

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Burak KOÇAK**

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİNDE YETİŞEN *Laurus nobilis* L. (DEFNE,  
LAURACEAE) YAPRAK EKSTRAKTLARININ İNSAN  
LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİSİ VE TOPRAKTA ORGANİK  
MADDE MİNERALİZASYONU**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2011**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİNDE YETİŞEN *Laurus nobilis* L. (DEFNE,  
LAURACEAE) YAPRAK EKSTRAKTLARININ İNSAN  
LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİSİ VE TOPRAKTA ORGANİK  
MADDE MİNERALİZASYONU**

**Burak KOÇAK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu Tez / /201- Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından  
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....  
Prof. Dr. Cengiz DARICI  
DANIŞMAN

.....  
Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI  
2. DANIŞMAN

.....  
Prof. Dr. Sadık DİNÇER  
ÜYE

.....  
Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ  
ÜYE

.....  
Yrd. Doç. Dr. Ahmet KAYRALDIZ  
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

**Kod No:**

**Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL  
Enstitü Müdürü**

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

**Proje No: FEF2010YL16**

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZ

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİNDE YETİŞEN *Laurus nobilis* L. (DEFNE, LAURACEAE) YAPRAK EKSTRAKTLARININ İNSAN LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİSİ VE TOPRAKTA ORGANİK MADDE MİNERALİZASYONU İLİŞKİSİ**

**Burak KOÇAK**

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

Danışman :Prof. Dr. Cengiz DARICI  
İkinci Danışman :Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI  
Yıl: 2011, Sayfa: 55  
Jüri :Prof. Dr. Cengiz DARICI  
:Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI  
:Prof. Dr. Sadık DİNÇER  
:Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ  
:Yrd. Doç. Dr. Ahmet KAYRALDIZ

Bu çalışmada Akdeniz iklimi etkisindeki Çukurova Üniversitesi Kampüsünde yetişen üç farklı *Laurus nobilis* L. (Defne) bitkisinin toprakları, yaprakları ve yapraklarının etken maddesi olan 1.8-Cineol ve yaprak ekstraktları kullanılmıştır. Bunun için toprak karbonuna ve yarısına eşdeğer karbon içeren yaprak ve 1.8-Cineol topraklara karıştırılarak karbon mineralizasyonu respirasyon yöntemiyle belirlenmiştir. S9mix yokluğunda yaprak ekstraktı insan periferik lenfositlerinde genotoksik etkileri kardeş kromatid değişimi (KKD) testiyle araştırılmıştır. Bu amaçla yaprak ekstraktının 3,0, 6,0 ve 12,0 µL/mL'lik dozları 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde denenmiştir.

Tüm toprak örneklerinde karbon mineralizasyonu 30 günlük inkübasyon boyunca yükselmiş, özellikle toprak karbonu kadar yaprak ve 1.8-Cineol eklenen topraklarda tanığa oranla hızla artmıştır. Karbon mineralizasyon oranı tanıkta % 2,22; toprak karbonuna eşdeğer ve yarısı kadar karbon içeren yaprak karıştırılmış toprakta % 2,16 ve % 2,94; aynı şekildeki 1.8-Cineol karıştırılan toprakta ise % 3,23 ve % 3,84 bulunmuştur.

S9mix yokluğunda, *Laurus nobilis* yaprak ekstraktı tüm dozlarda ve muamele sürelerinde KKD sayısını arttırmamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Laurus nobilis*, 1.8-Cineol, Karbon mineralizasyonu, insan periferik lenfositleri, kardeş kromatid değişimi

## ABSTRACT

### MSc THESIS

# THE GENOTOXIC EFFECTS OF *Laurus nobilis* L. LEAF EXTRACT ON HUMAN LYMPHOCYTES AND ITS SOIL ORGANIC MATTER MINERALIZATION ON EASTERN MEDITERRANEAN

Burak KOÇAK

ÇUKUROVA UNIVERSITY  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor :Prof. Dr. Cengiz DARICI  
Co-Supervisor :Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI  
Year: 2011, Pages: 55  
Jury :Prof. Dr. Cengiz DARICI  
:Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI  
:Prof. Dr. Sadık DİNÇER  
:Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ  
:Asst. Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ

In this study, soils of three different *Laurus nobilis* L. (Bay leaves), growing in Cukurova University Campus under the influence of Mediterranean climate were investigated by using its leaves and 1.8-Cineole, main constituent of leaves, and leaf extracts. Therefore, carbon mineralization was studied by adding the same and half amounts of carbon containing leaves and 1.8-Cineole, using respiration method. The genotoxic effects of leaf extract was tested in the absence of S9mix using sister chromatid exchange (SCE) test system. For this purpose, the lymphocytes were treated with 3.0, 6.0 and 12.0 µl/ml concentrations of Sf leaf extract for 24h and 48h treatment periods

In all soil samples, carbon mineralization increased during the 30 days of incubation period, especially in soils added with the same and half amounts of carbon containing leaves and 1.8-Cineole compared with the control soil. Carbon mineralization rate was 2.22 % in control soil; 2.16% and 2.94% added same and half amounts of carbon containing leaf added soils and were 3.23% and 3.84% in soils added with the same amounts of carbon containing and 1.8-Cineole added soils respectively.

*Laurus nobilis* leaf extract alone didn't increase SCE frequency at all concentrations and treatment periods in the absence of S9mix.

**Key Words:** *Laurus nobilis*, 1.8-Cineole, carbon mineralization, human peripheral lymphocytes, sister chromatid exchange

## **TEŞEKKÜR**

Çalıőmamın her aőamasında yardımlarını esirgemeyen, yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren ve her zaman problemlerime çözümler üreten danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Cengiz DARICI ve Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI'na en derin Őükranlarımı sunarım.

Bana destek veren, genetik deneylerimde her zaman yardımcı olan Uzman Biyolog Arkadaőlarım Fezel NİZAM, Nadire KOPAR, ve Mehmet ARSLAN ile toprak deneylerimde büyük emekleri olan Nacide KIZILDAĞ, Ahu KUTLAY, ve Gülistan ÖZER'e, ekstraksiyon işlemleri ve analizlerinde büyük katkıları olan Dr. Murat TÜRK ile Prof. Dr. Sadık DİNÇER'e ve çalıőmalarımızı maddi olarak destekleyen Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonuna ayrı ayrı teşekkür ederim.

Ayrıca deneylerimde , istatistik analizleri ve grafiklerin çiziminde yardımlarını esirgemeyen değerli dostlarım Őahin CENKSEVEN ve Mehmet BÜYÜKLEYLA'ya çok teşekkür ediyorum.

Özellikle yaşamım boyunca yanımda olup beni destekleyen sevgili aileme de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
2.1. Karbon Mineralizasyonu İle İlgili Önceki Çalışmalar.....	7
2.2. <i>Laurus nobilis</i> L. İle İlgili Önceki Çalışmalar.....	8
2.3. Genotoksisite İle İlgili Çalışmalar.....	10
3. MATERYAL VE METOD.....	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Araştırma Alanının Coğrafik Konumu ve Özellikleri.....	13
3.1.2. Toprak.....	14
3.1.3. İklim.....	14
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları.....	15
3.1.4.1. Etanol.....	15
3.1.4.2. Kromozom Medyumu.....	15
3.1.4.3. Kolşisin (Kolkisin).....	15
3.1.4.4. Hipotonik Eriyik.....	16
3.1.4.5. Fiksatif.....	16
3.1.4.6. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd).....	16
3.1.4.7. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer).....	16
3.1.4.8. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği.....	17
3.1.4.9. Giemsa.....	17
3.1.4.10. Entellan.....	17
3.1.4.11. Nitrik Asit (HNO <sub>3</sub> ).....	17
3.1.4.12. Mitomycin C (MMC).....	17

3.1.4.13. 1,8-Cineol .....	18
3.1.5. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	18
3.1.5.1. Hassas Terazî .....	18
3.1.5.2. Santrifüj .....	18
3.1.5.3. Mikroskop.....	18
3.1.5.4. İnkübatör.....	18
3.1.5.6. Flow Kabin (Steril Kabin) .....	19
3.1.5.7. Su Banyosu. ....	19
3.1.6. Lamların Temizlenmesi.....	19
3.2. Metod.....	19
3.2.1. Örneklik Alanın Seçimi ve Örneklerin Alınması .....	19
3.2.2. Toprak Örneklerinin Fiziksel ve Kimyasal Analizleri.....	20
3.2.3. Ekstraksiyon ve Kromatografik Ayırma ve Tanımlama .....	23
3.2.4. Genotoksisite Çalışmaları .....	25
3.2.4.1. Metabolik Aktivatör Yokluğunda Test Metodu.....	25
3.2.4.1.(1). Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) (Sister Chromatid Exchange=SCE) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması .....	25
3.2.4.2. Preparatların Boyanması.....	26
3.2.4.3. Mikroskopik İnceleme .....	27
3.2.4.4. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	33
4.1. Toprakların Fiziksel ve Kimyasal Analizlerinin Sonuçları .....	33
4.2. Metabolik Aktivatör Yokluğunda (S9mix) <i>Laurus nobilis</i> (Ln) Yaprak Ekstraktının KKD Üzerindeki Etkisi.....	37
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	43
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ .....	55

## ÇİZELGELER DİZİNİ

## SAYFA

Çizelge 4.1. Toprak ve Bitki Örneklerinin Fiziksel ve Kimyasal Analizlerinin Ortalama Sonuçları ve Standart Hata Değerleri.....	34
Çizelge 4.2. Clevenger cihazında yapraklardan elde edilen elde edilen uçucu yağ miktarı ve bu yağdaki GC-MS analiziyle ölçülen cineol miktarı.....	34
Çizelge 4.3. Çizelge 4.3.S9mix yokluğunda değişik dozlarda Ln yaprak ekstraktı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde ortalama kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısı.....	38



## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

Şekil 3.1. Adana İli İklim Diagramı.....	15
Şekil 3.2. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi .....	27
Şekil 3.3. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları.....	28
Şekil 3.4. BrdUrd'in DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması .....	30
Şekil 4.1. Cineol ve yaprak karıştırılmış toprakların karbon mineralizasyon eğrisi .....	35
Şekil 4.2. <i>Laurus nobilis</i> topraklarının karbon mineralizasyon oranları.....	36
Şekil 4.3. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Ln yaprak ekstraktı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde KKD/Hücre .....	39
Şekil 4.4. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Ln yaprak ekstraktı ile 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde ortalama KKD sayısının doza etki ilişkisi.....	39



## 1. GİRİŞ

Toprak organik maddesi (TOM) genellikle organik karbon ya da toplam azot içeriği olarak ölçülür ve uzunca bir süredir toprak verimliliğinin en önemli indikatörü olarak öne sürülmektedir. Toprak organik maddesi katyon değişim kapasitesi, tamponlama kapasitesi, metallere oluşan çözünebilir ve çözünemeyen kompleks maddeler ve ksenobiyotiklerle etkileşimleri (pestisitler gibi), ayrıca agregat formasyonu ve stabilizasyonu, su tutma, ısısal özelliklere karşı direnç ve esnekliği etkilemektedir. Organik maddenin en önemli biyolojik özellikleri ise mikrobiyal ve faunal aktivitede enerji deposu olarak rolü, enzim aktivitesini dengelemedeki etkisi ve mineralizasyon yoluyla bitkiye aktarılmış azot, kükürt ve fosfor kaynağı olarak değeridir (Huang, 2008).

Toprak organik maddesi değişken ve dengeli fraksiyon olarak iki büyük havuzdan oluşur: Aslında toprak organik maddesi çok miktarda ayrışabilen ve tam tersine ayrışmaya direnç gösteren materyalleri bir arada içermektedir. Değişken fraksiyon temel olarak, taze bitki artıkları ile dengeli organik madde arasındaki geçişte yer alan materyallerden meydana gelmektedir. Çoğunluğunu ayrışmanın çeşitli aşamalarında olan bitki ve mikrobiyal dokular oluşturur. Genellikle kısa bir devir (turnover) zamanına sahip olduğu bilinir. Değişken fraksiyon olarak tanımlanan organik madde havuzları, partiküllenebilen organik madde, çözünebilir karbon, potansiyel olarak mineralize olabilen karbon, çeşitli reaktiflerle çözünebilirler, mikrobiyal biyomas (biyokütle) karbonu ve çözünebilir formlarda olan enzimlerdir.

Dengeli organik madde ise, kimyasal yapılarından dolayı ve/veya toprak mineralleriyle ilişkilerinden dolayı mikrobiyal ayrışmaya çok dirençli materyallerden oluşur. Diğer bir ifadeyle, bitki ve hayvan artıklarının biyolojik ayrışımından ve mikroorganizmaların sentezlediği fenolik polimerlerin oluşturduğu yüksek moleküler ağırlığa sahip kompleks sistemlerden, yani humik maddelerden oluşmaktadır (Baldock ve Nelson 2000). Humik maddeler toprak organik maddesinin en büyük kısmını (%70-80) oluşturduğu için, toplam organik maddedeki (Organik karbon ve

toplam azot içeriği) değişimler, özellikle mevcut humik materyal miktarlarındaki değişimleri yansıtmaktadır.

Fiziksel olarak yoğunlukları  $1.6 \text{ g/cm}^3$ 'den küçük olan toprak organik maddesi hafif fraksiyon,  $1.6 - 2 \text{ g/cm}^3$  arasında olanlar ise ağır fraksiyon olarak adlandırılmaktadır (Von Lützow ve ark, 2007). Hafif fraksiyon genelde yüksek karbon konsantrasyonuna sahip bitki benzerli olan az stabil fraksiyon olarak bilinir. Aynı zamanda yüzey topraklarının toplam organik maddesinin %2-17'lik kısmına karşılık gelir ve ayrışmamış artıklar ve humusa dönüşmüş toprak organik maddesi (TOM) arasındaki bir havuz ortamını temsil eder. Ağır fraksiyon ise daha stabil ve düşük karbon konsantrasyonuna sahip yüksek yoğunluklu organo-mineral fraksiyondur. Ayrıca daha çok işlenmiş TOM içerir ve daha az mineralize olduğundan karbon depolanmasında önemli bir havuz olabilecek yapıdadır. Hafif fraksiyon ise toprak solunumunu sürdüren güç olarak düşünülmektedir. Hafif fraksiyonun toprak strüktürünün dengelenmesi ve düzenlenmesindeki önemi geniş bir şekilde bilinmektedir (Tan ve ark, 2007).

Toprak solunumu dış ortamdan oksijenin alınıp karbondioksidin salınımı olarak tanımlanmaktadır. Ancak toprak ekosisteminde  $\text{CO}_2$ , fermentasyon ve abiyotik işlemler gibi süreçler sonucunda da oluşabilmektedir. Buna ek olarak anaerobik solunumunun birkaç tipi de  $\text{NO}_3^-$  ve  $\text{SO}_4^{2-}$ 'i elektron akseptörü olarak kullanan mikroorganizmalarca gerçekleşmekte ve buna bağlı olarak oksijen aerobik solunumda kullanılmamaktadır. İşte  $\text{CO}_2$  ve  $\text{O}_2$  solunum indikatörü olarak kullanıldığında aslında karbon mineralizasyonunu ve aerobik solunumu temsil etmektedir. Toprak solunumu fungi, bakteri, protozoa ve alg gibi çok çeşitli mikroorganizmalara bağlıdır. Bununla beraber toprak faunasının önemli miktarda katkısı bulunmaktadır. Genelde  $\text{CO}_2$ 'nin toplam salınımına mikroorganizmaların katkısı (kök solunumu hariç) %90, faunanın ise %10 olarak düşünülmektedir. Fungal biyokütle bazen mikrobiyal biyokütleyi baskılamasına rağmen, solunuma bağlı olarak fungi-bakteri ilişkisi, toprak yönetimi veya ekosistem tipi gibi özellikler düşünüldüğünde, oldukça çeşitlilik göstermektedir. Arazide solunum yoluyla salınan toplam  $\text{CO}_2$ 'in %12-30'luk kısmını ise bitki kökleri sağlamaktadır (Bloem ve ark, 2005)

Karbon mineralizasyon kapasitesi toprak solunumu yoluyla ölçüldüğünde, toprağı CO<sub>2</sub> havuzu olarak düşünmek oldukça önemlidir. Çünkü hem kemolitotrofik ve fototrofik bakteriler, hem de bitkiler kendi biyokütlerine CO<sub>2</sub>'i fikse etmektedir.

Toprakta çok sayıda ve çeşitli türde solunum yapan mikroorganizmalar bulunduğundan bazal aktivitedeki en ufak bir değişiklik bile çok ciddi etki olarak göz önünde bulundurulmalıdır. Toprak solunumu bundan dolayı toprak kalitesi konseptinin (ISO TC 190 gibi) oldukça önemli bir bileşeni olmakta ve toprak kalitesinin yanı sıra çeşitli doğal ve antropojenik etkilere karşı verilen tepkileri belirlemek için uygulanan programlarda yer almaktadır (Brookes, 1995)

Toprak solunumu, karbonun atmosfere doğru akışındaki önemli bir süreçtir. Toprak su içeriği, oksijen konsantrasyonu, karbonun biyolojik olarak ortamda bulunuşu toprak solunumunu düzenleyen temel faktörlerdir. Belki en önemli düzenleyici olarak su gösterilebilir, çünkü organik karbonun yanı sıra oksijen suda çözünebilir ve difüzyonla bu maddelerin hücrelere erişim oranını kontrol edebilir. Bundan dolayı su, organik karbon ve enerjinin bulunabilirliğini kolaylaştırırken oksijene erişimi sınırlandırmaktadır. Bundan başka su, toprak yüzeyi ile atmosfer arasındaki CO<sub>2</sub> değişimini geciktirir. Toprakta solunum için gereken optimal su miktarı, toprağın su tutma kapasitesinin %50-70'i arasında olmalıdır (Orchard ve Cook, 1983).

Toprak solunumu genellikle toprağın CO<sub>2</sub> üretiminin ölçümüyle saptanmakta olup bu konuda değişik yöntemler geliştirilmiştir (Domsch, 1962; Jaggi, 1976). Yöntemlerin hepsi kapalı bir düzenek içinde toprakta üretilen CO<sub>2</sub>'nin bir baz tarafından absorbe edilmesi ve titrasyonla saptanmasına dayanmaktadır.

İnsanlar yüzyıllardan beri hastalıklara karşı elde ettikleri bitkilerle çare bulmaya çalışmışlar ve bu yöntemler oldukça başarılı sonuçlar vermiştir. Bundan dolayı bitkilerin tedavide kullanımı günümüze kadar devam etmiştir. Birçoğu tesadüfen, birçoğu da merak sonucu denenerek etkileri anlaşılan doğal ilaçlar, kulaktan kulağa yayılarak herkes tarafından tanınmış ve yıllar geçtikçe daha farklı bitkilerin başka dertlere de deva oldukları anlaşılmıştır. Diğer bir gelişme de bu bitkilerin, beslenmede lezzet, koku, tat verici ve iştah açıcı özelliklerinin anlaşılması ve kullanımının yaygınlaşmasıdır.

Şifalı bitkilerin özellikleri ve kullanımları hakkındaki ilk Avrupalı bilimsel eser olan De Materia Medica (Şifalı Bitkiler) Yunanlı hekim Dioscorides tarafından M.S. I. yüzyılda derlenmiş, 17. yüzyıla kadar onun 500'den fazla kataloğu yetkin bir başvuru kaynağı olarak kalmıştır. Orta çağı takip eden yüzyıllarda, özellikle 15. yüzyılda matbaanın icadı ile yüzlerce şifalı bitkiler kitabının basılması sonucu şifalı bitkilerin önemi geniş bir kitle tarafından fark edilmiştir. Theophrastus'un "Bitkiler Tarihi" bu kitaplardan biridir. 20. yüzyılda tıp bilimi muazzam bir şekilde gelişmesine rağmen bitkilerin geleneksel tıpta kullanımı devam etmektedir (Jain ve ark, 2007 ).

Geleneksel halk hekimliğinde kullanılan bitkiler bilimsel bir süzgeçten geçirilerek yeniden değerlendirilmiş ve fitoterapi adlı bir bilim dalı haline gelmiştir. Bu bilim dalı giderek gelişmekte ve daha fazla önem kazanmaktadır. Dünya sağlık örgütü (WHO) verileri, gelişmekte olan ülkelerde insanların % 80'nin bu terapi yöntemlerini kullandığını ve 3.3 milyar insanın da tıbbi bitkilerden terapi aracı olarak yararlandığını ortaya koymuştur (Çelik ve Çelik, 2007).

Bitki dünyasında en fazla yaygın doğal bileşiklerden olan monoterpenler güzel koku ve tat veren bileşiklerden birisidir. Bir monoterpen olan 1,8-cineol *Eucalyptus* türlerinden elde edilen uçucu yağların en önemli maddelerinden birisidir. Bu yüzden eucalyptol olarak da adlandırılır. *Eucalyptus* türlerinin dışında *Laurus nobilis* L. bitkisinde de oldukça yüksek miktarda bulunmaktadır (Sangun ve ark, 2007).

Fakat uçucu yağların bazı yan etkileri de bulunmaktadır (Leal-Cardoso ve Fonteles, 1999). Bu maddelerin en büyük tehlikeleri de mutasyon ve/veya kansere sebep olabilme riskleridir. Bitkilerin tedavi amaçlı kullanılmalarının yanısıra, bunların insan genomunda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılması da son derece önemlidir. Bir kimyasal maddenin böyle bir etkisinin olup olmadığının belirlenmesi, kısa süreli genotoksisite testleri ile mümkün olabilmektedir. Bugün kısa süreli genotoksisite testleri olarak bilinen ve bir kimyasal maddenin genotoksik veya anti-genotoksik olup olmadığının belirlenmesinde kullanılan metodlar kardeş kromatid değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange=SCE) (Tucker ve ark, 1993), kromozom aberasyonu (KA) (Chromosome

Aberration=CA) (Carrano ve Natarajan, 1988; Anderson, 1988; Hagmar ve ark, 1994) ve mikronükleus (MN) (Heddle ve ark, 1991, Fenech, 2002) testleridir.

Kardeş kromatid değişimi (KKD), DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarılmasını gösteren kardeş kromatidlerin homolog lokusları arasında DNA replikasyon ürünlerinin değişimidir (Sonoda ve ark, 1999, Helleday, 2003). Mutajen ve kanserojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan insan ve hayvanların hücrelerinde KKD frekansının arttığı ve tek-gen mutasyonlarının artışı ile KKD frekansı arasında lineer bir ilişki olduğu saptanmıştır (Perry ve Evans, 1975; Carrano ve ark, 1978; Albertini ve ark, 2000). Benzer bir ilişkinin KKD'nin artışıyla *in vivo* tümörlerin oluşumu arasında da olduğu Cheng ve ark. (1981) tarafından bildirilmiştir. KA'nin aksine KKD tek başına genotoksik riski belirlemede yetersizdir. Fakat deneysel çalışmalarda, indikatör test olarak KKD insanlarda genotoksik etkileri göstermede uygun bir yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir (Norppa ve ark, 2006).

*Laurus nobilis* Avrupa ve Türkiye'de çalılık arazilerde yetişen ve Akdeniz Bölgesine özgü bir bitkidir. Avrupa, Amerika ve Libya'dan Fas'a kadar geniş bir biçimde kültürü yapılmaktadır (Bailey 1963). *Laurus nobilis*'in tatlandırıcı özellikleri antik zamanlardan beri bilinmektedir. İncil zamanında defne bolluk ve günahkârlığın sembolüydü. Eski Roma devrinde kahramanlar ve fatihler defne tacıyla onurlandırılmış, yemeklerde kullanılmasıyla birlikte, defne dünya çapında tıbbi bitki olarak değerlendirilmiştir. Demlendiğinde terletici, gaz giderici etkilere sahip olduğu, aynı zamanda gastrik salgı uyarıcısı olarak görev yaptığı bilinmektedir.

Dünyada en önemli kaliteli defne yaprağı dışsatımı yapan birkaç ülkeden biri olan Türkiye dünya defne gereksiniminin yaklaşık % 90'ını karşılamaktadır. Son beş yıllık tıbbi ve aromatik bitkiler dışsatım değerlerine göre, defne yaprağı miktar olarak kimyon, kekik, keçiboynuzu ve kapariden sonra en fazla satılan beşinci ürün konumundadır. 1999 yılında 3783 ton ve 7.246 milyon \$'lık dışsatım değeri, yıllarla birlikte artmış ve 2003 yılında 5099 ton ve 8.233 milyon \$ değerine ulaşmıştır. Defne yaprağı satın alan ülkelerin başında Hong Kong, ABD, Almanya ve Brezilya gelmektedir. 2001-2003 yıllarına ait dış ticaret verilerine göre ülkemizden yıllık ortalama 500 bin \$ değerinde defne uçucu yağı ihraç edilmektedir. Ayrıca, defne

meyvelerinden sıkma veya suyla kaynatma yoluyla üretilen sabit yağ sabun yapımında kullanılmak üzere özellikle Arap ülkelerine ihraç edilmektedir (Özgüven ve ark, 2005).

Bu çalışmanın birbirini destekleyen iki amacı bulunmaktadır. Birincisi, Doğu Akdeniz Bölgesinde yer alan Çukurova Üniversitesi Kampüsü'nde yetişen *Laurus nobilis* L. (Defne, Lauraceae) bitkisinin etken maddelerinden birisi olan 1,8-cineol ve yapraklarını belli oranlarda ayrı ayrı toprağa karıştırıp organik madde mineralizasyonuna etkisini belirlemeye çalışmaktır. İkincisi ise *Laurus nobilis* yaprak ekstraktlarının insan periferik lenfositlerinde genotoksik etkiye sahip olup olmadığını metabolik aktivatör yokluğunda in vitro kardeş kromatid değişimi (KKD) testiyle araştırmaktır. Böylece bitkilerdeki bazı etken maddelerin toprak mikroflorasına etki yollarıyla ilgili yeni bilgilere (varsayımlara) ulaşılması amaçlanmış, ekosisteme yeni bir bakış açısı getirilmeye çalışılmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Karbon Mineralizasyonu İle İlgili Önceki Çalışmalar

Tiwari ve ark (1989), mevsimsel değişikliklerin topraktaki mikrobiyal populasyon, CO<sub>2</sub> miktarı ve enzim aktivitelere etkilerini araştırmak amacıyla farklı derinliklerden 12 ay boyunca ayda bir kez örnek almışlardır. Sonuçta, mikrobiyal populasyon, CO<sub>2</sub> miktarı ve enzim aktivitelerinin yüzey topraklarında alt katmanlara oranla daha fazla olduğunu ve bahar-yaz döneminde maksimum düzeye ulaşırken kış döneminde azaldığını belirlemişlerdir.

Korn (1994), topraktaki organik karbon içeriğinin bütün toprak türlerinde derinlikle azaldığını tespit etmişlerdir.

Rovira ve Vallejo (1997), karbon mineralizasyonun toprak derinliğini ilişkisini araştırmışlardır. *Eucalyptus globulus* Labill., *Quercus ilex* L. ve *Pinus halepensis* Mill. topraklarının karbon mineralizasyonunu 5 cm derinlikte düştüğünü saptamışlardır. Akdeniz koşullarında mikrobiyal aktivitenin derin tabakalarda üst tabakalara göre daha fazla olduğunu ve üst tabakalardaki kuraklığın önemli bir sınırlayıcı faktör olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca düşük oksijen miktarının ayrışmayı ve mineralizasyonu engellemediğini gözlemlemişlerdir.

Vokou ve ark (2002), *Lavandula stoechas* L. bitkisinin esansiyel yağın ve yağın ana bileşenlerinin toprak metabolizması ve mikrobiyal büyüme üzerine etkileri araştırmışlardır. Toprak örneklerine ilave edilen esansiyel yağın ve ana bileşeni ve bir monoterpen olan fenchone, toprak solunumunda dikkat çekici bir artışa sebep olduğunu saptamışlardır. Bununla beraber, toprak solunumundaki bu artışın, topraktaki bakteri populasyonunun 1000 kat artması sonucu gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Darıcı ve Aka (2003), *Ceratonia siliqua* L. topraklarına *Pinus halepensis* Mill. ve *Quercus coccifera* L. yapraklarını karıştırarak CO<sub>2</sub> solunumu yöntemiyle (30 gün, 28°C) karbon mineralizasyonunu belirlemişler, yaprakların mikrobiyal aktiviteyi arttırdığını saptamışlardır.

Darıcı ve Aka (2005), Doğu Akdeniz Bölgesinde farklı anakayadan (marn, konglomera) oluşan toprakta yetişen *Olea europaea* L. *Pinus brutia* Tenore ve *Pistacia terebinthus* L. topraklarında karbon mineralizasyonunu araştırmışlardır. Sonuçta bitkilerin organik madde kalitesinin artışı ile mikrobiyal aktivitenin arttığını, marnlı topraklarda organik maddenin konglomeralı topraklardan daha sıkı bağlandığı ve biyolojik parçalanmaya karşı daha dayanıklı olduğunu ifade etmişlerdir.

Song ve ark (2010), dışardan eklenen karbon ve azotun Alp çayır toprağının karbon mineralizasyon potansiyelini arttıracaklarını ileri sürmüşler, bunun için 2 doz Azot ve karbon desteğiyle 5°C, 10°C ve 25°C sıcaklıklarda bir inkübasyon yürütmüşlerdir. Sonuçta CO<sub>2</sub> emisyonunda dışardan eklenen azotun hiçbir etkisinin olmadığı ortaya çıkmış, fakat karbon desteğinin CO<sub>2</sub> emisyonunu arttırdığını bulmuşlardır. Buna bağlı olarak, azot desteği göz ardı edildiğinde, mikrobiyal ayrışmanın ilave edilen karbonun miktarına bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Karbon desteğinin Alp çayır toprağından CO<sub>2</sub> çıkışını daha fazla arttırabileceğini öngörmüşlerdir.

Wang ve ark (2010), Büyük Hing'an dağlarının sürekli don bölgesinden seçilen torf örneklerinin inkübasyonu ile sıcaklık ve nemin potansiyel CO<sub>2</sub> emisyonuna etkisini araştırmışlardır. Karbon mineralizasyon oranının toprak derinliğine bağlı olarak azaldığını, sıcaklıkla arttığını ve aynı sıcaklıkta toprağın su tutma kapasitesinin %60 oranında yüksek oranlara ulaştığını saptamışlardır. Toplam karbon mineralizasyonunun 40 günlük inkübasyon süresince 10,3'ten 95,0 mg seviyelerine ulaştığını ve toprak nemi ve sıcaklığından etkilendiğini bulmuşlardır (P < 0.001). Turbalıklarda karbon mineralizasyonunun yükselen sıcaklıkla paralel olarak arttığını belirlemişlerdir.

## 2.2. *Laurus nobilis* L. İle İlgili Önceki Çalışmalar

Gürbüz ve ark (2002), *Laurus nobilis* L. ekstraktlarının anti-ülsergenik potansiyelini araştırmışlar, bitkinin metanol ekstraktının sıçanların midelerini etanolla indüklenmiş ülser oluşumuna karşı % 100 koruduğunu saptamışlardır.

Ertürk (2006), *Laurus nobilis* ekstraktlarının *Candida albicans* ve *Aspergillus*

*niger* türlerine karşı standart antifungal Nystatin'e göre daha güçlü bir inhibitör etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

Tanaka ve ark (2006), *Laurus. nobilis*'in etanolle yapılmış ekstraktlarının insanda lanosterol sentezleyen rekombinant enzimini inhibe ettiğini saptamışlardır. *Laurus nobilis*'in metanol ekstraktındaki bileşikler silika jel kromatografisi ve HPLC ile ayırmışlar ve elde edilen 10 bileşikten biri olan Eremanthine'in 500 µM konsantrasyonda %70 inhibisyonla en güçlü etkiye sahip olduğunu ortaya çıkarmışlardır.

Sangun ve ark (2007), Antakya'da, Yayladağı'nda ve Samandağı'nda yetişen *Laurus nobilis* yaprak ve meyvelerinin GC-MS analizini yapmışlardır. 3 yerden alınan meyve ve yaprak örneklerinin kimyasal içeriklerinin birbirlerine yakın çıktığını ve %50 konsantrasyonla 1.8-Cineol'ün ana bileşenleri olduğunu saptamışlardır.

Zaitoun (2007), tıbbi amaçla kullanılan 21 bitkinin etanol ekstraktlarının *Galleria mellonella* L. ve *Apis mellifera syriaca* türlerinin gelişimlerine etkilerini araştırmışlardır. *Laurus nobilis* ekstraktları güvelere karşı insektisit özelliğini saptamıştır. *Laurus nobilis* ekstraktlarıyla muamele edilen *Galleria mellonella* bireyleri metamorfozlarını sürdürmüş, fakat yetişkinliğe eriştikten sonra öldüklerini tespit etmiştir.

Rozman ve ark (2007), 1.8-Cineol'ün *Sitophilus oryzae*, *Rhizopertha dominica* ve *Tribolium castaneum* türlerinin yetişkin bireylerine karşı etkilerini araştırmışlardır. 1.8-Cineol'ün 24 saatlik en düşük dozunun (0.1 mL/720 mL hacimde) *Sitophilus oryzae* türüne çok etkili olduğunu ve 7 gün boyunca bu 3 tür cineol ile maruz bırakıldığında %92.5 ölüm oranı gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Al-Kalaldehy ve ark (2010), *L. nobilis*'i kimyasal olarak analiz etmiş ve göğüs hücre dizisinin (MCF 7) adenokanserine karşı antiproliferatif aktivitesini incelemişlerdir. Hidrodistilasyonla elde edilen uçucu yağda 1,8- Cineol %40,91 konsantrasyonla *L. nobilis*'in ana bileşeni olarak bulmuşlardır. Aynı çalışmada *L. nobilis*'in kaba etanol ekstraktı, 24,49 µg/mL IC50 değeriyle MCF 7'ye karşı antiproliferatif etki gösterdiğini, uçucu ve sulu ekstraktının sitotoksik etki göstermediğini gözlemlemişlerdir.

Hassiotis ve ark (2011), *L. nobilis*'in iki mikoriza türü olan *Glomus deserticola* ve *Glomus intraradices*'in gelişimlerine etkilerini araştırmışlardır. Fungi kolonileşmesine ve konakta büyümeye verilen tepki, *L. nobilis* yapraklarının ve esansiyel yağlarının farklı konsantrasyonlarında izlenmiştir. Bitkilerin topraklarına karıştırılan *L. nobilis* yapraklarının mikorizayı inhibe ettiği ve inhibisyon düzeyinin eklenen yaprak miktarıyla uyumlu olduğu, esansiyel yağın da yapraklara göre daha yüksek inhibisyona sebep olduğunu belirlemişlerdir.

### 2.3. Genotoksisite İle İlgili Çalışmalar

Kanaya ve ark (1992), *Vicia faba* L. ve *Zea mays* L. türlerinin ekstraktlarının, Çin hamster'ının yumurtalık hücrelerinde kardeş kromatid değişiminin indüklenmesini araştırmışlardır. *Vicia faba*'nın kök ve yaprak ekstraktları bu hücrelerde KKD'yi indüklemiştir. Mısır bitkisinin *Vicia*'ya göre KKD indüksiyonunda daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Gomes-Carneiro ve ark (1998), Cineol'ün'de bulunduğu 6 monoterpeni, S9 varlığında ve yokluğunda *Salmonella* mikrozom testi kullanarak mutajenite testi yapmışlardır. 1.8-Cineol'ün Ames testinde mutajenik olmadığını saptamışlardır.

Prates ve ark (1998), Cineol'ün, depolanmış buğdaylara zarar veren *Rhyzopertha dominica* F. ve *Tribolium castaneum* Herbst türlerine karşı etkilerini incelemişlerdir. 1.8-Cineol'ün direk temas ve sindirim yoluyla insektisid özelliği olduğunu saptamışlardır.

Filistin'de bazı hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılan bitkilerden seçilen 24 türün anti-tumor (sitotoksik) ve anti-inflamatuar aktiviteleri farelerde fibroblast hücreleri (L929sA) ve insanda iyi huylu (MCF7) ve kötü huylu (MDA-MB231) göğüs kanseri hücreleri üzerinde test edilmiş ve yapılan çalışmalarda *L. nobilis*'in yüksek sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır (Kaileh ve ark, 2007).

Di Sotto ve ark (2008), *Laurus nobilis*'in esansiyel yağında bulunan linalool ve linalil asetat maddelerinin mutajenik ve antimutajenik etkilerini *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 ve *Escherichia coli* WP2uvrA suşlarında bakteri geri mutasyon testi uygulayarak araştırmışlardır. Linalool, herhangi bir mutajenite

göstermezken, linalil asetat WP2*uvrA* suşlarında revertant koloni sayılarını, hem S9'lu hem S9'suz ortamda, istatistiksel açıdan önemli bir artışa neden olduğunu saptamışlardır. Linalool'un 2-nitroflorene (2NF), sodyum azide (NA), metil metan sülfonata (MMS) ve 2-aminoantrasine karşı zayıf antimutajenik etkisi olduğunu saptamışlardır (Di Sotto ve ark, 2010).



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3. 1. Materyal

Araştırma materyali Çukurova Üniversitesi kampüsünde doğal olarak yetişen 3 farklı *Laurus nobilis* L. (Lauraceae, Defne)' in yaprakları ve 0-10 cm derinlikten alınan topraklarıdır (29.01.2010). Ayrıca genotoksisite çalışması için defnenin yaprak ekstraktı ile sigara içmeyen, 22 yaşında sağlıklı bir erkek ve bir kadından alınan periferik kan kullanılmıştır.

*Laurus nobilis* L. Akdeniz Bölgesi'ne özgü bir bitki olup çalı formunda 5-10 m boylanabilen bir bitkidir. Herdem yeşil olan lanseolat yaprakları alternat dizilişlidir.

#### 3.1.1. Araştırma Alanının Coğrafik Konumu ve Özellikleri

Araştırma alanı Doğu Akdeniz (Adana) Bölgesinde bulunan Çukurova Üniversitesi Balcalı Kampüsü (yüzölçümü 18.024 da) içinden seçilmiştir.

Denizden yüksekliği en fazla 170 m olan araştırma alanı deniz terasları, eğimli teras yamaçları, nehir terasları, alüviyol taban arazileri ve vadi taban dolgularından oluşmuştur (Özbek ve ark, 1974).

Kuzey ve orta kısmında pliosen yaşlı, deniz orijinli eski deniz terasları ve teras yamaçları yer almaktadır. Burada anakaya kireç taşı ve kireçle çimentolaşmış konglomeradır. Alanın kuzey yönünde ise yüksek miktarda kireç içeren yumuşak kil taşları bulunur. Güneye gidildikçe deniz terası sonrasında yan dereler ve Seyhan nehrinin oluştuğu pleistosen devrine ait eski alüvyon terasları yer alır. Bunların hemen güneyinde de holosende, kil, kum ve çakıl depozitlerinden oluşmuş yeni alüviyoller dikkati çeker. Çakılların orijini genellikle kireç taşı olup rengi gri ile beyaz arasında değişmektedir (Özbek ve ark, 1974).

### 3.1.2. Toprak

Çukurova Üniversitesi Kampüs toprakları Entisol, Vertisol ve Alfisol ordolarına dahil olup Pliyosene ait kirli beyaz ve pembe traverten, çok kireçli yumuşak kil ve konglomera ile holosene ait çakıl, kum ve kil serisinden ibaret yeni alüviyoller üzerinde oluşmuşlardır (Özbek ve ark, 1974).

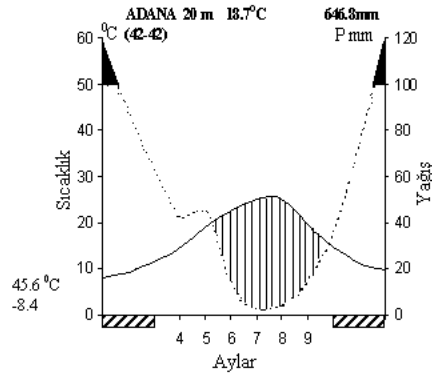
Örneklik alanın toprakları “Typic Rhodoxeralf” grubunda Karaburun taşı tını olarak tanımlanmış olup %2-6 eğimli, şiddetli erozyonlu çok sığ topraklardır (Özbek ve ark, 1974).

### 3.1.3. İklim

Çukurova bölgesinde yazları sıcak ve kurak, kışları ılık ve yağışlı olup yağışlar kışın Batı Akdeniz’e göre az, ilkbahar ve sonbaharda daha fazladır.

Çukurova Üniversitesi Kampüsü kuzeyde Toros Dağları ile çevrili olduğu için normalden daha sıcaktır. Genellikle yağmur şeklindeki en yağışlı aylar Aralık, Ocak, Şubat, en kurak aylar ise Haziran, Temmuz, Ağustos ve Eylüldür. Yıllık ortalama toplam yağış 646.8 mm, yıllık ortalama nem ise % 66’ dir.

Bölgede ortalama sıcaklık yıllık 18.7 °C, aylık 9.3 °C (Ocak) ile 28.1 °C (Ağustos) arasındadır. Ortalama düşük sıcaklık 4.8°C (Ocak), ortalama yüksek sıcaklık ise 34.8 °C (Ağustos) 'dir. Kurak dönem mayıs sonu-ekim sonu, yağışlı dönem kasım-nisan arası yaşanmaktadır. Mutlak don olayı yoktur (Walter, 1960, Meteoroloji Bülteni, 1974) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Adana İli İklim Diyagramı

### 3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

#### 3.1.4.1. Etanol (Merck)

*Laurus nobilis* yapraklarının ekstraksiyonunda ve çözücü kontrol olarak kullanılmıştır.

#### 3.1.4.2. Kromozom Besiyeri

Bu çalışmada Gibco firmasının ürettiği PB-Max Besiyeri (cat. no. 12552-013), hücre kültürü için kullanılmıştır. PB-Max içerisinde Fetal Bovine Serum, L-glutamine, Gentamicin sulfat (35 µg/mL) ve Phytohemagglutinin bulunmaktadır. Bu medyum steril kültür tüplerine 2.5 mL olacak şekilde paylaştırılarak kullanılmıştır.

#### 3.1.4.3. Kolşisin

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik zehir olarak Colchicine (kolşisin) (Sigma Cat. No. C9754) kullanılmıştır. Kolşisin eriyiği saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom besiyerine her mL'sinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/mL) 2.5 mL'lik kromozom besiyerine ilave edilmiştir.

#### 3.1.4.4. Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak %0,4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içinde stok halinde hazırlanıp ağzı kapalı bir cam kaptaki buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık 2 saat önce gerekli miktarda alınıp 37°C'deki inkübatörde ısıtılıp kullanılmıştır.

#### 3.1.4.5. Fiksatif

KKD için kullanılan fiksatif, 1 kısım glacial asetik asit 3 kısım metanol ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Fiksatif her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır.

#### 3.1.4.6. 5 -Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd)

BrdUrd Sigma firmasından (Cat. No. B 5002) temin edilmiştir. BrdUrd eriyiği bidistile su içerisinde hazırlanmış, daha sonra por çapı 0,2 µm olan membran filtre (Sartorius marka) ile süzülerek steril edilmiştir. Bu eriyikten kültür tüpleri içerisindeki kromozom medyumuna 10 µg/mL olacak şekilde ilave edilmiştir.

#### 3.1.4.7. Sorensen Tamponu

KKD'ni incelemek amacıyla preparat yapımı sırasında preparatlar Sorensen tamponu içerisinde UV lambası ile ışınlandırılmıştır. Ayrıca bu tampon %5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında da kullanılmıştır. Bu tampon eriyik, tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup bu çözeltiler çalışmanın amacına göre farklı miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır. Hazırlanışı:

Tampon A:11.34 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 250 mL saf su içinde çözülmüştür (pH=4.8).

Tampon B:14.83 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 250 mL saf su içinde çözülmüştür (pH=9.3).

#### 3.1.4.8. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği

Bu eriyik ışınlamadan sonra kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını arttırmak amacıyla kullanılmıştır. SSC eriyiğini hazırlamak için 11,05 g trisodyum sitrat ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ) ve 21,9 g NaCl kullanılmıştır. Bu iki madde ayrı ayrı kaplarda bir miktar saf su içerisinde çözülmüş, daha sonra aynı kaba aktarılarak birbirleriyle karıştırılmış ve üzerlerine 500 mL oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir. Hazırladığımız bu stok eriyik 5xSSC yoğunlukta olup buzdolabında saklanmış, bu stoktan 20 mL alınıp üzeri 100 mL'ye kadar saf su ile tamamlanarak elde edilen 1x SSC kullanılmıştır.

#### 3.1.4.9. Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olup deneylerimizde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış olan %5'lik boya eriyiği preparatların boyanmasında kullanılmıştır.

#### 3.1.4.10. Entellan

Preparat kapatma solüsyonudur (Merck, Cat. No. 7961). Preparatlar daimi hale getirilirken lam ve lamelin birbirlerine yapıştırılmasında kullanılmıştır.

#### 3.1.4.11. Nitrik Asit ( $HNO_3$ )

Lamları temizlemek amacıyla 1 N çözelti olarak hazırlanmıştır. Plastik şişede saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

#### 3.1.4.12. Mitomycin C (MMC)

S9mix yokluğunda pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. MMC (Sigma, M0503) suda eritilerek hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. MMC stok

çözeltisi çalışma başlangıcında taze olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır. MMC kültür tüplerine 0.2 µg/mL olacak şekilde ilave edilmiştir.

#### **3.1.4.13. 1.8- Cineol (Merck)**

*Laurus nobilis* L. nin yapraklarının etken maddesi olan 1.8-Cineol, karbon minerilazasyonda topraklara ilave edilmek amacıyla kullanılmıştır.

### **3.1.5. Kullanılan Deney Ekipmanları**

#### **3.1.5.1. Hassas Terazı**

Hava akımlarına karşı özel cam kabinli ve 0,0001 g hassasiyetli GEC AVERY marka terazi kullanılmıştır.

#### **3.1.5.2. Santrifüj**

Rotor çapı 21 cm olan ve 4000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 99 dk.'lık zaman ayarlayıcı, açılabilir başlığa sahip ve 28 tüp kapasiteli HETTICH UNIVERSAL marka santrifüj kullanılmıştır.

#### **3.1.5.3. Mikroskop**

Preparatlar koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskobu ile incelenmiş ve fotoğrafları dijital olarak çekilmiştir.

#### **3.1.5.4. İnkübatör**

Kan hücreleri 37°C'de INCUCCELL marka inkübatörde inkübe edilmiştir.

### 3.1.5.6. Flow Kabin (Steril Kabin)

Hücre kültürü tüplerine kromozom besiyeri konulması, kan ekiminin yapılması, test eriyikleri ve kültür tüplerine ilave edilmesi sırasında steril bir ortam olarak, % 99.9 partikül tutma özellikli, 1500 m<sup>3</sup>/h emiş kapasiteli, UV ve floresan ampülü olan LABORMED marka steril kabin kullanılmıştır.

### 3.1.5.7. Su Banyosu

Hücre kültürü preparatları hazırlandıktan sonra, kardeş kromatidlerin farklı boyanmasında kullanılan SSC eriyiğinin 58-60°C'de sabit kalmasını sağlamak amacıyla BM 302 NÜVE marka 0-60°C ayarlanabilir, zaman ayarlı su banyosu kullanılmıştır.

### 3.1.6. Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce etiketli olan lamlar şaleye dizilerek üzerlerini iyice örtecek şekilde 1 N nitrik asit konmuş, ağzı kapatılarak 24 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde lamlar yarım saat akan çeşme suyunda iyice yıkanmış, daha sonra 3-4 defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında saklanmıştır.

## 3.2. Metod

### 3.2.1. Örneklik Alanın Seçimi ve Örneklerin Alınması

Örneklik alan olarak Çukurova Üniversitesi Kampüsü içinde ağaç topluluklarını en iyi şekilde temsil eden, ayrıca doğal ve insan tahribinden olabildiğince uzakta olmasına dikkat edilmiştir.

Örneklik alanlardan *Laurus nobilis*'in 3 farklı bireyinin altından, yüzeydeki döküntüler iyice temizlendikten sonra, 0-10 cm derinlikten toprak örnekleri

alınmıştır. Yaprak örnekleri ise ağaçlarda 1,5 m yüksekliğe kadar olan bölgelerden ağacı en iyi temsil edecek şekilde, ağacın tüm çevresinden alınmıştır. Bu örnekler naylon torbalarda laboratuvara getirilmiş ve kâğıtların üzerine serilerek havada kurutulmuştur.

Bitki parçaları ve taşlarından arındırılmış toprak örnekleri havada kuruduktan sonra 2 mm'lik elekten elenmiş ve naylon torbalarda muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2. Toprak Örneklerinin Fiziksel ve Kimyasal Analizleri

Toprakların toplam N içeriği (%N) Kjeldahl metodu, organik C içeriği (%C) Anne metodu ile belirlenmiştir (Duchaufour, 1970). Topraklardaki karbon mineralizasyonu 30 gün boyunca CO<sub>2</sub> respirasyonu metodu ile kontrollü koşullar altında (28 °C, sabit nem) incelenmiştir (Schaefer, 1967).

Toprakların bünye tipi mekanik analiz (hidrometre yöntemi) ile (Bouyoucos, 1951), toprak pH'sı 1:2,5'lik toprak-su karışımında InoLab pH metresi ile (Jackson, 1958), kireç içeriği (%) Scheibler kalsimetresiyle (Allison ve Moodie, 1965), toprak renkleri Munsell renk skalası ile (Munsell, 1975), tarla kapasitesi (TK, %) 1/3 atm. basınçlı vakum pompası ile belirlenmiştir (Demiralay, 1993). Tüm ölçümler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Organik Karbon (% Corg) Tayini (Anne yöntemi) için;

- Kurutulup elenmiş toprak örneğinden yaklaşık 0.8 g rodajlı balona konmuştur.
- Üzerine 20 ml % 8'lik K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> ve 15 mL konsantre H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenmiştir.
- Rodajlı balon bek alevi üzerindeki geri soğutucuya bağlanarak bek alevinde yakılmıştır. Yakma işlemi ısınma sonucu oluşan ilk yoğunlaşma damlasından sonra 5 dakika devam etmiştir.
- Balondaki toprak örnekleri beklenerek dibe çökertilmiştir. K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>' in turuncu rengi kayboluncaya kadar pek çok kez damıtık su ile azar azar çalkalanarak 100 ml'lik balon jodede toplanmış ve son hacim damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- Balon joje iyice çalkalandıktan sonra süzüntüden 20 mL alınıp içinde 200 mL damıtık su bulunan 600 mL'lik behere aktarılmıştır. Üzerine bir spatül ucu NaF ve 8

damla difenilamin sülfürük eklenmiştir.

- Karışım karıştırıcıda homojenleştirildikten sonra 0.2 N Mohr tuzu ile titre edilmiştir. Titrasyonda ilk renk oldukça koyudur ve titrasyon sonunda açık ve parlak yeşil bir renk elde edilmiştir (Titrasyonda harcanan Mohr tuzu miktarı not edilir).

- Dikkat edilmesi gereken nokta örneklerin titrasyonunda kullanılan 0.2 N Mohr tuzunun titrasyonunun da aynı anda yapılmasıdır. Bunun için 600 mL'lik behere 200 mL damıtık su, 2 mL  $K_2Cr_2O_7$ , 3 mL saf  $H_2SO_4$ , bir spatul ucu NaF ve 8 damla difenilamin sülfürük konulmuştur. Mohr tuzu ile titre edilerek harcanan Mohr tuzu miktarı not edilir.

- Hesaplama Duchaufour (1970)'e göre yapılmıştır:

$$T = 960 / (294 \times M)$$

T : Mohr tuzu titri ( $T \cong 0.2$  N)

M : Titrasyonda harcanan Mohr tuzu miktarı (mL)

$$\%oC = 15,375 \cdot T(V_1' - V_1) / P$$

$V_1'$  : Tanık için harcanan Mohr tuzu miktarı (mL)

$V_1$  : Örnek için harcanan Mohr tuzu miktarı (mL)

P : Başlangıçta kullanılan fırın kurusu toprak ağırlığı (g)

Toplam Azot (%) Tayini (Kjeldahl yöntemi) 3 aşamalıdır: 1. Organik Azotun mineralleşmesi: Katalizör ( $K_2SO_4 + Cu_2SO_4$ ) ve konsantre  $H_2SO_4$  karışımında kaynatılan organik madde azotunu  $(NH_4^+)_2SO_4$  formunda serbest bırakır. 2.  $NH_3$  distilasyonu:  $NH_3$ 'ün NaOH ile yer değiştirerek Kjeldahl cihazında distilasyonla geri kazanılmasına dayanır. Distilasyon esnasında  $NH_3$  borik asit çözeltisi ile kompleksleştirilip  $NH_4H_2BO_3$  formuna getirilir. 3. Titrasyon: Borik asitle kompleksleştirilen azot N/50'lik  $H_2SO_4$  ile titre edilerek tekrar başlangıçtaki  $(NH_4^+)_2SO_4$  formuna dönüştürülür.

İşlemler şöyle yapılır:

- Toz haline getirilmiş toprak örneğinden 5g, bitki için de 0,04 g tartılıp yakma balonuna aktarılmıştır.

- Üzerine bir kaşık Wieninger katalizörü (10 birim  $K_2SO_4 + 1$  birim  $Cu_2SO_4 + 1$  birim Se) ve 30 ml  $H_2SO_4$  eklenip 24 saat ıslanmaya bırakılır.

- 24 saat sonunda örnek çeker ocakta 15 dakika hafif ısıtıldıktan sonra ısıtıcı 350-

400 °C ye yükseltilerek yakma işlemi parlak açık yeşil renkli sıvı ortaya çıkana kadar sürdürülmüştür. Yakma sırasında balon sık sık karıştırılarak boyun kısmındaki organik maddenin balonun haznesine düşmesi ve böylece tamamının yanması sağlanmıştır. Dikkat edilecek nokta, açık yeşil renk elde edildikten sonra yakma işleminin 1 saat daha devam ettirilmesidir.

- Yakma sonunda balon soğutulmuştur ve içindeki yanmış örneğe yaklaşık 30 mL damıtık su ilave edilmiştir. Tekrar soğuması beklendikten sonra, çöktürme yöntemi ile üstteki sıvı 100 mL'lik balon jøjeye aktarılmıştır ve yakma balonu 2-3 kez damıtık su ile yıkanarak aynı işlem tekrarlanmıştır. Balon jöje tamamen soğuduktan sonra hacmi damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

- Distilasyon işlemi için 250 mL'lik behere 20 mL % 4'lük H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Borik asit) ve birkaç damla Ma ve Zuazaga indikatörü konulmuştur. Bu beher distilasyon esnasında azotun toplandığı kısma konulmuştur.

- Geri soğutucu çalıştırıldıktan sonra analiz edilecek süzükten 10 mL alınıp yarı otomatik Kjeldahl distilatörünün rezervuarına konulmuştur.

- Distilasyon cihazında haznede bulunan süzük üzerine, esmer bir çökelti ortaya çıkana kadar, %60'lık NaOH ilave edilip distilasyona başlanmıştır. Distilasyon işlemi 5-7 dakika (yaklaşık 100-150 cc olana kadar) sürdürülmüştür. Distilasyon sonunda beherde mavi renkli bir çözelti oluşmuştur.

- Beherdeki mavi renkli çözelti N/50'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile başlangıçtaki parlak kırmızı renk elde edilinceye kadar titre edilmiştir.

- Tüm bu işlemler örnek konmadan hazırlanan tanık için de tekrarlanmıştır.

- Buna göre toplam azot miktarı şu formül ile hesaplanmıştır (Duchaufour, 1970) :

$$\% N = (0.28 \times T) / P$$

0.28 : Toplam azot hesabında kullanılan sabit sayı,

T : Örnekle tanık arasındaki titrasyon farkı,

P : Başlangıçta kullanılan kuru toprak ağırlığı (g).

Toprakta CO<sub>2</sub> Metodu (Respirasyon) ile Karbon Mineralizasyonu:

- 500 ml hacimli, lastik contalı cam mineralizasyon kavanozlarına elenmiş toprak örneğinden hava kurusu 80 g konmuştur.

- Toprak tarla kapasitesinin % 80 i oranında nemlendirilmiştir ve cam bir baget yardımıyla iyice karıştırılıp kümelenmemesine dikkat edilmiştir.
- 50 mL'lik bir cam behere 40 mL Ba(OH)<sub>2</sub> konup mineralizasyon kavanozlarının ortasına yerleştirilmiş ve kapağı sıkıca kapatılmıştır.
- Tanık için bir kavanoza toprak olmadan sadece 40 ml Ba(OH)<sub>2</sub> konulmuştur.
- Kavanozlar 28°C'lik etüvde inkübasyona bırakılmış, 1-3 günlük periyotlarla 30 gün boyunca CO<sub>2</sub> ölçülmüştür. Böylece her ölçüm günü kavanozlar açıldığında havaları da tazelenmiş olmaktadır.
- Titrasyon için kavanozdaki Ba(OH)<sub>2</sub>'den otomatik pipetle 2 mL alınıp 50 mL'lik cam behere aktarılmıştır. Üzerine 1 damla Fenolftalein indikatörü damlatılarak, çözelti rengi pembeleşmiştir ve N/22'lik Oksalik asit ile örnek titre edilmiştir.
- Çözelti rengi pembeden beyaza dönünce titrasyon işlemi bitirilmiştir.
- 40 ml'lik Ba(OH)<sub>2</sub>'ye göre % CO<sub>2</sub> miktarı şu formülle hesaplanmıştır:

$$\% \text{CO}_2 = \frac{x \cdot 20}{KT} \cdot 100$$

x: Harcanan Oksalik asit miktarı (ml)  
20: Seyreltme katsayısı  
KT: Kuru toprak (105 °C)

CO<sub>2</sub> ' 0,2727 çarpımı ise 100 g toprakta mineralleşen karbon miktarını [mg C(CO<sub>2</sub>) / 100g KT] verir.

- Her ölçüm gününde hesaplanan C(CO<sub>2</sub>) değerleri birbirleriyle toplanarak 30 günlük mineralleşmiş C(CO<sub>2</sub>) miktarı belirlenir. Bu değer in toprağın toplam karbonuna oranı **karbon mineralizasyon** oranıdır.

$$\frac{C(\text{CO}_2)}{C_{\text{toplam}}} \cdot 100$$

formülü ile 30 günlük karbon mineralizasyonu oranları hesaplanır.

### 3.2.3. Ekstraksiyon ve Kromatografik Ayırma ve Tanımlama

*Laurus nobilis* L. yaprakları havada kurutulduktan sonra bitki değirmeninde öğütülmüştür. 5 g öğütülmüş yaprak 25 dakika aralıklarla iki defa 25 mL ve 7 defa 15 mL %96'lık etanol kullanılarak (Toplamda 165 mL etanol) Whatmann No:42 filtre kağıdıyla süzölmüştür. Ardından rotary evaporator cihazına takılarak 4 saat boyunca içindeki etanol buharlaştırılıp geri kazanılmıştır. Elde edilen özüt 10 mL

etanolle karıştırılarak 1 mL'lik ependorflara aktarılmış ve +4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Bu özüt KKD (kardeş kromatid değişimi) testlerinde kullanılmıştır (Elmastaş ve ark, 2006).

Yaprakların 1.8-cineol içeriğini belirlemek için öğütülmüş yapraklardan 20 g tartılmış, 250 mL saf suyla beraber balon jöjeye konularak Clevenger cihazında 3 saat kaynatılmıştır. Daha sonra yaprakların uçucu yağları 10 ml'lik cam tüplere aktarılmış ve -20°C'de buzdolabında saklanmıştır.

Elde edilen uçucu yağlar, GC-MS analizleri Termo Scientific Triplus Trace GC Ultra ISQ marka kütle spektrometresinde elektron impakt (70 eV) ile yapılmıştır. Kromatografik ayırma TR-MS-5 (60m x 0,25 mm x 0,25 µm, %5 fenil polisiloksan) kolonda gerçekleştirilmiştir. Bunun için sıcaklık programı 50°C de 1 dakika bekletilir, 3°C/dk ısıtma hızıyla 160 °C ye çıkarılır, burada 3 dakika bekletildikten sonra 5°C/dk ısıtma hızıyla 250 °C ye çıkarılıp 10 dakika bekletilir. Enjeksiyon sıcaklığı 240°C ve split10 modunda çalışılmıştır. Her bir bileşen, kütle spektrumlarının Wiley07 ve NIST(2005) kütüphanesinden yararlanılarak tanımlanmıştır. Uçucu yağda cineol miktarı iç standart ekleme metodu kullanılarak GC-MS de belirlenmiştir. İç standart olarak toluen kullanılmıştır.

### 3.2.4. Genotoksisite Çalışmaları

#### 3.2.4.1. Metabolik Aktivatör Yokluğunda Test Metodu

##### 3.2.4.1.(1). Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) (Sister Chromatid Exchange=SCE) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması

Aynı yaş grubunda, sağlıklı ve sigara içmeyen insanlardan alınan (1 bayan, 1 erkek) 1/10 heparinize edilmiş periferik kanın 0.2 mL'si kromozom medyumuna PB-Max (Gibco cat. no. 12552-013) ilave edilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991). Kanın ilavesinden hemen sonra son konsantrasyonu 10 µg/mL olacak şekilde steril 5-bromo-2-deoksiuridin ilave edilerek kültür 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Test maddesinin ön çalışma sonucu belirlenen toksik olmayan 3 konsantrasyonu (3.0, 6.0 ve 12.0 µL/mL) kültür ortamına kültürün başlangıcından 24 ve 48 saat sonra ilave edilmiş ve hücrelerin test maddesiyle 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmeleri sağlanmıştır. Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden ilave edilmiş (0.06 µg/mL) ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat süresince (37°C'de) kolşisin ile ön muameleye tabi tutulmuştur. Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri 2000 devir/dk (rpm)'da 5 dk santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 mL'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37°C'de tutulan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırılarak yapılmıştır. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun olmayan preparatlar elde edilmektedir. Her tüpe 5 mL hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konulmuştur. Hücreler 4 dk hipotonik eriyikte 37°C'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 10 dk 1200 devir/dk'da santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Bu sefer hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 mL olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk fiksatif ile muamele edilen

hücreler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır. 3.fiksatif muamelesinin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Eğer sıvı berraklaşmamışsa tekrar fiksatif muamelesine devam etmek gerekir. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 mL sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçilmiştir.

Tüpün dibinde toplanan hücreler Pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan Pasteur pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanmış lamaların üzerine 45 cm yükseklikten farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir.

Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

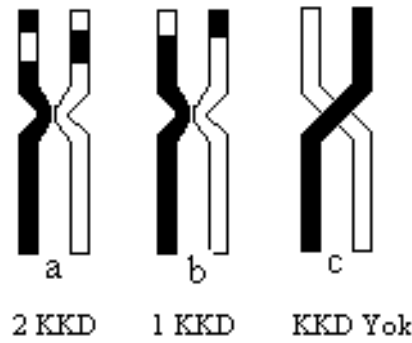
#### **3.2.4.2. Preparatların Boyanması**

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (sister chromatid differentiation=SCD) sağlamak amacıyla Speit ve Haupter (1985)'in geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film gibi örtülecek şekilde Sorensen tamponu ile kapatılmıştır. Işınlama eriyiği, 5 mL tampon A, 5 mL tampon B'den alınıp bu karışımın distile su ile 100 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Işınlama eriyiğinin fazla veya az olmasının kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği görülmüştür. Bu şekilde ince bir tabaka halinde ışınlama eriyiği ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviyole lambası ile 30 dk ışınlanmıştır. Işınlama bittikten sonra preparatlar 1xSSC eriyiği içerisinde 58-60°C arasındaki

sıcaklıklarda 60 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk önce %5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlanmıştır. %5'lik Giemsa boyası, 5 mL tampon A, 5 mL tampon B ve 5 mL Giemsa'nın karıştırılarak üzerleri 85 mL saf su ile tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kâğıtları ile süzölmüştür. İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1xSSC eriyiğinden alınarak doğrudan boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 30 dk boya içerisinde bekletilmiştir (kardeş kromatidler arasındaki en iyi kontrast farkı bu sürede sağlanmıştır). Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlarda mikroskobik incelemeler yapılmıştır.

### 3.2.4.3. Mikroskobik İnceleme

Hazırlanmış daimi preparatlar Olympus marka binoküler ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile (MB :10x100) incelenmiştir.



Şekil 3.2. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990).

KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (2 kişiden toplam 50 hücrede) saptanmıştır. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu

boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlenmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990). Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak değerlendirilmiş (Şekil 3.2.a), uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayılmıştır (Şekil 3.2.b). Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3.2.c).

*Laurus nobilis* L. yaprak ekstraktının DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile proliferasyon indeksi (PI) bulunmuştur. Bunun için tesadüfi seçilmiş 100 hücre incelenmiştir. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü metafaz devresindeki hücreler sayılmıştır. Bu verilerden yola çıkarak PI şu şekilde hesaplanmıştır:

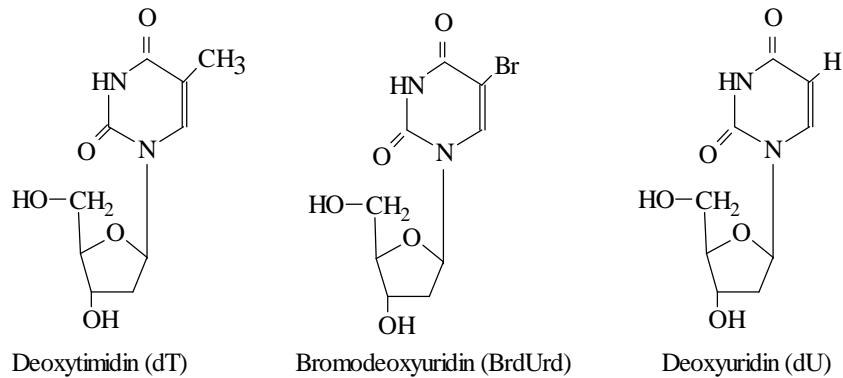
$$PI = (1M_1 + 2M_2 + 3M_3) / 100$$

$M_1$ : 1. Mitozdaki hücre sayısı

$M_2$ : 2. Mitozdaki hücre sayısı

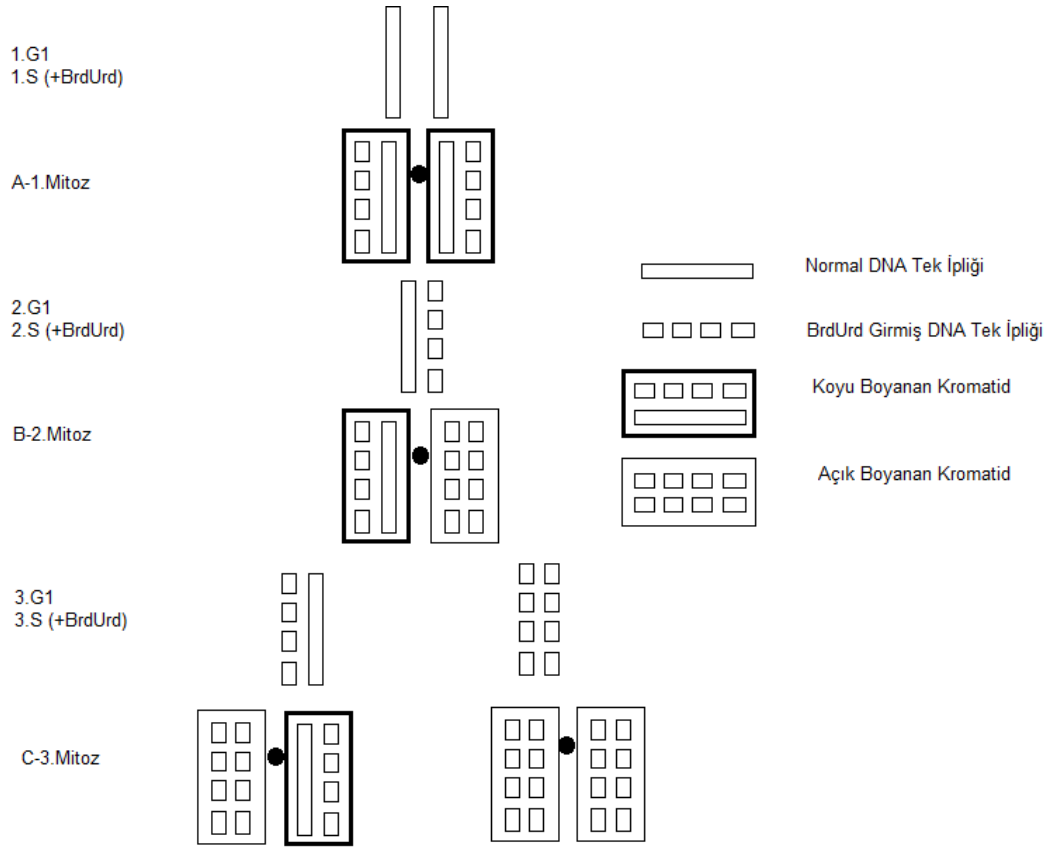
$M_3$ : 3. Mitozdaki hücre sayısı

Birinci, ikinci ve üçüncü metafazlar şu şekilde ayırt edilmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990): BrdUrd, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analoğu olan bileşiklerdir (Şekil 3.3). BrdUrd, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları benzen halkasındaki 5.C atomuna dT'de  $CH_3$ , BrdUrd'de Br ve dU'da H atomunun bağlı olmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.3. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları.

BrdUrd, DNA'nın yapısında bulunan timin bazlarının analogu olduğundan dolayı kültür ortamına BrdUrd koyduğumuzda hücre DNA'sını replike ettiği sırada (1.S fazında) yeni sentezlenen polinükleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdUrd'ni alacaktır. Böyle hücrelerin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de (BrdUrd/dT:dT/BrdUrd) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler 1. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.4 A). Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd'lu ortamda 2.S fazı) timin ihtiva eden polinükleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdUrd yer alacaktır. Bu iki polinükleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (BrdUrd/dT) oluşturacaktır. BrdUrd'lu ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdUrd girecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinükleotid ipliği de BrdUrd ihtiva ettiklerinden (BrdUrd/BrdUrd) bu kromatid aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır. İşte bu hücrenin metafaz devresinde preparat yapıldığında hücrenin tüm kromozomlarının (BrdUrd/dT:BrdUrd/BrdUrd) kromatidlerinden biri koyu diğeri ise açık renkte boyanacaktır. Bunlar da ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. (Şekil 3.4.B). Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd'lu ortamda 3.S fazı) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden tüm polinükleotid ipliklerine BrdUrd girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık renkte boyanacaktır (BrdUrd/BrdUrd:BrdUrd/BrdUrd). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise, bir kromatidin her iki ipliği BrdUrd'li ve diğeri kromatidin bir ipliği BrdUrd'li diğeri ipliği timinli olan bir kromozom oluşacaktır. Bu kromozom da boyandığında bir kromatidi koyu renkte, bir kromatidi de açık renkte boyanacaktır (BrdUrd/BrdUrd:dT/BrdUrd). İşte böyle hücrelerin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık, diğeri kromatidi de koyu renkte boyanacaktır. Bu hücrelerde 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.4.C). İşte bu şekilde 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş, bu hücrelerin 100 hücre içindeki sayısı saptanmış, bundan da yukarıda belirtilen formüle göre proliferasyon indeksi (PI) hesaplanmıştır.



Şekil 3.4. BrdUrd'in DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması (During 1985'e göre Topaktaş ve Speit 1990'den).

#### 3.2.4.4 İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Genotoksisite Analizinde mikroskobik inceleme sonucunda muameleli gruplardan elde edilen KKD ve PI değerleri ile kontrol, çözücü ve pozitif kontrollerin değerleri arasındaki farkın önemi t-testi ile araştırılmıştır. Doz etki ilişkisi ise korelasyon ve regresyon test sistemi ile saptanmış ve sonuçlar grafik ile verilmiştir.

Ayrıca mikroskobik incelemelerden elde edilen sonuçlar çizelge ve grafikler halinde verilmiştir.

Karbon mineralizasyon analizi sonuçlarının istatistiksel analizi SPSS paket programı ile yapılmıştır. Toprak karbonuna eşdeğer ve  $\frac{1}{2}$  si oranında karbon içeren yaprak ve cineol ilave edilen toprak örneklerinde organik madde mineralizasyonu

sonuçlarının ortalamaları arasında farkların önem düzeyi Varyans analizi (One Way Anova) ve Tukey HSD testi ile belirlenmiştir. Her bir bitki için alınan toprağın (3 tekrarlı) ortalamaları  $\pm$  standart hatalarıyla çizelge ve şekillerde sunulmuştur. Tüm istatistik analiz için önemlilik düzeyi  $p \leq 0.05$ , 0,01 ve 0,001 şeklindedir.



#### 4.BULGULAR VE TARTIŞMA

29.02.2010 tarihinde alınan *Laurus nobilis* L. toprak örneklerinin fiziksel ve kimyasal analizleri ile yaprak ve 1.8-cineol'ün kimyasal analizleri istatistiksel olarak değerlendirilmiş, ortalama ve standart hata değerleri hesaplanmış (Çizelge 4.1) ve P değerine (0,05; 0,01; 0,001) göre önem dereceleri belirlenmiştir.

Toprak karbonuna eşdeğer ve yarısı kadar karbon içeren yaprak ve 1.8- cineol karıştırılmış toprakların 30 günlük kumulatif karbon mineralleşme grafikleri (Tukey HSD) çizilip kıyaslanmış (Şekil 4.1) ve P değerine (0,05; 0,01; 0,001) göre önem dereceleri belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

##### 4.1. Toprakların Fiziksel ve Kimyasal Analizlerinin Sonuçları

*Laurus nobilis* L. toprakları kumlu tınlı bünyeli, Munsell renk skalasına göre koyu sarımsı kahverengidir (10YR 4/4). Topraklar bazik reaksiyonlu olup aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (Çizelge 4.1 ). Toprakların tarla kapasiteleri arasında istatistiksel olarak bir fark yoktur. Karbon ve azot içerikleri açısından topraklar arasındaki fark anlamlı iken, yapraklar arasında anlamsız bulunmuştur.

Karbon mineralizasyonu için karbon içeriği %3.70 olan L1 toprağı kullanılmıştır. Bu toprağın karbon değerlerine eşdeğer ve ½ si oranında karbon içeren yapraklar (Cyaprak) öğütülüp toz halinde, 1.8-cineole (Merck) ise sıvı olarak topraklara karıştırılmıştır. Buna göre inkübasyona bırakılan toplam karbon miktarları aşağıda verilmiştir (g C / 100 g Kuru toprak) :

Toprak karbonu	: 3,70
Toprak + ½ C <sub>1.8-Cineol</sub>	: 3,70 + 1,85 = 5,55
Toprak + 1C <sub>1.8-Cineol</sub>	: 3,70 + 3,70 = 7,40
Toprak + ½ Cyaprak	: 3,70 + 1,85 = 5,55
Toprak + 1Cyaprak	: 3,70 + 3,70 = 7,40

Çizelge 4.1. Defne Toprak ve Yapraklarının Fiziksel ve Kimyasal Analizlerinin Ortalama Sonuçları ve Standart Hata Değerleri

Analizler		Laurus			P
		L1	L2	L3	
Toprak	Toprak Rengi (Munsell)	10 YR 4/4 (koyu sarımsı-kahverengi)			-
	% Kum	77,21	67,18	79,06	-
	Tekstür % Silt	8,21	18,27	7,89	-
	% Kil	14,58	14,55	13,05	-
	Tekstür Tipi	SL	SL	SL	-
	TK (%)	53,42	38,39	46,36	
	pH	7,52±0,05	7,80±0,02	7,84±0,05	0,003
	CaCO <sub>3</sub> (%)	5,73±0,02	10,73±0,04	7,37±0,90	0,003
	% C	3,70±0,08	3,93±0,02	4,46±0,07	0,001
	% N	0,57±0,03	0,35±0,03	0,53±0,04	0,004
C/N	6,49±0,04	11,40±0,09	8,48±0,05	0,005	
Yaprak	%C	49,70±6,34	43,80±6,91	58,49±6,39	0,346
	%N	1,88±0,00	1,62±0,02	0,85±0,11	0,195

Çizelge 4.2. Defne yapraklarının uçucu yağ ve bu yağdaki GC-MS analizi ile elde edilen 1.8-cineol miktarları

Örnekler	Elde Edilen Uçucu Yağ Miktarı (ml/20 g yaprak)	Yağdaki Cineol Miktarı (mg /10 µl yağ)
L1	0.15	6,05
L2	0.12	7,55
L3	0.30	4,93

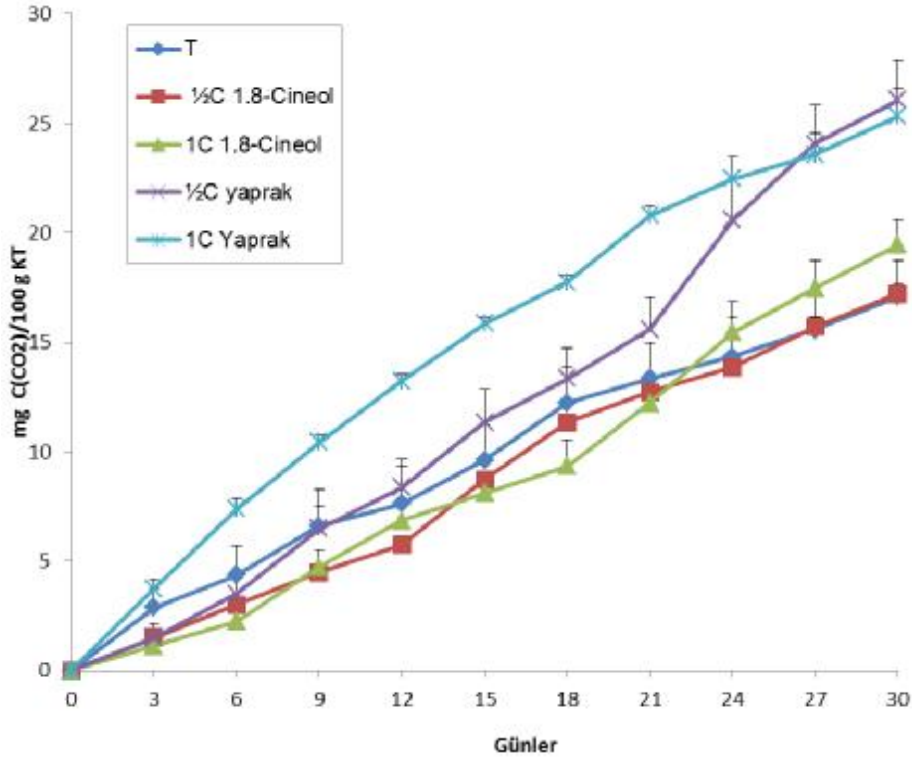
Topraklara karıştırılan yapraklar ve 1.8-Cineol miktarları aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

Yaprak % 49,70 karbon içermekte olup toprağın % 3,70 karbonuna eşdeğer karbona sahip yaprak miktarı 7,44 g'dır. Toprak karbonunun ½ si oranında karbon içeren yaprak için de bu miktarın yarısı (3,72 g) alınmıştır.

100 g yaprakta 453,45 mg Cineol bulunduğu için 3,72 g yaprak toprağa karıştırıldığında 16,86 mg, 7,44 g yaprak ile de 33,72 mg cineol eklenmiş olmaktadır.

1.8-Cineol'ün mol. ağırlığı 154 g olup 120 g karbon içermektedir. Topraktaki 3,70 g karbona eşdeğer karbon içeren (1 X) cineol miktarı 4,75 g'dır. Cineol

solusyonu % 98 saflıkta olduğu için bu miktar cineole karşılık 4,85 ml cineol kullanılmıştır. Toprak karbonunun  $\frac{1}{2}$  sine eşdeğer karbon içeren cineol için de bu değerlerin yarısı kullanılmıştır.

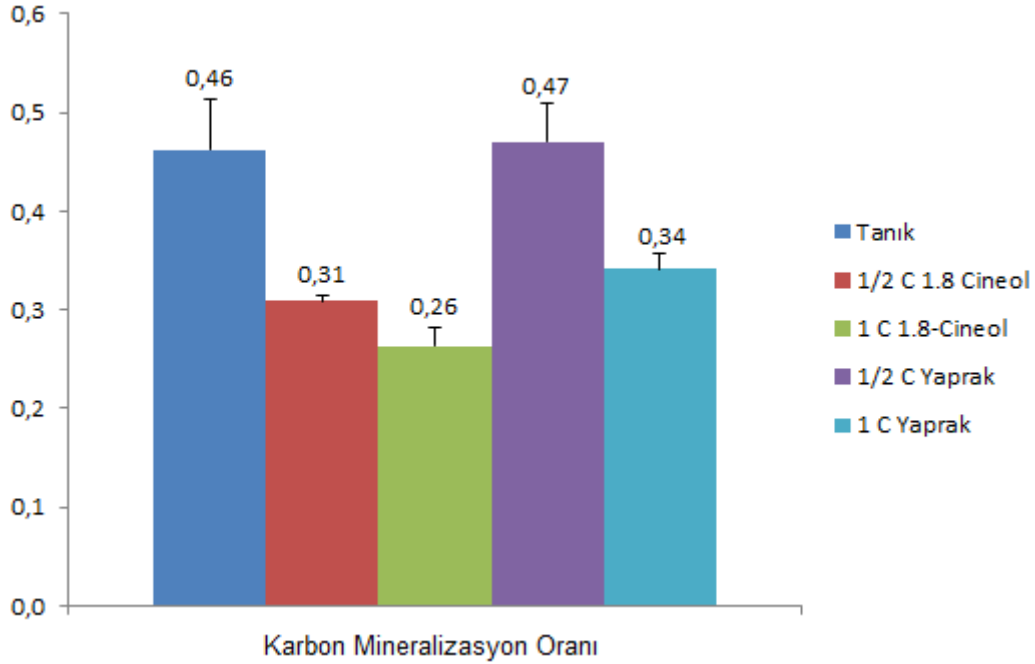


Şekil 4.1. 1.8-Cineol ve defne yaprağı karıştırılmış topraklarda karbon mineralizasyon eğrisi (T:Toprak)

Toprak karbonuna eşdeğer ve  $\frac{1}{2}$  si oranında karbonlu yaprak ve cineol karıştırılmış topraklarda karbon mineralizasyonunun zamana bağlı olarak yükseldiği gözlenmektedir (Şekil 4.1). Bu durum istatistiksel olarak incelenmiş; hem tanıkla hem de toprak karbonuna eşdeğer ve yarısı kadar karbonlu yaprak ilave edilmiş topraklar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur.  $\frac{1}{2}$  C<sub>1.8-Cineol</sub> ve 1 C<sub>1.8-Cineol</sub> ile  $\frac{1}{2}$  C<sub>yaprak</sub> arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Bunun yanında  $\frac{1}{2}$  C<sub>1.8-Cineol</sub>'ün 1 C<sub>yaprak</sub> ile arasında anlamlı bir fark varken 1 C<sub>1.8-Cineol</sub>'nin 1 C<sub>yaprak</sub> ile arasındaki fark anlamsızdır.

Monoterpenlerin toprak mikroorganizmaları tarafından kolayca parçalanabildiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda mikroorganizmalardaki bazı

parçalayıcı enzimlerin diğer primer karbon kaynakları bitmeden oluşmadığı saptanmıştır. Bunun sebebi olarak cineol gibi bireysel bileşenlerin önce ani bir etkiye sebep olmadığı, fakat toprak solunumunun artmasından önce belirli bir sürenin gerekli olduğu belirlenmiştir (Vokou ve ark, 1984; Vokou ve Margaris, 1988).



Şekil 4.2. *Laurus nobilis* topraklarında karbon mineralizasyon oranları (30 gün, n=3) ( mg C(CO<sub>2</sub>)/ Top. C x 100) (Tanık: Kontrol)

Mineralizasyon grafiğine göre; toprak karbonuna eşdeğer karbonlu yaprak (1C<sub>yaprak</sub>) karıştırılmış toprakta karbon mineralizasyonu diğer ortamlara göre daha yüksekte seyretmesi yaprak bileşiminde kolay ayrışabilen, yeterli miktarda organik bileşik bulunduğunu göstermektedir. Fakat buna rağmen mineralizasyon oranının tanıktan daha düşük çıkması cineolün antimikrobial etkisinin varlığını da çağrıştırmaktadır. Toprak karbonunun ½ si oranında karbon içeren yaprak karıştırılmış toprakta mikrobiyal faaliyet 21. güne kadar daha düşük seviyede, fakat artarak ilerlemiş, sonra 27 ve 30. günlerde 1C<sub>yaprak</sub> 'lı ortamdan bile fazla olmuştur. Bu durum ortamda mevcut organik bileşiklerin ayrıştığını, 21. günden sonra ise mevcut cineolün de inhibitör etkisi azaldığı için ayrışmaya başlaması olarak açıklanabilir. Gerçekten bu durum mineralizasyon oranı grafiğinde çok net olarak

yansımaktadır. Cineol daha düşük miktarda olmasına rağmen, gene de etkisini gösterdiği ve bu ortamda karbonun ancak tanık kadar mineralizasyona uğradığı anlaşılmaktadır.

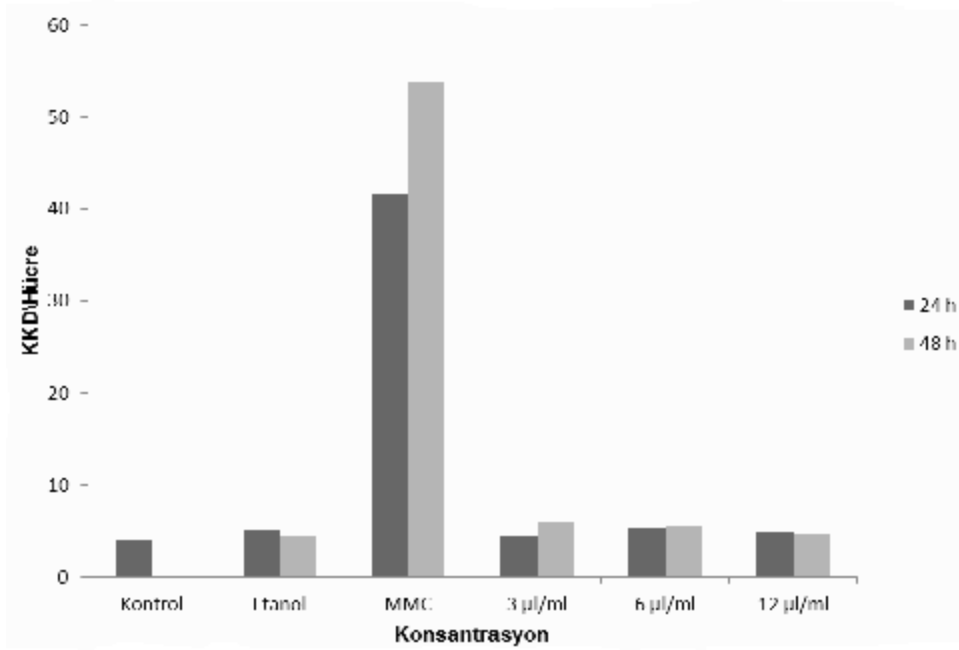
#### **4.2. Metabolik Aktivatör Yokluğunda (S9mix) *Laurus nobilis* (Ln) Yaprak Ekstraktının KKD Üzerindeki Etkisi**

*Laurus nobilis* yaprak ekstraktının 3 farklı konsantrasyonu (3.0 , 6.0 ve 12.0 µL/mL) ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde saptanan ortalama kardeş kromatid sayısı (KKD/Hücre) çizelge 4.3'te görülmektedir. Her iki kontrol ile karşılaştırıldığında; *Laurus nobilis* (Ln) yaprak ekstraktı insan lenfositlerinde KKD sayısını 24 saatlik muamele süresinde sadece 2.dozda arttırmasına rağmen 48 saatlik muamelede tüm dozlarda arttırmamıştır (Çizelge 4.3. ve Şekil 4.4). Hatta Ln 48 saatlik muamelede ortalama KKD sayısını doza bağlı olarak azaltmış (Şekil 4.5) ve bu etki istatistiksel bakımdan anlamlı bulunmuştur ( $r=0.993$ ,  $P\leq 0.05$ ).

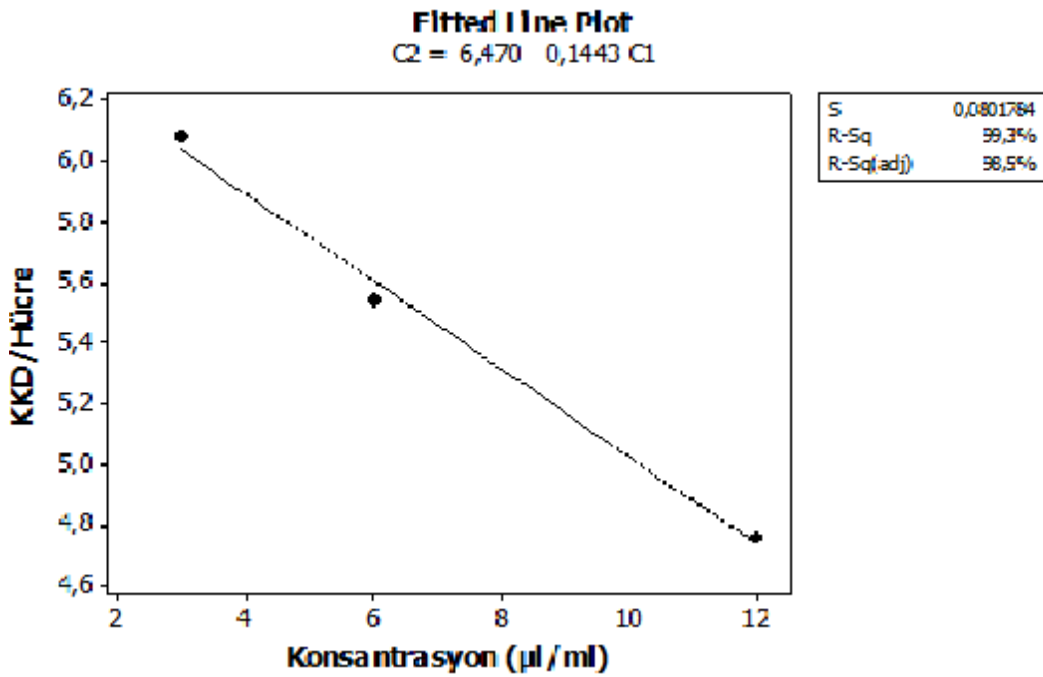
Çizelge 4.3. S9mix yokluğunda değişik dozlarda Ln yaprak ekstraktı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde ortalama kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısı

Test maddesi	Süre (saat)	Konsantrasyon $\mu\text{l/ml}$	Min-Max KKD	KKD/Hücre $\pm$ SE
Kontrol	-	-	1-9	4.1 $\pm$ 0.06
Etanol	24	10	1-26	5.02 $\pm$ 0.30
MMC	24	10	14-72	41.72 $\pm$ 8.24
Ln.	24	3	1-15	4.52 $\pm$ 0.40
“	24	6	2-11	5.30 $\pm$ 0.02 a2b1
“	24	12	2-12	4.94 $\pm$ 0.50
Etanol	48	10	2-10	4.46 $\pm$ 0.06
MMC	48	10	28-81	53.92 $\pm$ 1.58
Ln.	48	3	1-11	6.08 $\pm$ 0.80
“	48	6	2-18	5.54 $\pm$ 0.46
“	48	12	1-11	4.76 $\pm$ 0.76

a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; b: Çözücü kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; 1:  $P \leq 0.05$ ; 2:  $P \leq 0.01$ ; 3:  $P \leq 0.001$



Şekil 4.3. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Ln yaprak ekstraktı ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde KKD/Hücre



Şekil 4.4. S9mix yokluğunda farklı dozlarda Ln yaprak ekstraktı ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde ortalama KKD sayısının doza etki ilişkisi

Hollman ve ark. (1996) bitkilerden elde edilen flavonoidlerin anti-inflamatuar etkileri yanında anti-mutajenik ve hatta anti-allerjik özelliklerinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Fakat bazı bitkilerin uçucu yağlarının da insanlarda bazı istenmeyen etkilere ve hatta ölümlere yol açabilecek kadar zehirli maddeler içerebildikleri de bildirilmiştir (Qu ve ark, 1992; Chiang ve ark, 1997; Şarer, 1991; Leal-Cardoso ve Fonteles, 1999).

Bu çalışmadan elde edilen sonuçları destekleyen ve monoterpenlerin genotoksik olmadığını hatta anti-genotoksik etkiye sahip olduklarını gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır.

Gomes-Carneiro ve ark. (1998), monoterpenoid bileşikler olan (+/-) camphor, citral, citronellal, 1,8 cineole ve (-) menthol'un *Salmonella typhimurium*'un TA97, TA98, TA100ve TA102 suşlarında, S9 mix varlığında ve yokluğunda mutajenik olmadığını; fakat, bir monoterpen olan terpineolun TA102 suşunda S9 mix varlığında ve yokluğunda his+ revertant sayısını konsantrasyona bağlı olarak arttırdığını bildirmişlerdir. Aynı çalışma grubu,  $\beta$ -myrcene,  $\alpha$ -terpinene ve (+/-)- $\alpha$ -pinene monoterpenlerinin de Ames testinde mutajenik olmadığını bulmuşlardır (Gomes-Carneiro ve ark, 2005). Linalool monoterpeni, bakteriyel reverse mutasyon testine göre, *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100, ve *Escherichia coli* WP2uvrA suşlarında ne mutajenik ne de antimutajenik etkiler göstermiştir (Di Sotto ve ark., 2008). Linalool, *Salmonella typhimurium*'un TA92, TA94, TA98, TA100, TA1535, TA1537 ve TA1538 suşlarında S9 metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda mutajenik bulunmamıştır (Eder ve ark, 1980, 1982a, 1982b, Heck ve ark, 1989, Ishidate ve ark., 1984, Lutz ve ark., 1980).

Görüldüğü gibi, monoterpenoid bileşikler Ames testinde genellikle negatif sonuçlar vermiştir, yani bu maddeler genellikle mutajenik bulunmamıştır. Fakat, Uluslararası Toksikoloji Programı (NTP, 1990), bir monoterpen olan d-carvone üzerinde yaptıkları çalışmada *Salmonella typhimurium*'da mutajenik etkiye sahip olmadığını ancak kardeş kromatid değişimine ve kromozomal aberasyonlara neden olduğunu bildirmişlerdir.

Kauderer ve ark. (1991) tarafından,  $\beta$ -myrcene monoterpeninin metabolik aktivator varlığında ve yokluğunda kültüre alınmış insan lenfositlerinde 1.000  $\mu$ g/ml

konsantrasyona kadar KA ve KKD frekansını arttırmadığı bildirilmiştir. Benzer şekilde Murthy ve ark. (1991) tarafından, 10 mM konsantrasyondaki mentholün metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda insan lenfositlerinde KA ve KKD frekansını kontrollere göre istatistiksel olarak attırmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda KKD frekansı bakımından elde edilen sonuçları bu araştırmacıların elde ettiği sonuçlar desteklemektedir.



## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma sonuçlarına göre, toprak karbonu ve yarısı kadar eklenmiş *Laurus nobilis*'in toprak mikroorganizmalarının bu bitkinin yapraklarını 1.8-Cineol'e göre çok daha kolay bir şekilde karbon kaynağı olarak kullandığı söylenebilir.

Bu bitkinin yaprak özütlerinin insan sağlığına yararlı bileşikler içerdiği önceki çalışmalardan anlaşılmaktadır. Fakat yaprak ekstraktının mutajen maddelerle beraber kullanıldığında ortaya çıkacak etkileri bilinmemektedir. Bu yüzden bu bitkinin yaprak ekstraktlarının genotoksisite ve antigenotoksisite testlerinin yapılması bu türün alternatif tıpta yeni bir tedavi seçeneği olup olmayacağını belirlemesi açısından faydalı olacağı bir gerçektir.

Bu çalışmada *Laurus nobilis* L. yaprak ekstraktı insan periferik lenfositlerinde genotoksik etki göstermezken ortalama KKD sayısını azaltarak koruyucu etkiye sahip olduğu izlenimini vermektedir. Fakat KKD testi sadece indikatör test olduğundan Ln yaprak ekstraktının genotoksik veya anti-genotoksik etkisinin olup olmadığının kromozom anormalliği ve mikronukleus testleri gibi diğer genotoksisite testleri ile denemesi ve ona göre karar verilmesi uygun olacaktır.

Bunun dışında yaprakların içerdikleri bileşenlerin (özellikle terpenlerin), farklı dozlarının topraktan izole edilen bakteriler ve hatta mikoriza türlerine etkilerinin araştırılmasıyla elde edilecek bilgiler karbon mineralizasyonu konusunda biraz daha geniş perspektif sağlayarak ekosistemlere farklı yaklaşımlar getirebilir.



## KAYNAKLAR

- ALBERTINI, R.J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G.R., HAGMAR, L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A.T., NORPPA, H., SHUKER, D.E., TICE, R., WATERS, M.D. and AITIO, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. 463(2), 111-72.
- AL-KALALDEH, J.Z., ABU-DAHAB, R. and AFİFİ, F.U., 2010. Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare* and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. Nutrition Research, 30(4), 271-278.
- ALLISON, L.E. and MOODIE, C.D., 1965. Carbonate. In: C.A. Black et al (ed.) Methods of Soil Analysis, Part 2. Agronomy., Am. Soc. Of Agron., Inc., Madison, Wisconsin, U.S.A., 9, 1379-1400.
- ANDERSON, D., 1988. Human Biomonitoring. Mutation Res., 204, 353-541.
- AYDIN, S., BAŞARAN, A.A., BAŞARAN, N., 2005. The Effects of Thyme Volatiles on the Induction of DNA Damage by the Heterocyclic Amine IQ and Mitomycin C, *Mutat Res.*, 581, 43-53,
- BAILEY, L.H., 1963. The Standard Cyclopaedia of Horticulture. Vol II. The Macmillan Company, New York, pp. 182–7.
- BALDOCK, J.A., NELSON, P.N., 2000. Handbook of soil science. CRC, Boca Raton, FL, USA. B25-B84.
- BLOEM J., BENEDETTI A., HOPKINS D.W., 2005. Microbiological Methods for Assessing Soil Quality. CABI, Wallingford, UK, sf. 23-49.
- BOUYOUCOS, G.S., 1951. A Recalibration of the Hydrometer for Mohing Mechanical Analysis of Soil. Agron.Jour., 43:434-438.
- BROOKES, P.C., 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. Biol. Fertile. Soils, 19 (4), 269- 279.
- CARRANO, A.V., THOMPSON, L.H., LINDI, P.A., MINKLER, J.L., 1978. Sister Chromatid Exchanges As An Indicator Of Mutagenesis. Nature, 271, 551-553.

- CARRANO, A.V., NATARAJAN, A.T., 1988. Consideration for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques. *Mutation Res.*, 204: 379-406.
- CHENG, M., CONNER, M.K. and ALARIA, Y., 1981. Potency of Some Carbamates as Multiple Tissue Sister Chromatid Exchanges in Bloom's Syndrome Lymphocytes. *Cancer Res.*, 71: 4508-4512.
- CHIANG, T.A., WU, P.F., WANG, L.F., LEE, H., LEE, C.H., and KO, Y.C., 1997. Mutagenicity and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Content of Fumes from Heated Cooking Oils Produced in Taiwan. *Mutation Res.*, 381(2): 157-161.
- ÇELİK, E., ÇELİK, G.Y., 2007. Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5: 1-6.
- DARICI, C., ve AKA, H., 2003. Carbon and nitrogen mineralization in carob soils with Kermes oak and Aleppo pine leaf litter. *European Journal of Soil Biology*, 41, 31-38.
- DARICI, C., ve AKA, H., 2005. Doğu Akdeniz Bölgesinde İki Farklı Ana Materyalde Yetişen *Olea europaea* L., *Pinus brutia* Ten., ve *Pistacia terebinthus* L., Topraklarında Karbon mineralizasyonu. *Ekoloji Dergisi* 14, 54, 20-24.
- DEMİRALAY, İ., 1993. Toprak Fiziksel Analizleri. Atatürk Ün. Ziraat Fak. Yayınları No: 143, Erzurum, 78-89.
- DI SOTTO, A., EVANDRI, A. G., MAZZANTI, G., 2008. Antimutagenic and Mutagenic Activities of Some Terpenes in the Bacterial Reverse Mutation Assay, *Mutat. Res.*, 653: 130-3.
- DI SOTTO, A., MAZZANTI, G., CARBONE, F., HRELIA, P., and MAFFEI F. 2010. Genotoxicity of lavender oil, linalyl acetate, and linalool on human lymphocytes in vitro. *Envir. Mol. Mutagen.*, 52(1),69-71
- DOMSCH, K.H., 1962. Bodenatmung: Sammelbericht über Methoden und Ergebnisse. *Zbl. Bakt. Abt. 11*, 116, 33-78.
- DUCHAUFOR, P., 1970. *Precis de Pedologie*. Paris: Masson et Cie.

- EDER, E., NEUDECKER, T., LUTZ, D., HENSCHLER, D., 1980. Mutagenic Potential of Allyl and Allylic Compounds: Structure–Activity Relationship as Determined by Alkylating and Direct In-Vitro Mutagenic Properties, *Biochemical Pharmacology*, 29, 993–8.
- EDER, E., HENSCHLER, D., NEUDECKER, T., 1982a. Mutagenic Properties of Allylic And a,b- Unsaturated Compounds: Considerations of Alkylating Mechanisms, *Xenobiotica*, 12, 831–48.
- EDER, E., NEUDECKER, T., LUTZ, D., HENSCHLER, D., 1982b. Correlation of Alkylating and Mutagenic Activities of Allyl and Allylic Compounds: Standard Alkylation Test vs Kinetic Investigation, *Chemico-Biological Interactions*, 38, 303–15.
- ELMASTAS, M., GULCİN, I. , İSİLDAK, O., KUFREVİOĞLU, O. I., İBAOĞLU, K. ABOUL-ENEİN, H. Y., 2006 Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*.3:3-258-266.
- ERTÜRK, Ö., 2006. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia (Bratisl)*, 61,3, 275-278.
- FENECH, M., 2002. Biomarkers of Genetic Damage for Cancer Epidemiology. *Toxicology*, 181, 411-416.
- GOMES-CARNEIRO, M.R., FELZENSZWALB, I., PAUMGARTTEN, F.J., 1998. Mutagenicity testing (+/-)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-) menthol and terpineol with the *Salmonella*/microsome assay. *Mutation Research*, 416, 129–136.
- GOMES-CARNEIRO, M.R., VIANA, M.E.S., FELZENSZWALB, I., PAUMGARTTEN, F.J.R., 2005. Evaluation of  $\beta$ -Myrcene,  $\alpha$ -Terpinene and (+)- and (-)- $\alpha$ -Pinene in the *Salmonella*/microsome Assay, *Food Chem Toxicol*, 43, 247-252.
- GÜRBÜZ, I., ÜSTÜN, O., YEŞİLADA, E., SEZİK, E., AKYÜREK, N., 2002. In vivo gastroprotective effects of five Turkish folk remedies against ethanol-induced lesions. *J. Ethnopharmacol.*, 83, 241-244.

- HAGMAR, L., BROGGER, A., HANSTEEN, I.L., HEIM, S., HÖGSTEDT, B., KNUDAEN, L., LAMBERT, B., LINNAINMAA, K., MITELMAN, F., NORDENSON, I., REUTERWALL, C., SALOMAA, S., SKERFVING, S., SORSA, M., 1994. Cancer Risk in Human Predicted by Increased Levels of Chromosomal aberrations in Lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. *Cancer Res.*, 54, 2919-2922.
- HASSIOTIS, C.N., DINA, E.I., 2011. The effects of laurel (*Laurus nobilis* L.) on development of two mycorrhizal fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65,4, 628-634.
- HECK, J.D., VOLLMUTH, T.A., CIFONE, M.A., JAGANNATH, D.R., MYHR, B., CURREN, R.D., 1989. An Evaluation of Food Flavoring Ingredients in a Genetic Toxicity Screening Battery, *The Toxicologist*, 9, 257.
- HEDDLE, J.A., CIMINO, M.C., HAYASHI, M., ROMAGNA, F., SHELBY, M.D., TUCKER, J.D., VANPARYS, P., Mac GREGOR, J.T., 1991. Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. *Environ. and Mol. Mutagen.*, 18, 277-291.
- HELLEDAY, T., 2003. Pathways for Mitotic Homologous Recombination in Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 532: 103-115.
- HOLLMAN, P.C.H., HERTOOG, M.G.L., and KATAN, M.B., 1996. Analysis and Health Effects of Flavonoids. *Food. Chem.*, 57: 43-46.
- HUANG, Q., HUANG, P.M., VIOLANTE A., 2008. Soil Mineral-Microbe-Organic Interactions: Theories and Applications. Springer-Verlag, Berlin, sf 203-205.
- ISHIDATE, M., SOFUNI, T., YOSHIKAWA, K., HAYASHI, M., NOHMI, T., SAWADA, M., MATSUOKA, A., 1984. Primary Mutagenicity Screening of Food Additives Currently Used in Japan, *Food Chem Toxicol.*, 22, 623-36
- JACKSON, M.L., 1958. *Soil Chemical Analysis*. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, U.S.A., p: 1-498.
- JAGGI, W., 1976. Die Bestimmung der CO<sub>2</sub> -Bildung als Mass der bodenbiologischen Aktivität. *Schweizer Landwirtschaftliche Forschung* 15, pp. 371–380.

- JAIN, S., SHRIVASTAVA, S., NAYAK, S., SUMBHATE, S., 2007. PHCOG MAG: Plant Review, Recent Trends in *Curcuma longa* Linn. Pharmacognosy Reviews, 1, 119-128.
- KAILEH, M., BERGHE, W.V., BOONE, E., ESSAWI, T., HAEGEMAN, G., 2007. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. . J Ethnopharmacol., 113: 510-516.
- KANAYA, N., TAKEHISA, S., NICOLOFF, H., NIKOLOVA. T., DAMIANOVA, V., 1992. Plant extracts induce chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells and human lymphocytes. Mutation Research Letters, 281, 1, 47-54
- KAUDERER, B., ZAMITH, H., PAUMGARTTEN, F.J.R., SPEIT, G., 1991. Evaluation of the Mutagenicity of Beta-Myrcene in Mammalian Cells in vitro, Environ Mol Mutagen., 18(1), 28-34.
- KORN, J.S., 1994. Spatial Patterns of Soil Organic Carbon in the United States. Soil Sci. Soc. Am. J. 58, 325-331.
- LEAL-CARDOSO, J.H. and FONTELES, M.C.1999. Pharmacological Effects of Essential Oils of Plants of the Northeast of Brazil. An Acad. Bras. Cienc., 71(2): 207-213.
- LUTZ, D., NEUDECKER, T., EDER, E., 1980. Mutagenic Effects of Allylic Alcohols and Their Corresponding Aldehydes, Archives of Pharmacology, 311 (suppl), R25.
- METEOROLOJİ BÜLTENİ, 1974. Ortalama ve Ekstrem Kıymetler. Meteoroloji Müdürlüğü Yayını, Ankara.
- MUNSELL COLOR, 1975. Munsell Soil Color Charts. Macbeth Division of Kollmorgen Corporation, 2441 North Calvert Street, Baltimore, Maryland-21218.4
- MURTHY, P. B., AHMED M. M., REGU, K., 1991. Lack of genotoxicity of menthol in chromosome aberration and sister chromatid exchange assays using human lymphocytes in vitro. Toxicology in Vitro, 5: 337–340.

- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1990 NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of d-Carvone (CAS no. 2244-16-8) in B6C3F1 Mice (Gavage Studies), National Toxicology Program Tech Rep Ser., Mar, 378, 1-191.
- NORPPA, H., BONASSI, S., HANSTEEN, I.L., HAGMAR, L., STRÖMBERG, U., RÖSSNER, P., BOFFETTA, P., LINDHOLM, C., GUNDY, S., LAZUTKA, J., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., FABIÁNOVÁ, E., ŠRÁM, R.J., KUNUDSEN, L.E., BARALE, R. and FUCIC, A., 2006. Chromosomal Aberrations and SCE as Biomarkers of Cancer Risk. *Mutation Res.*, 600: 37-45.
- ORCHARD, V.A., COOK, F.J. 1983. Relationship between soil respiration and soil moisture. *Soil Biology and Biochemistry*, 15, 447-453.
- ÖZBEK, H., DİNÇ, U., ve KAPUR, S., 1974. Çukurova Üniversitesi Yerleşim Sahası Topraklarının Detaylı Etüd ve Haritası. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları: 73, sf: 17-32
- ÖZGÜVEN, M., SEKİN, S., GÜRBÜZ, B., ŞEKEROĞLU, N., AYANOĞLU, F., EKREN, S., 2005. Tütün, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretimi ve Ticareti. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi. 3-7 Ocak 2005, Milli Kütüphane Konferans Salonu, ANKARA. Bildiri Kitabı, 1, 481-501.
- PERRY, P., EVANS, H.J., 1975. Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure By Sister Chromatid Exchange. *Nature*, 258, 121-125.
- PRATES, H.T., SANTOS, J.P., WAQUIL, J.M., FABRIS, J.D., OLIVEIRA, A.B., FOSTER, J.E., 1998. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*, 34, 243-249.
- QU, Y.H., XU, G.X., ZHOU, J.Z., CHEN, T.D., ZHU, L.F., SHIELDS, P.G., WANG, H.W. and GAO, Y.T., 1992. Genotoxicity of Heated Cooking Oil Vapors. *Mutation Res.*, 298(2): 105-111.

- RENCÜZOGULLARI, E. and TOPAKTAS, M., 1991. The Relationship between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood with Determination of the Best Differential Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium-B. *Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5(3): 19-24.
- ROVIRA, P., VALLEJO V.R., 1997. Organic carbon and nitrogen mineralization under Mediterranean climatic conditions: The effects of incubation depth. *Soil Biology and Biochemistry*, 29, 1509-1520.
- ROZMAN, V., KALINOVIC, I., KORUNIC, Z., 2007. Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 43, 4, 349-355.
- SANGUN, M.K., AYDIN, E., TİMUR, M., KARADENİZ, H., ÇALIŞKAN, M., 2007. Comparison of chemical composition of the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves and fruits from different regions of Hatay, Turkey. *Journal Of Environmental Biology*, 28, 4, 731-733.
- SCHAEFER, R., 1967. Caracteres et evolution des Activites Microbiennes Dans Une Chaine de Sols Hidromorphes Mesotrophiques de la Plaine d'Alsace, *Revue d'Ecologie et de Biologie du sol (IV)* 4, 567-592.
- SONG, M., JIANG, J., CAO., G, XU, X., 2010. Effects of temperature, glucose and inorganic nitrogen inputs on carbon mineralization in a Tibetan alpine meadow soil. *European Journal of Soil Biology*. 46, 6:375-380
- SONODA, E., SASAKI, M.S., MORRISON, C., YAMAGUCHI-IWAI, Y., TAKATA, M., TAKEDA, S., 1999. Sister Chromatid Exchanges Are Mediated by Homologous Recombination in Vertebrate Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 19: 5166-5169.
- ŞARER, E. 1991. Uçucu Yağların Biyolojik Etkileri ve Tedavide Kullanımları, 9. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler Kitapçığı, Eskişehir.
- TAN, Z., LAL, R., OWENS, L., IZAURRALDE, R.C., 2007. Distribution of light and heavy fractions of soil organic carbon as related to land use and tillage practice. *Soil Till. Res.* 92, 53–59.

- TANAKA, R., SAKANO, Y., SHIMIZU, K., SHIBUYA, M., EBIZUKA, Y.,  
GODA, Y., 2006. Constituents of *Laurus nobilis* L. inhibit recombinant human lanosterol synthase. *J. Nat. Med.*, 60, 78-8.1
- TIWARI, S.C., TIWARI, B.K., MISHRA, R., 1989. Microbial Community Enzyme activity and CO<sub>2</sub> evaluation in Pineapple Orchard Soil. *Tropical Ecology* 30:2, 265-273.
- TOPAKTAS, M. and SPEIT, G., 1990. Sister Chromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite ve Kanserojenitenin Belirlenmesinde Kullanılması. *Ç.Ü. Sağlık Bil. Der.*, 5, 73-84.
- TUCKER, J.D., AULETTA, A., CIMINO, M.C., DEARFIELD, K.L., JACOBSON-KRAM, D., TICE, R.R., CARRANO, A.V., 1993. Sister-Chromatid Exchange: Second Report of the Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 297: 101-180.
- VOKOU, D., MARGARIS, N. S., and LYNCH, J. M., 1984. Effects of volatile oils from aromatic shrubson soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 5:509–513.
- VOKOU D., MARGARIS, N.S., 1988. Decomposition of terpenes by soil microorganisms. *Pedobiologia* 31:413–419.
- VOKOU D., CHALKOS D., YANGOU M., KARAMANLİDOU G., 2002. Activation of soil respiration and shift of the microbial population balance in soil as a response to *Lavandula stoechas* essential oil. *J. Chem. Ecol.* 28(4), 755-68
- VON LUTZOW, M., KOGEL-KNABNER, I., EKSCHMITT, K., FLESSA, H., GUGGENBERGER, G. MATZNER E. and MARSCHNER, B., 2007. SOM fractionation methods: Relevance to functional pools and to stabilization mechanisms. *Soil Biology & Biochemistry*, 39, 2183–2207.
- WALTER, H., et LIETH, 1960. Klimadiagramm- Weltatlas. Fischer, Jena.
- WANG, X., LI, X., HU, Y., LU, J., SUN, J., LI, Z., HE, H., 2010. Potential Carbon Mineralization of Permafrost Peatlands in Great Hing'an Mountains, China. *WETLANDS*. 30, 4, 747-756

ZAITOUN, S.T., 2007. The effect of different Mediterranean plant extracts on the development of the great wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) and their toxicity to worker honeybees *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) under laboratory conditions. Food, Agriculture & Environment, 5, 2, 289-294.



## **ÖZGEÇMİŞ**

24.06.1986'da Bursa'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 2004 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'ne girip 2008 yılında mezun oldu ve aynı yıl Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisansa başladı. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başlamıştır.