 anafaz ve % 7,31 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 4,87 ve standart sapması 1,45 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,08 düzensiz profaz, % 0,08 dağınık metafaz, % 0,02 anafaz köprü ve % 0,02 multipolar anafaz gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 0,20 ve standart sapması 0,22 olarak hesaplanmıştır. Arıtım öncesi atık suyun % 25 konsantrasyonunda 24 saat köklendirilen soğanlarda toplam 4837

hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 296' dir. % 56,04 profaz, % 25,50 metafaz, % 4,36 anafaz ve % 14,09 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 6,11 ve standart sapması 1,05 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,33 düzensiz profaz, % 0,33 dağınık metafaz, % 0,04 dağınık anafaz, % 0,04 sıkışık metafaz, % 0,02 c-metfaz ve % 0,04 telofaz köprü gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 0,80 ve standart sapması 0,54 olarak hesaplanmıştır. Arıtım öncesi atık suyun % 50 konsantrasyonunda 24 saat köklendirilen soğanlarda toplam 5002 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 307' dir. % 50,80 profaz, % 26,54 metafaz, % 7,44 anafaz ve % 15,21 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 6,24 ve standart sapması 1,46 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,12 düzensiz profaz, % 0,38 dağınık metafaz, % 0,06 dağınık anafaz, % 0,04 sıkışık metafaz, % 0,06 c-metfaz ve % 0,06 anafaz köprü gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 0,76 ve standart sapması 0,41 olarak hesaplanmıştır. Arıtım öncesi atık suyun % 75 konsantrasyonunda 24 saat köklendirilen soğanlarda toplam 4826 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 334' dir. % 54,05 profaz, % 21,92 metafaz, % 13,51 anafaz ve % 10,51 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 6,87 ve standart sapması 1,55 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,27 düzensiz profaz, % 0,23 dağınık metafaz, % 0,08 dağınık anafaz, % 0,06 sıkışık metafaz, % 0,06 metafazda dışarda kalmış kromozom, % 0,06 anafaz köprü ve % 0,02 anafazda dışarda kalmış kromozom gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 0,82 ve standart sapması 0,33 olarak hesaplanmıştır. Arıtım öncesi atık suyun % 100 konsantrasyonunda 24 saat köklendirilen soğanlarda toplam 5172 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 387' dir. % 44,95 profaz, % 28,03 metafaz, % 12,12 anafaz ve % 14,65 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 7,57 ve standart sapması 1,25 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,33 düzensiz profaz, % 0,39 dağınık metafaz, % 0,10 dağınık anafaz, % 0,21 sıkışık metafaz, % 0,02 c-metfaz, % 0,10 anafaz köprü, % 0,02 multipolar anafaz ve % 0,02 telofaz köprü gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 1,25 ve standart sapması 0,82 olarak hesaplanmıştır.

Kontrol olarak saf suda 48 saat köklendirilen soğanlarda toplam 5257 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 168' dir. 48 saat kontrol grubunda % 70,12 profaz, % 15,85 metafaz, % 7,31 anafaz ve % 6,71 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 3,77 ve standart sapması 1,85 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu için saf suda 48 saat köklendirilen soğanlarda % 0,13 düzensiz profaz, % 0,04 dağınık metafaz ve % 0,02 c-

metafaz anomalisi gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 0,23 ve standart sapması 0,17 olarak hesaplanmıştır. Arıtım öncesi atık suyun %1 konsantrasyonunda 48 saat köklendirilen soğanlarda toplam 4411 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 236' tür. % 52,79 profaz, % 24,46 metafaz, % 11,59 anafaz ve % 10,73 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 5,66 ve standart sapması 2,67 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,09 düzensiz profaz, % 0,14 dağılık metafaz, % 0,07 dağılık anafaz, % 0,04 sıkışık metafaz, % 0,02 metafazda dışarda kalmış kromozom, % 0,02 anafaz köprü ve % 0,02 mikronükleus gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 0,44 ve standart sapması 0,25 olarak hesaplanmıştır. Arıtım öncesi atık suyun % 25 konsantrasyonunda 48 saat köklendirilen soğanlarda toplam 5100 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 422' tür. % 57,82 profaz, % 26,78 metafaz, % 8,06 anafaz ve % 7,35 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 8,43 ve standart sapması 1,78 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,10 düzensiz profaz, % 0,39 dağılık metafaz, % 0,02 dağılık anafaz, % 0,02 c-metafaz, % 0,08 metafazda dışarda kalmış kromozom, % 0,02 anafaz köprü ve % 0,02 telofaz köprü gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 0,68 ve standart sapması 0,33 olarak hesaplanmıştır. Arıtım öncesi atık suyun % 50 konsantrasyonunda 48 saat köklendirilen soğanlarda toplam 4679 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 341' tür. % 48,02 profaz, % 29,48 metafaz, % 10,94 anafaz ve % 9,42 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 7,40 ve standart sapması 1,37 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,09 düzensiz profaz, % 0,31 dağılık metafaz, % 0,11 sıkışık metafaz, % 0,15 c-metafaz, % 0,04 metafazda dışarda kalmış kromozom, % 0,09 anafaz köprü, % 0,07 anafazda dışarda kalmış kromozom ve % 0,02 telofaz köprü gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 1,17 ve standart sapması 0,17 olarak hesaplanmıştır. Arıtım öncesi atık suyun % 75 konsantrasyonunda 48 saat köklendirilen soğanlarda toplam 4132 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 333' tür. % 48,35 profaz, % 27,63 metafaz, % 12,61 anafaz ve % 10,81 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 8,07 ve standart sapması 1,72 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,22 düzensiz profaz, % 0,36 dağılık metafaz, % 0,12 dağılık anafaz, % 0,17 sıkışık metafaz, % 0,17 metafazda dışarda kalmış kromozom, % 0,19 anafaz köprü ve % 0,07 anafazda dışarda kalmış kromozom gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 1,37 ve standart sapması 0,43 olarak hesaplanmıştır. Arıtım öncesi atık suyun % 100 konsantrasyonunda 48 saat köklendirilen soğanlarda toplam 3890 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 299' tür. % 43,81 profaz, % 29,43 metafaz, % 14,72 anafaz ve % 12,04

telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 7,71 ve standart sapması 1,50 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,23 düzensiz profaz, % 0,51 dağınık metafaz, % 0,08 dağınık anafaz, % 0,20 sıkışık metafaz, % 0,15 metafazda dışarda kalmış kromozom, % 0,08 anafaz köprü ve % 0,08 anafazda dışarda kalmış kromozom gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 1,38 ve standart sapması 0,58 olarak hesaplanmıştır.

Analiz sonuçları istatistiksel olarak tek yönlü varyans analizi ANOVA, Tukey post hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Arıtım öncesi 24 ve 48 saat uygulamaları kendi içerisinde P değeri $P=0,05$ e göre değerlendirilmiştir. Arıtım öncesi 24 saat uygulamasında $P<0,05$ olduğundan dolayı konsantrasyonların ve kontrolün mitotik indeksi ve kromozomal aberasyonları arasında anlamlı bir farklılık olduğu belirlenmiştir. Mitotik indekste kontrol ile % 100 konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmiştir. Kromozomal aberasyon indeksinde ise kontrole ile % 100 konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmiştir. Arıtım öncesi 48 saat uygulamasında $P<0,05$ olduğundan dolayı konsantrasyonların ve kontrolün mitotik indeksi ve kromozomal aberasyonları arasında anlamlı bir farklılık olduğu belirlenmiştir. Mitotik indekste kontrol ile % 25, % 50, % 75 ve % 100 konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmiştir. Kromozomal aberasyon indeksinde ise kontrole ile % 50, % 75 ve % 100 konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmiştir.

4.9.2. Arıtım sonrası atık suyun *Allium* Test analizleri

Çizelge 4.15. *Allium cepa* kök uçlarının arıtım sonrası atık suyunun farklı konsantrasyonlarında muamelesinden sonra toplam olarak sayılan hücre sayıları, toplam mitoz hücre sayıları, mitotik fazların toplam ve anormal hücre sayılarının yüzdesi ve mitotik indeks

Süre (saat)	Kons.	Toplam Hücre Sayısı	Toplam Mitoz Sayısı	Mitotik Evreler (%)				MI Ort±SS	Kromozom Aberasyon Tipleri (%)										CAI Ort±SS Medyan (Min-Maks.)			
				Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz		Düzensiz profaz	Dağınık metafaz	Dağınık anafaz	Sıkışık metafaz	C-metafaz	Met. Dış. Kalmış kromozom	Anafaz Köprü	Multiple anafaz	Ana. Dış. Kalmış kromozom	Telofaz Köprü		Mikronükleus		
24	Kontrol	4103	188	31,91	32,98	20,74	14,36	4,61±1,41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ± 0
	%1	4295	207	39,05	24,29	16,19	19,05	4,72±1,33	0,19	0,09	0	0,02	0	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0,32 ± 0,25
	%25	4072	205	57,56	25,37	5,85	11,22	5,02±2,03	0,07	0,17	0	0,12	0	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0,38 ± 0,36
	%50	4339	204	37,38	34,47	10,68	17,96	4,69±0,83	0,07	0,07	0	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,23 ± 0,23
	%75	4527	205	46,08	29,41	13,73	10,78	4,53±0,96	0,07	0,04	0	0	0	0	0,04	0	0	0	0	0	0	0,15 ± 0,18
	%100	4500	233	36,48	33,91	17,17	11,16	5,27±1,27	0,04	0,11	0,04	0,04	0	0	0,11	0	0	0	0	0	0	0,38 ± 0,29
48	Kontrol	4758	136	39,13	24,64	15,22	21,01	3,05±2,00	0,02	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ± 0-0,31
	%1	4382	201	45,23	27,64	18,09	9,05	4,60±1,96	0,02	0,04	0,02	0	0	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0,05± 0-0,55
	%25	3973	204	58,25	31,55	10,68	12,62	5,15±1,17	0,10	0,15	0,02	0,15	0	0,02	0	0	0	0,02	0	0	0	0,45 ± 0-1,09
	%50	4416	197	35,02	39,09	14,72	10,66	4,44±2,08	0,02	0,07	0	0	0	0	0,02	0	0	0	0,02	0	0	0,13 ± 0-0,25
	%75	4256	169	40,83	34,32	20,71	4,14	4±1,09	0,09	0,02	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,21 ± 0-0,32
	%100	4549	150	35,33	30	24,67	8,67	3,30±1,05	0,04	0,02	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05 ± 0-0,29

P<0.05

Gıda endüstrisi arıtım sonrası atık suyunun gösterebileceği etkileri *Allium* test kullanılarak 24 ve 48 saat uygulamalarında kromozomlar üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmiştir. Sonuçlara SPSS 28.0.0.0 programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi ANOVA, Tukey post hoc testi uygulanmıştır. Çalışmanın sonuçlarını aşağıdaki şekilde değerlendirebiliriz.

Her bir konsantrasyonda en az 4000 hücre sayılmıştır. Kromozom anomalileri daha çok profaz, metafaz ve anafaz safhalarında gözlemlenmiştir. Telofaz safhasında ise çok az anomaliye rastlanmıştır. Kontrol grubunda 24 saat uygulamasında anomaliye rastlanmazken, 48 saat uygulamasında profaz ve metafaz safhalarında anomaliye rastlanmaktadır. Atık suyun konsantrasyonunun artması ile kontrole göre mitotik indekste artış gözlemlenmektedir.

Çizelge 4.15 incelendiğinde kontrol olarak saf suda 24 saat uygulamasında köklendirilen soğanlarda toplam 4103 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 188' dir. Mitotik evreler ve kromozom aberasyon tipleri toplam hücre sayısına göre (%) oranları hesaplanarak tabloya eklenmiştir. 24 saat kontrol grubunda % 31,91 profaz, % 32,98 metafaz, % 20,74 anafaz ve % 14,36 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 4,61 ve standart sapması 1,41 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu için saf suda 24 saat köklendirilen soğanlarda anomaliye rastlanmamıştır. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 0,00 ve standart sapması 0,00 olarak hesaplanmıştır. Arıtım sonrası atık suyun % 1 konsantrasyonunda 24 saat köklendirilen soğanlarda toplam 4295 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 207' dir. % 39,05 profaz, % 24,29 metafaz, % 16,19 anafaz ve % 19,05 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 4,72 ve standart sapması 1,33 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,19 düzensiz profaz, % 0,09 dağınık metafaz, % 0,02 sıkışık metafaz ve % 0,02 anafaz köprü gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 0,32 ve standart sapması 0,25 olarak hesaplanmıştır. Arıtım sonrası atık suyun % 25 konsantrasyonunda 24 saat köklendirilen soğanlarda toplam 4072 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 205' tir. % 57,56 profaz, % 25,37 metafaz, % 5,85 anafaz ve % 11,22 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 5,02 ve standart sapması 2,03 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,07 düzensiz profaz, % 0,17 dağınık metafaz, % 0,12 sıkışık metafaz ve % 0,02 anafaz köprü gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 0,38 ve standart sapması 0,36 olarak hesaplanmıştır. Arıtım sonrası atık suyun %

50 konsantrasyonunda 24 saat köklendirilen soğanlarda toplam 4339 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 204' dir. % 37,38 profaz, % 34,47 metafaz, % 10,68 anafaz ve % 17,96 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 4,69 ve standart sapması 0,83 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,07 düzensiz profaz, % 0,07 dağınık metafaz ve % 0,07 sıkışık metafaz gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 0,23 ve standart sapması 0,23 olarak hesaplanmıştır. Arıtım sonrası atık suyun % 75 konsantrasyonunda 24 saat köklendirilen soğanlarda toplam 4527 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 205' tür. % 46,08 profaz, % 29,41 metafaz, % 13,73 anafaz ve % 10,78 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 4,53 ve standart sapması 0,96 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,07 düzensiz profaz, % 0,04 dağınık metafaz ve % 0,04 anafaz köprü gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 0,15 ve standart sapması 0,18 olarak hesaplanmıştır. Arıtım sonrası atık suyun % 100 konsantrasyonunda 24 saat köklendirilen soğanlarda toplam 4500 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 233' tür. % 36,48 profaz, % 33,91 metafaz, % 17,17 anafaz ve % 11,16 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 5,27 ve standart sapması 1,27 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,04 düzensiz profaz, % 0,11 dağınık metafaz, % 0,04 dağınık anafaz, % 0,04 sıkışık metafaz ve % 0,11 anafaz köprü gözlemlenmiştir. Kromozom aberasyon indeks ortalaması 0,38 ve standart sapması 0,29 olarak hesaplanmıştır.

Kontrol olarak saf suda 48 saat köklendirilen soğanlarda toplam 4758 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 136' dir. 48 saat kontrol grubunda % 39,13 profaz, % 24,64 metafaz, % 15,22 anafaz ve % 21,01 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 3,05 ve standart sapması 2,00 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu için saf suda 48 saat köklendirilen soğanlarda % 0,02 düzensiz profaz ve % 0,04 dağınık metafaz anomalisi gözlemlenmiştir. Medyanı 0 ve minimum-maksimum değeri 0- 0,31 olarak hesaplanmıştır. Arıtım sonrası atık suyun % 1 konsantrasyonunda 48 saat köklendirilen soğanlarda toplam 4382 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 201' dir. % 45,23 profaz, % 27,64 metafaz, % 18,09 anafaz ve % 9,05 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 4,60 ve standart sapması 1,96 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,02 düzensiz profaz, % 0,04 dağınık metafaz, % 0,02 dağınık anafaz ve % 0,02 anafaz köprü gözlemlenmiştir. Medyanı 0,05 ve minimum-maksimum değeri 0-0,55 olarak hesaplanmıştır. Arıtım sonrası atık suyun % 25 konsantrasyonunda 48 saat köklendirilen soğanlarda toplam 3973 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 204' tür. % 58,25 profaz, %

31,55 metafaz, % 10,68 anafaz ve % 12,62 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 5,15 ve standart sapması 1,17 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,10 düzensiz profaz, % 0,15 dağınık metafaz, % 0,02 dağınık anafaz, % 0,15 sıkışık metafaz, % 0,02 metafazda dışarda kalmış kromozom ve % 0,02 telofaz köprü gözlemlenmiştir. Medyanı 0,45 ve minimum-maksimum değeri 0-1,09 olarak hesaplanmıştır. Arıtım sonrası atık suyun % 50 konsantrasyonunda 48 saat köklendirilen soğanlarda toplam 4416 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 197' tür. % 35,02 profaz, % 39,09 metafaz, % 14,72 anafaz ve % 10,66 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 4,44 ve standart sapması 2,08 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,02 düzensiz profaz, % 0,07 dağınık metafaz, % 0,02 anafaz köprü ve % 0,02 telofaz köprü gözlemlenmiştir. Medyanı 0,13 ve minimum-maksimum değeri 0-0,25 olarak hesaplanmıştır. Arıtım sonrası atık suyun % 75 konsantrasyonunda 48 saat köklendirilen soğanlarda toplam 4256 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 169' tür. % 40,83 profaz, % 34,32 metafaz, % 20,71 anafaz ve % 4,14 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 4 ve standart sapması 1,09 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,09 düzensiz profaz, % 0,02 dağınık metafaz ve % 0,05 dağınık anafaz gözlemlenmiştir. Medyanı 0,21 ve minimum-maksimum değeri 0-0,32 olarak hesaplanmıştır. Arıtım sonrası atık suyun % 100 konsantrasyonunda 48 saat köklendirilen soğanlarda toplam 4549 hücre sayılmıştır. Toplam mitoz sayısı 150' tür. % 35,33 profaz, % 30 metafaz, % 24,67 anafaz ve % 8,67 telofaz safhaları gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalaması 3,30 ve standart sapması 1,05 olarak hesaplanmıştır. Anomali olarak; % 0,04 düzensiz profaz, % 0,02 dağınık metafaz ve % 0,02 dağınık anafaz gözlemlenmiştir. Medyanı 0,05 ve minimum-maksimum değeri 0-0,29 olarak hesaplanmıştır.

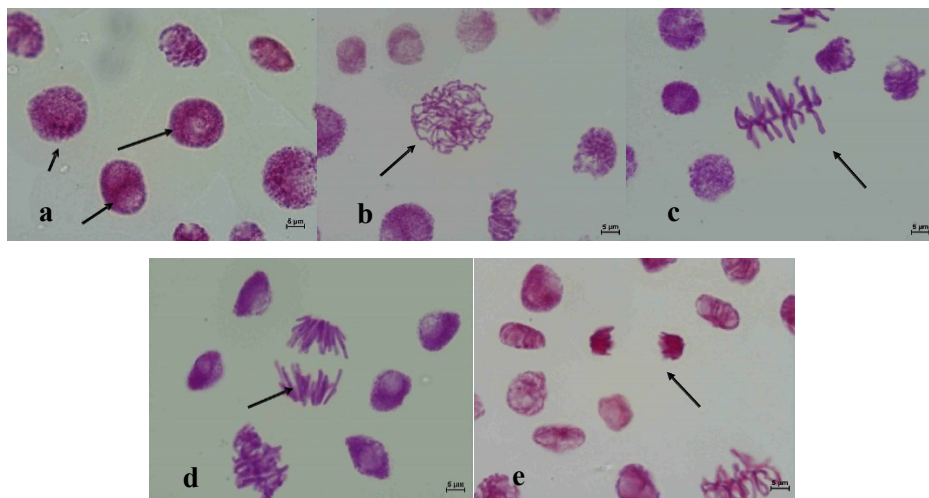
Analiz sonuçları istatistiksel olarak 24 saat uygulamasında ve 48 saat uygulamasının mitotik indeksinde tek yönlü varyans analizi ANOVA, Tukey post-hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir. 48 saat uygulamasının kromozomal aberasyon indeksi normal dağılım göstermediği için nonparametrik test olan Kruskal Wallis analiz yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Arıtım sonrası 24 ve 48 saat uygulamaları kendi içerisinde P değeri $P=0,05$ 'e göre değerlendirilmiştir. Arıtım sonrası 24 saat uygulamasında $P>0,05$ olduğundan dolayı konsantrasyonların ve kontrolün mitotik indeksleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Mitotik indekste kontrol ile konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. 24 saat uygulamasının kromozomal

aberrasyon indeksi $P>0,05$ olduğundan dolayı konsantrasyonların ve kontrolün arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Kromozomal aberrasyon indeksinde ise kontrole ile konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Aritım sonrası 48 saat uygulamasında $P>0,05$ olduğundan dolayı konsantrasyonların ve kontrolün mitotik indeksi ve kromozomal aberrasyonları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Mitotik indekste kontrol ile konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Aritım sonrası 48 saat uygulamasının kromozomal aberrasyon indeksi normal dağılım göstermediği için nonparametrik test uygulanmıştır.

Aritım öncesi atık suyunda daha çok anomali profaz ve metafaz safhalarında gözlenirken, arıtım sonrası atık suyunda profaz ve metafaz safhaları ile anafaz safhasında da anomaliye rastlanmıştır. Her iki suda da telofaz safhasında anomali çok az görülmüştür. Preparatlarda gözlemlenen normal ve anomali hücrelerin görüntüleri bölüm 4.9.3' de verilmiştir.

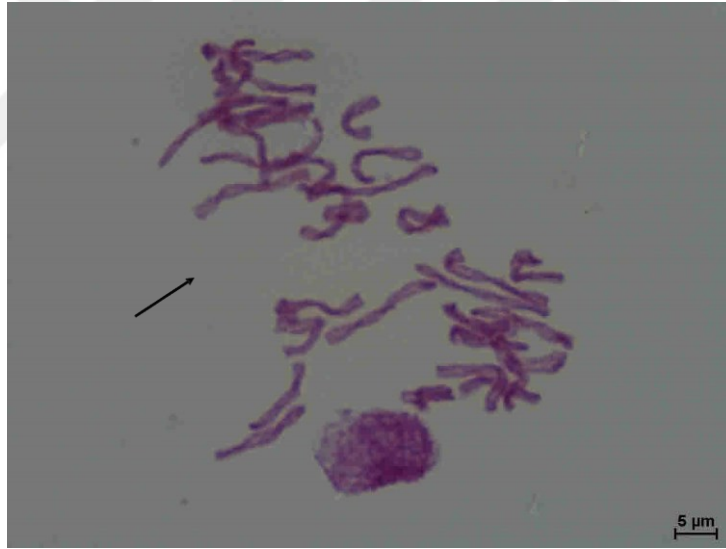
4.9.3. *Allium* Test normal ve anomali hücreleri



Şekil 4.19. Gıda atık suyu konsantrasyonlarındaki normal mitoz safhaları (a: interfaz, b: profaz, c: metafaz, d: anafaz, e: telofaz. Ölçek $5 \mu\text{m}$ ' yi göstermektedir.)



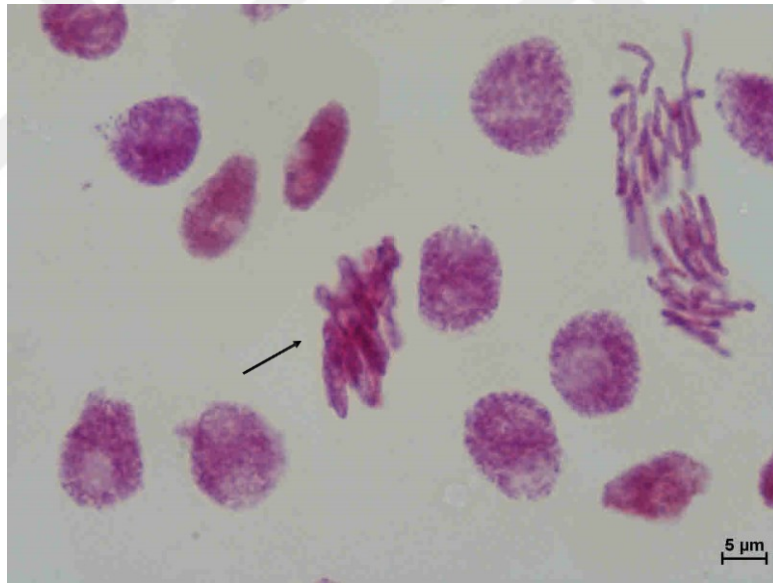
Şekil 4.20. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 1 konsantrasyonu 24 saat uygulamasında düzensiz profaz.



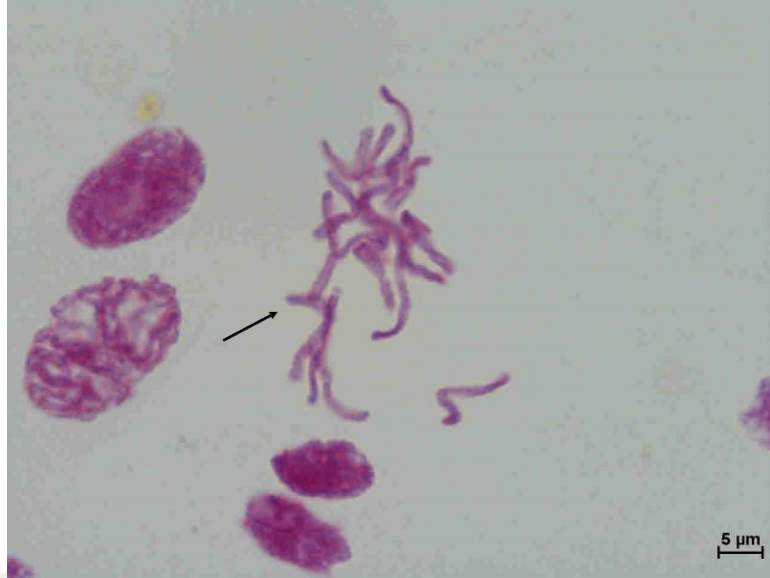
Şekil 4.21. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 50 konsantrasyonu 48 saat uygulamasında dağınık metafaz.



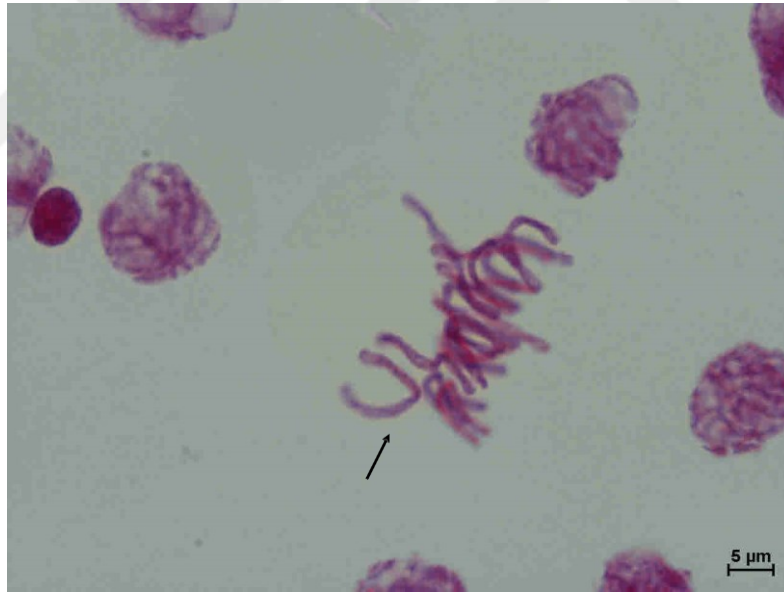
Şekil 4.22. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 50 konsantrasyonu 24 saat uygulamasında dağınık anafaz.



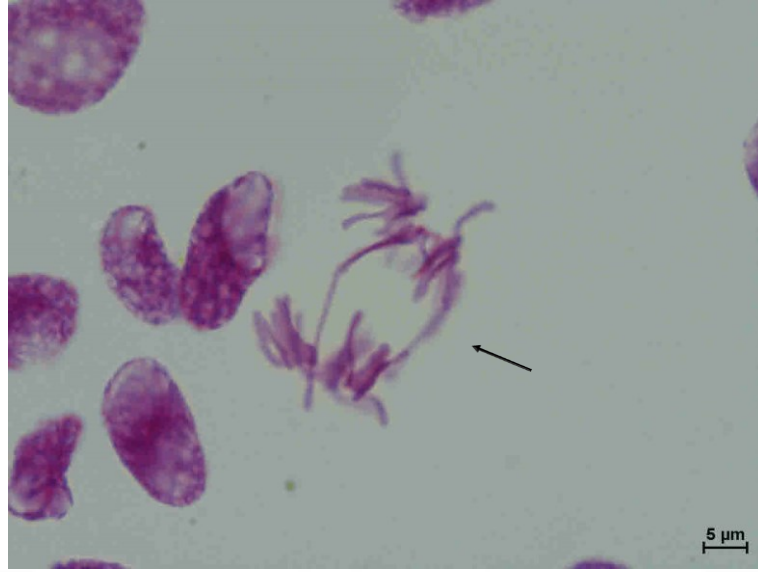
Şekil 4.23. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 1 konsantrasyonu 48 saat uygulamasında sıkışık metafaz.



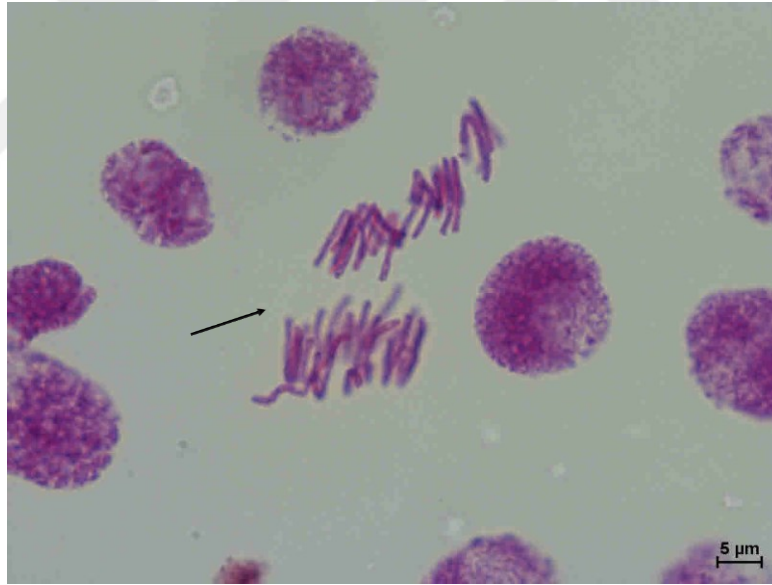
Şekil 4.24. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 25 konsantrasyonu 24 saat uygulamasında c-metafaz.



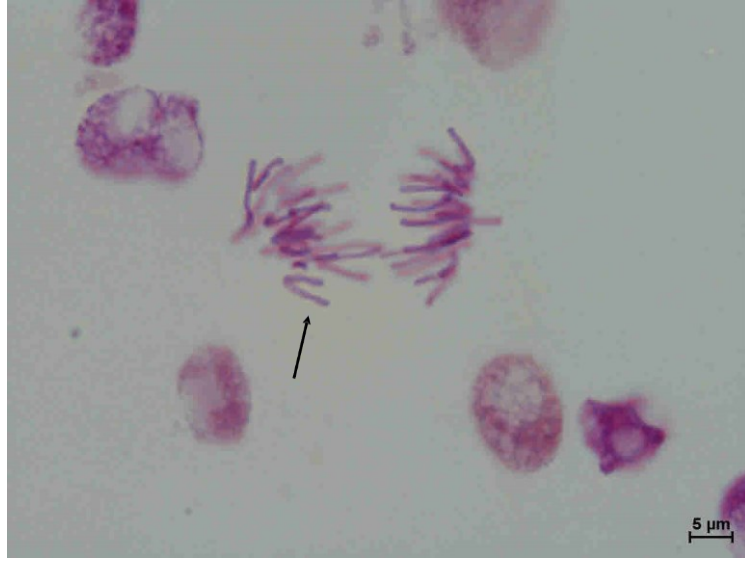
Şekil 4.25. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 50 konsantrasyonu 48 saat uygulamasında metafazda dışarda kalmış kromozom.



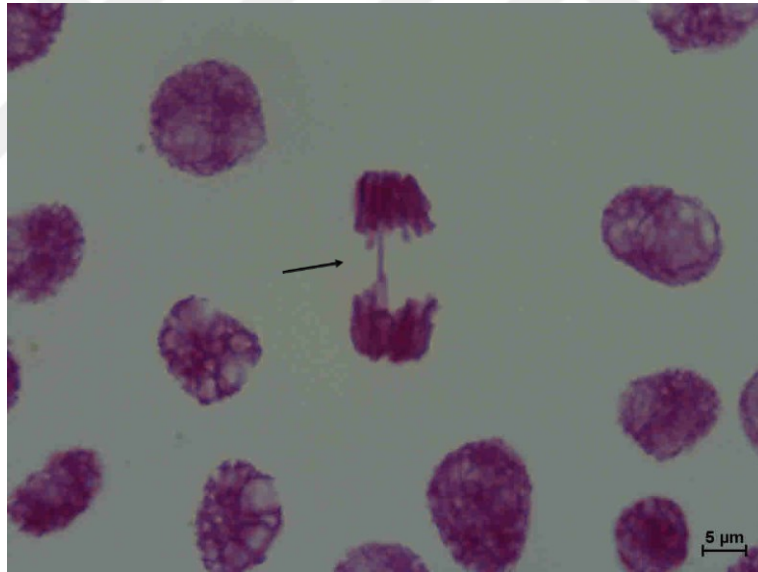
Şekil 4.26. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 75 konsantrasyonu 24 saat uygulamasında anafaz köprü.



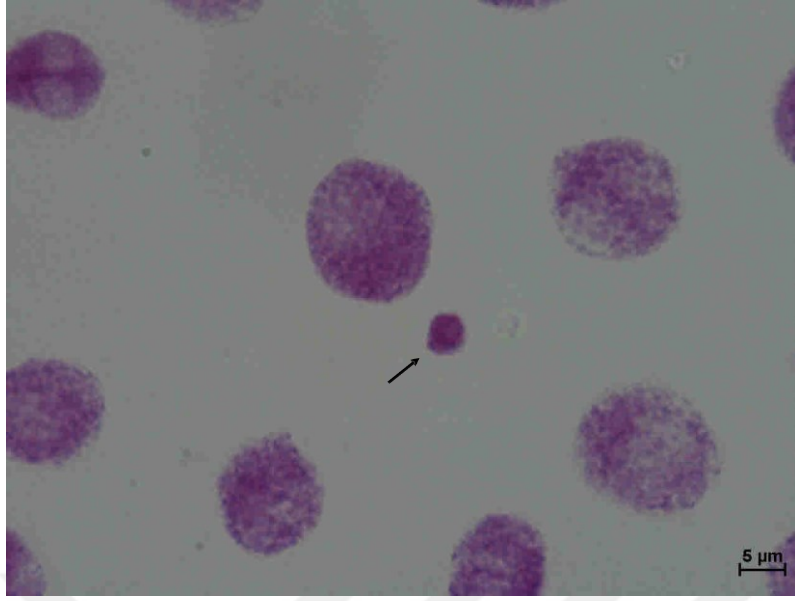
Şekil 4.27. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 1 konsantrasyonu 24 saat uygulamasında multipolar anafaz.



Şekil 4.28. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 100 konsantrasyonu 48 saat uygulamasında anafazda dışarda kalmış kromozom.



Şekil 4.29. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 100 konsantrasyonu 24 saat uygulamasında telofaz köprü.



Şekil 4.30. Gıda endüstrisi arıtım öncesi atık suyu % 1 konsantrasyonu 48 saat uygulamasında mikronükleüs.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gıda endüstrisi atık suyunun genotoksik ve sitotoksik etkileri RAPD-PCR, Mikrotoks ve *Allium* test kullanılarak test edilmiştir. RAPD yöntemi ile genotoksik etkisi, Mikrotoks yöntemi ile akut toksisite etkisi, *Allium* test yöntemi ile mitotik indeksi belirlenerek sitotoksitesisi, kromozomal aberasyon indeksi belirlenerek genotoksitesisi değerlendirilmiştir. Gıda endüstrisi atık suyunun genotoksitesininin bu çalışmada kullanılan testlerle analiz edilmesi ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamıştır. Bu açıdan çalışmanın literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Çalışmanın sonuçları şu şekilde değerlendirilebiliriz.

RAPD-PCR analizi sonuçlarına göre arıtım öncesi konsantrasyonlarda polimorfik bant gözlemlenirken arıtım sonrası atık suyunun hiçbir konsantrasyonunda polimorfik bant gözlemlenmemiştir. Arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarında polimorfik bant olmadığından dolayı kümeleme analizi sonucunda dendogram elde edilememiştir. Arıtım sonrası atık su konsantrasyonlarının arıtım öncesi atık su konsantrasyonlarına göre genomik kalıp stabilitesinde artma gözlemlenmektedir.

Mikrotoks analizi ile gıda endüstrisi atık suyun akut toksisitesi 5 ve 15 dakikalık periyotlarda incelenmiştir. Arıtım öncesi ve arıtım sonrası atık su örnekleri arasında belirgin bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Her bir konsantrasyon için yapılan uygulamalarda yakın değerler elde edilmiş, akut toksik etki görülmemiştir.

Allium testi analizinde arıtım öncesi ve arıtım sonrası atık sularının belirlenen konsantrasyonlarına iki farklı maruz kalma süresi (24 ve 48 saat) uygulanarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda düzensiz profaz, dağınık metafaz, dağınık anafaz, sıkışık metafaz, c-metafaz, metafazda dışarıda kalmış kromozom, anafaz köprü, multipolar anafaz, anafazda dışarıda kalmış kromozom, telofaz köprü ve mikronükleus oluşumu gibi kromozomal aberasyonlar gözlemlenmiştir. *Allium* testi sonuçlarına göre arıtım öncesi atık suya maruz bırakma süresi arttıkça kromozomlarda görülen anomalilerde anlamlı bir artış gözlemlenmektedir. Mitotik indekste kontrole göre konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir artış meydana gelmiştir. Mitotik indeks, sitotoksitesiyi belirlemede toksisite testlerinde sıklıkla kullanılan en temel yöntemlerden birisidir (Kanev, vd., 2017).

Allium testinde kullanılan arıtım öncesi atık suyun 24 ve 48 saat uygulamalarında $p < 0.05$ olduğu için konsantrasyonların kontrole göre mitotik indeksi ve kromozomal aberasyonları arasında anlamlı bir farklılık olduğu ortaya çıkmıştır. Mitotik indekste 24 saat uygulamasında sadece kontrol ile % 100 konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenirken, 48 saat uygulamasında kontrol ile %25, %50, %75 ve %100 konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmiştir. Arıtım öncesi atık suyun bu konsantrasyonları mitotik indeksi anlamlı bir şekilde artırmıştır. Kromozomal aberasyon indeksinde 24 saat uygulamasında kontrol ile sadece % 100 konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenirken, 48 saat uygulamasında kontrol ile % 50, % 75 ve % 100 konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmiştir. Arıtım öncesi atık suyun bu konsantrasyonları kromozomal aberasyon indeksini anlamlı bir şekilde artırmıştır. Dolayısıyla bu konsantrasyonların genotoksik etki gösterdiğini söyleyebiliriz. Arıtım sonrası atık suyun 24 ve 48 saat uygulamalarında $p > 0.05$ olduğundan dolayı konsantrasyonların kontrole göre mitotik indeksi ve kromozomal aberasyonları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bu da arıtım sonrasında genotoksik etkinin ortadan kalktığını göstermektedir.

Yapılan üç testin analiz sonuçlarına göre arıtım sonrası atık suyun arıtım öncesi atık suyuna göre toksik etkisinde bir azalma gözlemlenmektedir. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılacak olursa *Allium* testinde elde edilen sonuçlar RAPD yönteminde elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Deney sonuçları göz önünde bulundurulduğunda gıda endüstrisi atık suyunun arıtma işlemi gerçekleştirilmeden doğaya salıverilmemesi gerektiği önemle vurgulanabilir. Ayrıca endüstriyel atık suların çeşitli arıtma yöntemleriyle arıtılmalarının genel olarak birçok toksik maddeyi bertaraf ederek toksik etkiyi ortadan kaldırdığı söylenebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Acar Ö. (2020) Sakarin ve Aspartamin Farklı Konsantrasyonlarının Genotoksik Etkilerinin *Allium* Testi ile Belirlenmesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale, (Danışman: Prof. Dr. Cüneyt AKI)

Akın, F. (2012). Gıda Ürünleri ve İçecek Sanayinin Ekonomik Özellikleri, Gazi Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi, 14(3), 17-70.

Akkan, A. G. (2014). Farmakokinetik / Farmakodinamik Temel Tanımlar, ANKEM Dergisi, 28(Ek-2), 82-85.

Akyıl, D., Özkara, A. (2015). Bitkilerde Genotoksisite Çalışmalarında Kullanılan Parametreler ve Uygulanan Test Sistemleri, EÜFBED- Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 8 (2), 223-247.

Atienzar, F.A., Conradi, M., Evenden, A.J., Jha, A.N. and Depledge, M.H. (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. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 2275–2282.

Demir, Ö., Yıldız, M., Sercan, Ü., Arzum, C. Ş. (2017). Atıksuların Geri Kazanılması ve Yeniden Kullanılması, Harran Üniversitesi Mühendislik Dergisi, 2, 1-14.

Direk, M., Güngör, L., Acar, R. (2022). Atık suyun Önemi, Değeri ve Tarım ile İlişkisi, Ulusal Çevre Bilimleri Araştırma Dergisi, 5(1), 47-54.

Fiskesjö, G. (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring, *Hereditas*, 102, 99-112. Lund, Sweden. ISSN 0018-0661.

Gözükara, E. (1989) Biyokimya, Ofset Repromat Ltd. Şti. 428 s

Güner, U. (2014). Toksikoloji. Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi, 2, 186-189.

Kanev, M. O., Özdemir, K., Gökalp, F. D. (2017). Ergene Nehir Suyunun Soğan (*Allium cepa* L.) Kök Ucu Hücrelerinde Genotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi, Marmara Fen Bilimleri Dergisi, 3, 111-117. DOI:10.7240/marufbd.311079.

Karaca, M., Arıcak, K., Gürbüz, F. (2020). Genetic Characterization of Some Cyanobacterial Species Using by RAPD-PCR Technique, *International Journal of Scientific and Technological Research*, 6 (9), 92- 105. DOI: 10.7176/JSTR/6-09-09.

Karataş, M. (Ed.). (2012). Moleküler biyoloji (Vol. 445). Nobel Akademik Yayıncılık.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Kavurucu, B., Ekmen, E., Yaman, Ö., Yazan, S. Y., Kanmaz, N., Ünver, Ü. (2022). Türkiye’de Endüstriyel Su Tüketimi ve Arıtımı, İleri Mühendislik Çalışmaları ve Teknolojileri Dergisi, 3(1), 19-33.

Kaya, N. (2022). *Viburnum Opulus* ve *Equisetum Arvense* Ekstraktı Ticari Formülasyonlarının Anti-Sitotoksik ve Anti-Genotoksik Açından Değerlendirilmesi, Icontech International Journal Of Surveys, Engineering, Technology, Vol. 6, 26-32., ORCID NO: 0000-0002-4206-1149.

Koca, S. (2020). Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2020-2021 Güz Dönemi Genel Atık Yönetimi Ders Notu; Atıkların Sınıflandırılması. Powerpoint sunusu.

Korkmaz- Aydoğdu, F. (2003). Bazı 9-Aril Substitue Fenantren Türevlerinin Genotoksik Etkilerinin Ames Testi ve *Allium* Testi ile Araştırılması, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, (Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ayşe MERCANGÖZ)

Kukul, Y. S., Ünal Çalışkan, A. D., Anaç, S. (2007). Arıtılmış Atık Suların Tarımda Kullanılması ve İnsan Sağlığı Yönünden Riskler, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 44 (3), 101-116. ISSN 1018-8851.

Özkan, G., Gültekin Subaşı, B., Kamiloğlu, S., Çapanoğlu, E. (2022). Sürdürülebilir Gıda ve Tarımsal Atık Yönetimi, İTÜ Çevre, İklim ve Sürdürülebilirlik Dergisi, 23(2), 145-160.

Özmen, N. (2008). Lakkaz Üretimi ve Ham Kültür Filtratının Tekstil Boyalarının Renginin ve Toksisitesinin Gideriminde Kullanımı, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, (Danışman: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA)

Pavel, A. B., & Vasile, C. I. (2012). PyElph-a software tool for gel images analysis and phylogenetics. BMC bioinformatics, 13(1), 1-6.

Sabeen, M., Mahmood, Q., Bhatti, Z. A., Faridullah, Irshad, M., Bilal, M., Hayat, M. T., Irshad, U., Akbar, T. A., Arslan, M., Shahid, N. (2020). *Allium cepa* assay based comparative study of selected vegetables and the chromosomal aberrations due to heavy metal accumulation, Saudi Journal of Biological Sciences, 27(5), 1368–1374.

Sönmez, V. Z., Sivri, N. (2016). Akut Toksikite Testi Hassasiyetinin Belirlenmesinde Referans Toksik Madde Olarak Formaldehit Kullanımı, Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi, 1(3), 96-99.

Şener, A., Ünal, M. Ü. (2008). Gıda Sanayii Atıklarının Biyoteknolojik Yöntemlerle Değerlendirilmesi, Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum, 1035- 1038.

Üçüncü, O. (2019). Atıksu Arıtımı, Atıksu Deşarjı ve Su Kirliliği: Trabzon İli Örneği, Türk Hidrolik Dergisi, 3(2), 14-29.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Vural, N. (2005). "Toksikoloji", Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 115-129.

Yağcı, S., Altan, A., Göğüş, F., Maskan, M. (2006). Gıda Atıklarının Alternatif Kullanım Alanları, Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26.

Yıldız, M., Arıkan, E. S. (2007). Pestisitlerin Sitotoksik Etkileri ve Bitki Biyotestleri, Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8 (2), 299-311.

Yıldız, S., Namal, O. Ö., Çekim, M. (2013). Atık Su Arıtma Teknolojilerindeki Tarihsel Gelişimler, Selçuk Üniversitesi Mühendislik Bilim ve Teknoloji Dergisi, 1(1), 55-67.