

Çamaşır suyu ve bulaşık deterjanının *Lepistes (Poecillia reticulata Peters, 1859)* balıkları üzerindeki genotoksik etkilerinin mikronükleus testi kullanılarak araştırılması

Pınar ARSLAN^{1*}, Mehmet Ali DALGIÇ¹, Sedanur SARIÇAKMAK¹, Necla SARIGİL¹, Şeyma ÜLKER¹ ve Burcu KOÇAK MEMMİ²

¹Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi, Teknikokullar, Ankara 06500

²Hacettepe Üniversitesi, İnsektisit Test Laboratuvarı, Beytepe, Ankara

*Sorumlu yazar e mail: pinarslan89@gmail.com

Özet

*Bu çalışmada sucul ekosisteme evsel, endüstriyel ve genel amaçlı kullanım sonucunda kirletici olarak karışan temizlik malzemelerinden bulaşık deterjanı ve çamaşır suyunun standard test organizması *Lepistes (Poecillia reticulata Peters, 1859)* balıkları üzerindeki muhtemel genotoksik etkileri balık eritrositi mikronükleus testi kullanılarak araştırılmıştır. 15 µl/L konsantrasyonundaki bulaşık deterjanı ve çamaşır suyuna 96 saat süresince maruz bırakılan *Poecillia reticulata*'nın kan örnekleri 96. saatin sonunda alınmıştır. 96 saat süreyle maruz kalan balıkların mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlikleri değerlerinde kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir.*

Anahtar kelimeler: *Poecillia reticulata*, çamaşır suyu, mikronükleus, morfolojik nükleus düzensizlikleri, genotoksisite

Investigation of the genotoxic effects of chlorine bleach and dishwashing detergent on Guppy (*Poecillia reticulata Peters, 1859*) by using the micronucleus test

Abstract

*In this study, the potential genotoxic effects of dishwashing detergent and chlorine bleach, which pollute aquatic ecosystems due to domestic, industrial and general uses were investigated on the standard test organism Guppy (*Poecillia reticulata Peters, 1859*) by using the fish erythrocyte micronucleus test. The fish were exposed to dishwashing detergent and chlorine bleach at 15 µl/L concentration for 96 hours and blood samples were taken after 96 hours from *Poecillia reticulata*. Micronuclei and nucleus morphological irregularities were compared to control group and an increase was observed in the fish exposed to household cleaning agents for 96 hours.*

Key words: *Poecillia reticulata*, bleach, Mikronucleus, nucleus morphological irregularities, genotoxicity

Giriş

Sucul ekosistemlerinin kirlenmesine yol açan etkenlerden bir grup evsel atıklardır (Kışlalıoğlu & Berkes, 1990). Temizlik amacıyla kullanılan bulaşık deterjanı ve çamaşır suyu bu evsel atıklardandır.

Çamaşır suyu, kimyasal adı sodyum hipoklorit olan, temizlik ve hijyen amacıyla kullanılan kimyasal maddedir. Kimyasal özelliklerinden dolayı öldürücü, zehirleyici, yaralayıcı, tahriş edici ve aynı zamanda yangın çıkartıcı, insanlara, bitki ve metallerle etkisi olan bir maddedir. Çamaşır suyu alkali bir koroziv maddedir. Koroziv maddelerle olan zehirlenmeler son yıllarda bu maddelerin özellikle ev ve iş yerlerinde günlük kullanıma daha fazla girmesi ile artış göstermiştir. Bununla birlikte ailelerin eğitimsiz olması ve dikkatsiz davranmaları da bu zehirlenmeleri arttıran diğer bir faktör olarak düşünülmektedir (Çam & diğ., 2003).

Çamaşır suyu (sodyum hipoklorit) tekstilde kumaşları renksizleştirme özelliği ve geniş antimikrobiyal etkiye sahip olduğu için sağlık alanında antisepsi, yüzey ve aletlerin dezenfeksiyonu işlevlerinde de kullanılmaktadır. İçeriğinde bulunan klor, kanalizasyon atık suları ve içme sularının dezenfeksiyonunda kullanılmasıyla da halk sağlığı açısından önem kazanmıştır. 1854 yılında Londra'da lağım sularının dezenfeksiyonunda hipoklorit kullanılmıştır. Klor ile suların dezenfeksiyonu ise ilk kez 1902 yılında Belçika'nın küçük bir kenti olan Middekerk'de yapılmıştır. Daha sonraki yıllarda kullanımı, başta A.B.D. olmak üzere, dünyanın çeşitli yerlerine yayılmıştır (Rutala ve diğ., 1997).

Sodyum hipoklorit'in (NaOCl) toz, granül ve sıvı olmak üzere üç şekli bulunmaktadır. Sıvı sodyum hipoklorit belli miktarlarda alınarak bilinen çamaşır suyu elde edilir. Sodyum hipokloritin en önemli maddesi klordur. Klor suda eridiğinde küçük bir kısmı suyun kirliliği ile tükenir (tükenen klor = chlorine demand), geri kalan kısmına serbest klor (mevcut total artık klor = total residual available chlorine) adı verilir. Mevcut artık klorun elementer klor (Cl_2), hipoklorik asit (HOCl) ve hipoklor iyonları (OCl) olmak üzere üç şekli bulunur. Her üç şeklin de suda oluşması için suda amonyak veya diğer nitrojenli bileşiklerin olmaması gerekir. Amonyak veya diğer nitrojenli bileşiklerin bulunması durumunda klor bunlarla bileşerek kloramin veya N-klor bileşikleri oluşturur. Klorun oluşturduğu bu son bileşiklere

kombine mevcut klor (combined available chlorine) adı verilir. Klor elektronlara karşı afinitesinden dolayı çok güçlü bir okside edici ajandır, suda bulunan demir iyonları (Fe^{++}), manganez iyonları (Mn^{++}), nitritler (NO_2^-) ve hidrojen sulfid (H_2S) gibi inorganik maddeler ve ayrıca organik maddelerle birleştiğinde redüklenir ve kloride dönüşerek dezenfektan özelliğini kaybeder.

Çamaşır suyunun etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir, ancak yapılan deneyler sonucu elde edilen bilgiler ışığında bazı görüşler ileri sürülmüştür:

1. Klor hücre membranındaki proteinler ile birleşerek N-klor bileşikleri oluşturur ve bu son ürün hücre metabolizmasını bozarak hücrenin ölümüne neden olur.
 2. Klor hücre membranına etki ederek hücre içindeki maddelerin dışarıya sızmasına ve hücrenin ölümüne neden olur.
 3. Klor hücre içinde anahtar rolü oynayan enzimleri etkileyerek hücrenin ölümüne neden olur.
- Bu son görüş diğerlerine göre daha geçerlilik kazanmış, bunun nedeni olarak klorun hızlı antimikrobiyal etkisi gösterilmiştir (Rutala ve diğ., 1997, Dychdala ve diğ., 1991).

Bulaşık deterjanı uygun şekillerde kullanıldığında bulaşıkların temizlenmesinde dolayısıyla da gıda hijyeninde önemlidir. Ayrıca biyolojik pestisit olarak da kullanılabilir. Bunun için; tütün bitkisinin (*Nicotina tabacum*); 1 çay kaşığı kurutulmuş yaprak tozu ile bir çay kaşığı bulaşık deterjanı yaklaşık 3,5 litre su ile karıştırılmalı ve bu karışım bir sprey yardımıyla uygulanmalıdır (Tepe, 2000).

Bu çalışmanın amacı bulaşık deterjanı ve çamaşır suyunun *Poecillia reticulata* bireyleri üzerindeki olası genotoksik etkisini mikronükleus testi ile incelemektir.

Materyal- yöntem

Laboratuvar şartları ve balıkların temini

Bu çalışma Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yapılmıştır. Deneyde kullanılan *Poecillia reticulata* bireyleri Ankara'daki yerel yetiştiricilerden temin edilmiş ve yeterince hava içeren plastik torbalarda 30 dakika içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Plastik torbalar 30-35 dakika akvaryum içerisinde tutularak iklimlendirme yapılmıştır. Daha sonra torbalar kesilerek açılmış ve balıklar akvaryum suyu içerisine bırakılmıştır. Deneylerde yaklaşık 15 L kapasiteli cam akvaryumlar

kullanılmıştır (Selvi ve diğ., 2004).

Balığın özelliği

Bu çalışmada akvaryum balığı olarak ortalama boyları $4,00 \pm 0,3$ cm, ortalama ağırlıkları $0,80 \pm 0,20$ g olan 15 adet *Lepistes (Poecillia reticulata)* kullanılmıştır. Balıklar ortama uyum sağlamaları için deneylerden 1 gün önceden akvaryumlara yerleştirilmiştir. Deneyden önce balık yemiyle beslenmeleri sağlanmış ve deney süresince balıklara yem verilmemiştir.

Su kalitesi

Deneyde dinlendirilerek kloru giderilmiş çeşme suyu kullanılmıştır. Kullanılan su parametreleri şu şekildedir: sıcaklık 25°C , pH 7,82, çözünmüş oksijen 6,1 mg/L, iletkenlik $0,209 \mu\text{S/cm}$.

Deney basamakları

Deneyde üç adet akvaryum kullanılmıştır. Balıklar deneye başlamadan 1 gün önce içinde 7 L su bulunan deney akvaryumlarına yerleştirilmiştir. Bir akvaryum kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bir akvaryuma 15 μL /L sıvı bulaşık deterjanı, bir akvaryuma 15 μL /L çamaşır suyu mikropipet kullanılarak ilave edilmiştir. Her akvaryuma rastgele seçilmiş 5'er balık konulmuştur. *Poecillia reticulata* bireyleri 96 saat boyunca kimyasala maruz bırakılmıştır. Maruziyet süresinin sonunda deney sonlandırılmış ve balıklardan, heparinize tek kullanımlık 2 cc'lik enjektör ile kalpten $0,7 \pm 0,2$ cc oranında kan örnekleri alınmıştır. Lamların üzerine damlatılan kan ince tabaka oluşturacak şekilde yayılmıştır. Hazırlanan preparatlar kurutulduktan sonra %95'lik etanol'de 20 dakika süresince fiske edilmiştir. Fiske edilen preparatlar kurutulduktan sonra %5'lik tamponlu su ile hazırlanan Giemsa boyasında 20 dakika süresince boyanmıştır. Boyama işleminden sonra preparatlar distile sudan geçirilerek fazla boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra preparatlar mikroskopta incelenmeye alınmıştır. Mikroskobik incelemelerde Carl Zeiss Primostar marka mikroskop ve mikronükleus fotoğraflarının çekiminde ise Canon EOS 1000D görüntüleme cihazı ve Axiovision 4 görüntüleme programı kullanıldı.

Mikronükleus ve Morfolojik Nükleus Düzensizliklerinin İncelenmesi

Her preparattan 1000 eritrosit hücresi sayılarak kaç tane mikronükleus ve kaç tane morfolojik nükleus anormallikleri bulunduğu saptanmıştır (Tablo 1).

Mikronükleus (MN): Mitoz hücre bölünmesi sonucunda sitoplazma içerisinde ana nükleus yanında gözlenen ikinci, bir küçük nükleus yapısıdır. Mikronükleus sayımlarında bazı kriterler söz konusudur. Bunlar;

- Mikronükleus ana nükleus ile aynı boyama tonuna sahip olmalıdır.
- Mikronükleus ana nükleus yanında bulunmalıdır.
- Bir mikronükleus ana nükleusun 1/3'ünden daha küçük olmalıdır.

Bu kriterler göz önüne alınarak mikronükleus sayımı yapılmıştır (Çavaş & Ergene Gözükara, 2005)

Morfolojik nükleus düzensizlikleri Carrasco ve arkadaşlarına göre başlıca dört grup altında toplanır:

- a) Çentikli nükleus: Nükleus zarında nükleus içerisine doğru oluşan, kromatin içermeyen girintilere sahip nükleus yapısıdır.
- b) Tomurcuklu nükleus: Nükleus zarından dışarı doğru çıkıntılar yapan, kromatin içeren küçük tomurcuklanmalara sahip nükleus yapısıdır.
- c) Loblu nükleus: Tomurcuklara oranla daha büyük ve fazla sayıda loblar içeren nükleus yapısıdır.
- d) Binükleus: Bir hücre içerisinde iki adet nükleus bulunma durumudur (Çavaş & Könen, 2010).

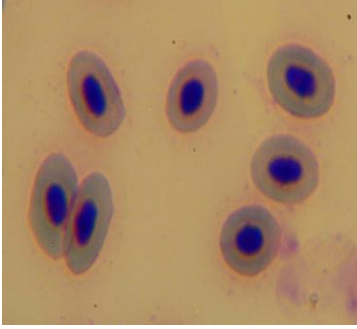
Bulgular

Mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlikleri eritrosit hücrelerinde gözlenmiştir. Mikroskopta incelenen eritrosit hücrelerinin fotoğrafları 100'lük objektifte immersiyon yağı kullanarak çekilmiştir (Şekil 1, 2, 3, 4, 5). Şekil 1'de normal eritrosit hücreleri gözlenmektedir.

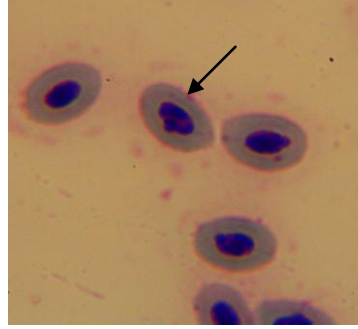
Şekil 2, 3, 4 ve 5'te okla gösterilmiş eritrosit hücreleri sırasıyla tomurcuklu nükleus, mikronükleus, binükleus ve çentikli nükleustur.

Kontrol grubundaki bireylerden elde edilen 1000 eritrosit hücresi sayımı sonuçlarına göre mikronükleus sayısı 0, toplam morfolojik nükleus düzensizlikleri (binükleus, tomurcuklu nükleus, loblu nükleus ve çentikli nükleus toplamı) sayısı 5 çıkmıştır. Bulaşık deterjanı grubundaki bireylerden elde edilen 1000 eritrosit hücresi sayımı sonuçlarına göre mikronükleus sayısı 33, toplam morfolojik nükleus düzensizlikleri sayısı 60 çıkmıştır.

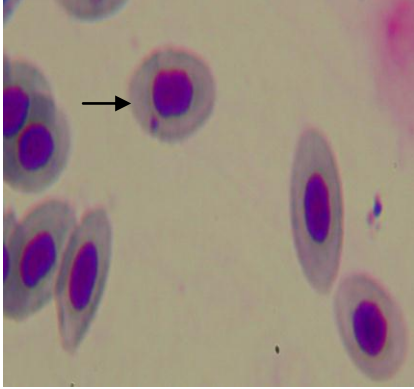
Çamaşır suyu grubundaki bireylerden elde edilen 1000 eritrosit hücresi sayımı sonuçlarına göre mikronükleus sayısı 16, toplam morfolojik nükleus düzensizlikleri sayısı 87 çıkmıştır.



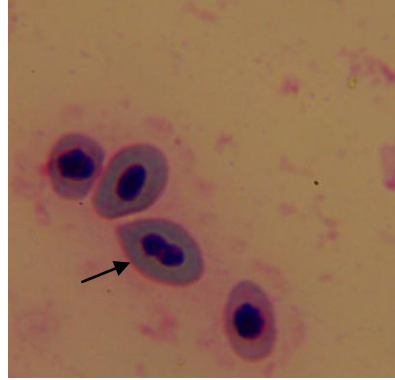
Şekil 1. Normal Eritrositler (x1000)



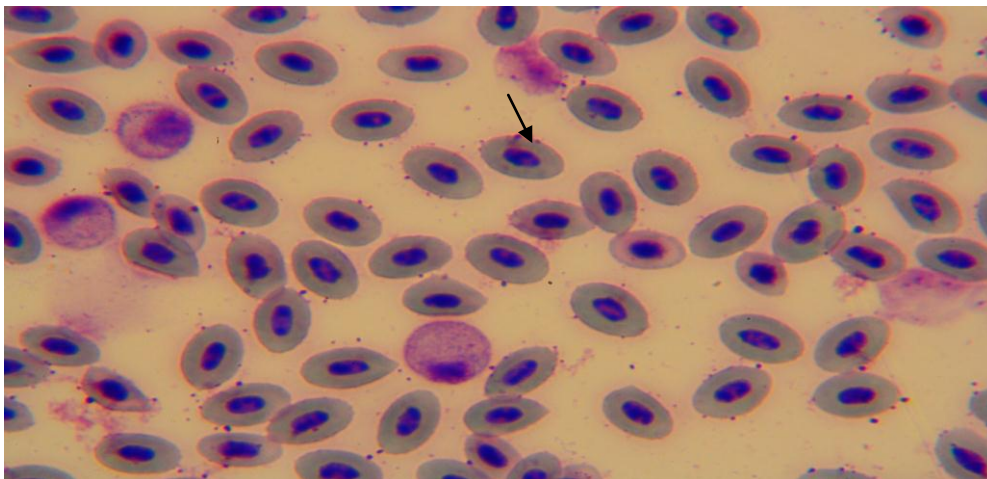
Şekil 2. Tomurcuklu Nükleus (x1000)



Şekil 3. Mikronükleus (x1000)



Şekil 4. Binükleus (x1000)



Şekil 5. Çentikli Nükleus (x400)

Tablo1. *Poecillia reticulata* 'nın mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizlikleri frekansı

Madde adı	Maruz kalma süresi		Balık sayısı	Toplam eritrosit			Tomurcuklu nükleus	Loblu nükleus	Çentikli nükleus	Toplam morfolojik nükleus düzensizlikleri
	(saat)			Mikronükleus	Binükleus					
Kontrol grubu	96	5	1000	0	2	0	0	3	5	
Bulaşık deterjanı	96	5	1000	33	39	1	2	18	60	
Çamaşır suyu	96	5	1000	16	62	5	6	14	87	

Tartışma ve Sonuç

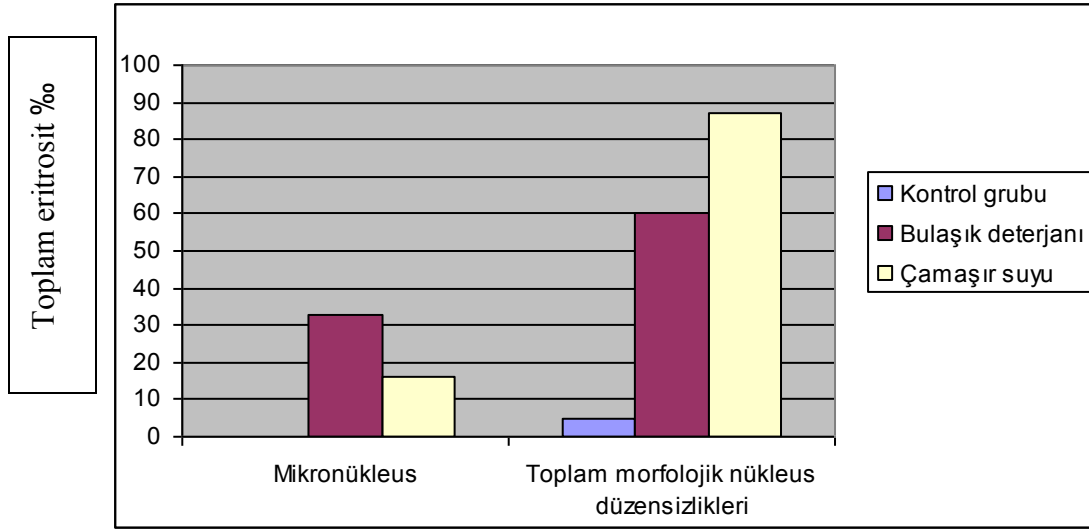
Dezenfektan olarak yaygın biçimde kullanılan çamaşır suyunun (NaOCl'in) toksisitesi üzerine çalışmalar literatürde çok az yer almaktadır. Göksu ve arkadaşları *Pinctada radiata*'daki NaOCl'in 24 saatlik akut LC₅₀ değerini 1,75 mg/L olarak belirlemiştir (Göksu, 2002). Bu sonucun sebebi; istiridyenin bu tür kimyasallara karşı savunma sistemi geliştirme kabiliyeti olabilir (Gül, 2008).

Temizlik amacıyla kullanılan bulaşık deterjanı ile ilgili çalışmalara da çok az rastlanılmaktadır. Biyolojik pestisit olarak kullanımıyla ilgili çalışma bulunmaktadır (Tepe, 2000).

Su kirliliğine sebep olan kimyasal maddelerin bir kısmının kanserojen özellik taşıması, mutajenik ve genotoksik etkiye sahip olması, kirliliğin şimdiki ve daha sonraki nesiller üzerinde yaratacağı olumsuz etkilerini düşünülmesi açısından kirliliğe sebep olan kimyasallar üzerine yapılan sitogenetik ve sitotoksikite çalışmaların önemini daha da arttırmaktadır (Gül, 2008).

Bu çalışma sonucunda 15 µl/L konsantrasyonunda çamaşır suyu ve bulaşık deterjanına maruz bırakılan *Poecillia reticulata* bireylerinde tespit edilen mikronükleus değerlerinin kontrol grubuna oranla arttığı saptanmıştır (Şekil 6). Sudaki oranın çok düşük (15 µl/L) olması bile mikronükleus ve morfolojik nükleus düzensizliklerinin artmasına yol açmıştır.

Sucul ekosistemler evsel atık içeren kirliticilerle doğrudan kirlenmemelidir. Zararlı maddeler içeren evsel atıkların belirli bir arıtma sistemiyle arıtılması sonucunda daha zararsız bir hale döndürülmesi sağlanmalı ve bunun sonucunda ortama verilmelidir.



Şekil 6. Bulaşık deterjanı ve çamaşır suyu etkisinde kalan *Poecillia reticulata*'nın kontrol grubuna göre mikronükleus ve toplam morfolojik nükleus düzensizliklerinin frekans grafiği

Teşekkür

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bize bilimsel yol gösteren Doç. Dr. Mahmut Selvi ve Doç. Dr. A. Çağlan Karasu Benli'ye teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Çam H., Kiray E., Tafşan Y., Özkan H.Ç. (2003). İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı acil servisinde izlenen zehirlenme olguları. *Türk Pediatri Arşivi* 38: 233-9.

Çavaş T., Könen S. (2010). Askorbik asitin *O. niloticus* üzerindeki antigenotoksik etkilerinin mikronükleus testi kullanılarak araştırılması. <http://20biyolojikongresi.pau.edu.tr>

Çavaş, T., Ergene Gözükara S., (2005). Micronucleus test in fish cells: A bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46, 64-70.

Dychdala G.R. (1991). Chlorine and chlorine compounds. SS Block (ed): Disinfection, sterilization, and presevation", p131, Lea & Febiger, Philadelphia.

Göksu M.Z.L., Çevik F., Fındık Ö. (2002). İnci istiridyesi *Pinctada radiata* (Leach, 1814) için öldürücü Klor konsantrasyonları, *Turk J Vet Anim Sci*, 26, 157-60.

Gül S. (2008). Kura-Aras havzasında yaygın olarak bulunan *Orthrias angorae* (Steindachner,



1897), *Orthrias panthera* (Heckel, 1843) ve *Orthrias tigris* (Heckel, 1843)'de kromozomal çalışmalar. <http://uvt.ulakbim.gov.tr>

Kışlalıoğlu M., Berkes F. (1990). Ekoloji ve çevre bilimleri. Remzi Kitapevi: İstanbul.

Rutala W.A., Weber D. (1997). Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *J Clin Microbiol Rev* 10: 597.

Selvi M., Sarıkaya R., Erkoç F. (2004). Temefosa maruz kalan *Lepistes (Poecillia reticulata)* bireylerindeki akut davranış değişimleri. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 4 , 15-19.

Tepe S. (2000). Bitki korumada doğal pestisitlerin kullanımı. http://www.batem.gov.tr/yayinlar/bilimsel_makaleler/