T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUNCA NEHRİ (EDİRNE) SU VE SEDİMENTİNİN MUTAJENİK POTANSİYELİNİN AMES TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Didar GÜZEY

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **26/06/2013**

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

ÇANAKKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

DİDAR GÜZEY tarafından **YRD. DOÇ. DR. NESLİHAN DEMİR** yönetiminde hazırlanan "**TUNCA NEHRİ (EDİRNE) SU VE SEDİMENTİNİN MUTAJENİK POTANSİYELİNİN AMES TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI"** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

Danışman

Prof. Dr. Hülya SİVAS

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

Jüri Üyesi

Sıra No :

Tez Savunma Tarihi: 26/06/2013

Doç. Dr. Zeki KARACA

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Didar GÜZEY

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca benden yardım ve katkılarını esirgemeyen ve bu tezin hazırlanmasında tüm laboratuvar desteğini sağlayan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR'e; çalışmada kullanılan test suşlarının temini ve değerli katkıları için Sayın Prof. Dr. Hülya SİVAS'a; çalışmada kullanılan cihazların temini için Sayın Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN'a; ekstraktların eldesindeki yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Mustafa YILDIZ'a; çalışma boyunca yapmış oldukları değerli katkıları için Sayın Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ, Sayın Prof. Dr. Ahmet GÖNÜZ, Sayın Arş. Gör. Dr. Nurcihan HACIOĞLU ve Sayın Arş. Gör. Dr. Tülay BİCAN SÜERDEM'e ve Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın her aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Deniz ÇAKMAK'a; laboratuvar çalışmalarımda ve tezimin yazımında büyük yardımları olan değerli Merve BALLI, Esen GEREN, Arş. Gör. Selin ERTÜRK ve Uzm. Nuray YILDIRIM'a; ayrıca katkılarından dolayı sevgili Berken AĞAOĞLU, Burak ÖZDEMİR, Arş. Gör. Nihan AKINCI, Arş. Gör. Dr. Berrak Damla YAĞAN, Arş. Gör. Aslıhan ÖZBİLEN, Fatih SEZER, ve Gülru YÜCEL'e teşekkür ederim.

Maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olup bana güç veren annem Öznur GÜZEY, babam Necdet GÜZEY ve ağabeyim Ertan GÜZEY'e sonsuz teşekkürler…

Didar GÜZEY

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
2AF	2-Aminofloren
A	Adenin bazı
C	Sitozin bazı
cm	Santimetre
dk	Dakika
DMSO	Dimetilsülfoksit
DCM	Diklorometan
DNA	Deoksiribonükleik asit
g	Gram
G	Guanin bazı
HB	Histidin/biyotin
HBA	Histidin/biyotin/ampisilin
kg	Kilogram
kob	Koloni oluşturan birim
M	Molarite
MA	Molekül ağırlığı
mg	Miligram
MGA	Minimal glikoz agar
ml	Mililitre
N	Normalite
NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth
NPD	4-Nitro-*o*-fenilendiamin
OD	Optik yoğunluk

ºC	Santigrat derece
S9	Sıçan karaciğeri mikrozomal enzimleri
SA, NaN_3	Sodyum azid
sn	Saniye
T	Timin bazı
UV	Ultraviyole
β-NADP	β-Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbon
PCB	Poliklorlu bifenil

ÖZET

TUNCA NEHRİ (EDİRNE) SU VE SEDİMENTİNİN MUTAJENİK POTANSİYELİNİN AMES TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Didar GÜZEY

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

26/06/2013, 68

Bu çalışmada, Tunca Nehri'nin su ve sedimentinin mutajenik potansiyeli kısa zamanlı mutajenite test sistemlerinden Ames testi ile araştırılmıştır. Çalışmada test edilmek üzere, 4 farklı istasyondan su ve sediment örnekleri alınmıştır. Su örneklerinden hekzan, kloroform ve diklorometan ekstraktları; sediment örneklerinden ise hekzan, kloroform, aseton (1:1:1 v:v:v) karışımı ile ekstrakt elde edilmiştir. Çalışmalarda bu ekstraktlardan hazırlanan (10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}) konsantrasyonlar kullanılmıştır. Deneyler *Salmonella typhimurium* bakterisinin TA98 ve TA100 mutant suşları ile yürütülmüştür. Ekstraktların mutajenik potansiyelleri, mikrozomal enzimler içeren S9 varlığında ve yokluğunda test edilmiştir.

Mutajenite çalışmaları sonucunda, 4. istasyondan alınan su örneklerinin kloroform ekstraktlarında hem çerçeve kayması hem de baz çifti değişimine yol açan mutajenik etki gözlenirken 2. ve 3. istasyonlardan alınan örneklerde sadece baz çifti değişimine yol açan mutajenik etki belirlenmiştir. Diklorometan ekstraktlarının 1., 2. ve 3. istasyonlardan alınan örneklerinde baz çifti değişimine yol açan mutajenik etki gözlenmiştir. Ayrıca sediment örneklerinden elde edilen ekstraktlarda S9 varlığında 3. istasyonda; S9 yokluğunda ise 3. ve 4. istasyonlarda baz çifti değişimine yol açan mutajenik etki gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Tunca Nehri, Ames testi, su, sediment, mutajenite.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF MUTAGENIC POTENTIAL OF WATER AND SEDIMENT FROM TUNCA RIVER (EDIRNE) BY THE AMES TEST

Didar GÜZEY

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Biological Science

Advisor: Assist. Prof. Dr. Neslihan DEMİR

26/06/2013, 68

In this research, the potential mutagenic effects of water and sediment of Tunca River have been investigated by using short-term mutagenicity test system named Ames. In this study for testing, hexane, chloroform and dichloromethane extracts of water and hexan, chloroform and acetone (1:1:1 v:v:v) extract of sediment have been obtained. 10^{0}, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} concentrations of extracts have been used. Experiments were carried out on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 mutant strains. Mutagenic potencies of extracts have been tested in absence and presence of S9 which contains microsomal enzymes.

As a result of the mutagenicity studies, it has been determined that chloroform extracts of water samples from station 4 have mutagenic effect which can lead to frameshift mutation and base pair substitution, and samples from stations 2 and 3 only base pair substitution have been determined. Dichloromethane extracts from stations 1, 2 and 3 mutagenic effect have been observed which can lead to base pair substitution. Also in presence of S9 at sediment samples from station 3 and in absence of S9 at stations 3 and 4 mutagenic effect which can lead base pair substitution has observed.

Keywords: Tunca River, Ames test, water, sediment, mutagenicity.

İÇERİK **Sayfa**

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU…..……ii

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI……..iii

TEŞEKKÜR……..iv

SİMGELER VE KISALTMALAR…….……..…v

ÖZET……...vii

ABSTRACT……viii

BÖLÜM 1 - GİRİŞ 1

1.1. Mutasyon 3

1.1.2. Mutasyon çeşitleri 4

1.1.2.1. Kromozom sayısı mutasyonları 4

1.1.2.2. Kromozom yapısı mutasyonları 4

1.1.2.3. Gen mutasyonları 4

1.1.2.3.1. Baz değişimi mutasyonları 5

1.1.2.3.2. Çerçeve kayması mutasyonları 5

1.2. Mutajenite Testleri 6

1.2.1. Sitogenetik yöntemler 7

1.2.2. Bakteriyel yöntemler 8

1.2.2.1. *UMU* (SOS) testi 8

1.2.2.2. SOS kromotest 8

1.2.2.3. Mutatox testi 8

1.2.2.4. Ames (*Salmonella*/mikrozom) testi 9

BÖLÜM 2 - ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 13

BÖLÜM 3 - MATERYAL VE YÖNTEM 21

3.1. Materyal 21

3.1.2. Test suşları 22

3.1.3. Kimyasal maddeler 22

3.1.4. Besiyerleri ve stok çözeltiler 23

3.2. Yöntem 29

3.2.1. Su örneklerinin ekstraksiyonu 30

3.2.2. Sediment örneklerinin ekstraksiyonu 30

3.2.3. Test suşlarının genetik özelliklerinin kontrol edilmesi 31

3.2.3.1. Histidin gereksinimi 31

3.2.3.2. *rfa* mutasyonu kontrolü 31
3.2.3.3. *uvrB* mutasyonu kontrolü 31
3.2.3.4. R faktörü kontrolü 32
3.2.4. Test suşlarının master plaklarının hazırlanması 32
3.2.5. Test suşlarının uzun süre saklanması ve stok kültürlerinin açılması 32
3.2.6. Test suşlarının gecelik kültürlerinin hazırlanması 32
3.2.7. Sıvı kültürün ml'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi 33
3.2.8. Ekstraktların sitotoksik etkilerinin belirlenmesi 33
3.2.9. Testin yapılışı 33
3.2.10. Spontan kontrol (kendiliğinden geri dönen koloni sayısı) 34
3.2.11. Sonuçların değerlendirilmesi 34
BÖLÜM 4 - ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 35
4.1. Test Suşlarının Genetik Özelliklerinin Kontrolü 35
4.1.1. Histidin gereksinimi 35
4.1.2. *rfa* mutasyonu 36
4.1.3. *uvrB* mutasyonu 37
4.1.4. R faktörü 37
4.2. Mutajenik Aktivite Sonuçları 38
BÖLÜM 5 - SONUÇ VE ÖNERİLER 57
KAYNAKLAR 58
Çizelgeler……. I
Şekiller……. II
Özgeçmiş IV

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Günümüzde nüfus artışı, endüstrileşme, yoğun tarımsal faaliyetler ve bilinçsiz tarım ilacı uygulamaları sonucunda çevre kirliliği önemli bir sorun haline gelmiştir. Bunlara ek olarak su kaynaklarının bilinçsiz kullanımı, sulama ve diğer amaçlar için baraj, gölet gibi alanlarda toplanması, suyun yerleşim alanlarının içme ve kullanma ihtiyacını sağlamak için kapalı borular içinde iletilmesi gibi suyun doğal döngüsüne yapılan müdahaleler sonucunda su kirliliği olayları ortaya çıkmaktadır.

Su kirliliği, su kaynağının kimyasal, fiziksel, bakteriyolojik ve ekolojik özelliklerinin olumsuz yönde değişmesi şeklinde gözlenen ve su kaynağını doğrudan veya dolaylı yoldan etkileyen, biyolojik kaynaklarda, insan sağlığında, su kalitesinde ve suyun diğer amaçlarla kullanılmasında bozulmalar yaratacak madde veya enerji atıklarının boşaltılmasını ifade eder (Uslu ve Türkman, 1987).

Su kirliliği, genel olarak 5 gruptan köken alır:

1. Organik madde kirliliği: Organik kirleticiler, bozunmaya karşı direnç göstermeleri nedeniyle doğada uzun süre ayrışmadan kalan, doğal veya antropojenik kökenli organik bileşiklerdir (Buccini, 2001). Bu bileşiklerin temel özelliği, sudaki çözünürlüklerinin düşük olmasına karşın, lipidler içerisinde yüksek çözünürlüğe sahip olmalarıdır. Bu durum, canlı organizmaların yağ içeren dokularında biyolojik birikime sebep olmaktadır. Besin zinciri aracılığıyla insanlara da geçen bu maddeler, anneden çocuğa aktarılmakta ve bağışıklık, sinir ve üreme sistemleri üzerinde önemli etkiler meydana getirmektedir (Acara, 2006). Örneğin polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), organik bileşiklerin eksik yanması sonucu ortaya çıkan toksik, mutajen ve kanserojen etkiye sahip, yine organik yapıda olan bileşiklerdir. Bu bileşiklerin tümör başlatıcı, geliştirici ve ilerletici özellikleri olduğu tespit edilmiştir (Alver ve ark., 2012).

Ayrıca tarımsal alanlarda sorunlara yol açan zararlılar ile mücadelede yoğun şekilde kullanılan pestisitlerin de büyük kısmı bu gruba girmektedir. Üretimin artırılmasındaki faydaları büyük olan pestisitlerin, çevre için oluşturdukları kirlilik sorunları da tartışılmazdır. Özellikle doğada kaybolmayan pestisitler, besin zincirinde canlıdan canlıya geçerek birçok canlının vücudunda birikmektedir (Göksu, 2003). Pestisitlerle kontamine olmuş nehirlerle yapılan çalışmalarda, bu pestisitlerin nehir suyunda mutajenik etkiye sebep olduğu tespit edilmiştir (Yamaguchi ve ark., 1991; Rehana ve ark., 1995).

2. İnorganik madde kirliliği: Sulara karışan evsel, endüstriyel, tarımsal atıklar ve ağır metaller inorganik madde kirliliğine neden olmaktadır.

Ağır metaller, canlılar için az miktarlarda dahi tehlike arz eden maddelerdir. Bu nedenle, canlılardaki birikimleri dikkatle izlenmeli ve araştırılmalıdır (Rainbow, 1995). Canlı vücudu için gerekli olan ağır metaller olduğu gibi, vücutta kullanılmayan ağır metaller de vardır. Fakat bu ağır metallerin tümü metalden metale ve organizmadan organizmaya değişen oranlarda toksiktirler (Haktanır ve Arcak, 1998).

3. Katı madde kirliliği: Atık sular su kaynaklarına karıştığında, beraberinde çökebilen katı maddeleri, yüzücü maddeleri ve askıda kalan maddeleri getirmektedirler. Bu maddeler, organik veya inorganik kökenli olabilir. Özellikle rafineri ve petrol endüstrilerinden kaynaklanan yüzücü kirleticiler, sucul ortama atmosferden oksijen girişini engellerler. Ayrıca yine bu kirleticilerin ışık geçirgenliğini azaltması ve dibe çöken parçacıkların dip yaşamını olumsuz şekilde etkilemesi, sucul sistemleri önemli derecede kirleten etmenlerdir (Göksu, 2003).

4. Isıl (Termal) kirlenme: Sucul ortamlarda doğal sıcaklığın değişmesi, ekolojik dengeyi bozmaktadır. Ayrıca bu ısıl kirlenme, su kalitesinin de önemli derecede değişmesine sebep olmaktadır.

Isıl kirlenmenin ana kaynağı, termal santraller ve soğutma sularını çevreye bırakan endüstrilerdir. Sucul sistemlerde ısının artması, bu alanlarda yaşayan canlıların hayatlarını tehlikeye soktuğu gibi suyun gaza doygunluk oranını değiştirerek ortamın oksijene olan doygunluk seviyesini de azaltacaktır (Göksu, 2003).

5. Radyoaktif kirlenme: Radyoaktif maddelerin çevreye yaydığı radyasyon, biyolojik parçalanmaya uğramaz ve gıda zincirinde birikirler. Çevrede çok uzun süre varlığını koruyan radyasyonun başlıca kaynakları, nükleer santraller, nükleer yakıtla çalışan sanayiler, radyoaktif maden ocakları ve nükleer kazalardır. Bu kaynaklardan çevreye yayılan radyasyon, canlıda hücresel ve işlevsel bozukluklara, üreme bozukluklarına, mutasyonlara ve kansere neden olmaktadır (Göksu, 2003).

Canlılar için ciddi sorunlar oluşturan birçok hastalığın tetikleyici sebepleri arasında en üst sıraları günlük yaşamda da sıklıkla kullandığımız kimyasallar almaktadır (Ergene, 1998). Bu bileşiklerin birçoğu, canlıların genetik materyalinde değişikliklere yol açarak genotoksik etki göstermektedir (Gesamp, 1991; Galli ve Schiestl, 1996).

Mutajen maddelerin en önemli kaynağı sanayi ve tarım aktiviteleridir. Birçok genotoksisite çalışması, endüstriyel atıkların ve atık suların özellikle de mineralden

özütlenen metallerin, petrol rafinerilerinin, küspe, kağıt ve kimya endüstrilerinin atıklarının genotoksik olduğunu kanıtlamıştır. Bu kaynaklardan gelen kimyasallar genellikle su ekosistemlerine karışırlar. Bunun dışında, seyrek olmakla birlikte doğal felaketler de su ekosistemlerine doğal kaynaklardan mutajenik madde girişine sebep olabilmektedir (Gesamp, 1991; Houk, 1992; Claxton ve ark., 1998). Bu doğal ajanlar, kimi zaman insan yapımı zirai ilaçlardan daha fazla mutajen etki yaratabilmektedir (Ames ve ark., 1987).

Mutajenler araştırılırken insanda kansere sebep olup olmadığı şüphesi doğmuş ve mutajenite ile kanserojenite arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda mutajenite ile kanserojenite arasındaki ilişkinin %90 oranında olduğu ileri sürülmüştür. Mutajenlerin, hücrede somatik mutasyonları uyararak kansere neden olması, kanserin somatik mutasyon teorisiyle de uyuşmaktadır (Griffiths ve ark., 1996).

Sucul ortamlarda özellikle organik kimyasalların sebep olduğu kirliliği saptamak, ortamda var olan organik kimyasalların karışık moleküler yapısı nedeniyle ekonomik ve pratik değildir (Kutlu ve ark., 2004).

1.1. Mutasyon

Hücrenin kalıtsal materyalinde, kendiliğinden veya çeşitli etkenlerle meydana gelen kalıcı değişikliklere mutasyon denir. Mutasyonlar, değişik şekillerde ortaya çıkabilirler. DNA replikasyonu, onarımı veya rekombinasyonu sırasında meydana gelen mutasyonlara kendiliğinden olan mutasyonlar denir. Bazı fiziksel ve kimyasal ajanların etkisiyle meydana gelen mutasyonlara ise mutajenlerin sebep olduğu mutasyonlar denilmektedir. Mutajenler, bazı mutasyon tiplerinin frekansında artışa neden olan maddelerdir. Mutajenleri, fiziksel ve kimyasal mutajenler olarak ikiye ayırabiliriz. Fiziksel mutajenlere örnek olarak sıcaklık, manyetik alan, X ve UV ışınlar; kimyasal mutajenlere ise polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), poliklorlu bifeniller (PCB'ler) ve bazı ağır metaller verilebilmektedir (Song ve ark., 2006). Mutajenler kalıtsal materyale farklı şekillerde etki edebilirler. Baz analogları, normal DNA bazlarına benzer olan ancak DNA replikasyonu sırasında yanlış çift oluşturan kimyasal mutajenler olabildiği gibi DNA'nın yapısına katılarak çift sarmal yapıyı bozan kimyasallar da vardır. Ayrıca bazı mutajenler bazların yapısını değiştirerek eşleşme özelliklerini bozabilirler (Atasoy, 2009; Campbell ve Reece, 2010).

1.1.2. Mutasyon çeşitleri

Mutasyon, tek bir baz çifti yer değişiminden, bir delesyondan ya da bir veya daha fazla baz çiftinin DNA'ya katılımından oluşabilir ya da bir kromozomun yapısında önemli bir değişimden meydana gelebilir (Klug ve ark, 2009).

Mutasyonları genel olarak üç grupta inceleyebiliriz:

1.1.2.1. Kromozom sayısı mutasyonları

Kromozom sayısı mutasyonları, bir ya da daha fazla haploid kromozom takımının ilavesinden, bir ya da daha fazla kromozom ilavesi ya da kaybına kadar çeşitlilik gösterebilmektedir. Organizmanın bir ya da birden fazla kromozom kazanması veya kaybetmesi durumu anöploidi; organizmadaki kromozom takımının sayısındaki değişmeler öploidi olarak adlandırılmaktadır (Klug ve ark., 2009).

1.1.2.2. Kromozom yapısı mutasyonları

Kromozom yapısı mutasyonları, genetik materyalin kaybı ya da yer değiştirmesine neden olan bir ya da daha fazla kromozom kırıklarından kaynaklanmaktadır. Bir kromozomun kırılması, kromozomun yapısında dört çeşit değişikliğe sebep olabilmektedir. Sentromer taşımayan bir kromozom parçasının hücre bölünmesi sırasında kaybolması delesyon olarak adlandırılmaktadır. Delesyonda hücrede genetik materyalden kayıp olduğundan bazı gen bölgeleri kaybedilebilmektedir. İnsanda kromozom delesyonu sonucu oluşmuş sendromlara örnek olarak Cri du Chat sendromu verilebilmektedir. Bir DNA parçasının kopyalanıp, her iki kopyanın da korunduğu kromozomal mutasyonlara duplikasyon adı verilmektedir. Duplikasyonda delesyonun tersine parça çoğalması durumu vardır. Dolayısıyla duplikasyonlu hücrelerde bazı genlerden fazla sayıda bulunabilmektedir. Ayrıca bir teoriye göre duplikasyonlar, yeni genlerin oluşmasında etkili ve evrimsel açıdan oldukça önemlidir. İnversiyon, bir kromozom parçasının koptuğu kromozoma ters yönde geri yapışması olayıdır. Bu durumda gen kaybı olmaz, fakat doğrusal gen sırası değiştiği için evrimsel süreçte farklılıklar oluşabilmektedir. Son olarak kırılan bir kromozom parçasının homolog olmayan bir kromozoma yapışması, translokasyon olarak adlandırılmaktadır (Klug ve ark., 2009; Campbell ve Reece, 2010).

1.1.2.3. Gen mutasyonları

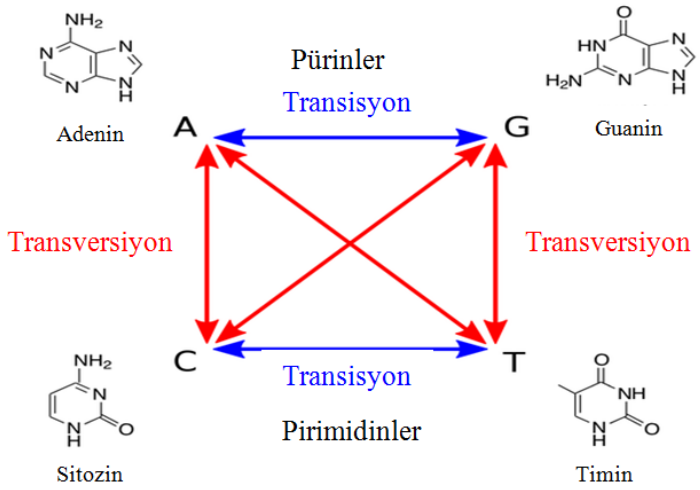
Gen mutasyonları, DNA üzerindeki bir veya birkaç bazı etkileyen küçük ölçekli mutasyonlardır. Bu tür mutasyonlar kromozom yapısında herhangi bir değişikliğe sebep

olmaz fakat meydana geldikleri bölgenin özelliklerine bağlı olarak organizmada birçok önemli etki sağlayabilirler (Demirsoy, 1992; Karadayı, 2010).

Gen mutasyonları genel olarak ikiye ayrılırlar:

1.1.2.3.1. Baz değişimi mutasyonları

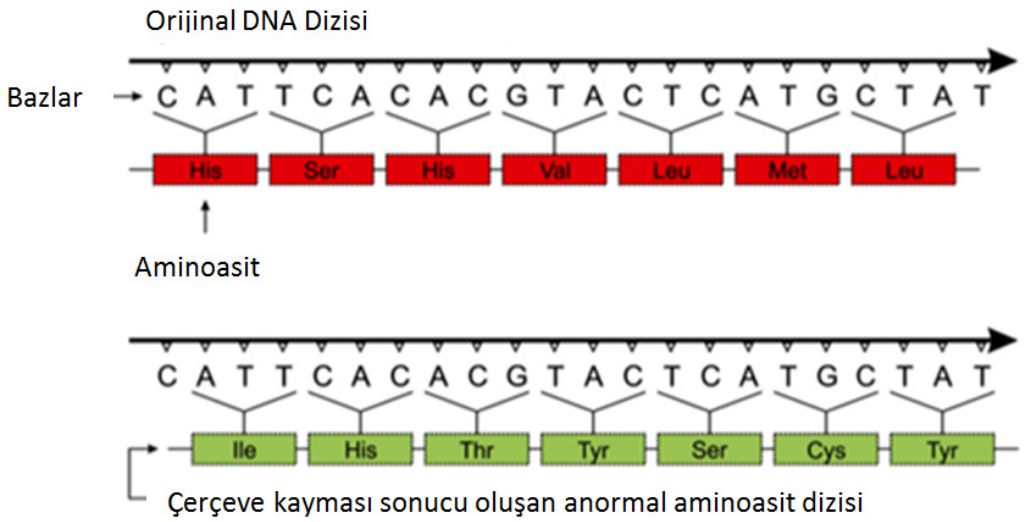
Baz değişimi mutasyonları, bir baz çiftinin başka bir baz çifti ile yer değiştirmesi (baz substitisyonu) sonucu oluşmaktadır. Bu tip mutasyonlar iki şekilde gerçekleşebilmektedir: bir pürin bazının yerine başka bir pürin bazı, bir pirimidin bazı yerine de başka bir pirimidin bazı geçmesiyle oluşan durum transisyon; bir pürin bazı ile bir pirimidin bazının yer değiştirmesi ile oluşan durum ise transversiyon olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1). Bazı yer değişimleri sessiz mutasyonlar olarak adlandırılır; çünkü bu mutasyonlar gen ürününün yapısını ve aktivitesini değiştirmezler. Bu durum, DNA'daki kodonların ilk iki bazının oldukça spesifik olmasına rağmen üçüncü bazdaki farklılığın tolere edilebilmesinden kaynaklanmaktadır (Ateş, 2002; Yıldırım ve ark., 2010).



Şekil 1. Baz substitisyon çeşitleri: transisyonlar ve transversiyonlar (http://en.wikipedia.org/wiki/Transversion).

1.1.2.3.2. Çerçeve kayması mutasyonları

Genetik materyaldeki bazlarda üç ve üçün katları olmayan sayıda insersiyon ya da delesyon sonucunda kodonların değişmesine yol açan mutasyonlar oluşmaktadır (Şekil 2). Bu tip mutasyonlar çerçeve kayması mutasyonları olarak adlandırılır ve organizmada mutasyonun pozisyonuna bağlı olarak son derece etkili sonuçlar doğurabilmektedirler (Yıldırım ve ark., 2010).



Şekil 2. Çerçeve kayması mutasyonu (http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Molelkularis_diagnoszitka_en_book/ch03.html).

Çerçeve kayması mutasyonlarında eklenme ya da eksilmenin olduğu noktanın ilerisinde bulunan tüm nükleotidler yanlış kodonlar şeklinde gruplanır. Bu durumda çoğunlukla fonksiyonel olmayan bir protein üretimi oluşmaktadır. Ayrıca bu durum herhangi bir noktada dur anlamına gelen bir kodon oluşturarak protein sentezinde erken sonlanmaya yol açabilmektedir. Bunların yanı sıra bir gende üç ve üçün katı sayıda baz çifti insersiyonu veya delesyonu meydana geldiğinde ise amino asit sayısının fazla veya eksik olduğu bir protein sentezlenir ve bu durumda çerçeve kayması olmadığı halde fonksiyonel bir protein sentezlenme ihtimali oldukça düşüktür (Campbell ve Reece, 2010; Yıldırım ve ark., 2010).

1.2. Mutajenite Testleri

Bileşiklerin toksik olup olmadığını tespit etmek için pek çok metot geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları DNA hasarlarına sebep olan kimyasalların test edildiği *in vivo* ve *in vitro* metotlardır (Mumcu, 2005).

Toksisite çalışmalarında bir kimyasalın değerlendirilmesinde üç farklı yöntem uygulanmaktadır:

1. Kimyasala maruz kalmış canlı popülasyonları üzerinde gözlemler yaparak,
2. Kontrollü şartlarda hayvan ya da bitkileri kimyasala maruz bırakıp etkilerini gözlemleyerek,

3. Kimyasala maruz kalmış hücreleri, alt hücresel fonksiyonları veya tek hücreli organizmaların üzerindeki etkileri gözlemleyerek yapılabilmektedir (Cohrssen ve Covello, 1989; Timbrell, 2008).

Mutajenlerin saptanmasında genellikle sıçan ve farelerin kullanıldığı *in vivo* testler yapılmaktadır. Ancak bu testler oldukça pahalıdır ve uzun zaman almaktadırlar (Ames, 1979). Ayrıca fazla sayıda kalifiye iş gücü gerektirmeleri, besinlerdeki doğal kimyasal maddelerle, su ve hava kirleticileri gibi kompleks bileşiklerin testine uygun olmamaları ve kullanılan hayvan sayısının azlığı nedeniyle, test duyarlılığının düşük oluşu gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bu nedenle, çok sayıda kimyasalın mutajenitesini ölçebilmek için canlı hayvan deneyleri yerine *in vitro* test sistemleri geliştirilmiştir (Asal, 1983).

Düşük maliyetli ve hızlı olan hücre ve doku testleri potansiyel mutajenlerin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Bu testlerin avantajları:

1. Rutin olarak kimyasalların potansiyel olumsuz etkilerini izleyen tekniklerdir ve daha ucuz ve daha hızlıdırlar,
2. Biyolojik tekniklerle hücresel davranışın izlenmesi, doku gelişiminin başlama hızı ve yenilenmesi konusunda avantaj sağlarlar,
3. Hayvanların aktivitelerinden ve canlı hayvan deneylerinden alternatifler geliştirilmesine olanak sağlarlar (Parlak ve ark., 2011).

Test sistemleri sitogenetik ve mikrobiyal yöntemler olarak iki alt gruba ayrılabilir (Korkmaz, 2005).

1.2.1. Sitogenetik yöntemler

Sitogenetik yöntemlerle büyük çaplı kalıtsal materyal hasarları incelenmektedir. Bu yöntemlere örnek olarak kromozom kırıkları, yer değiştirmeleri, fragmentler ve kromozom tipi bozuklukları gibi anomalilerin gözlendiği yapısal kromozom bozulma testi; hücre bölünmesi sırasında oluşan kromozom kırıklarını ölçen mikronükleus testi; iplik kıvrılmaları ve çapraz bağlanma, kesme, çıkarma ve onarım bölgelerindeki hataları gözlemeye yarayan comet testi ve kardeş kromatidlerde meydana gelen parça değişimlerini incelemeyi sağlayan kardeş kromatid değişim testi verilebilir (Singh ve ark., 1988; Ribas ve ark., 1996; Fender ve Wolf, 1998; Abou-Eisha ve ark., 1999; Korkmaz, 2005).

1.2.2. Bakteriyel yöntemler

Bakteriyel test metotları, DNA'da meydana gelen hasarları karakteristik suşlarla kısa zamanda belirlemektedir. Bu testler genellikle S9 karaciğer homojenatı varlığında ve yokluğunda uygulanmaktadır (Korkmaz, 2005; Parlak, 2011).

Bakteriyel test sistemlerinin kullanım alanlarından bazılarını şöyle sıralayabiliriz:

1. Çeşitli kimyasalların potansiyel kanserojenitelerinin taranmasında,
2. Vücut sıvılarının ve atıklarının test edilmesi yöntemiyle, insanların mutajen ve kanserojenlere maruz kalma düzeylerinin izlenmesinde,
3. Kimyasalların mutajenik etki mekanizmalarının belirlenmesinde,
4. Kanserojen/mutajenlerin neden olduğu DNA hasar tiplerini saptamada bakteriyel test sistemleri kullanılmaktadır (Öksüzoğlu, 1997).

1.2.2.1. *UMU* (SOS) testi

Umu testi mutajenlerin genotoksik etkilerini saptamak amacıyla kullanılan kolorimetrik bakteriyel bir test sistemidir (Quillardet ve Hofnung, 2005). SOS cevabı esas alınarak geliştirilmiş ve regülator bir sistem olan *Umu* testi, DNA hasarı ile indüklenebilen sistemler içerisinde ilk olarak karakterize edilmiş olan en kapsamlı, kompleks ve iyi anlaşılmış sistemdir (Oda ve ark., 1985).

1.2.2.2. SOS kromotest

SOS kromotest, *Escherichia coli* K12 bakterisine DNA hasarı ile ilişkili olan SOS genlerin indüksiyonunu belirlemektedir. Bu test, *Umu* test ile benzemekte ve özellikle sedimentlerin mutajenitesinin araştırıldığı çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Chen ve White, 2004).

1.2.2.3. Mutatox testi

Mutatox testi, DNA hasarına neden olan maddeler, DNA sentezi inhibitörleri ve direkt mutajenler gibi kimyasallara hassas ve normalde ışık saçan *Photobacterium phosphoreum* bakterisinin mutant parlamayan suşunun kullanımına dayanan genotoksik bir test yöntemidir. Testte DNA hasarı, bakterilerin test örneği ile muamele edildikten sonra parlama yeteneğini geri kazanmasıyla ölçülür. Test örneğinin genotoksisitesi bakterinin ışık miktarının artmasını indüklemektedir ve çeşitli genotoksik maddelerin etkileri bu test ile kontrol edilmiştir (Kwan ve ark., 1990; Johnson, 1992).

1.2.2.4. Ames (*Salmonella*/mikrozom) testi

Ames testi, Prof. Dr. Bruce N. Ames ve ekibi tarafından 1970'lerin başında geliştirilmiş ve dünya çapında kabul görmüş bakteriyel bir testtir (Ames, 1971; Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000). Bu test, bakteriyel mutajenite testleri içerisinde en yaygın kullanılan testlerden olup, detaylarının iyi bilinmesi, uygulama kolaylığı ve hassaslığı nedeniyle en fazla tercih edilen test sistemlerinden biridir (Gatehouse ve ark., 1998).

Testte, Prof. Dr. Bruce N. Ames ve Dr. Dorothy M. Maron tarafından *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlar sonucu elde edilen mutantlar kullanılmaktadır. Bu mutant suşlar, histidin operonunda yer alan çeşitli genlerde farklı tipte mutasyonlara sahiptirler. Çoğalmaları için gerekli histidin amino asidini sentezleme yeteneğini kaybetmiş olan bu oksotroflar, ortamda histidin olmadığı sürece gelişip koloni oluşturamazlar. Bu testin temeli; oksotrof (his^- = histidin sentezleme yeteneğini kaybetmiş) *Salmonella* suşlarının genellikle kimyasal bir ajanla muamele edildikten sonra, ikinci mutasyon sonucu prototrof (his^+ = yabani tip) haline dönmesi esasına dayanır (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Ayrıca test suşlarında farklı mutasyonlar da oluşturulmuş ve çeşitli kimyasallara karşı hassasiyetlerinin arttırılması amaçlanmıştır (Mortelmans ve Zeiger, 2000). Genellikle bu işlemler DNA onarım mekanizmasının zarar görmesi, bakteri hücre duvarının geçirgenliğinin arttırılması ve antibiyotik direnç geni içeren bir plasmidin hücreye sokulması gibi mutasyonlardır (Gatehouse ve ark., 1990).

Ames testinde çeşitli kimyasalların etkilerini belirlemek için farklı suşlarla çalışılmaktadır. En çok kullanılan *Salmonella typhimurium* suşları; TA98, TA100, TA102, TA1535 ve TA1538'dir. Bu suşlardan her biri histidin operonunda değişik tipte mutasyonlar içermektedir (Maron ve Ames, 1983). Ames testinde kullanılan suşlar ve genetik özellikleri Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Ames testinde kullanılan *Salmonella typhimurium* mutant suşlarının genetik özellikleri (Öksüzoğlu, 1997).

Suş	Histidin Mutasyonu	LPS	Onarım	pKM 101	Mutasyonun Niteliği	Belirlenecek Bileşik Sınıfları
TA1535	*hisG46*	*rfa*	*ΔuvrB*	-	AT_GC transisyon	Baz çifti değişimine neden olan mutajenler
TA1537	*hisC3076*	*rfa*	*ΔuvrB*	-	C…...C yanına +1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA1538	*hisD3052*	*rfa*	*ΔuvrB*	-	CG…...CG yanından -1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA98	*hisD3052*	*rfa*	*ΔuvrB*	+	CG yanından -1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA100	*hisG46*	*rfa*	*ΔuvrB*	+	AT_CG transisyon	Baz çifti değişimine neden olan mutajenler
TA97	*hisD6610*	*rfa*	*ΔuvrB*	+	CCC yanına +4	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA102	*PAQ1 hisG428 Δ his*	*rfa*	*ΔuvrB*	-	G Ochre AT	Oksidantlar, X-Işınları, U.V., mitomisin C ve kinonlar…

*LPS: Lipopolisakkarit, *Δ*: Delesyon

Bu çalışmada kullanılan TA100 suşunda bulunan *hisG46* mutasyonu, histidin biyosentezinin ilk enzimini kodlayan hisG geni üzerindedir. Bu mutasyon, hisG geninde lösin amino asidinin kodonu olan GAG-CTC yerine prolin amino asidinin kodonu olan GGG-CCC'nin gelmesine sebep olur. Bu mutasyon, baz çifti değişimine neden olan mutajenler tarafından eski haline döndürülebilmektedir. Bu yüzden bu suş, özellikle G-C baz çiftlerinde baz çifti değişimlerine neden olan mutajenlerin keşfinde kullanılan suşlardır (Maron ve Ames, 1983).

TA98 suşunun taşıdığı *hisD3052* mutasyonu ise histidin sentezindeki son enzimi (histidinol dehidrogenaz) kodlayan hisD geninde meydana gelen çerçeve kayması mutasyonu sonucunda oluşmuştur. Bu mutasyon, genin sahip olduğu -C-G-C-G-C-G-C-G- dizisinin yakınındaki bir bazın yapıdan ayrılması sonucunda meydana gelen -1 çerçeve kayması mutasyonudur. *hisD3052* mutasyonunun eski haline dönmesi, çerçeve kayması tipinde mutasyona yol açabilen mutajenler tarafından mümkün olabilmektedir (Maron ve Ames, 1983).

Ayrıca bütün suşlar, normalde kendilerini kuşatan lipopolisakkarit kapsül tabakasının yapımından sorumlu genlerde bir mutasyon (*rfa*) taşımaktadırlar. Bu sayede hücreler büyük moleküllere karşı duyarlı hale gelir ve böylelikle mutajenlerin hücreye girmesi kolaylaşır (Ames ve ark., 1973).

Yine Ames testinde kullanılan suşlardan TA102 dışındaki tüm suşlar *uvrB* mutasyonu taşımaktadır. Bu mutasyon, DNA kesme onarma sistemi için kodlanan uvrB-bio genlerinde delesyona neden olarak mutajenlere karşı hassasiyetin artmasını sağlar. *uvrB*, hatasız kesip çıkarma tamir mekanizmasını engellemekte ve hata yapmaya eğilimli DNA tamir mekanizmasını devreye sokmaktadır. Ayrıca biyotin vitamininin sentezinden sorumlu bio geni de delesyona uğradığından, bu mutasyona sahip test suşları üreyebilmek için biyotine ihtiyaç duymaktadırlar (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Son olarak, suşların çoğu (TA97, TA98, TA100, TA102 ve TA104) ampisilin direnç geni taşıyan pKM101 plazmidi içermektedir. Bu plazmid, hem plazmidin hücredeki varlığını belirlemek için uygun bir marker taşımakta; hem de hata yapmaya eğilimli DNA tamir mekanizmasını uyarmaktadır (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Ames testinde ayrıca bazı kimyasalların memeli vücudunda metabolik aktivasyon sonucu alabilecekleri mutajenik aktiviteyi ölçmek amacıyla rat karaciğeri süpernatantını ve kofaktörleri içeren bir metabolik aktivasyon sistemi kullanılmaktadır. Bu sistem, memelilerde mevcut olan enzim sisteminden yoksun olan bakteriler için metabolik bir ortamı taklit etme olanağı vermektedir. Böylece, test edilen maddenin enzim aktivasyonu sonucu mutajenik etkiye sahip olup olmadığı belirlenebilmektedir. Bu enzim karışımı kısaca S9 olarak isimlendirilmektedir (Ames, 1973; Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000; Sakura ve ark., 2004).

Ames testi, özellikle kimyasal olarak indüklenen mutajeniteyi belirlemek amacıyla tasarlanmıştır (Ames ve ark., 1975). Bu test sistemi kısa sürede 5000'den fazla kimyasalın, çeşitli bitkilerin ve onlardan izole edilen biyoaktif bileşenlerin, toprağın, suyun ve havanın mutajenik potansiyelini; ayrıca yine bitkilerin, doğal ya da yapay kimyasalların ve vitaminler, karotenoidler, flavonoidler ve terpenoidler gibi fitokimyasalların antimutajenik etkisini belirlemek için yaygın olarak uygulanmıştır (Maron ve Ames, 1983; Lewtas, 1988; Kool ve ark., 1989; Cerná ve ark., 1996; 2000; Aleem ve Malik, 2003; Umbuzeiro ve ark., 2004; Cardoso ve Cólus, 2006; Watanabe ve ark., 2008; Zeytinoğlu H., 2008; Ghazali ve ark., 2011; Hong ve Lyu, 2011; Sghaier ve ark., 2011; Vu ve ark., 2012).

Ames testi ile yapılan çalışmalar sonucunda pozitif çıkan bir kimyasalın kesin olarak mutajen/kanserojen ya da antimutajen/antikanserojen olduğunu söylemek mümkün değildir. Bu kimyasalın sadece potansiyel olarak bu özellikleri taşıyabileceği öngörülebilir. Sonucun kesinlik kazanabilmesi için, mutlaka *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Ames testi, geleneksel hayvan kanserojenite testlerini tamamlayıcı özelliğe sahiptir (McCann ve Ames, 1976).

Çalışma alanı olarak belirlenen Tunca Nehri, çevresinde tarım arazilerinin yaygın olarak görüldüğü bir nehirdir ve bu alanlarda kullanılan yapay gübrelerin ve birçok zirai ilacın atıkları nehre karışmaktadır. Yapılan kimyasal incelemeler sonucunda nehrin kirlilik taşıdığı bilinmektedir (Uluçam, 1997; Yıldırım, 2001). Bu çalışma ile Tunca Nehri su ve sedimentinden elde edilen farklı ekstraktların (hekzan, kloroform, DCM), potansiyel mutajenik aktivitelerinin Ames (*Salmonella*/mikrozom) testi yardımıyla belirlenmesi amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Sato ve ark. (1983) yaptıkları çalışmada Nagara Nehri'nin ve bu nehre ait yan kolların sedimentlerinin mutajenitesini Ames/*Salmonella* mikrozom testi ile araştırmışlardır. Alınan sediment örnekleri ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Ekstraktların mutajenitelerinin araştırıldığı çalışmada *Salmonella typhimurium* TA100 suşu, metabolik aktivasyon (S9) varlığında uygulanmıştır. Ekstraktlar dört farklı organik çözücü (izooktan, izooktan-benzen, benzen-etil asetat ve benzen-metanol) ile fraksiyonlanmış ve bu fraksiyonlardan en yüksek mutajenik aktivite, nehir kollarından biri olan Arata Nehri'nden alınan örneğin izooktan-benzen fraksiyonunda görülmüştür.

Oishi ve Takahashi (1987), Japonya'nın en kirli kentsel bölgelerinden olan Tokyo Kanagawa arasındaki Tama Nehri sedimentleriyle çalışmışlardır. *S. typhimurium* TA1535, TA1537 ve TA1538 suşları kullanılarak S9 varlığında ve yokluğunda sekiz bölgeden alınan sedimentlerin potansiyel mutajenitesi araştırılmıştır. Sediment ekstraktlarının çoğunda mutajenik yanıt indüklenirken; S9 varlığının, üç istasyon dışında mutajenik etkiyi arttırdığı belirlenmiştir.

Maccubbin ve Ersing (1991), Hindistan'daki Grand Calumet Nehri'nin mutajenik aktivitesini Ames testi ile incelemişlerdir. Nehrin sedimentinin organik ekstraktlarının mutajenitesinin araştırıldığı çalışmada, 10 alandan örnekleme yapılmıştır. Çalışmanın sonunda, alınan örneklerin tümünün mutajenik yanıtı indüklediği gözlenmiştir.

Maccubbin ve ark. (1991) yaptıkları çalışmada Detroit Nehri'nin alt bölgesinde otuz istasyondan ve Michigan Gölü'nde bir alandan alınan sediment örnekleriyle çalışmışlardır. *S. typhimurium* ile S9 yokluğunda çalışılan örneklerin bir kısmında zayıf mutajenik etki belirlenmiştir. S9 varlığında ise 31 örneğin 16'sında mutajenitenin indüklendiği saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, Detroit Nehri'ndeki bileşikler metabolik aktivasyon varlığında mutajenik etki göstermektedir. Çalışma sonucunda sedimentlerin, bu bölgedeki balıklar ve diğer organizmalar için potansiyel bir mutajenik kaynak ve muhtemel kanserojenik bir bileşik olduğu düşünülmüştür.

Jarvis ve ark. (1996) yaptıkları çalışmada on sediment örneğini, sokslet ekstraksiyonuna tabi tutmuşlardır. Ekstraktların her biri ikiye bölünerek yarısı silika jel kromatografisinden geçirilmiş, diğer yarısı ise işlenmemiştir. Örnekler Ames ve Mutatox testi ile S9 varlığında ve yokluğunda incelenmiştir. Ames testinde S9 varlığında

S. typhimurium TA98 ve TA100 suşları sırasıyla sedimentlerin %80 ve %50'si için pozitif mutajen yanıt verirken; S9 yokluğunda TA98 suşu sedimentlerin yarısı için ve TA100 suşu ise sadece %10'u için pozitif mutajen yanıt vermiştir. Mutatox testi, S9 varlığında sedimentlerin %75'inde pozitif mutajen yanıt verirken, S9 yokluğunda hiçbir sediment örneğinde mutajenik etki görülmemiştir.

Uluçam (1997), yaptığı çalışmada Tunca Nehri'ndeki kimyasal kirliliği, çözünmüş oksijen, biyolojik oksijen ihtiyacı, kimyasal oksijen ihtiyacı, iletkenlik, askıda katı madde, sıcaklık, pH gibi önemli parametreler açısından incelemiştir. İncelemeler sonucunda Tunca Nehri'ndeki kimyasal kirliliğin limit değerlere ulaştığı görülmüştür. Kirliliğin sebebi, küçük sanayi kuruluşlarının atıkları ve evsel atıklar olarak değerlendirilmiştir. Özellikle yaz aylarında debisi düşen nehirde, askıda kalan katı maddelerin önemli kirlilik oluşturduğu belirtilmiştir.

Ehrlichmann ve ark. (2000), yaptıkları çalışmada, 19 toprak örneğinden ekstrakt elde ederek üç farklı genotoksisite testi uygulamışlardır. Ames çalışmasında, bazı toprak örnekleri oldukça genotoksik olarak belirlenmiştir.

Picer ve ark. (2001), Adriyatik Denizi'nin sedimentiyle çalışmışlar ve ekstraksiyonda petrol eter ile metanol kullanmışlardır. *S. typhimurium* TA98 suşunun S9 varlığındaki etkisine bakılan çalışmada, yedi ekstrakttan beş tanesinde anlamlı mutajenik etki görülmüştür. Ekstraktların mutajenik potansiyellerine bakıldığında metanolün etkisinin petrol eterden yüksek olduğu ve polar çözücülerin daha yüksek mutajenik sonuçlar verdiği görülmüştür.

Yıldırım (2001), yaptığı tez çalışmasında Meriç, Arda ve Tunca Nehirleri'nden 1997-2000 yılları arasında yıllık örneklemeler ile kirlilik durumu incelemesi yapmıştır. Çalışmada, suni gübrelemeden gelen toplam azot ve fosfor yükleri ve sanayi kaynaklı toplam kimyasal oksijen ihtiyacı artışı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, bu nehir sularının içme suyu temininde, rekreasyon amaçlar için, alabalık üretiminde, hayvan üretimi ve çiftlik ihtiyacı için kesinlikle kullanılamayacağı saptanmıştır. Ancak ileri arıtma ile içme suyu temininde, alabalık dışındaki balık üretiminde, tarım alanında sulamada kullanılabileceği ve uygun bir arıtma ile endüstri sektöründe kullanılabileceği belirtilmiştir. Ayrıca organik ve inorganik kirliliğin en az düzeye indirilmesi için bölgedeki deşarjların kontrol altına alınması gerektiği vurgulanmıştır.

Zietz ve ark. (2001), Baltık Denizi'nin Almanya kıyılarındaki mutajeniteyi belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmalarında sekiz bölgeden deniz suyu ve sediment

örnekleri alarak suları kolon maddesiyle ekstre etmişlerdir. Ekstraktlar, *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanılarak, S9 varlığında ve yokluğunda test edilmiştir. Su örneklerinin üçü, TA98 suşuyla yapılan çalışmalarda mutajenik aktivasyon göstermiş, fakat sediment örneklerinde mutajenik aktiviteye rastlanmamıştır.

Vigano ve ark. (2002), İtalya'daki Po Nehri sedimentinin farklı mevsimlerdeki mutajenitesini araştırmışlardır. S9 olmaksızın yapılan çalışmalarda örnekler *S. typhimurium* TA98, TA100 ve TA102 suşları için mutajenik sonuçlar vermezken YG1024 suşunda mutajenik yanıt indüklenmiştir. Sedimentlerin mutajenitesi kış mevsiminde daha yüksek tespit edilmiştir. Ayrıca mutajenitenin mekansal dağılımının kirlilik gözlenen kolların birleşim yerleriyle tutarlı olduğu belirlenmiştir.

Ma ve ark. (2003), Çin'deki Guantin Rezervuarı ve Yongdinghe Nehri Havzası'ndan aldıkları su ve sediment örneklerini incelemişlerdir. Sediment örnekleriyle yapılan deneylerin sonucunda mutajenik aktivitenin genelde metabolik aktivasyondan sonra ortaya çıktığı görülürken su örneklerinde direkt mutajenik etki belirlenmiştir. Sonuçlar genelde altı örnekleme alanından üçünün mutajenik risk teşkil ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca çalışılan alanlardan birinde su, diğer bir alanda da sediment kalitesindeki düşüklüğe dikkat çekilmiştir.

Siddiqui ve Ahmad (2003), Hindistan'daki Aligarh Şehri'nin üç su kaynağıyla yaptıkları çalışmada, Ames plak inkorporasyon ve Ames fluktuasyon testlerini kullanmışlardır. Yeraltı ve nehir suyu örnekleri kolon maddesi ile ekstre edilirken, endüstriyel atık su örnekleri direkt olarak uygulanmıştır. Alınan bütün örnekler, her iki test yönteminde de anlamlı derecede mutajenik yanıtlar vermiştir.

Horn ve ark. (2004), Brezilya'daki Bom Jardim Deresi sedimentinin mutajenik potansiyelini araştırmışlardır. Bir petrokimya tesisinin dolaylı atığına maruz kalan akarsuyun üç noktasından örnek alınmıştır. Örnekler, *S. typhimurium* TA97a, TA98, TA100 ve TA1535 suşları ile S9 varlığında ve yokluğunda test edilmiştir. Çalışmanın sonucunda farklı alanlarda düşük mutajenik aktivite gözlenmekle birlikte, S9 yokluğunda özellikle çerçeve kayması mutasyonlarına daha sık rastlanmıştır.

Kutlu ve ark. (2004), Eskişehir'deki Porsuk Nehri'nin su ve sedimentiyle yaptıkları çalışmada *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarıyla S9 yokluğunda çalışmışlardır. Diklorometan, aseton, dietil eter ve metanol ekstraktları, beş farklı konsantrasyonda denenmiş ve her iki suş için de iki istasyonda mutajenik sonuçlar elde edilmiştir. Su ve

sedimentlerinde, çerçeve kayması ve baz çifti değişimi mutasyonlarına neden olan mutajenlerin varlığı, elde edilen sonuçlarla kanıtlanmıştır.

Umbuzeiro ve ark. (2004), Cristais Nehri (Brezilya) mutajenik potansiyelinin araştırıldığı çalışmada, S9 varlığında ve yokluğunda *S. typhimurium* TA98, TA100, YG1041 ve YG1042 suşlarını kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda azo boya endüstrisinin nehre atık boşalttığı bölgede nehir suyunda mutajenik etkinin tetiklendiği belirlenmiştir. Ayrıca işlenmek için su alınan bölgede bulunan sedimentin mutajenik bileşiklerle kontamine olduğu gözlenmiştir. Bu durumun, mutajenik deşarjların azaltılması halinde dahi su kirliliğini tetikleyecek bir unsur olacağı düşünülmüştür.

Mumcu (2005) yapmış olduğu tez çalışmasında, Seydi Çayı (Eskişehir) çevresinden toplanan su ve toprak örneklerinin mutajenitesini saptamaya çalışmıştır. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının kullanıldığı çalışmalar sonucu, bazı istasyonlardan alınan su ve toprak örneklerinin mutajenik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Fatima ve Ahmad (2006), Hindistan'ın kuzeyinde yer alan iki bölgeden aldıkları endüstriyel atık suların genotoksik potansiyellerini Ames testi ile beraber üç farklı test sistemi ile araştırmışlardır. Çalışmalar sonunda, test edilen su örneklerinin genotoksik potansiyele sahip oldukları belirlenmiştir.

Kummrow ve ark. (2006), Güney Brezilya'da bulunan Santos Nehri'nin su kalitesini belirlemek amacıyla aldıkları örneklerin kimyasal analizlerini yaptıktan sonra, potansiyel genotoksik etkilerini belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmada *S. typhimurium* TA98, TA100, YG1041 ve YG1042 suşları kullanılmıştır. Sedimentinde yüksek miktarda oranlarda polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) içeren bölgenin test sonuçları, diğer bölgeye göre daha pozitif sonuç vermiştir. Çalışma sonunda, blue rayon yöntemiyle birlikte YG1041 suşunun kullanıldığı Ames test sisteminin su kalitesini izleme çalışmalarında kullanılabilir olduğunu belirtmişlerdir.

Sujbert ve ark. (2006), ozon ilave edilmiş ve klorlanmış içme sularının potansiyel mutajenik etkisini araştırmışlardır. Çalışma, *S. typhimurium* bakterisinin TA98 ve TA100 suşları ile birlikte S9 varlığında ve yokluğunda yapılmıştır. Sonuç olarak, test edilen içme sularının mutajenik potansiyele sahip olduğu bulunmuştur.

Umbuzeiro ve ark. (2006), Brezilya'da 9 farklı alandan aldıkları örneklerle yaptıkları çalışmada, PAH kirliliği olduğu bilinen su ve sedimentlerle kimyasal analizlerde PAH içeriği olduğu tespit edilen kok fabrikasının sıvı atığından örnekler alınmıştır. Çalışmada örnekler *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ile S9 varlığında ve yokluğunda test

edilmiştir. Çalışmanın sonucunda Billings şehrinin rezervuar atığının döküldüğü, endüstriyel atıkların boşaltıldığı ve yine bir çelik sanayisinin atıklarının boşaltıldığı alanlardan alınan örneklerde düşük mutajenik aktivite gözlenmiştir.

Mathur ve Bhatnagar (2007), boyama endüstrisinin yoğun olduğu ve boyama atıklarının çevreye bırakıldığı bir alandaki gölet suyunun genotoksik etkisini *S. typhimurium* TA100 suşunu kullanarak araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda, atık içeren suların yüksek mutajenik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Pereira ve ark. (2007), Brezilya'daki Rio Grande do Sul Nehri'nde üç alanda çalışmışlardır. Çalışma alanlarından ilki bir endüstriyel etki alanının yakınından diğerleri ise endüstriyel etkilerin olmadığı alanlardan seçilmiştir. Su örneklerinin ekstraktları *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarıyla S9 varlığında ve yokluğunda test edilmiştir. Çalışmanın sonucunda endüstriyel faaliyetlerin olduğu bölgeden alınan örneklerde mutajenik etki görülmüştür.

Singh ve ark. (2007), çalışmalarında Hindistan'da Uttar Pradesh bölgesindeki metal, tabaklama ve boya sanayilerinin katı atıklarının mutajenik potansiyelini araştırmışlardır. Deneylerde *S. typhimurium* TA97a, TA98, TA100 ve TA102 suşları kullanılmıştır. Örneklerdeki metal konsantrasyonlarının da belirlendiği çalışmada sonuçlar metal ve tabaklama sanayilerinin atıklarındaki mutajenik etkiyi destekleyecek nitelikte görülmüştür. Bulgular ışığında, uygun olmayan koşullarda depolanan atıkların çevre ve sağlık açısından risk teşkil ettiği belirlenmiştir.

Boyacıoğlu ve ark. (2008), Gediz Nehri'nin sedimentiyle yaptıkları çalışmada, Ramsar Sitesi olarak koruma altına alınan kuş cennetinin bulunduğu Gediz Nehri deltasının mutajenik potansiyeli araştırmışlardır. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının kullanıldığı çalışmada sediment örneklerinde mutajenik sonuçla karşılaşılmazken, revertant koloni sayısındaki azalmaya bakılarak örneklerin toksik olduğu düşünülmüştür.

Magdaleno ve ark. (2008), Latin Amerika'nın en kirli nehirlerinden biri olan Matanza-Riachuelo ile çalışmışlardır. Çalışmada örnekleme sahaları kırsal ve kentsel alanlardan, katı atık depolama alanından ve endüstriyel alanlardan seçilmiştir. Aşağı bölgelere doğru ağır metal konsantrasyonunun arttığı tespit edilen nehirde test sonuçlarına göre mutajenik etkiye rastlanmamıştır.

Atasoy (2009), üç hastanenin atık sularının genotoksisitesini araştırmıştır. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının kullanıldığı çalışmada Çapa, Haseki ve Vakıf

Gureba hastanelerinin atık suları sırasıyla %50, %56 ve %61 oranında genotoksik olarak belirlenmiştir.

Valente-Campos ve ark. (2009), su kalitesini test etmek amacıyla yapılan bir yer altı suyu izleme programı dahilinde çalışmışlardır. Farklı havzalardaki yedi kuyuya ait su örnekleri analiz edilmiştir. Örneklerin hazırlanmasında membran filtrasyon, sıvı-sıvı ve kolon ekstraksiyon metotları kullanılmıştır. Filtre edilen örneklerin hiçbirinde mutajenik aktivite gözlenmezken, kolon ve sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen örneklerin bazılarında değişen oranlarda mutajenik etki tespit edilmiştir. Çalışma sonunda, *Salmonella*/mikrozom testinin, yer altı sularının mutajenik aktivite açısından izlenmesinde etkili bir yöntem olduğu belirtilmiştir.

Giorgio ve ark. (2010), Fransa'da yaptıkları çalışmada, sedimentlerinde çeşitli PAH'lar ve pestisitler saptanan küçük akarsuların mutajenitesini araştırmışlardır. Örnekler *S. typhimurium* TA98 suşu ile S9 varlığında, YG1041 suşuyla da S9 varlığında ve yokluğunda araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, istasyonlardan birinde TA98 suşu için S9 varlığında mutajenik yanıt gözlenmiştir. Ayrıca bazı istasyonlarda potansiyel mutajenitenin söz konusu olduğu belirtilmiştir.

Altınoluk (2011), yaptığı yüksek lisans tezi çalışmasında Tunca Nehri'nin bakteriyolojik ve fizikokimyasal özelliklerini araştırmıştır. Ekim 2010-Eylül 2011 tarihleri arasında 5 farklı noktadan yapılan örneklemelerin sonucunda nehir suyu; sıcaklık, pH, klorür, nitrat azotu, sülfat, fosfat ve kadmiyum parametreleri açısından I. sınıf kalitede bulunurken, çözünmüş oksijen, nitrit azotu, demir, bakır ve çinko parametreleri açısından II. sınıf kaliteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca nehrin, saptanan toplam koliform, fekal koliform, kurşun değerleri, biyolojik ve kimyasal oksijen ihtiyacı parametreleri açısından ise IV. sınıf kaliteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra nehirde dışkı kaynaklı *E. coli* varlığı belirlenmiştir.

Arabacı (2011), yaptığı tez çalışmasında Tunca ve Meriç Nehirleri'ndeki ağır metal kirliliğini belirlemeyi amaçlamıştır. Bu amaçla nehirlerden yakalanan *Leusiscus* sp. (kefal balığı) kas, solungaç, böbrek, bağırsak ve deri dokularında Zn, Cd, Pb, Cu, Cr, Mn, Ni ve Fe ağır metal konsantrasyonları araştırılmıştır. Çalışma bulgularına göre, nehirlerden alınan balık numunelerinde ölçülen Cd, Pb ve Zn konsantrasyonları Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı'nca yayınlanan kabul edilebilir değerlerin üzerinde bulunmuştur.

Ateş (2011), Bilecik Karasu Deresi'nin altı farklı noktasından alınan su ve sediment örneklerinin mutajenitesini incelemiştir. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının

kullanıldığı çalışmada elde edilen sediment ekstraktları 5 farklı konsantrasyonda uygulanmış ve sonuçta Bilecik Karasu Deresi'nin herhangi bir noktasında anlamlı derecede bir mutajenik etkiye rastlanmamıştır.

Benisek ve ark. (2011), Çek Cumhuriyeti'nde yaptıkları çalışmada 14 bölgeden aldıkları sediment örneklerinin mutajenitesini incelemişlerdir. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ile S9 yokluğunda yapılan çalışmalarda anlamlı bir mutajenik sonuca rastlanmazken S9 karışımı kullanılan çalışmaların sonucunda değişen oranlarda mutajenik sonuçlarla karşılaşılmıştır.

Reifferscheid ve ark. (2011), sediment ekstraktlarıyla yaptıkları çalışmada, Almanya'daki Elbe Nehri'nin mutajenitesini araştırmışlardır. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının kullanıldığı çalışmada mutajenite sonuçlarının, polar çözücülerin kullanıldığı ekstraktlarda gözlendiği belirtilmiştir.

Boyacıoğlu ve ark. (2012), çalışmalarında İzmir'deki endüstriyel tesislerin bulunduğu bir alanda yer alan Nif Çayı'ndan aldıkları sediment örneklerini eşit hacimlerde karıştırdıkları hekzan, kloroform ve aseton ile ekstraksiyona tabi tutmuş ve daha önce yapılan sokslet ekstraksiyonuyla karşılaştırmayı hedeflemişlerdir. Çalışmada sediment örnekleri beş alandan toplanmış ve ekstraktlar üç farklı konsantrasyonda araştırılmıştır. Deneylerde *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanılırken S9 uygulanmamıştır. Sonuçta bir istasyonda TA98 suşu için mutajenik etkiye ve iki istasyonda da toksik etkiye rastlanmıştır.

Rigaud ve ark. (2012) çalışmalarında Fransa'daki Berre Lagünü'ndeki bentik organizmaları barındıran üç alandan (VA, VC ve VN) ve bu organizmaları barındırmayan bir alandan (RN) sediment örnekleri almışlardır. Çalışmada sediment örneklerinin pH 4 ve pH 6'da elde edilmiş ekstraktları, *S. typhimurium* TA102 suşu ile araştırılmıştır. Sonuçta pH 6'da elde edilen RN alanı ve pH 4'te elde edilen VA alanı örnekleri için mutajenik aktivite belirlenmiştir.

Soylu (2012), yaptığı çalışmada Tunca, Meriç, Arda ve Ergene Nehirleri'nden su ve sediment örnekleri alarak Ames testinde incelemiştir. *S. typhimurium* TA100 suşunun S9 yokluğunda kullanıldığı çalışmada, örnekler seyreltilerek uygulanmıştır. Test sonuçlarına göre, Ergene Nehri ve bu nehrin suladığı çeltik tarlasından alınan su örneklerinde mutajenite belirlenmiştir. Tunca, Meriç ve Arda Nehirleri'nin sularında mutajeniteye rastlanmazken sedimentlerinde değişen oranlarda mutajenik etki görülmüştür.

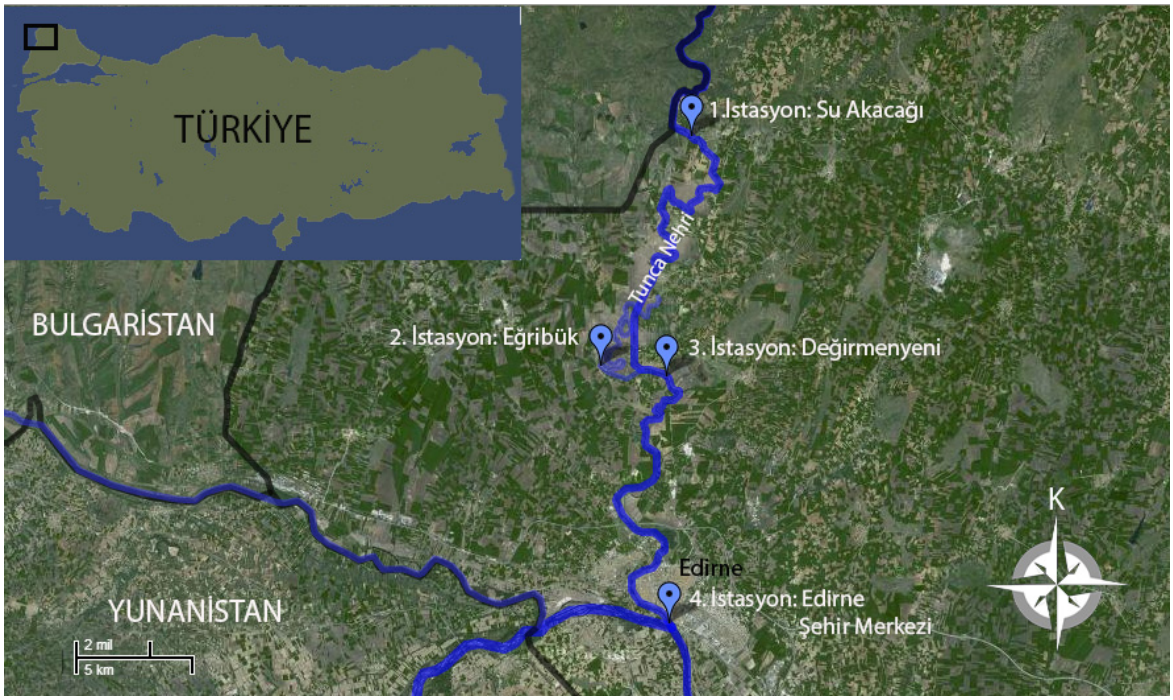
Vincent-Hubert ve ark. (2012), yüzey suyu ve sediment örneklerinde PAH'lar gibi oldukça mutajenik bileşikler bulunan Fransa'daki Seine Nehri ile çalışmışlardır. Çalışmada birçok endüstriyel alandan ve endüstriyel su arıtma tesisinin 25 m aşağısından su örnekleri alınmıştır. Çalışmada *S. typhimurium* TA98 suşu, S9 karışımı varlığında kullanılmıştır. En yüksek mutajenik potansiyeli kimyasal boya sanayisi ve arıtma tesisi alanlarından alınan sular göstermiş, bunları petrokimyasal sanayi alanı, petrol rafineri alanı ve kağıt öğütme alanı izlemiştir. Ayrıca çalışmada sediment örnekleriyle yapılan testlerin sonucunda nehrin alt bölgesindeki örneklerde yüksek seviyede mutajenik etki belirlenmiştir. Belirlenen mutajenik etkilerin kaynağının Seine Nehri'ne boşalan çeşitli türdeki atıkların karışmasıyla oluşan bileşikler olduğu düşünülmüştür.

Anjum ve Malik (2013), Hindistan'daki Lucknow şehri yakınındaki Chinhat endüstriyel alanından zirai ilaç sanayisine ait atık sulardan örnekler almışlar ve su örneklerine kolon ve sıvı-sıvı ekstraksiyon metotları uygulamışlardır. Sıvı-sıvı metodunda çözücü olarak hekzan ve kloroform kullanılmıştır. *S. typhimurium* TA97a, TA98, TA100 ve TA102 suşlarının kullanıldığı çalışmada, S9 varlığında ve yokluğunda en yüksek mutajenik aktivite TA98 suşunda gözlenmiştir.

BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, Bulgaristan'da doğup Suakacağı sınır köyünden Türk topraklarına girerek Edirne'de Bülbül Adası'nda Meriç Nehri ile birleşen Tunca Nehri'nin su ve sediment örneklerinin potansiyel mutajenik özellikleri araştırılmıştır. Nehrin uzunluğu 289 km olup akış hızı ortalama 22 m^3/sn'dir (Sakçali ve ark., 2009). Örnekler, nehrin Türkiye sınırları içindeki kısmından seçilen dört istasyondan alınmıştır. Bu istasyonlar; 1. Suakacağı Köyü, 2. Eğribük, 3. Değirmenyeni Köyü ve 4. Edirne Şehir Merkezi'dir (Şekil 3).



Şekil 3. Tunca Nehri'nde örneklerin alındığı istasyonlar.

İstasyonlardan Suakacağı Köyü, nehrin Bulgaristan'dan Türkiye'ye girdiği noktada yer almaktadır. Bu noktadan Edirne Şehir Merkezi'ne kadar olan alanda yoğun olarak tarım arazileri bulunmaktadır. Özellikle çeltik tarımının yoğun olarak yapıldığı bölgede herbisit ve insektisit uygulamaları görülmektedir. Ayrıca Şehir Merkezi istasyonu yakınlarında küçük endüstriyel işletmeler bulunmakta ve bu bölgede nehre kirleticiler ve evsel atıklar karışmaktadır.

3.1.2. Test suşları

Bu çalışmada, *Salmonella typhimurium* bakterisinin LT2 atasal suşundan Prof. Dr. Ames ve Dr. Maron (1971) tarafından *in vitro* mutasyonlar sonucu elde edilen TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. Suşlar, Prof. Dr. Hülya Sivas (Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından hediye edilmiştir. Çalışmada TA98 suşu çerçeve kayması mutasyonlarını, TA100 suşu ise baz çifti değişimi mutasyonlarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Suşların genetik özellikleri Çizelge 2'de verilmiştir (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* suşlarının genetik özellikleri

Suşlar	Histidin Mutasyonu	LPS	Onarım	R Faktörü	Mutasyonun Niteliği	Belirlenecek Bileşik Sınıfları
TA98	*hisD3052*	*rfa*	*ΔuvrB*	pKM101	CG yanından - 1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA100	*hisG46*	*rfa*	*ΔuvrB*	pKM101	AT→GC transisyon	Baz çifti değişimine neden olan mutajenler

*LPS: Lipopolisakkarit, *Δ*: Delesyon

3.1.3. Kimyasal maddeler

Ekstraktlarının eldesinde çözücü olarak hekzan ($CH_3(CH_2)_4CH3$), diklorometan (CH_2CI_2) (Tekkim), kloroform ($CHCI_3$) (Kimetsan) ve aseton (Işık Kimya) kullanılmıştır. Ayrıca çalışmada dimetilsülfoksit (DMSO), sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), magnezyum klorür ($MgCl_2.6H_2O$), sodyum dihidrojen fosfat ($NaH_2PO_4.H_2O$) ve disodyum hidrojen fosfat ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (Merck), sodyum amonyum fosfat ($NaHNH_4(PO_4.4H_2O)$), glikoz, L-histidin, D-biyotin, glikoz-6-fosfat, sıçan karaciğeri S9 fraksiyonu (Sigma-Aldrich), magnezyum sülfat ($MgSO_4.7H_2O$), sitrik asit monohidrat, potasyum fosfat (K_2HPO_4), sodyum hidroksit (NaOH), nutrient broth (Oxoid) ve agar (Difco); pozitif kontrollerde ise 4-nitro-*o*-fenilendiamin (NPD) (Sigma-Aldrich), sodyum azid (SA, NaN_3) ve 2-aminofloren (2AF) (Merck) kullanılmıştır.

3.1.4. Besiyerleri ve stok çözeltiler

Histidin/Biyotin/Ampisilin (HBA) Agar: Master plakların hazırlanmasında ve ampisiline direnç testinde kullanılmıştır.

	500 ml için
Agar	7,5 g
Distile su	450 ml
50X VB tuz çözeltisi	10 ml
%20 Glikoz çözeltisi	50 ml
%0,5 Histidin çözeltisi	5 ml
0,5 mM Biyotin çözeltisi	3 ml
(%0,8/0,02 N NaOH) Ampisilin çözeltisi	1,575 ml

Bir litrelik erlen içerisine alınan agar ve su 121 °C'de 20 dk otoklavlanarak steril edilmiş ve otoklavdan çıkarılan karışım yaklaşık 45 °C'ye kadar soğutularak manyetik karıştırıcı üzerinde sırasıyla steril 50X VB tuz, glikoz, histidin, biyotin ve ampisilin çözeltileri eklenmiştir. Hacmi distile su ile 500 ml'ye tamamlanan karışım 25 ml/plak olacak şekilde petrilere paylaştırılmıştır.

Histidin/Biyotin (HB) Agar: Histidin gereksinimi kontrolünde kullanılmıştır.

	500 ml için
Agar	7,5 g
Distile su	420 ml
50X VB tuz çözeltisi	10 ml
%20 Glikoz çözeltisi	50 ml
%0,5 Histidin çözeltisi	5 ml
0,5 mM Biyotin çözeltisi	3 ml

Agar ve su karıştırılarak 121 °C'de 20 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan karışımın 50 °C'ye kadar soğuması beklenerek sırasıyla steril 50X

VB tuz, glikoz, histidin ve biyotin çözeltileri eklenmiştir. Karışımın son hacmi 500 ml'ye tamamlanmış ve 25 ml/plak olacak şekilde petrilere dökülmüştür.

Nutrient Agar (NA): Genotip kontrolünde (UV ve kristal viyole hassasiyeti) ve gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısının bulunmasında kullanılmıştır.

	500 ml için
Nutrient broth (Oxoid, No:2)	12,5 g
Agar	7,5 g
Distile su	500 ml

Nutrient broth ve agara distile su eklenerek karıştırılmış ve 121 °C'de 20 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Bir süre karışımın soğuması için beklendikten sonra 25 ml/plak olacak şekilde petrilere paylaştırılarak soğuduktan sonra +4 °C'de saklanmıştır.

Minimal Glikoz Agar (MGA): Histidin gereksinimi kontrolünde ve mutajenite deneylerinde kullanılmıştır.

	1000 ml için
Agar	15 g
Distile su	830 ml
50X VB tuz çözeltisi	20 ml
%20 Glikoz çözeltisi	100 ml

Agar ve distile su karıştırılıp otoklavlanarak steril edilmiştir. Bir süre soğuması için beklendikten sonra 50X VB tuz ve glikoz çözeltileri eklenerek karışım 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Karışım 40-45 °C'ye ulaştığında 25 ml/plak olacak şekilde petrilere dökülmüştür.

Top (Üst) Agar: Mutajenite çalışmalarında kullanılmıştır.

	1000 ml için
Agar (Difco)	6 g
Sodyum klorür (NaCl)	5 g
Distile su	1000 ml

Agar ve NaCl distile suya ilave edilerek manyetik karıştırıcı üzerinde iyice çözülmüştür. Homojen hale gelen karışım 2 ml olacak şekilde cam tüplere aktarılmış ve otoklavda steril hale getirilmiştir. Otoklavdan çıkarılan tüpler su banyosuna (43 °C) alınmıştır.

Nutrient Broth (NB): Gecelik kültürlerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

	200 ml için
Nutrient broth (Oxoid, No:2)	5 g
Distile su	200 ml

Distile suya nutrient broth eklenerek manyetik karıştırıcıda ısıtılarak çözünmesi sağlanmış ve karışım 50 ml'lik erlenlere 20'şer ml paylaştırılarak otoklavda steril edilmiştir.

Vogel-Bonner E (50X VB) Tuz Çözeltisi: MGA, HB ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

	1000 ml için
Distile su (45 ^{O}C)	670 ml
Magnezyum sülfat ($MgSO_4.7H_2O$)	10 g
Sitrik asit monohidrat	100 g
Potasyum fosfat (K_2HPO_4)	500 g
Sodyum amonyum fosfat ($NaHNH_4(PO_4.4H_2O)$)	175 g

Kimyasallar manyetik karıştırıcı üzerindeki ılık distile suya sırasıyla ilave edilmiştir. Kimyasalların her biri tamamen çözündükten sonra karışım 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 20 dk otoklavlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

%20 Glikoz Çözeltisi: MGA, HB ve HBA plaklarının hazırlanmasında karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

	100 ml için
Glikoz	20 g
Distile su	100 ml

Glikoz distile suda iyice çözülerek otoklavda steril edilmiş ve +4 °C'de saklanmıştır.

%0,5 Histidin Çözeltisi: HB ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

	100 ml için
L-Histidin	0,5 g
Distile su	100 ml

Histidin distile suda çözülerek 0,22 µm çaplı membran filtre ile steril edilip +4 °C'de saklanmıştır.

0,5 mM Biyotin Çözeltisi: HB ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

	100 ml için
D-Biyotin (MA 244,3 g/mol)	0,01 g
Distile su	100 ml

Biyotin, manyetik karıştırıcı üzerinde kaynama noktasına kadar ısıtılan distile su içerisinde çözülerek 0,22 µm çaplı membran filtre ile steril edilmiş ve +4 °C'de saklanmıştır.

0,02 N NaOH Çözeltisi: Ampisilin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

	100 ml için
Sodyum hidroksit (NaOH) (MA 40 g/mol)	0,08 g
Distile su	100 ml

NaOH bir miktar suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

(%0,8/0,02 N NaOH) Ampisilin Çözeltisi: pKM101 plazmidi varlığının kontrolünde ve HBA (master) plakların hazırlanmasında kullanılmıştır.

	100 ml için
Ampisilin trihidrat	0,8 g
0,02 N NaOH	100 ml

Ampisilin trihidrat 0,02 N NaOH içinde çözülerek 0,22 µm çaplı membran filtre ile steril edilmiş ve cam şişe içerisinde +4 °C'de saklanmıştır.

0,5 mM Histidin/Biyotin Çözeltisi: Histidin gereksinimi kontrolü için kullanılmıştır.

	500 ml için
D-Biyotin (MA 244,3 g/mol)	0,062 g
L-Histidin.HCl (MA 191,7 g/mol)	0,048 g
Distile su	500 ml

Manyetik karıştırıcıda kaynama noktasına kadar ısıtılan distile suya biyotin eklenerek tamamen çözündükten sonra histidin eklenmiştir. Sterilizasyon için 0,2 µm çaplı membran filtre kullanılmış ve çözelti +4 °C'de saklanmıştır.

%0,1 Kristal Viyole Çözeltisi: *rfa* mutasyonu kontrolünde kullanılmıştır.

	100 ml için
Kristal viyole	0,1 g
Distile su	100 ml

Kristal viyole distile suya eklenerek iyice karıştırılmış ve koyu renkli cam şişede +4 °C'de saklanmıştır.

%0,9 Tuz Çözeltisi (Serum Fizyolojik): Bakteri kültürlerini seyreltmek amacıyla kullanılmıştır.

	500 ml için
NaCl	4,5 g
Distile su	500 ml

Çözelti hazırlandıktan sonra otoklavlanarak steril edilmiştir.

0,1 µg/µl 4-Nitro-*o*-fenilendiamin (NPD): S9 yokluğunda pozitif kontrol olarak TA98 suşu için kullanılmıştır.

	10 ml için
NPD	1 mg
Dimetilsülfoksit (DMSO)	10 ml

NPD, DMSO'da çözülüp 0,2 µm çaplı membran filtre ile steril edilmiştir. Deneylerde 10 µg/plak olacak şekilde kullanılmıştır.

0,01 µg/µl Sodyum Azid (SA): S9 yokluğunda pozitif kontrol olarak TA100 suşu için kullanılmıştır.

	10 ml için
SA (NaN_3)	0,1 mg
Distile su	10 ml

NaN_3, distile suda çözülüp 0,2 µm çaplı membran filtre ile steril edilmiştir. Deneylerde 1 µg/plak olacak şekilde kullanılmıştır.

0,05 µg/µl 2-Aminofloren (2AF): S9 varlığında pozitif kontrol olarak her iki suş için de kullanılmıştır.

	10 ml için
2AF	0,5 mg
DMSO	10 ml

2AF, DMSO'da çözülüp 0,2 µm çaplı membran filtre ile steril edilmiştir. +4 °C'de saklanan madde, 5 µg/plak olacak şekilde kullanılmıştır.

0,2 M Sodyum-Fosfat Tamponu (pH=7,4): S9 karışımında kullanılmıştır.

	250 ml için
0,2 M Sodyum dihidrojen fosfat ($NaH_2PO_4.H_2O$) (6,9 g/250 ml) (MA 137,99 g/mol)	30 ml
0,2 M Disodyum hidrojen fosfat ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (8,9 g/250 ml) (MA 177,99 g/mol)	220 ml

Ayrı ayrı hazırlanan iki çözelti, kapaklı cam şişede karıştırılmıştır. pH'ı 7,4'e ayarlanan karışım otoklavlanarak steril hale getirilmiştir.

0,1 M β-NADP Çözeltisi: S9 karışımında kullanılmıştır.

	5 ml için
β-NADP (MA 765,4 g/mol)	0,383 g
Steril distile su	5 ml

β-NADP suda çözülerek 0,2 µm çaplı membran filtrede steril edilmiştir.

1 M Glikoz-6-Fosfat Çözeltisi: S9 karışımında kullanılmıştır.

	5 ml için
Glikoz-6-fosfat (MA 260,13 g/mol)	1,3 g
Steril distile su	5 ml

Glikoz-6-fosfat suda çözülerek 0,2 µm çaplı membran filtrede steril edilmiştir.

Tuz Çözeltisi (0,4 M $MgCl_2$+1,65 M KCl): S9 karışımında kullanılmıştır.

	50 ml için
Magnezyum klorür ($MgCl_2.6H_2O$) (MA 203,3 g/mol)	4,07 g
Potasyum klorür (KCl) (MA 74,55 g/mol)	6,15 g
Distile su	50 ml

S9 Karışımı (Sıçan Karaciğeri Mikrozomal Enzimleri+Kofaktörleri): Mutajenite deneylerinde metabolik aktivasyon amacıyla kullanılmıştır.

	50 ml için
Steril distile su	19,75 ml
0,2 M Sodyum-fosfat tamponu (pH=7,4)	25 ml
0,1 M β-NADP çözeltisi	2 ml
1 M Glikoz-6-fosfat çözeltisi	0,25 ml
$MgCl_2$-KCl tuz çözeltisi	1 ml
Sıçan karaciğeri S9 fraksiyonu	2 ml

Distile suya tampon ve çözeltiler yazıldıkları sıraya göre ilave edilmiştir. S9 fraksiyonu, karışıma en son eklenmiştir. S9 karışımı çalışmalara başlamadan hemen önce taze olarak hazırlanmış ve deney boyunca buz içinde tutulmuştur.

3.2. Yöntem

Çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* bakterisinin TA98 ve TA100 suşlarının master plak ve stok kültürlerinin hazırlanması, genetik özelliklerinin kontrolü ve mutajenite çalışmaları Maron ve Ames (1983) tarafından geliştirilen plak inkorporasyon metodu ile yapılmıştır.

3.2.1. Su örneklerinin ekstraksiyonu

Belirlenen noktalardan 2 Eylül 2012 tarihinde alınan 5'er litre su örneği laboratuvara getirilerek süzülmüş ve +4 °C'de saklanmıştır. Su örnekleri, her 500 ml için 25 ml hekzan eklenerek bir süre hızlıca çalkalanmıştır. Birbirine karışan sıvılar ayırma hunisine alınarak faz oluşuncaya kadar beklenmiş ve farklı şişelere alınmıştır. Bu işlem her 500 ml su örneği için ikişer kez tekrarlanmış ve hekzan temiz bir cam şişede saklanmıştır. Bütün istasyonlardan alınan örnekler hekzan ile muamele edildikten sonra aynı işlemler sırasıyla kloroform ve diklorometan ile de tekrarlanmıştır.

Su örneklerinin çözücülerle muamelesi bittikten sonra elde edilen fraksiyonlar 35-40 °C'ye ayarlanmış rotary evaporatör (Spektral, Heidolph, Laborota 4001; Şekil 4) ve su banyosunda uçurulmuştur. Steril eppendorf tüplere alınan ekstraktlar dimetilsülfoksitte (DMSO) çözülerek çalışma için hazır hale getirilmiş ve +4 °C'de saklanmıştır (Singh ve ark., 1987).



Şekil 4. Su örnekleri ekstraktlarının elde edilmesinde kullanılan evaporatör.

3.2.2. Sediment örneklerinin ekstraksiyonu

Belirlenen noktalardan 2 Eylül 2012 tarihinde alınan sediment örnekleri steril petrilerde +60 °C'de etüvde kurutularak porselen havanda toz haline getirilmiştir. Örneklerden 0,1 g tartılarak steril eppendorf tüplere alınmış ve üzerlerine 1 ml hekzan, kloroform, aseton (1:1:1 v:v:v) karışımı eklenerek vortekslenmiştir. Daha sonra soğutmalı santrifüjde (Hettich, Universal 320R) 10 dk +4 °C'de 6700 rpm'de santrifüjlenmiştir. Elde

edilen süpernatant ayrı bir steril tüpe alınarak örneklerin üzerine tekrar karışımdan 1'er ml ilave edilip aynı işlem toplam üç kez tekrarlanmıştır. Elde edilen süpernatantların organik solventi su banyosunda +40 °C'de uçurulmuştur. Ekstraktlar DMSO'da çözülerek Ames testinde uygulanmaya hazır hale getirilmiş ve +4 °C'de kullanılıncaya kadar saklanmıştır (Keijzer ve ark., 2000).

3.2.3. Test suşlarının genetik özelliklerinin kontrol edilmesi

Çalışmada kullanılan mutant bakterilerin genetik kontrolü testin güvenilirliği açısından önem taşımaktadır. Bu sebeple suşların orjinal mutasyonları taşıyıp taşımadıkları aşağıda belirtilen testlerle sürekli olarak kontrol edilmiştir.

3.2.3.1. Histidin gereksinimi

Çalışmada kullanılacak olan suşların histidin oksotrofu (his^-) olduğunu belirlemek amacıyla 12-16 saatlik nutrient broth (NB)'da üretilen taze kültürden minimal glikoz agar (MGA) ve histidin/biyotin (HB) agar plaklarına çizgi ekim yapılarak 37 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3.2. *rfa* mutasyonu kontrolü

Bu mutasyon, hücre zarının geçirgenliğini arttırmak için oluşturulmuştur. Test suşlarının *rfa* taşıyıp taşımadıklarını kontrol etmek amacıyla kristal viyole hassasiyeti testi kullanılmıştır. Bu amaçla, 12-16 saatlik gecelik kültürü hazırlanan bakterilerden nutrient agar (NA) plaklarına mikropipet yardımıyla 100 µl ekilmiştir. Plağın ortasına 0,5 cm çaplı steril filtre kağıdı disklerden bir adet yerleştirilerek üzerine %0,1'lik kristal viyole çözeltisinden 10 µl emdirilmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılan plaklarda, sürenin sonunda disklerin çevresinde şeffaf inhibisyon zonu oluşup oluşmadığı gözlenmiştir.

3.2.3.3. *uvrB* mutasyonu kontrolü

Bu mutasyon, bakterilerde UV ışığının sebep olduğu replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan DNA onarım mekanizmasını engellemiştir. Mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Testte bakteriler NA plaklarına öze ile paralel çizgiler halinde ekilmiştir. Yarısı çizgi ekimleri kesecek şekilde plastik bir tabaka ile kapatılan plaklar, 30 watt'lık germisidal UV lambasına 33 cm yükseklikten 8 sn boyunca maruz bırakılmış ve 37 ºC'de 24 saat inkübe edilmiştir.

3.2.3.4. R faktörü kontrolü

Bakterilerin içerdiği ampisilin direnç faktörünü (R faktör) taşıyan pKM101 plazmidlerinin korunup korunmadıkları R faktörü kontrolü ile tespit edilmiştir. Bu testte bakteriler HBA plaklarına ekilerek 37 ºC'de 24 saat inkübe edilmiştir.

3.2.4. Test suşlarının master plaklarının hazırlanması

Bakteri kültürlerinden HBA plaklarına çizgi ekim yapılarak 37 ºC'de 48 saat inkübe edilmiştir. Sonuç olarak, iyi izole olmuş ve normal büyüklüğe sahip bir koloni öze ile alınıp 6,3 µl ampisilin çözeltisi içeren 2 ml NB ortamına ekilerek 37 ºC'de 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanan gecelik kültürden tekrar HBA plaklarına ekim yapılarak 37 ºC'de 48 saat inkübe edilmiş ve master plaklar +4 ºC'de saklanmıştır.

3.2.5. Test suşlarının uzun süre saklanması ve stok kültürlerinin açılması

Bakteriler, genetik özelliklerinin uzun süre korunabilmesi için -80 °C'de saklanmıştır. Test suşları bunun için genetik kontrolleri yapılarak HBA plaklarına ekilmiş ve iyi izole olmuş normal büyüklükteki bir koloniden seçilmiştir. Koloni öze yardımıyla alınarak 2 ml NB içerisine ekilmiştir. Suşların ampisiline direnç özelliklerinin kaybolmaması için NB içerisine 63 µl ampisilin çözeltisi eklenmiştir. 37 ºC'de 12 saat inkübe edilen gecelik kültürden 0,9 ml alınarak 0,1 ml DMSO içeren steril eppendorf tüplere eklenmiştir. Sıvı azotta bekletilen tüpler, -80 °C'de saklanmıştır.

Stok kültürler açılırken öncelikle -80 °C'deki bakteri kültürlerinin oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Öze yardımıyla hızlıca NB ortamına ekilen bakteriler, 37 °C'de 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra öze ile HBA plaklarına ekilen bakteriler 37 °C'de 48 saat inkübe edilerek iyi izole olmuş bir koloni gecelik kültüre ekilmiştir. Son olarak 37 °C'de 12 saat inkübe edilen bakterilerden tekrar HBA plaklarına ekim yapılmıştır.

3.2.6. Test suşlarının gecelik kültürlerinin hazırlanması

Gecelik kültürler, genetik kontrolleri yapılarak hazırlanan master plaklardan ya da -80 °C'de saklanmış kalıcı kültürlerden hazırlanmıştır. Öze yardımıyla iyi izole olmuş bir koloniden ya da sıvı ortamdan alınan bakteriler 63 µl ampisilin çözeltisi içeren 20 ml NB'ye ekilmiş ve 37 °C'de 140 rpm'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra bu ortamdan 0,5 ml alınarak taze ortama aktarılan bakteriler 37 ºC'de 110 rpm'de 6 saat

inkübe edilmiştir (Akın, 2010). Çalışma için yaklaşık 1-2x10^9 koloni oluşturan birim (kob)/ml yoğunluğa sahip bakteri kültürleri kullanılmıştır.

3.2.7. Sıvı kültürün ml'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi

Test suşlarının gecelik kültürlerindeki bakteri miktarı, spektrofotometre (OD_{540} ~ 0,1-0,2) ve buna paralel olarak yapılan seri sulandırma ekimleri ile belirlenmiştir. Bakteri yoğunluğunun seyreltilmesi için 10^{-1}-10^{-7} arasında %0,9 serum fizyolojik çözeltisi ile seyreltme yapılmıştır. Her seyreltmeden 0,l ml alınıp 43 ºC'de tutulan 2 ml top agara ilave edilerek yavaşça karıştırıldıktan sonra NA plaklarına dökülmüştür. Plaklar 37 ºC'de 24 saat inkübe edildikten sonra koloniler sayılmış ve aşağıdaki formüle göre ml'deki canlı bakteri sayısı tespit edilmiştir.

Canlı hücre sayısı (kob/ml) = sulandırma faktörü x plaktaki koloni sayısı x 10

3.2.8. Ekstraktların sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Mutajenite çalışmalarına başlamadan önce, su ve sediment ekstraktlarının sitotoksik etkisi ön çalışma ile belirlenmiştir. Bu ön çalışmada 5 ayrı konsantrasyon (10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}) hazırlanmış ve 2 ml'lik top agar içeren tüplere 100'er µl konularak üzerlerine 100 µl bakteri kültürü eklenmiştir. Daha sonra tüpler vortekslenerek NA plaklarına dökülmüş ve 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda oluşan koloniler spontan kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik etkinin olup olmadığı belirlenmiştir.

3.2.9. Testin yapılışı

Çalışmada S9 karışımı kullanılarak ve kullanılmaksızın iki tip deney yapılmıştır. S9 kullanılarak yapılan deneyde 43 °C'de su banyosunda tutulan, 222 µl histidin-biyotin çözeltisi eklenmiş top agara 500 µl S9 karışımı, 100 µl su veya sediment ekstraktı ve 100 µl bakteri kültürü ilave edilerek MGA plaklarına dökülmüştür. S9 kullanılmaksızın yapılan deneyde ise top agara 500 µl sodyum-fosfat tamponu, 100 µl su veya sediment ekstraktı ve 100 µl bakteri kültürü eklenerek MGA plaklarına dökülmüştür. Bu plaklar 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda geri dönen bakteri kolonileri (his^+ revertantlar) sayılmıştır. Çalışmada her konsantrasyon için üç ayrı plağa ekim yapılırken çalışmalar birbirinden bağımsız iki deney şeklinde uygulanmıştır.

Pozitif kontrol olarak S9 yokluğunda *S. typhimurium* TA98 suşu için 4-nitro-*o*-fenilendiamin (NPD) ve TA100 suşu için sodyum azid (SA, NaN_3) kullanılırken S9 varlığında her iki suş için 2-aminofloren (2AF) kullanılmıştır. Negatif kontrolde her iki

suş için ise dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılmıştır. Spontan kontrol ise bakteri suşlarının kendiliğinden dönen (revertant) koloni miktarını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Pozitif, negatif ve spontan kontroller mutajenite testine benzer şekilde uygulanmış; pozitif kontrolde kullanılan mutajen maddeler ve negatif kontrolde kullanılan DMSO, 100 µl miktarında top agara ilave edilerek plaklara dökülmüştür.

3.2.10. Spontan kontrol (kendiliğinden geri dönen koloni sayısı)

Spontan kontrolde, 43 °C'de tutulan 2 ml top agara sırasıyla 222 µL HB çözeltisi, 500 µl sodyum-fosfat tamponu ya da S9 karışımı ve 100 µl bakteri kültürü eklenip yavaşça karıştırılarak MGA plaklarına dökülmüştür. Plaklar, 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda geri dönen bakteri kolonileri (his^+ revertantlar) sayılmıştır.

3.2.11. Sonuçların değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan su ve sediment ekstraktlarının mutajenik aktiviteye sahip olup olmadığı negatif kontrolle karşılaştırılarak belirlenmiştir. Ekstraktlar uygulandığında geri dönen koloni sayısının negatif kontrole oranla iki katı ve daha üstü olması durumunda mutajenitenin var olduğu söylenebilmektedir. Konsantrasyona bağlı olarak koloni sayısında bir artış gözlenmesi durumunda ise, zayıf mutajenik aktiviteden bahsedilmektedir (Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Çalışma sonunda elde edilen verilerin ortalamaları alınarak standart sapmaları hesaplanmıştır.

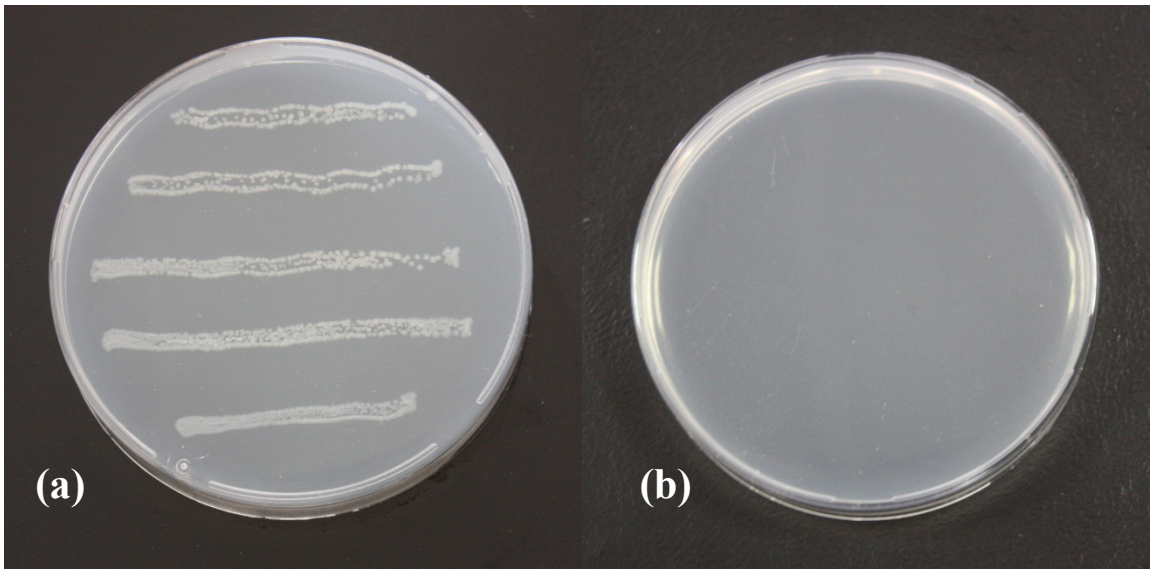
BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Test Suşlarının Genetik Özelliklerinin Kontrolü

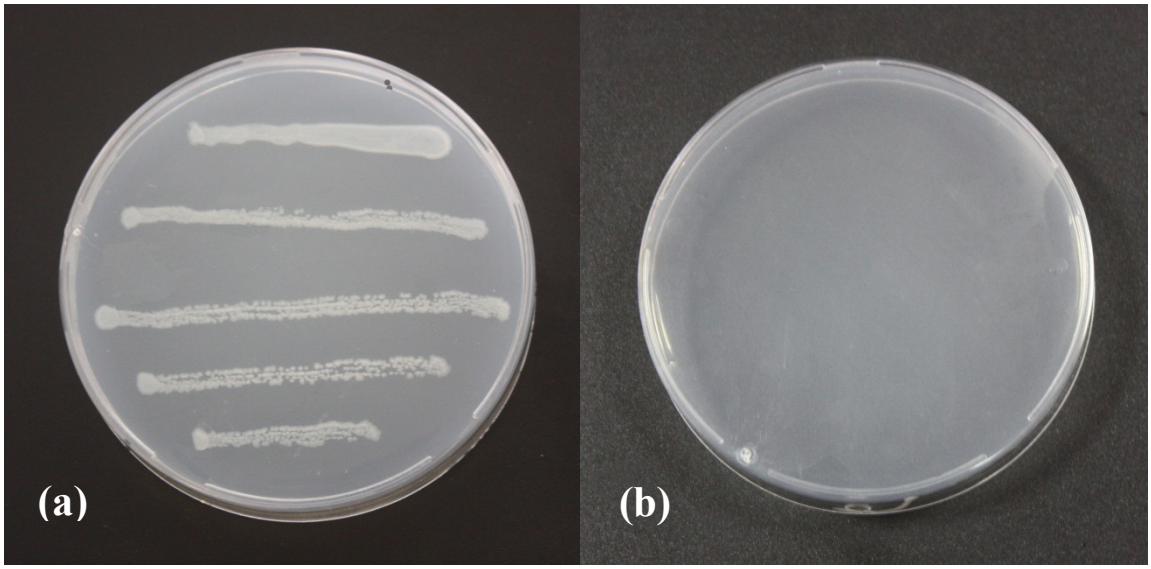
Deneylerde kullanılan bakteri suşlarının orjinal genetik özelliklere sahip olup olmadıkları her deneyde kontrol edilmiştir. *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının aşağıda belirtilen genetik kontrollerin sonuçlarına bakılarak mutajenite çalışmaları için uygun olduğu gözlenmiştir.

4.1.1. Histidin gereksinimi

S. typhimurium TA98 ve TA100 suşları, histidin/biyotin agar (HB) ve biyotin içeren minimal glikoz agar (MGA) plaklarına ekilmiştir. Her iki suş HB plaklarında üreme gösterirken, MGA plaklarında üremeyiş ve bu durum suşların his^- özellikte olduğunu doğrulamıştır (Şekil 5 ve 6).



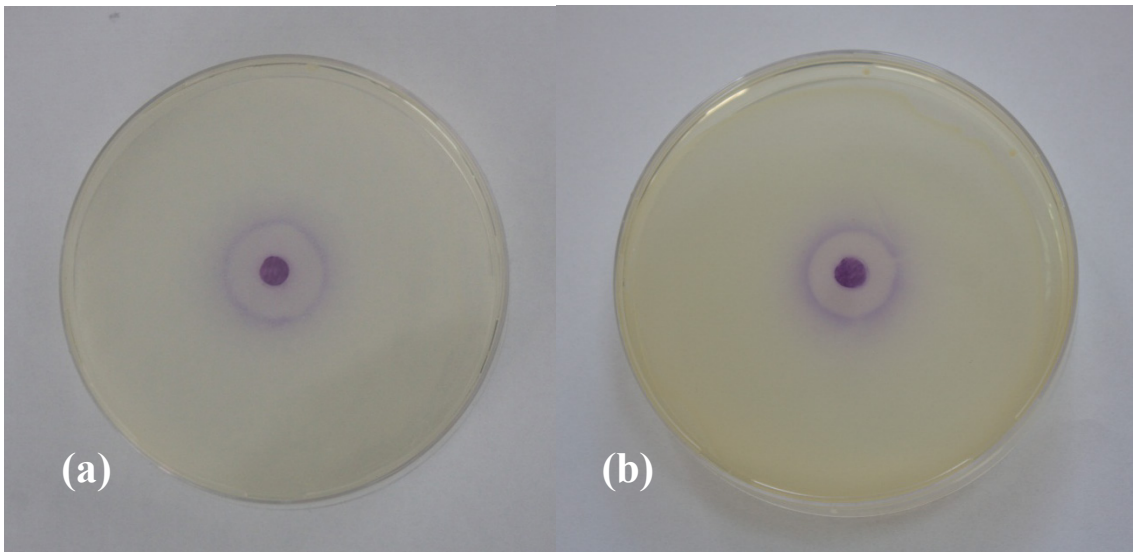
Şekil 5. *S. typhimurium* TA98 suşunun (a) HB ve (b) MGA plaklarında üreme durumu.



Şekil 6. *S. typhimurium* TA100 suşunun (a) HB ve (b) MGA plaklarında üreme durumu.

4.1.2. *rfa* mutasyonu

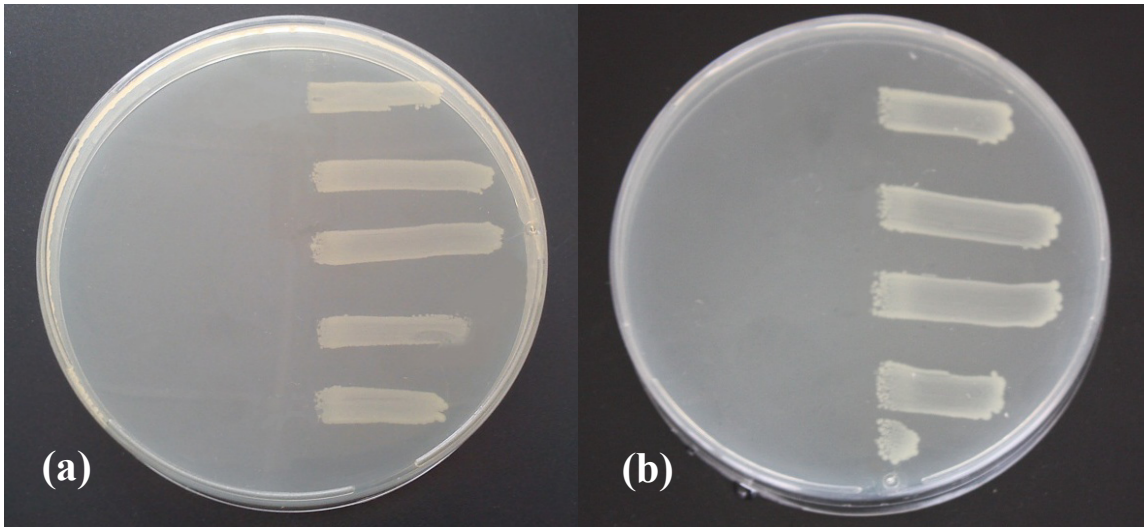
S. typhimurium TA98 ve TA100 suşlarına kristal viyole hassasiyeti testi uygulanmıştır. Test sonucunda, kristal viyole çözeltisi emdirilmiş disklerin etrafında yaklaşık olarak 14 mm olarak gözlenen şeffaf zon, normalde hücre duvarından geçemeyecek büyüklükteki boya moleküllerinin *rfa* mutasyonu taşıyan bakteri hücresine girmesi sonucu oluşarak mutasyonun varlığını kanıtlamaktadır (Şekil 7).



Şekil 7. *S. typhimurium* (a) TA98 ve (b) TA100 suşlarına uygulanan kristal viyole hassasiyeti testi sonuçları.

4.1.3. *uvrB* mutasyonu

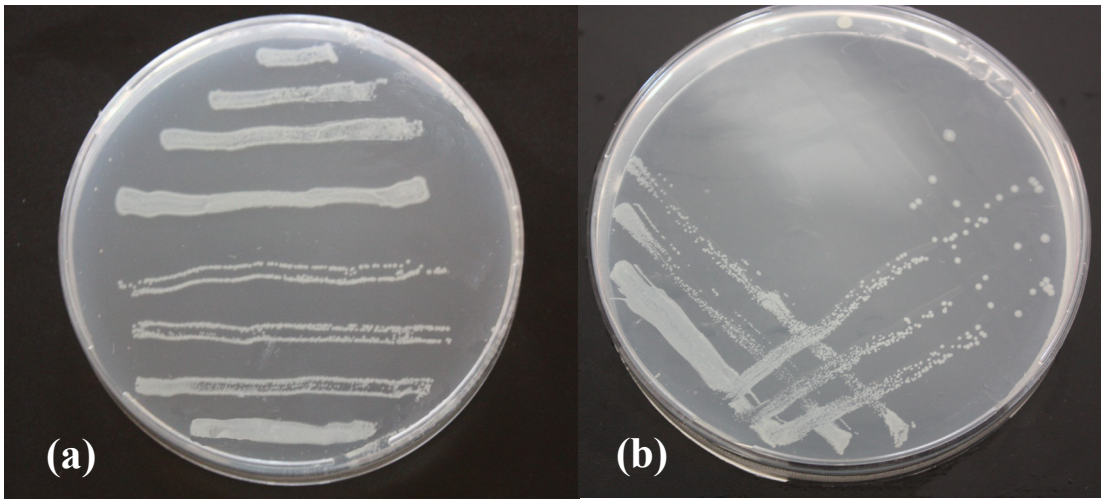
S. typhimurium TA98 ve TA100 suşlarına ultraviyole hassasiyeti testi uygulanmıştır. Test sonucunda suşların UV'ye maruz kalan kısımda üremedikleri, korunan kısmında üredikleri görülmüş, böylece suşların *uvrB* delesyonu taşıdıkları ispatlanmıştır (Şekil 8).



Şekil 8. *S. typhimurium* (a) TA98 ve (b) TA100 suşlarına uygulanan ultraviyole hassasiyeti testi sonuçları.

4.1.4. R faktörü

Test suşlarında ampisilin direnç geni taşıyan pKM101 plazmidlerinin varlığı, bakterilerin histidin/biyotin/ampisilin (HBA) plaklarında üremeleri sonucu kanıtlanmıştır (Şekil 9).



Şekil 9. *S. typhimurium* (a) TA98 ve (b) TA100 suşlarının HBA plaklarında üremesi.

4.2. Mutajenik Aktivite Sonuçları

Bu çalışmada, Tunca Nehri'nin su ve sedimentinin potansiyel mutajenik aktiviteleri standart plak inkorporasyon metoduna dayalı Ames (*Salmonella*/mikrozom) test sistemi ile araştırılmıştır (Maron ve Ames, 1983). Test, gelişmek için histidin amino asidine ihtiyaç duyan suşların, kullanılan test maddesi ile tekrar histidin sentezleyebilir hale dönüşmesi temeline dayanmaktadır. Bu amaçla su örneklerinin herbiri için hekzan, kloroform ve diklorometan ekstraktları; sediment örnekleri için ise hekzan, kloroform, aseton (1:1:1 v:v:v) karışımı ile ekstrakt hazırlanmış ve her ekstrakt için 5'er konsantrasyon (10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}) test edilmiştir. Her konsantrasyon üç ayrı plağa ekilerek çalışmalar birbirinden bağımsız iki deney şeklinde uygulanmıştır. Deneyler, *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ile S9 (+) ve S9 (-) olarak yapılmış ve çalışmalara paralel olarak pozitif, negatif ve spontan kontroller uygulanmıştır. Pozitif kontrolde S9 yokluğunda TA98 suşu için 4-nitro-*o*-fenilendiamin (NPD), TA100 suşu için ise sodyum azid (SA) ve S9 varlığında her iki suş için de 2-aminofloren (2AF) kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak NPD 10 µg/plak, SA (NaN_3) 1 µg/plak ve 2AF 5 µg/plak olacak şekilde uygulanmıştır. Negatif kontrolde ekstraktları çözmek için kullanılan DMSO kullanılmıştır.

Deneylerde histidin sentezleyemeyen oksotrof suşlar (*S. typhimurium* TA98 ve TA100) kullanılmış olup, bu suşların histidini tekrar sentezleyebilir hale gelmesini sağlayan su ve sediment örneklerinin ekstraktları ve konsantrasyonları belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun değerlendirilmesi için, histidini yeniden sentezleyebilen (his^+ revertant) kolonilerin sayısı ile negatif kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Negatif kontrolde gözlenen koloni sayısını 2 katına çıkaran örnek, mutajenik sayılmıştır. Geriye dönen bakteri sayısında konsantrasyona bağlı bir artış olduğunda ise, bu durum zayıf mutajenik etki olarak kabul edilmiştir. Ayrıca her deney suşu karakteristik olarak spontan geriye dönüş mutasyonu taşımaktadır. TA 98 için spontan geriye dönüş sıklığı 20-50 koloni/plak, TA100 için ise 75-200 koloni/plak'tır (Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinin hekzan ekstraktı ile *S. typhimurium* TA98 suşunun kullanıldığı ve S9 yokluğunda yapılan deneylerde, 1. istasyonda 10^{-1} konsantrasyonda revertant koloni sayısında artış gözlenmiştir. Fakat koloni sayısı negatif kontrolde elde edilen (24±3,50) sayının 2 katına ulaşmadığı için (30±3,79) bölgede potansiyel bir mutajenik aktiviteden bahsedilebilmektedir (Şekil 14). Aynı örneklerle S9 varlığında yapılan çalışmalarda da, negatif kontrole (28±5,98) göre 2. istasyonda 10^0 konsantrasyonda (40±3,51) ve 4. İstasyonda 10^{-1} konsantrasyonda (37±6,11) revertant

koloni sayısında artış görülmüştür (Şekil 15). Hekzan ekstraktı ile *S. typhimurium* TA100 suşuyla S9 yokluğunda yapılan deneylerde herhangi bir mutajenik etki görülmemiştir (Şekil 16). Bu suş ile S9 varlığında yapılan çalışmalarda ise negatif kontrolle (144±34,76) karşılaştırıldığında 2. istasyonda 10^0 konsantrasyonda (209±33,08) revertant koloni sayısındaki artışa bakılarak potansiyel mutajenik etki belirlenmiştir (Çizelge 3 ve Şekil 17).

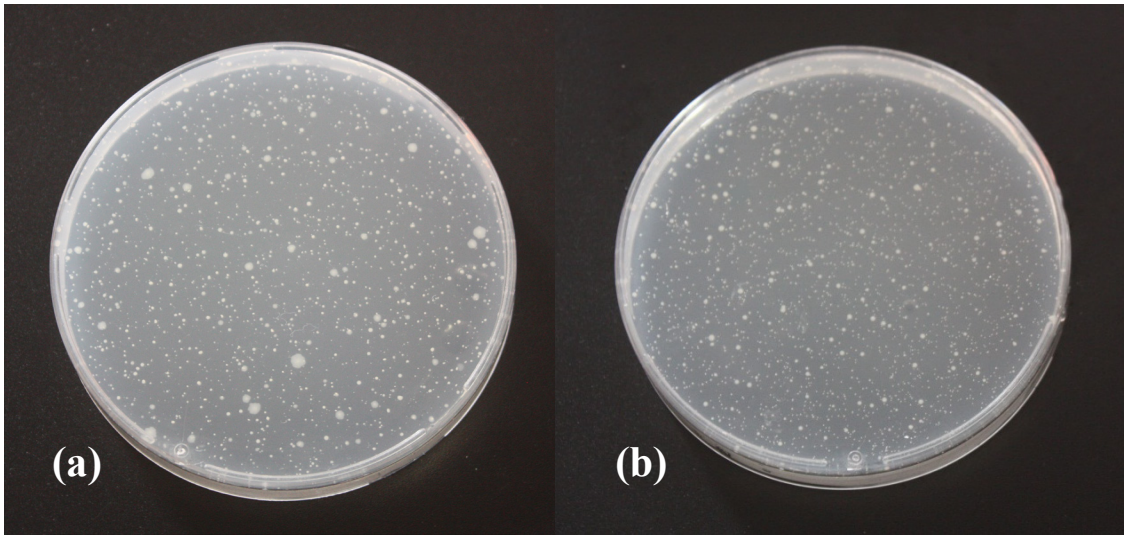
Su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktı ile *S. typhimurium* TA98 suşunun kullanıldığı, S9 yokluğunda yapılan deneylerde 2. istasyonun 10^0 konsantrasyonunda (42±3,21) ve 3. istasyonun 10^0 konsantrasyonunda (44±7,02) revertant koloni sayısında artış gözlenmiştir. Fakat bu değerler negatif kontrolde (24±3,50) elde edilen değerin 2 katına ulaşmadığından zayıf mutajenik etki bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 18). Bu suş ile S9 varlığında yapılan deneylerde yine 2. ve 3. istasyonların 10^0 konsantrasyonunda elde edilen revertant koloni sayılarında (43±1,53 ve 47±4,51) negatif kontrole (28±5,98) göre artış görüldüğünden potansiyel mutajenik etkinin varlığı belirlenmiştir. 4. istasyonda ise revertant koloni sayısı 53±5,69 olup mutajenik etki tespit edilmiştir (Şekil 19). Kloroform ekstraktının ve *S. typhimurium* TA100 suşunun kullanıldığı çalışmalardan S9 yokluğunda alınan sonuçlar negatif kontrolle (135±21,06) karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlara göre 1. ve 2. istasyonların 10^0 konsantrasyonunda sırasıyla elde edilen 199±30,02 ve 249±26,41 değerleri zayıf mutajenik etkiye işaret ederken; 3. ve 4. istasyonların 10^0 konsantrasyonunda elde edilen 412±46,00 ve 308±31,72 değerleri negatif kontrolde elde edilen ortalama değerin 2 katından fazla olduğu için mutajenik etki belirlenmiştir (Şekil 20). Bu suş ile S9 varlığında yapılan deneylerde ise 2., 3. ve 4. istasyonların 10^0 konsantrasyonunda sırasıyla elde edilen revertant koloni sayıları 278±46,16; 315±25,78 ve 384±45,62 olarak bulunmuştur. Negatif kontrolle (144±34,76) karşılaştırıldığında bu değerlerin mutajenik etki gösterdiği anlaşılmıştır (Çizelge 4 ve Şekil 21).

Su örneklerinden elde edilen DCM (diklorometan) ekstraktı ve *S. typhimurium* TA98 suşu ile S9 yokluğunda yapılan deneylerde 1. ve 3. istasyonların 10^0 konsantrasyonunda zayıf mutajenik etkiye rastlanırken (Şekil 22), bu suş ile S9 varlığında yapılan deneylerde mutajenik aktivite görülmemiştir (Şekil 23). DCM ekstraktının *S. typhimurium* TA100 suşu kullanılarak araştırıldığı çalışmalarda S9 yokluğunda yapılan deneylerde negatif kontrol değeri 135±21,06 olarak bulunmuştur. Bu değerle karşılaştırıldığında 1. istasyonun 10^0 konsantrasyonu (321±13,80), 2. istasyonun 10^0 konsantrasyonu (297±25,93) ve 3. istasyonun 10^0 konsantrasyonu (303±17,04) mutajenik etki gösterirken 4. istasyonun 10^0

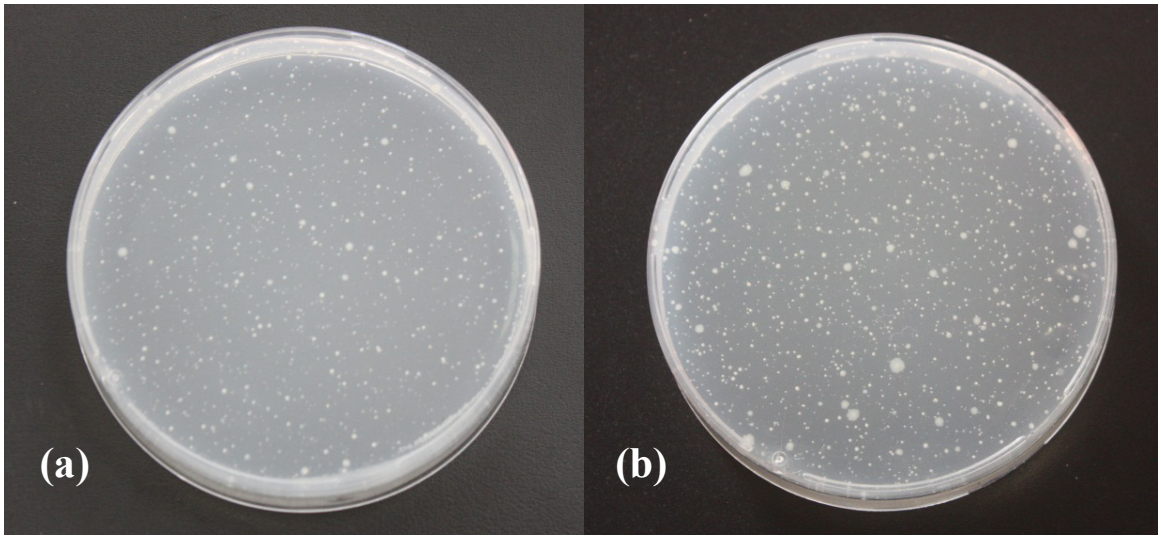
konsantrasyonunda (200±20,21) zayıf mutajenik etki belirlenmiştir (Şekil 24). *S. typhimurium* TA100 suşu ile S9 varlığında yapılan çalışmalarda negatif kontrol değeri 144±34,76 olarak bulunmuştur. Bu değerle karşılaştırıldığında 1. istasyonun 10^0 konsantrasyonunda elde edilen 282±34,27 değeri mutajen etkiye işaret ederken, 3. ve 4. istasyonlarda konsantrasyon artışına bağlı olarak revertant koloni sayısındaki artışa bakılarak zayıf mutajenite tespit edilmiştir (Çizelge 5 ve Şekil 25).

Tunca Nehri'nden alınan sediment örneklerinin *S. typhimurium* TA98 suşu ile S9 yokluğunda araştırıldığı çalışmalarda, 2. istasyonun 10^0 konsantrasyonunda elde edilen 29±3,00 değeri zayıf mutajenik aktivite göstermiştir (Şekil 26). Bu örneklerin S9 varlığında araştırıldığı çalışmalarda mutajenik etkiye rastlanmamıştır (Şekil 27). Sediment örneklerinin *S. typhimurium* TA100 suşu ile S9 yokluğunda araştırıldığı çalışmalarda negatif kontrol değeri 135±21,06 olarak bulunmuştur. Bu değerle karşılaştırılan 3. ve 4. istasyonlarda elde edilen 261±28,68 ve 283±18,15 revertant koloni değerlerinde mutajenik etki tespit edilmiştir (Şekil 28). S9 varlığında yapılan deneylerde ise 1. istasyonda zayıf mutajenik etki görülürken 3. istasyonun 10^0 konsantrasyonunda elde edilen 280±42,12 sonucu ile mutajenik aktivitenin olduğu görülmüştür (Çizelge 6 ve Şekil 29).

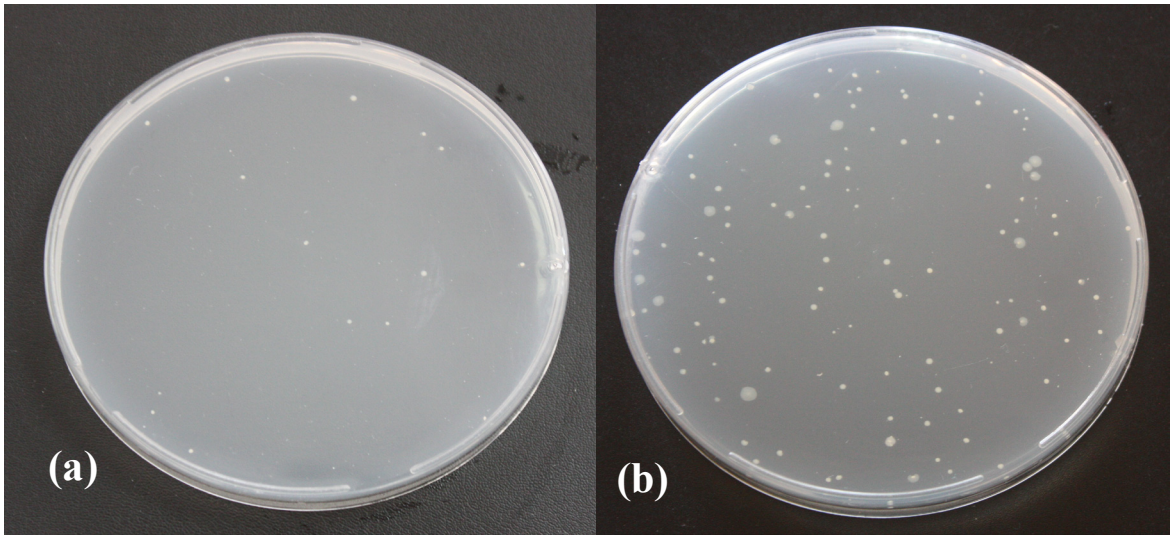
Deneylere paralel olarak yürütülen pozitif, negatif ve spontan kontrollerde gözlenen revertant bakteri sayısı, daha önce yapılan çalışmalara ve literatüre uygunluk göstermiştir (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000) (Çizelge 3, 4, 5, 6 ve Şekil 10, 11, 12, 13).



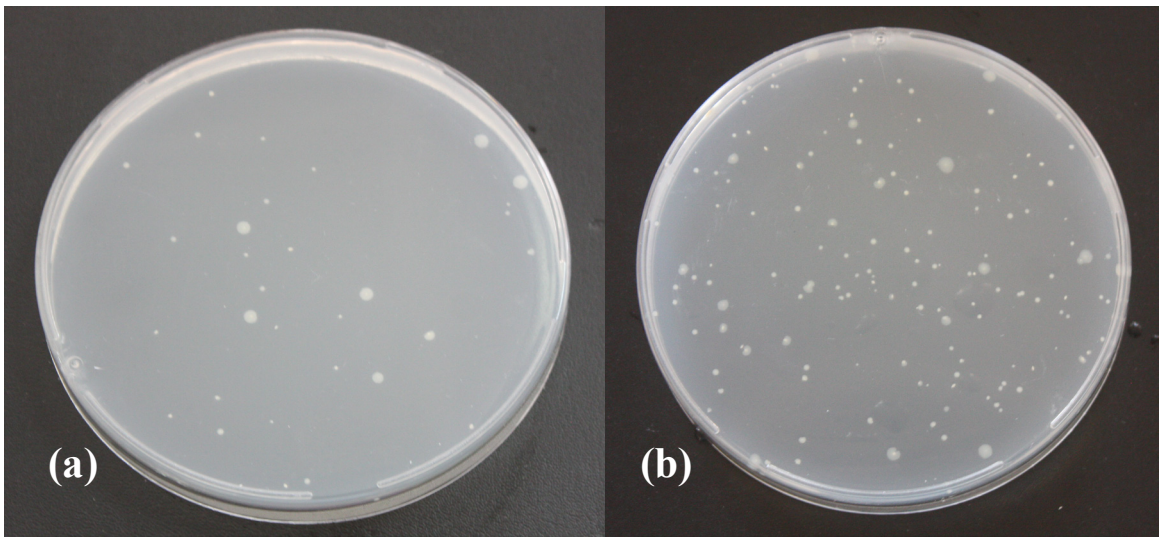
Şekil 10. *S. typhimurium* (a) TA98 ve (b) TA100 suşlarının S9 yokluğundaki pozitif kontrol sonuçları.



Şekil 11. *S.typhimurium* (a) TA98 ve (b) TA100 suşlarının S9 varlığındaki pozitif kontrol sonuçları.



Şekil 12. *S. typhimurium* (a) TA98 ve (b) TA100 suşları için negatif kontrol (DMSO) sonuçları.



Şekil 13. *S. typhimurium* (a) TA98 ve (b) TA100 suşları için spontan kontrol (kendiliğinden geri dönen koloni sayısının kontrolü) sonuçları.

Çizelge 3. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinin hekzan ekstraktlarının *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki etkileri

Uygulama		Konsantrasyon	Revertant koloni sayısı/Plak			
			TA98		TA100	
			S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
			Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD
Pozitif kontrol	NPD	10^{-2}	811±94,55			
	SA	10^{-3}			1189±147,33	
	2AF	$5x10^{-3}$		957±107,29		1295±156,70
İstasyon 1		10^{0}	24±6,66	27±4,58	113±16,46	158±23,26
		10^{-1}	34±4,93	29±5,57	121±5,51	113±11,85
		10^{-2}	15±4,36	34±6,03	140±3,22	130±2,52
		10^{-3}	19±5,51	29±4,58	132±16,17	136±11,53
		10^{-4}	19±5,29	33±5,13	136±4,36	121±2,65
İstasyon 2		10^{0}	16±2,52	40±3,51	142±11,79	209±33,08
		10^{-1}	17±4,04	17±3,79	131±14,93	125±11,72
		10^{-2}	19±3,22	30±6,51	155±16,70	160±4,58
		10^{-3}	16±5,13	34±3,22	131±14,22	143±6,56
		10^{-4}	17±2,08	20±3,06	161±16,29	132±1,73
İstasyon 3		10^{0}	17±2,08	23±1,15	106±9,64	151±18,90
		10^{-1}	19±1,53	29±1,16	130±19,52	185±17,58
		10^{-2}	21±4,93	33±3,51	118±14,42	142±2,65
		10^{-3}	19±1,53	34±5,86	111±9,07	147±3,22
		10^{-4}	21±3,06	23±2,08	117±10,69	135±10,69
İstasyon 4		10^{0}	14±3,79	31±3,22	133±5,51	111±5,51
		10^{-1}	19±2,52	37±6,11	130±21,83	125±3,79
		10^{-2}	17±5,51	17±3,46	155±14,57	152±8,15
		10^{-3}	24±1,53	22±2,65	147±11,24	125±4,36
		10^{-4}	27±3,61	26±1,73	224±17,62	135±7,77
Negatif kontrol	DMSO		24±3,50	28±5,98	135±21,06	144±34,76
Spontan Kontrol			24±6,94	25±6,59	157±27,52	152±18,64

* NPD (4-nitro-*o*-fenilendiamin): S9 yokluğunda TA98 suşu için, SA (sodyum azid): S9 yokluğunda TA100 suşu için, 2AF (2-Aminofloren): S9 varlığında her iki suş için pozitif kontrol amacıyla kullanıldı.

** DMSO (dimetilsülfoksit) ve su 100 µl/plak olacak şekilde negatif kontrol amacıyla kullanıldı.

*** Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma

Çizelge 4. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinin kloroform ekstraktlarının *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki etkileri

Uygulama		Konsantrasyon	Revertant koloni sayısı/Plak			
			TA98		TA100	
			S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
			Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD
Pozitif kontrol	NPD	10^{-2}	811±94,55			
	SA	10^{-3}			1189±147,33	
	2AF	$5x10^{-3}$		957±107,29		1295±156,70
İstasyon 1		10^{0}	24±2,89	30±1,53	199±30,02	182±41,15
		10^{-1}	30±3,79	25±5,51	130±27,79	158±38,44
		10^{-2}	18±3,51	25±5,69	153±23,54	129±7,10
		10^{-3}	28±7,21	30±2,08	150±20,08	144±10,21
		10^{-4}	26±1,53	32±2,52	117±11,14	118±19,76
İstasyon 2		10^{0}	42±3,21	43±1,53	249±26,41	278±46,16
		10^{-1}	20±1,53	36±5,13	154±4,93	129±18,23
		10^{-2}	31±3,21	27±2,08	134±19,52	106±9,07
		10^{-3}	19±5,51	17±1,73	131±5,86	121±6,93
		10^{-4}	18±3,51	26±1,15	111±10,69	120±32,66
İstasyon 3		10^{0}	44±7,02	47±4,51	412±46,00	315±25,78
		10^{-1}	34±3,61	21±2,65	173±21,93	151±17,78
		10^{-2}	25±3,21	22±4,04	136±7,77	141±8,33
		10^{-3}	21±2,52	33±8,02	150±7,23	143±11,27
		10^{-4}	18±3,51	17±1,73	138±7,51	132±15,63
İstasyon 4		10^{0}	22±3,06	53±5,69	308±31,72	384±45,62
		10^{-1}	28±7,10	29±5,13	188±5,69	178±19,29
		10^{-2}	20±1,53	34±6,43	137±11,59	109±18,36
		10^{-3}	15±2,52	29±6,03	112±7,00	109±9,17
		10^{-4}	27±3,79	24±3,22	114±4,16	140±9,07
Negatif kontrol	DMSO		24±3,50	28±5,98	135±21,06	144±34,76
Spontan Kontrol			24±6,94	25±6,59	157±27,52	152±18,64

* NPD (4-nitro-*o*-fenilendiamin): S9 yokluğunda TA98 suşu için, SA (sodyum azid): S9 yokluğunda TA100 suşu için, 2AF (2-Aminofloren): S9 varlığında her iki suş için pozitif kontrol amacıyla kullanıldı.

** DMSO (dimetilsülfoksit) ve su 100 µl/plak olacak şekilde negatif kontrol amacıyla kullanıldı.

*** Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma

Çizelge 5. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinin DCM ekstraktlarının *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki etkileri

Uygulama		Konsantrasyon	Revertant koloni sayısı/Plak			
			TA98		TA100	
			S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
			Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD
Pozitif kontrol	NPD	10^{-2}	811±94,55			
	SA	10^{-3}			1189±147,33	
	2AF	$5x10^{-3}$		957±107,29		1295±156,70
İstasyon 1		10^{0}	35±4,16	30±6,81	321±13,80	282±34,27
		10^{-1}	13±1,53	23±2,65	154±13,20	203±18,50
		10^{-2}	14±2,65	23±1,53	149±14,36	226±35,73
		10^{-3}	13±2,08	30±5,69	124±8,14	121±12,22
		10^{-4}	13±2,52	34±4,51	123±7,10	215±30,51
İstasyon 2		10^{0}	29±3,00	22±2,08	297±25,93	204±35,51
		10^{-1}	22±2,08	24±4,58	125±11,68	125±6,66
		10^{-2}	12±0,58	25±4,73	124±7,23	120±6,11
		10^{-3}	24±5,51	23±2,08	112±11,55	117±8,74
		10^{-4}	19±2,52	26±4,58	118±7,51	119±7,51
İstasyon 3		10^{0}	36±5,51	28±2,08	303±17,04	218±19,50
		10^{-1}	22±3,06	36±4,58	110±15,63	170±14,50
		10^{-2}	16±1,53	28±2,52	125±6,43	164±9,07
		10^{-3}	14±2,00	29±5,51	136±19,86	132±9,50
		10^{-4}	16±3,06	26±3,79	147±4,04	128±16,50
İstasyon 4		10^{0}	31±3,51	26±4,73	200±20,21	264±36,50
		10^{-1}	14±3,06	27±1,00	136±32,04	164±10,69
		10^{-2}	19±2,08	35±4,58	166±40,04	179±13,80
		10^{-3}	20±3,21	19±4,00	116±9,07	156±10,07
		10^{-4}	15±2,52	23±2,00	117±8,50	159±17,50
Negatif kontrol	DMSO		24±3,50	28±5,98	135±21,06	144±34,76
Spontan Kontrol			24±6,94	25±6,59	157±27,52	152±18,64

* NPD (4-nitro-*o*-fenilendiamin): S9 yokluğunda TA98 suşu için, SA (sodyum azid): S9 yokluğunda TA100 suşu için, 2AF (2-Aminofloren): S9 varlığında her iki suş için pozitif kontrol amacıyla kullanıldı.

** DMSO (dimetilsülfoksit) ve su 100 µl/plak olacak şekilde negatif kontrol amacıyla kullanıldı.

*** Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma

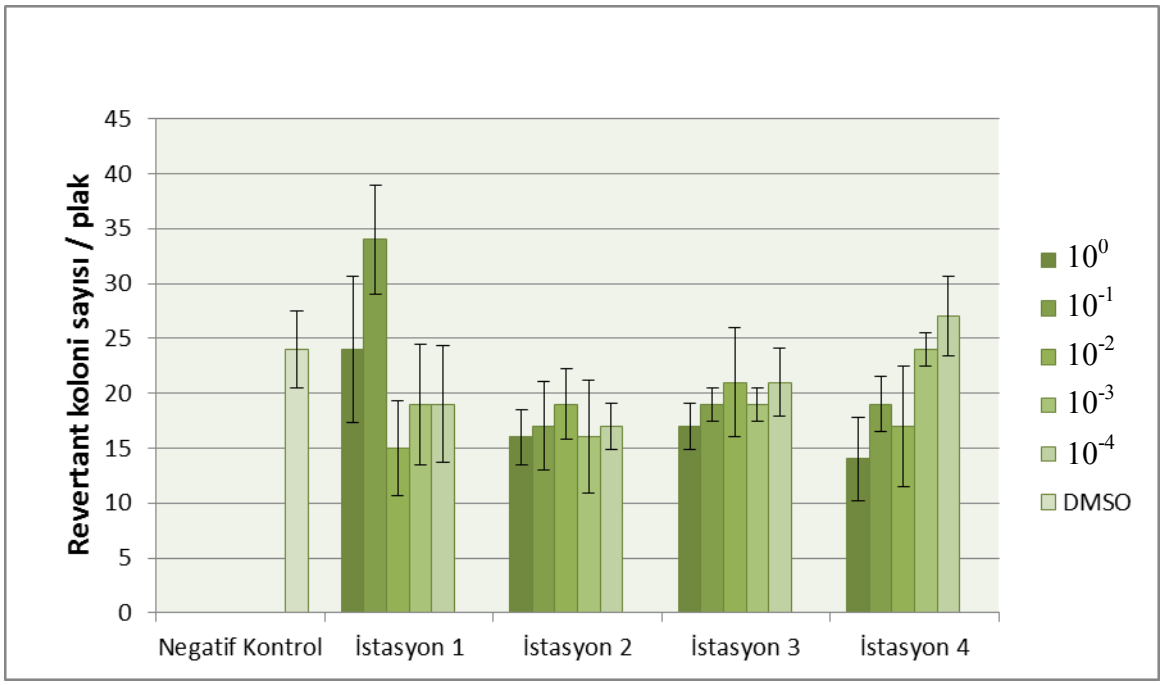
Çizelge 6. Tunca Nehri'nden alınan sediment örneklerinin ekstraktlarının *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki etkileri

Uygulama		Konsantrasyon	Revertant koloni sayısı/Plak			
			TA98		TA100	
			S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
			Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD
Pozitif kontrol	NPD	10^{-2}	811±94,55			
	SA	10^{-3}			1189±147,33	
	2AF	$5x10^{-3}$		957±107,29		1295±156,70
İstasyon 1		10^{0}	30±4,04	22±3,51	211±23,80	209±23,90
		10^{-1}	31±3,21	18±2,08	218±22,68	133±13,20
		10^{-2}	35±1,53	20±5,03	171±38,37	112±13,00
		10^{-3}	25±2,08	25±1,53	237±49,94	128±4,51
		10^{-4}	26±1,53	28±3,51	208±19,00	134±10,69
İstasyon 2		10^{0}	40±2,08	19±2,00	172±16,09	164±11,14
		10^{-1}	24±4,16	23±1,53	226±18,01	124±9,64
		10^{-2}	31±2,65	19±1,00	170±29,09	120±6,66
		10^{-3}	23±1,53	22±1,15	149±14,29	123±10,07
		10^{-4}	26±5,13	18±2,52	202±23,52	138±8,02
İstasyon 3		10^{0}	22±3,00	25±1,73	261±28,68	280±42,12
		10^{-1}	29±2,00	18±1,53	176±8,50	171±13,05
		10^{-2}	35±5,13	20±3,61	152±21,50	133±9,29
		10^{-3}	23±4,58	19±2,52	153±25,70	186±30,09
		10^{-4}	29±1,53	24±4,58	189±38,53	125±11,93
İstasyon 4		10^{0}	33±3,06	20±2,08	283±18,15	127±8,50
		10^{-1}	33±2,08	22±3,21	165±14,50	163±6,03
		10^{-2}	26±2,65	21±2,65	150±29,82	121±6,66
		10^{-3}	29±6,56	19±5,00	174±37,81	129±5,51
		10^{-4}	24±2,52	18±4,51	137±11,00	117±15,72
Negatif kontrol	DMSO		24±3,50	28±5,98	135±21,06	144±34,76
Spontan Kontrol			24±6,94	25±6,59	157±27,52	152±18,64

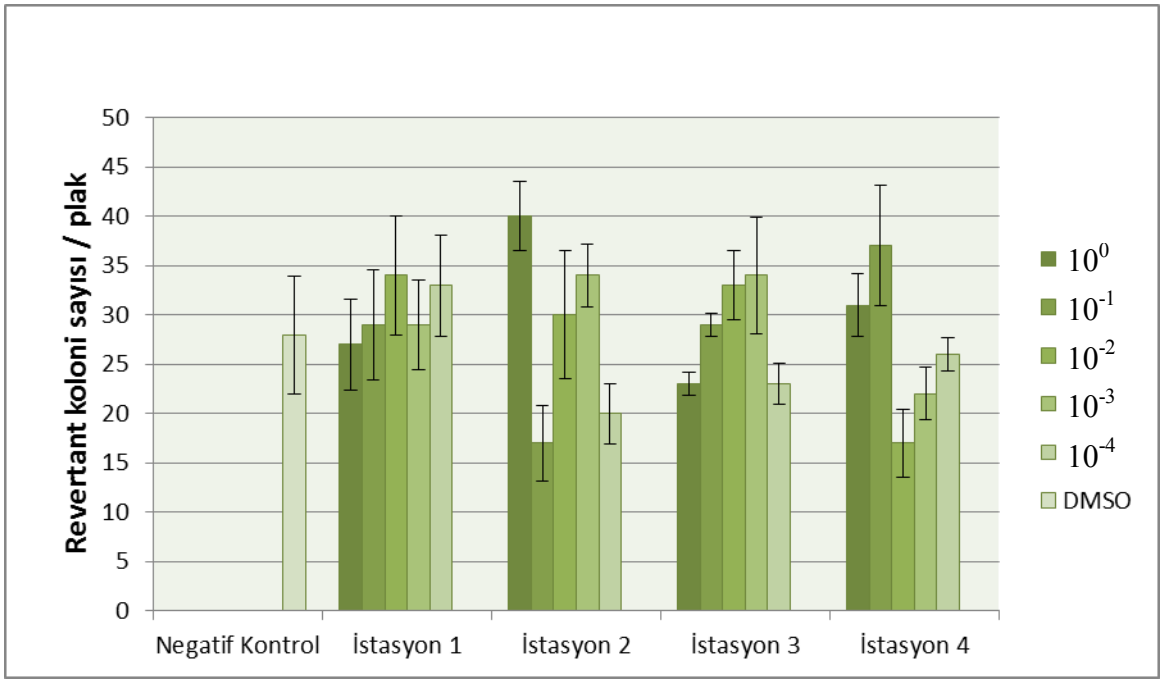
* NPD (4-nitro-*o*-fenilendiamin): S9 yokluğunda TA98 suşu için, SA (sodyum azid): S9 yokluğunda TA100 suşu için, 2AF (2-Aminofloren): S9 varlığında her iki suş için pozitif kontrol amacıyla kullanıldı.

** DMSO (dimetilsülfoksit) ve su 100 µl/plak olacak şekilde negatif kontrol amacıyla kullanıldı.

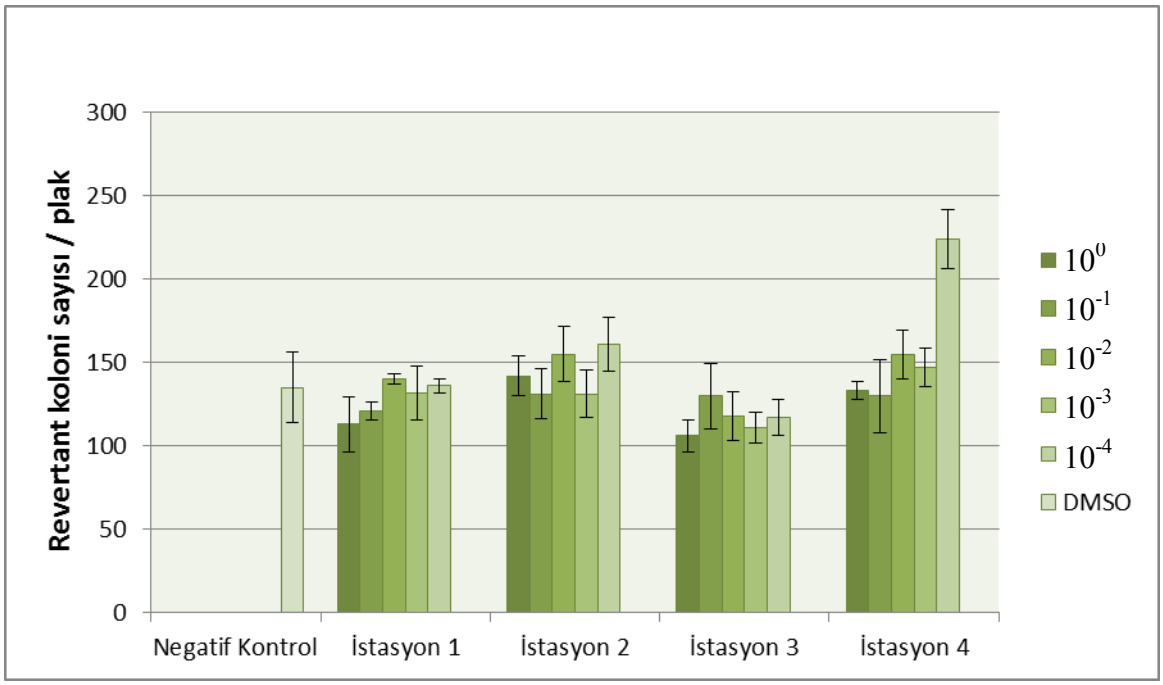
*** Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma



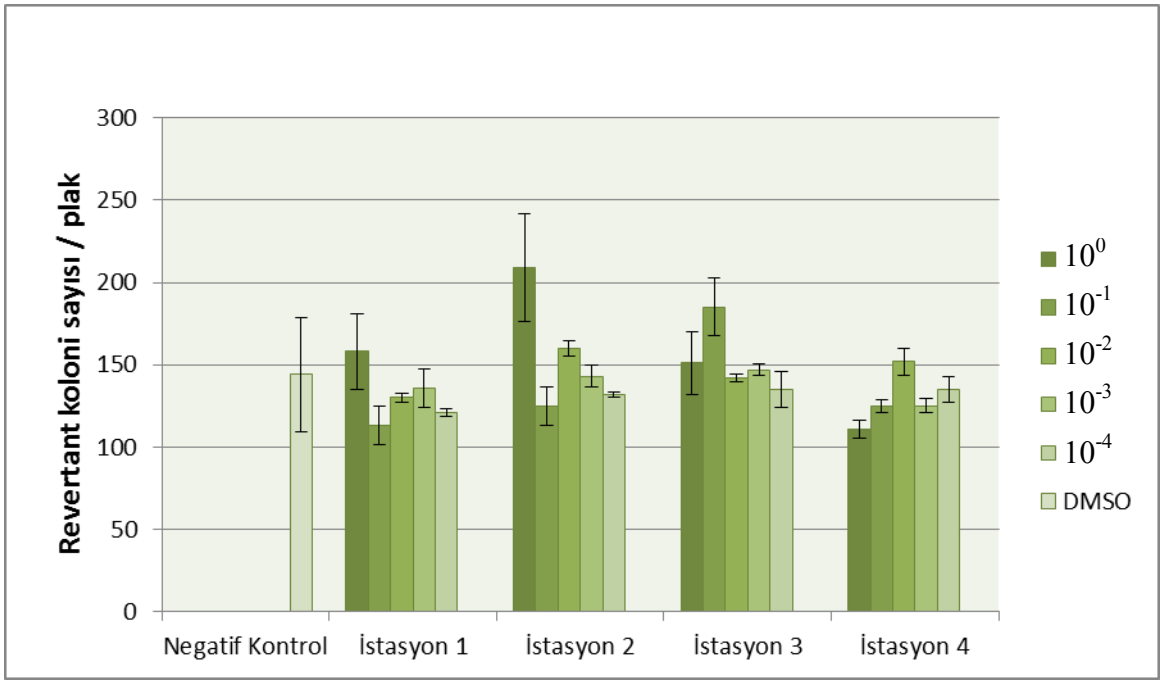
Şekil 14. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde S9 yokluğundaki etkileri.



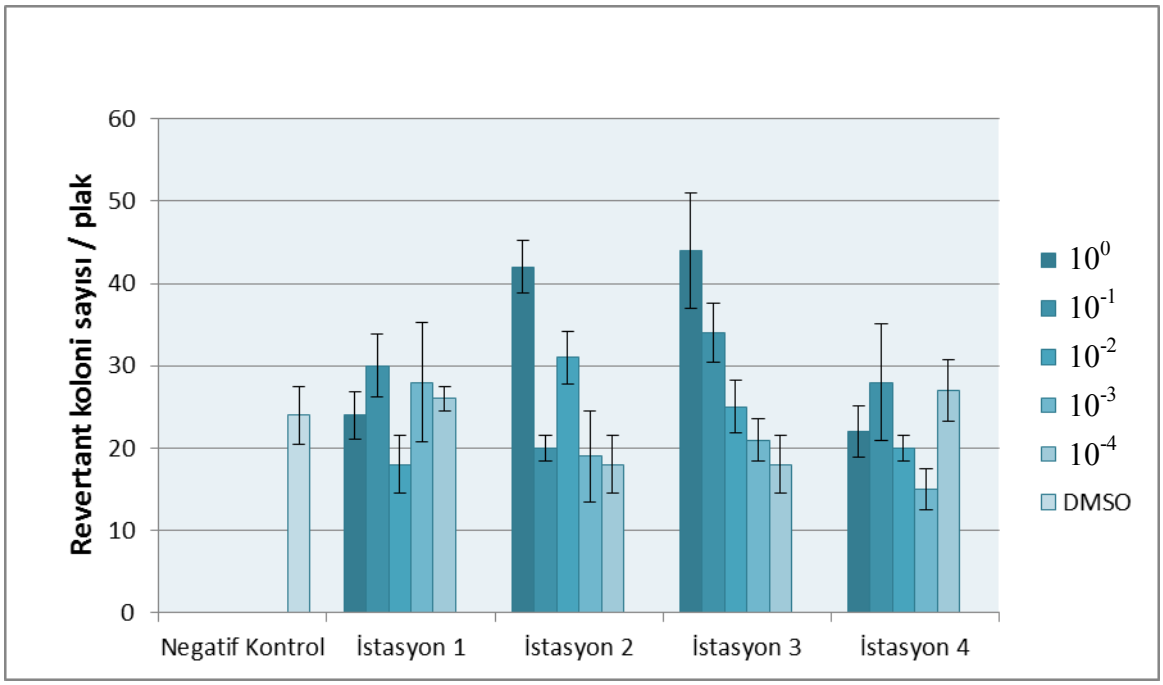
Şekil 15. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde S9 varlığındaki etkileri.



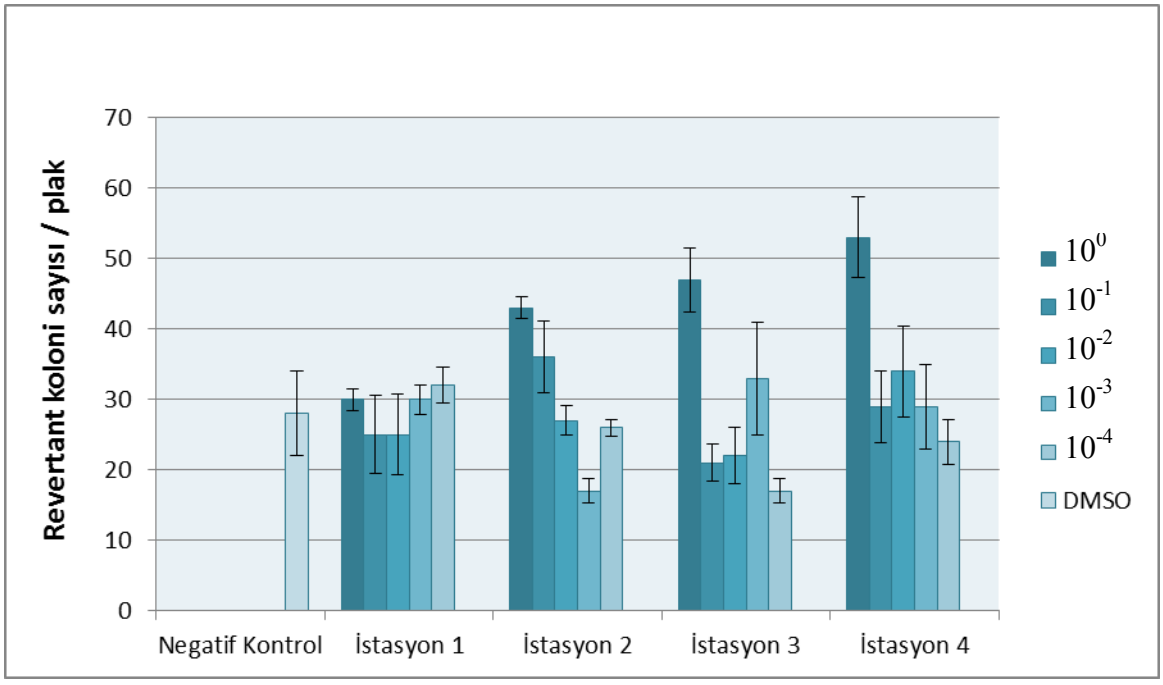
Şekil 16. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 yokluğundaki etkileri.



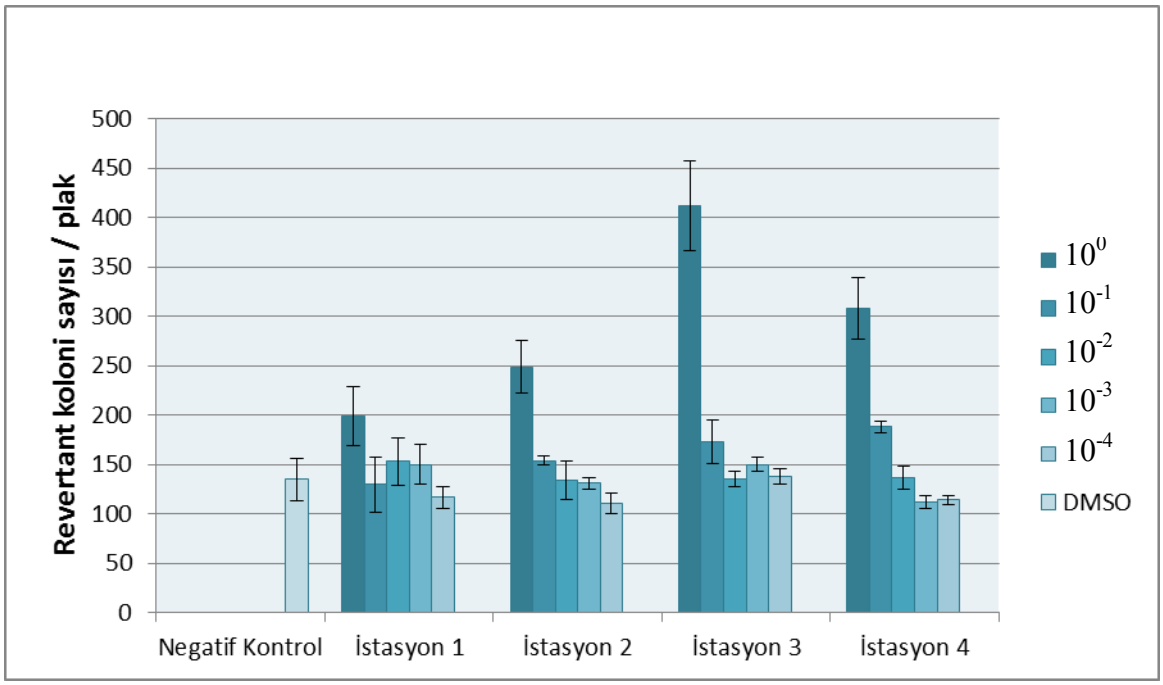
Şekil 17. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 varlığındaki etkileri.



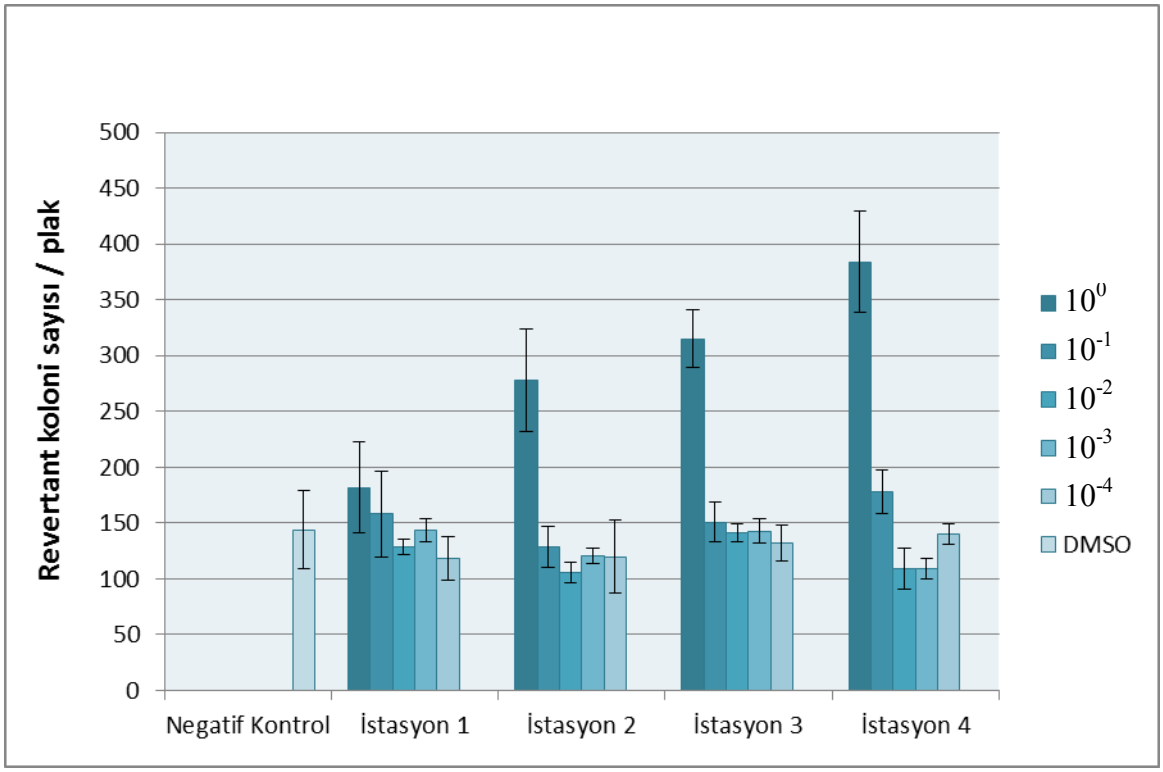
Şekil 18. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde S9 yokluğundaki etkileri.



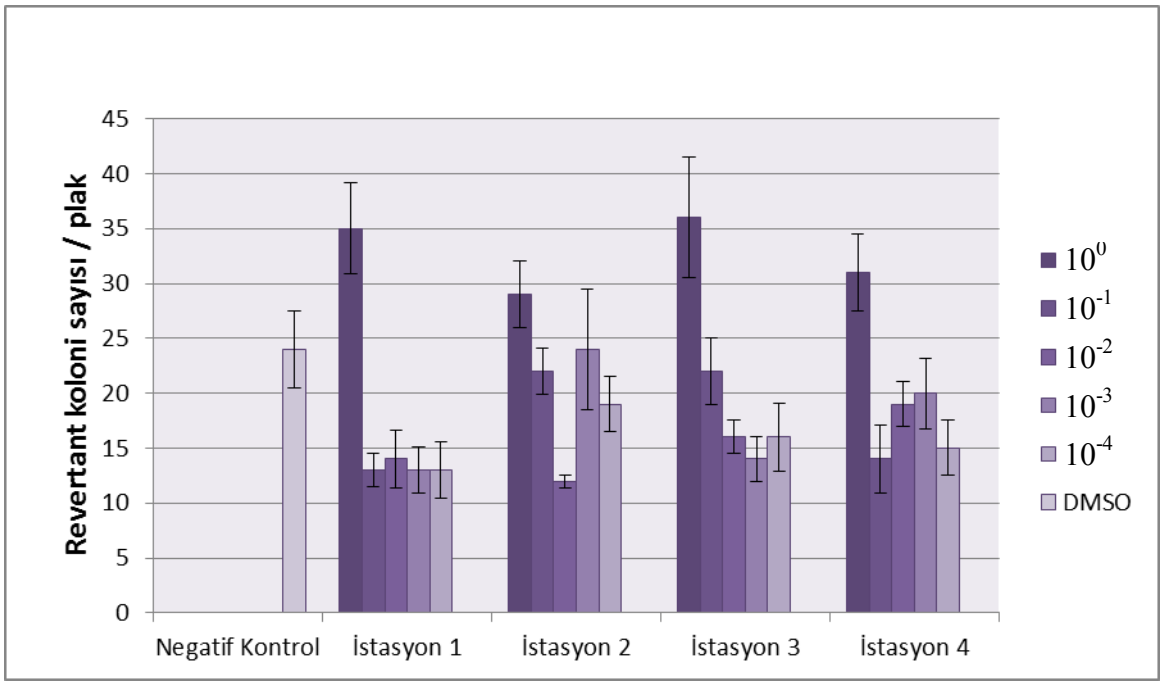
Şekil 19. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde S9 varlığındaki etkileri.



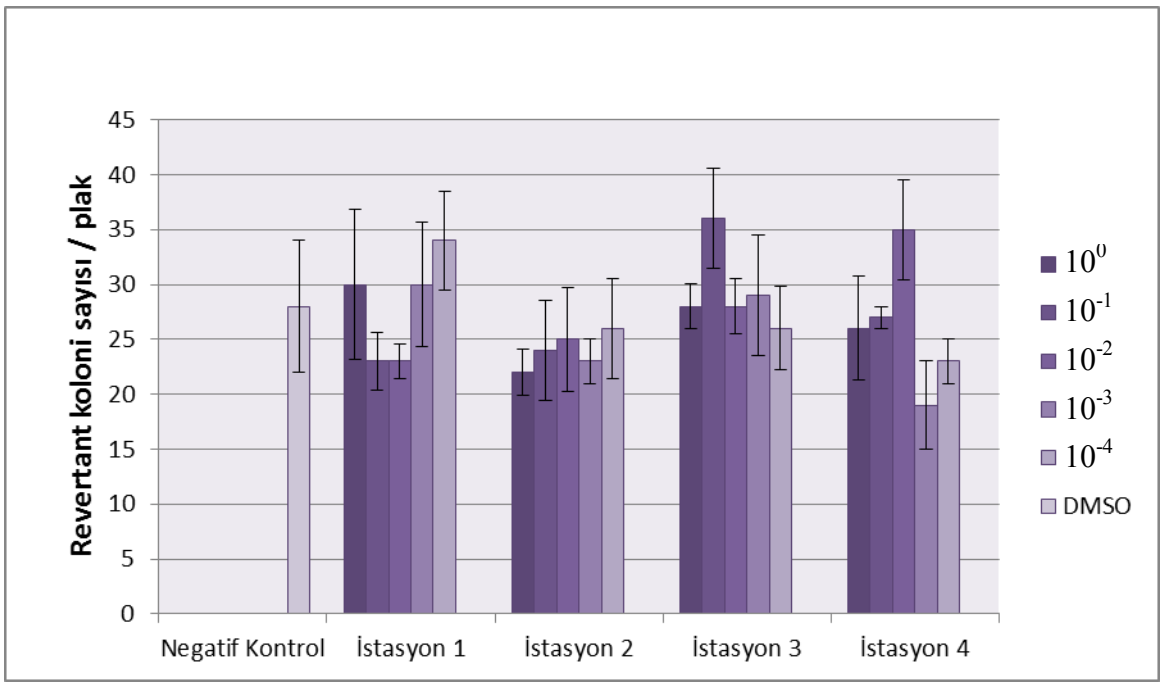
Şekil 20. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 yokluğundaki etkileri.



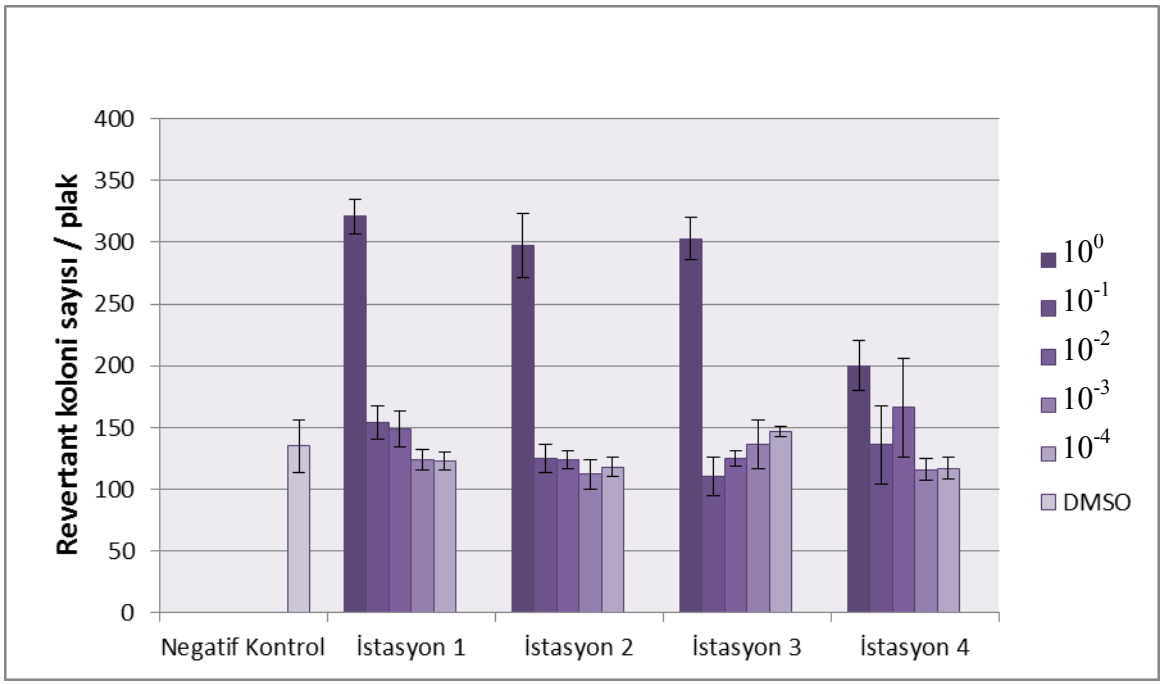
Şekil 21. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 varlığındaki etkileri.



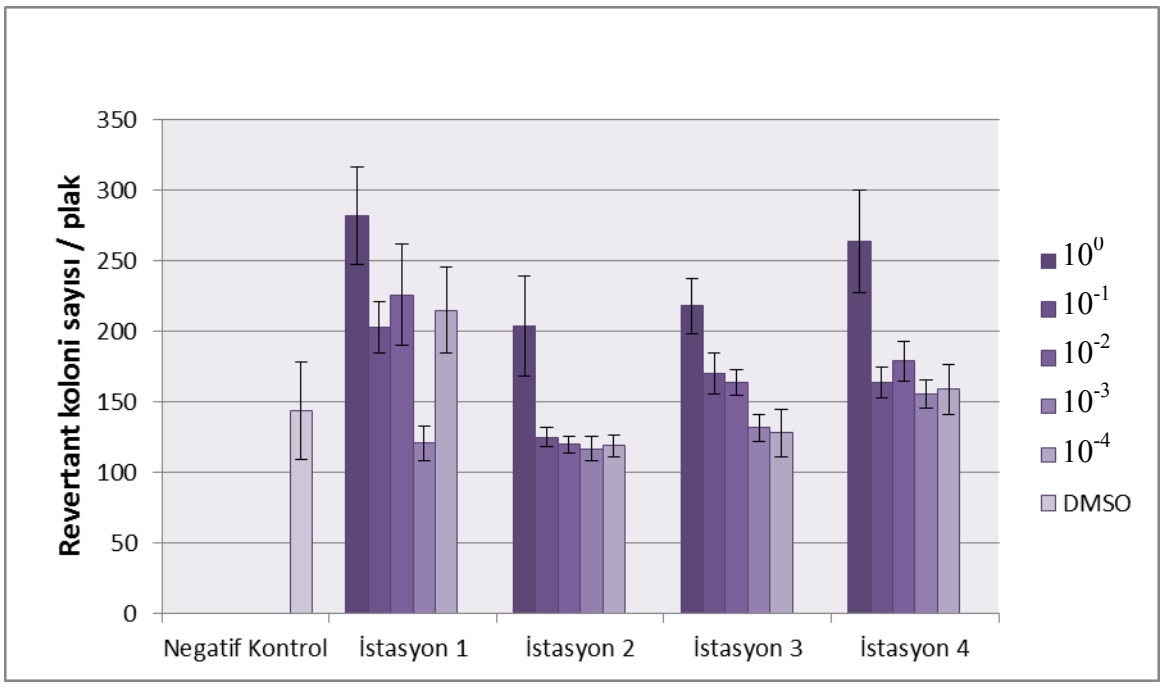
Şekil 22. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde S9 yokluğundaki etkileri.



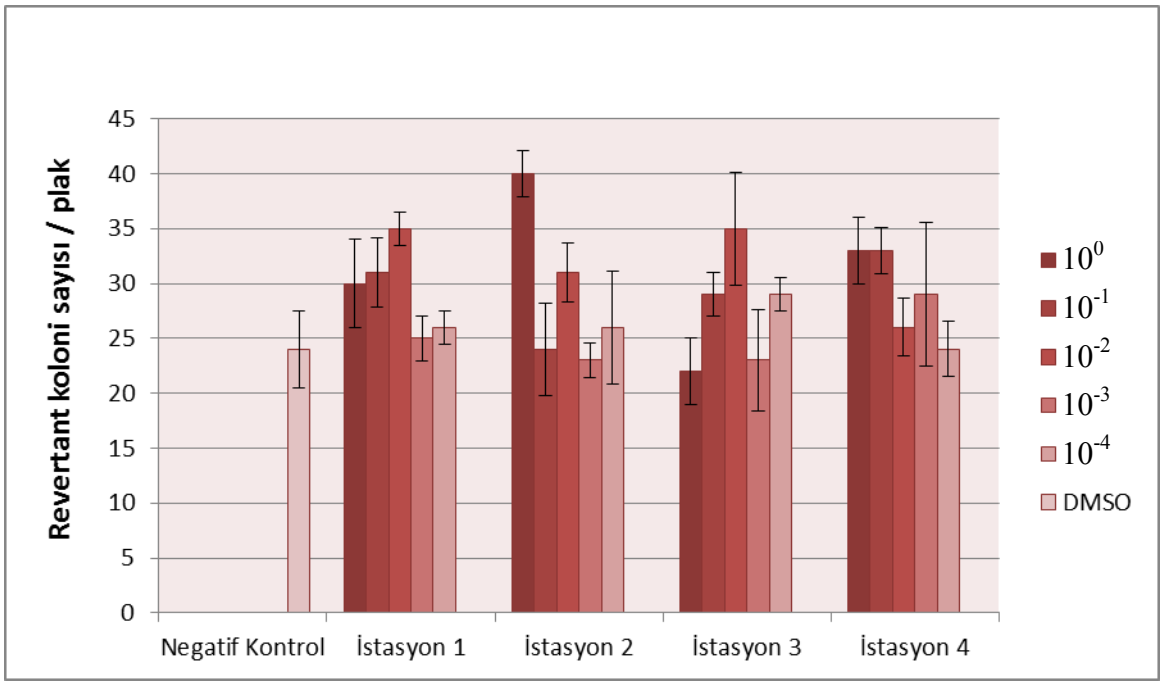
Şekil 23. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde S9 varlığındaki etkileri.



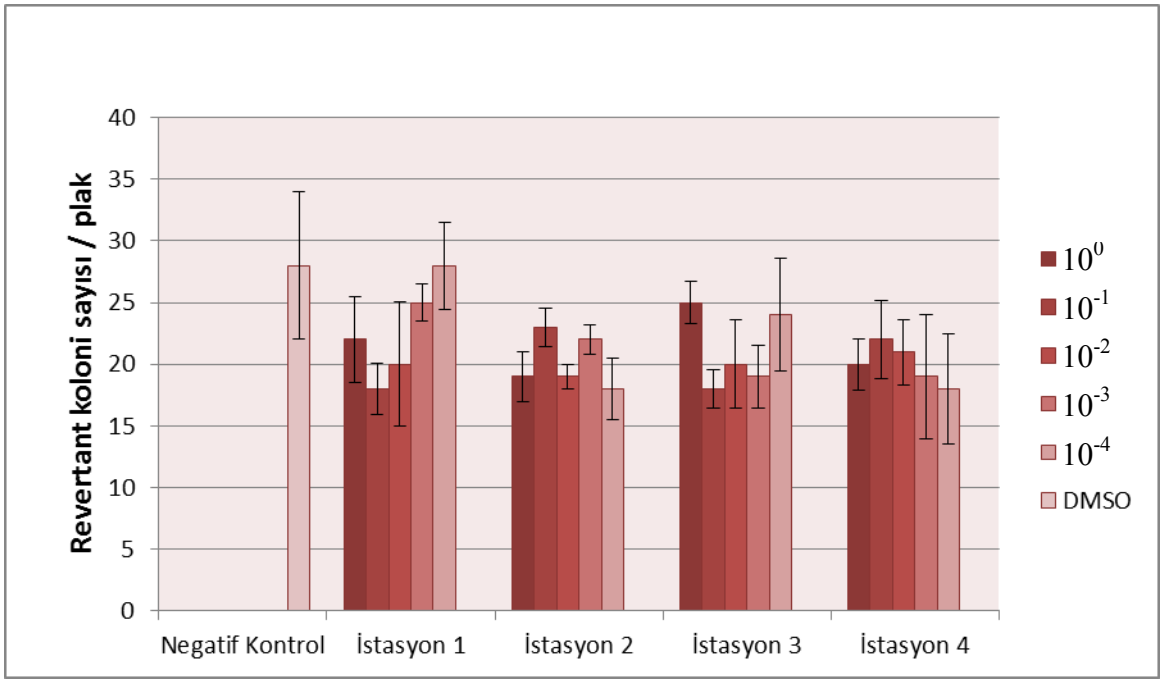
Şekil 24. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 yokluğundaki etkileri.



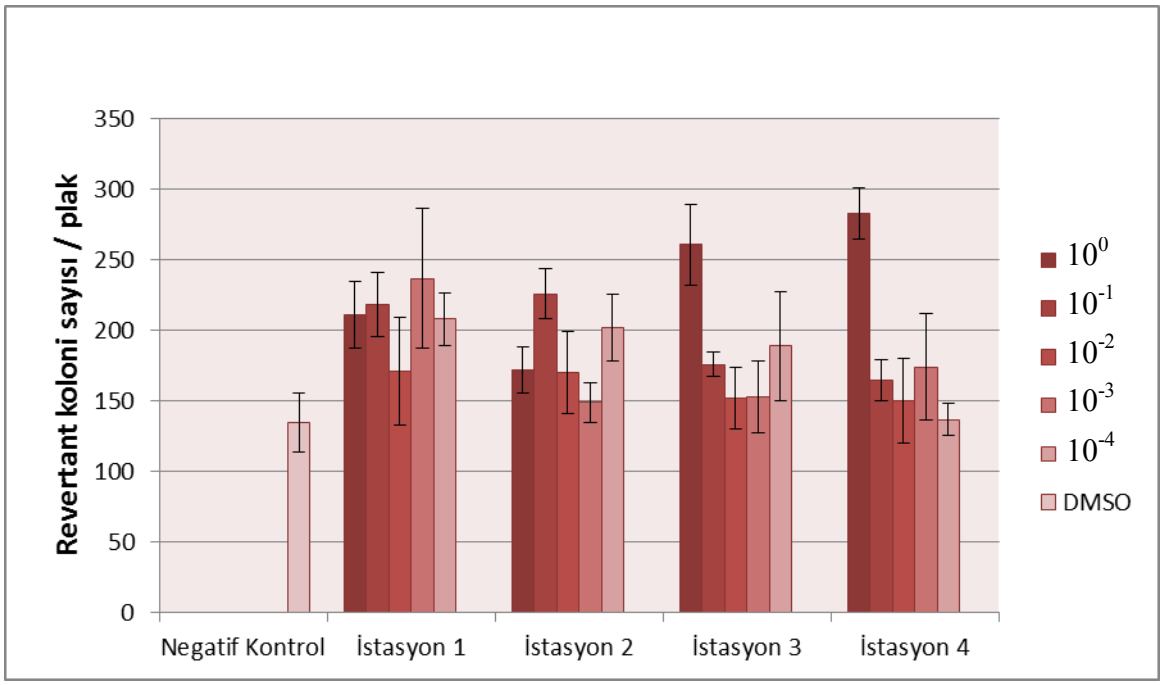
Şekil 25. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 varlığındaki etkileri.



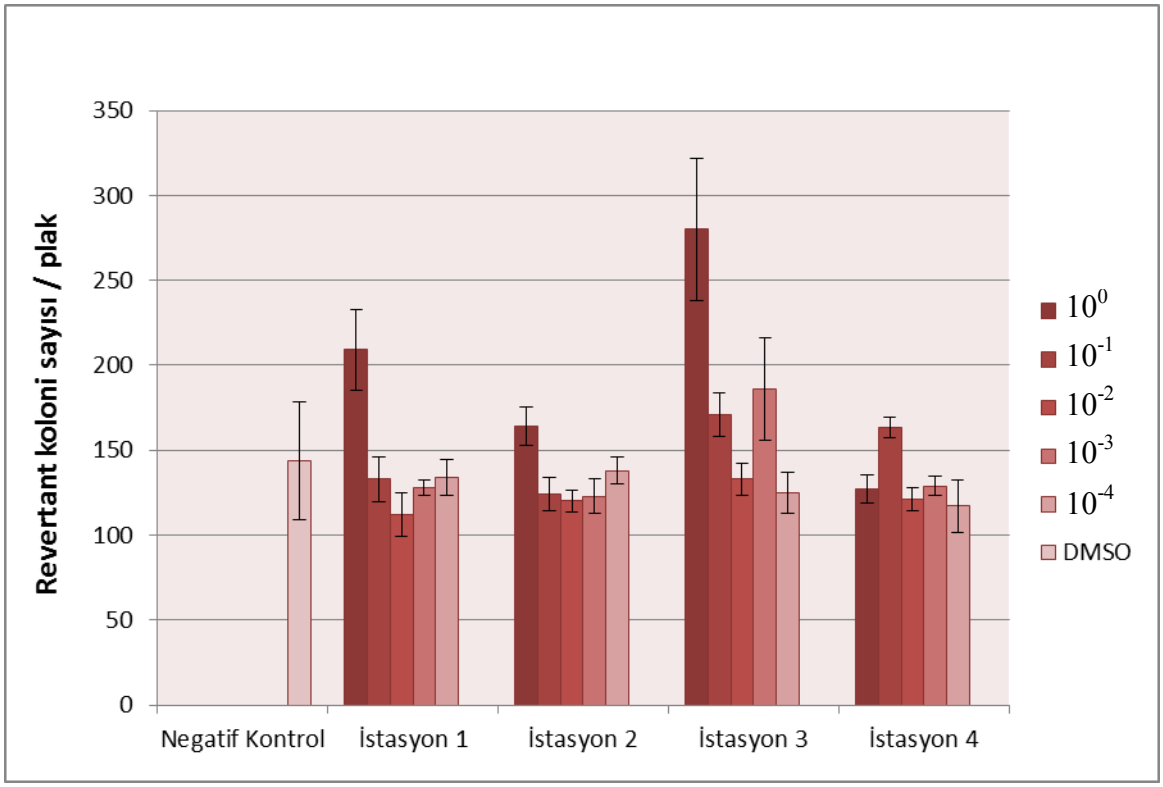
Şekil 26. Tunca Nehri'nden alınan sediment örneklerinden elde edilen ekstraktların farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde S9 yokluğundaki etkileri.



Şekil 27. Tunca Nehri'nden alınan sediment örneklerinden elde edilen ekstraktların farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde S9 varlığındaki etkileri.



Şekil 28. Tunca Nehri'nden alınan sediment örneklerinden elde edilen ekstraktların farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 yokluğundaki etkileri.



Şekil 29. Tunca Nehri'nden alınan sediment örneklerinden elde edilen ekstraktların farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 varlığındaki etkileri.

Yapılan deneyler sonucunda, Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinde mutajenik aktivite tespit edilmiştir. En yüksek mutajenik etkiye 3. ve 4. istasyonlardan alınan su örneklerinde rastlanırken 1. ve 2. istasyonlardan alınan örneklerde sadece diklorometan (DCM) ekstraktında mutajenik etki görülmüştür (Şekil 20, 21, 24, 25). Ayrıca sediment örnekleriyle yapılan çalışmalarda, 3. ve 4. istasyonlardan alınan örneklerin en yüksek konsantrasyonlarında mutajenik etki gözlenmiştir (Şekil 28, 29). Bulgaristan'dan kirlilik yükü taşıyarak ülkemize giriş yapan nehrin, daha sonra karşılaştığı yoğun tarımsal faaliyetlerle de kirlenmiş olması muhtemeldir.

Çalışmada en yüksek mutajenik cevap kloroform ve DCM ekstraktlarının kullanıldığı deneylerde elde edilmiştir (Çizelge 4, 5). Ames testinde su örneklerinin ekstraksiyonu için kompleks çevresel karışımların araştırılması ve bazik-nötral bileşiklerin eldesinde DCM'nin kullanışlı bir çözücü olduğu belirtilmiştir (Lippincott ve ark., 1990; Nielsen, 1992). Farklı tipteki toprakların mutajenitesinin araştırıldığı bir çalışmada, DCM, aseton, asetonitril ve metanolle hazırlanan ekstraktlardan en yüksek mutajenik değer DCM'nin kullanıldığı ekstraktlarda elde edilmiştir (Edenharder ve ark., 2000). Ayrıca hekzanın organoklorlu pestisitlerin; kloroformun ise organofosforlu pestisitlerin eldesinde iyi çözücüler olduğu bildirilmiştir (Aleem ve Malik, 2005). Bu durum, Tunca Nehri'ndeki kirlilik yükünün tarımsal faaliyetlerde (özellikle yoğun olarak çeltik üretiminde) kullanılan zirai ilaçlardan kaynaklandığını düşündürmektedir. Ayrıca 4. istasyonun Edirne İli Şehir Merkezi yakınında olması ve bu bölgeye yakın nehir kenarında aktif çalışan bir deri işleme atölyesi bulunması, nehirde kompleks bir kirlilik beklentisini yükseltmiştir.

Durant ve Hemond (1992), Massachusetts'te yaptıkları çalışmada Aberjona Havzası'na, deri işleme ve zirai ilaç fabrikası gibi endüstriyel alanlardan dökülen organik ve inorganik atıkların etkilerini araştırmışlardır. Önceki çalışmalarda, havzanın farklı bölgelerindeki sedimentlerde yüksek konsantrasyonlarda toksik metaller ve organik kirleticiler tespit edilmiştir. Bu verilere dayanarak bölgeden 32 alandan sediment örnekleri alınarak mutajenik etkileri incelenmiştir. Sedimentlerin diklorometan-metanol ekstraktlarının kullanıldığı çalışmada 32 örneğin 20'sinde mutajenik etki saptanmıştır. 2010 yılında Hindistan'da yapılan bir çalışmada da deri işleme atölyesinin atık suyuyla çalışılmış ve bu atıkların mutajenik oldukları tespit edilmiştir (Alam ve ark., 2010).

Rehana ve ark. (1995) pestisit kontaminasyonu olduğu belirlenen Ganj Nehri ile çalışmışlardır. Çalışmada, nehir suyundaki organoklorlu ve organofosforlu pestisit miktarlarının, Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği kabul edilebilir sınır değerlerin

üzerinde olduğu tespit edilmiştir. *S. typhimurium* TA97a, TA98, TA100, TA102 ve TA104 suşlarının kullanıldığı deneylerde, özellikle TA98 ve TA100 suşlarıyla yapılan çalışmalarda yüksek mutajenik aktivite belirlenmiştir.

Rehana ve ark. (1996) yine Ganj Nehri'nin farklı bir bölgesinde yaptıkları çalışmada, pestisit kontaminasyonu belirlenen nehir suyunu ekstrakte etmek için XAD ve sıvı-sıvı ekstraksiyon metotları uygulamışlardır. Sıvı sıvı ekstraksiyonda organoklorlu ve organofosforlu pestisitlerin eldesi için hekzan ve kloroform kullanılmıştır. Çalışma sonucunda XAD ile elde edilen ekstraktlarda S9 varlığında ve yokluğunda TA98 ve TA100 suşları için mutajenik aktivite tespit edilirken; sıvı-sıvı ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktlarda aynı suşlarla düşük mutajenik etki belirlenmiştir.

Boyacıoğlu (1999), yaptığı doktora tezi çalışmasında İzmir Körfezi'ne drene olan dere ve kanalizasyon ağızlarından ve körfezin iç, orta ve dış kısımlarından aldığı sediment örneklerinin genotoksik potansiyelini araştırmıştır. Örneklerin hekzan, kloroform, aseton (1:1:1 v:v:v) karışımı ile ekstrakte edildiği çalışmada *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarıyla çalışılmıştır. Testte, körfezin iç kısmına drene olan dere ve kanalizasyonların taşıdıkları kirlilik yükü sebebiyle körfez için mutajenik aktivite kaynağı teşkil ettiği bulunmuştur. İç kısımdan orta kısma doğru mutajenitenin azaldığı ve dış kısımda ise Gediz Nehri'nden kaynaklandığı düşünülen bir mutajenik etki olduğu saptanmıştır.

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde endüstrileşmenin yanısıra insan nüfusunun ve tarımsal aktivitelerin artmasıyla ekosistemlerde birtakım değişiklikler meydana gelmektedir. Meydana gelen olumsuz değişiklikler doğal su kaynaklarını (özellikle yüzey sularını) da etkilemekte ve kirletmektedir.

Çalışma alanımız olan Edirne, su kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen çeltik yetiştiriciliği ile Türkiye'nin çeltik ihtiyacının yaklaşık yarısını karşılamaktadır. Son yıllarda bu tarımsal aktivitenin de içinde bulunduğu birtakım antropojenik etkiler, Tunca Nehri'ni de kapsayan Meriç-Ergene Havzasının kirlenmesine sebep olmuştur.

Yapılan mutajenite çalışmaları sonucunda, Tunca Nehri su ve sediment örneklerinin yoğun bir mutajenik etkisinin olmadığı saptanmıştır. Yüksek konsantrasyonlardaki sonuçlara bakılarak bu bölgelerdeki kirliliğin mutajenite riski taşıdığı tespit edilmiştir.

Bu bilgiler ışığında, tarım ilaçlarının uygulama miktarlarının, çevresel kirlilik göz önünde tutularak düzenlenmesi ve kontrol altına alınması gerekmektedir. Ayrıca evsel ve endüstriyel atıkların su kaynaklarına boşaltılmadan önce filtrasyona tabi tutulması önerilmektedir.

Bu testte kullanılan yöntem, mutajenite araştırmaları için sadece ön adım teşkil etmektedir. Sonuçlarla ilgili kesin yargılara varabilmek için uzun zamanlı *in vivo* test sistemleri ile desteklenmesi gerekmektedir.

Ayrıca bu çalışma, Tunca Nehri'ndeki kirliliğin oluşturduğu mutajenik potansiyelin belirlenmesi açısından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

Abou-Eisha A., Creus A. ve Marcos R., 1999. Genotoxic Evaluation of the Antimicrobial Drug, Trimethoprim, in Cultured Human Lymphocytes. *Mutation Research*, 440: 157-162.

Acara A., 2006. Türkiye'nin Kalıcı Organik Kirletici Maddelere (POP'ler) İlişkin Stockholm Sözleşmesi İçin Taslak Ulusal Uygulama Planı. UNIDO-POP'ler Projesi, Proje No. GF/TUR/03/008.

Alam M.Z., Ahmad S., Malik A. ve Ahmad M., 2010. Mutagenicity and Genotoxicity of Tannery Effluents Used for Irrigation at Kanpur, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 73: 1620-1628.

Aleem A. ve Malik A., 2003. Genotoxic Hazards of Long-Term Application of Wastewater on Agricultural Soil. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 538: 145-154.

Aleem A. ve Malik A., 2005. Genotoxicity of the Yamuna River Water at Okhla (Delhi), India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61: 404-412.

Altınoluk P., 2011. Tunca Nehrinin Bakteriyolojik Özellikleri ve Fizikokimyasal Faktörlerle İlişkisinin Belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Trakya Üniversitesi, Edirne.

Alver E., Demirci A. ve Özcimder M., 2012. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar ve Sağlığa Etkileri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* 3 (1): 45-52.

Ames B.N., 1971. The Detection of Chemical Mutagens with Enteric Bacteria. In: Hollaender, A., Ed. *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*. Plenum, New York, 267-282.

Ames B.N., Durston W.E., Yamasaki E. ve Lee F.D., 1973. Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.,* 70 (8): 2281-2285.

Ames B.N., 1979. Identfying Environmental Chemicals Causing Mutation and Cancer. *Science*, 204: 587-793.

Ames B.N., Magaw R. ve Gold S., 1987. Mutagenicity of Sediments from the Detroit River. *Journal of Great Lakes Research*, 17 (3): 314-321.

Anjum R. ve Malik A., 2013. Evaluation of Mutagenicity of Wastewater in the Vicinity of Pesticide Industry. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35: 284-291.

Arabacı S.S., 2011. Meriç ve Tunca Nehirlerindeki Agır Metal Birikiminin Su ve Balık Türleri Açısından Degerlendirilmesi (Yüksek Lisans Tezi). Trakya Üniversitesi, Edirne.

Asal S., 1983. Türkiye'de Yaygın Olarak Kullanılan Bazı Pestisitlerin Mutajen Etkilerinin *Salmonella typhimurium* Histidin Mutantlarıyla Saptanması Üzerinde Araştırmalar. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu, Ankara.

Atasoy A.R., 2009. Determination of Genotoxic Pollution of Some Hospital Wastewater with Genotoxicity Test Method (Yüksek Lisans Tezi). Fatih Üniversitesi, İstanbul.

Ateş A., 2002. *Moleküler Biyoloji*, 9. Bölüm, Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Konya, 113–121.

Ateş Ö., 2011. Bilecik Karasu Deresinin Mutajenitesinin Araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.

Benisek M., Hilscherova K., Hollert H. ve Blaha L., 2011. Cytotoxic, Mutagenic and Genotoxic Effects of Sediments from Czech River Basin. *Acta Environmentalica Universitatis Comenianae (Bratislava)*, 19: 27-30.

Boyacıoğlu M., 1999. İzmir Körfezi Sedimanının Genotoksik Etkisinin Araştırılması (Doktora Tezi). Ege Üniversitesi, İzmir.

Boyacıoğlu M., Parlak H. ve Çakal Arslan O., 2008. The *Salmonella* Mutagenicity of Sediments from Gediz River (Western Turkey). *E.U. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 25 (1): 13-17.

Boyacıoğlu M., Parlak H.,Çakal Arslan O., Katalay S. ve Karaslan M.A., 2012. Mutagenicity of Sediment Samples from Nif Brook (Western Turkey). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11 (1): 83-87.

Buccini J., 2001. Implementing Global Action on Persistent Organic Pollutants (POPs) Under the Stockholm Convention: Issues and Opportunities. *Environmental Risks and the Global Community, Strategies for Meeting the Challenges, Argonne National Laboratory*, May 14-18.

Campbell N.A. ve Reece J.B., 2010. *Biyoloji* (3. Baskı). Gündüz, E., Demirsoy, A. ve Türkan, İ., Eds. Palme Yayıncılık, Ankara. 279-325.

Cardoso C. ve Cólus I., 2006. Mutagenic Activity Promoted by Amentoflavone and Methanolic Extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology*, 225 (1): 55-63.

Cerná M., Pastorková A., Smíd J., Bavorová H., Ocadlíková D., Rössner P. ve Zavadil J., 1996. Genotoxicity of Industrial Effluents, River Waters and Their Fractions Using the Ames Test and *in vitro* Cytogenetic Assay. *Toxicology Letters*, 88 (1-3): 191-197.

Cerná M., Pochmanová D., Pastorková A., Benes I., Lenícek J., Topinka J. ve Binková B., 2000. Genotoxicity of Urban Air Pollutants in the Czech Republic Part I. Bacterial Mutagenic Potencies of Organic Compounds Absorbed on PM10 Particulates. *Mutation Research*, 469: 71-82.

Chen G. ve White P.A., 2004. The Mutagenic Hazards of Aquatic Sediments: A Review. *Mutation Research*, 567: 151-225.

Claxton L.D., Houk V.S. ve Hughes T.J., 1998. Genotoxicity of Industrial Wastes and Effluents. *Mutation Research,* 410: 237–243.

Cohrssen J.J. ve Covello V.T., 1989. *Risk Analysis: A Guide to Principles and Methods for Analyzing Health and Environmental Risks.* Springfield, Washington. 407 s.

Demirsoy A., 1992. *Yaşamın Temel Kuralları / Genel Biyoloji.* Cilt 1, Kısım 1, Ankara, 196-200.

Durant J.L. ve Hemond H.F., 1992. Determination of Mutagenicity in Sediments of the Aberjona Watershed Using Human Lymphoblast and *Salmonella typhimurium* Mutation Assays. *Environmental Science and Technology,* 26: 599-608.

Edenharder R., Ortseifen M., Koch M. ve Wesp H.F., 2000. Soil Mutagensare Airborne Mutagens: Variation of Mutagenic Activities Induced in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 by Organic Extracts of Agricultural and Forest Soils Independence on Location and Season. *Mutation Research*, 472: 23–36.

Ehrlichmann H., Dott W. ve Eisentraeger A., 2000. Assessment of the Water-Extractable Genotoxic Potential of Soil Samples from Contaminated Sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46 (1): 73–80.

Ergene E., 1998. Bazı 2–Sübstitüe H–Fenentro (9, 10–d) İmidazol Bileşiklerinin Mutajenik Etkilerinin Araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye.

Fatima R.A. ve Ahmad M., 2006. Genotoxicity of Industrial Wastewaters Obtained from Two Different Pollution Sources in Northern India: A Comparison of Three Bioassays. *Mutation Research*, 609: 81–91.

Fender H. ve Wolf G., 1998. Cytogenetic Investigations in Employees from Waste Disposal Sites. *Toxicology Letters*, 96-97; 149-154.

Galli A. ve Schiestl R.S., 1996. Effects of Salmonella Assay Negative and Positive Carcinogens on Intrachromosomal Recombination in G1- Arrested Yeast Cells. *Mutation Research*, 370: 209–221.

Gatehouse D.G., Rowland I.R., Wilcox P., Callander R.D. ve Foster R., 1990. Basic Mutagenicity Ukems Recommended Procedures. In: Kirkland, D.J., Ed. *Bacterial Mutation Assay*. The Bath Press, Avon, Great Britain, UK.

Gesamp, 1991. Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution, Review of Potentially Harmful Substances: Carcinogens, *Gesamp Reports and Studies*, 46: 1-6.

Ghazali A.R., Abdullah R., Ramli N., Rajab N.F., Ahmad-Kamal M.S. ve Yahya N.A., 2011. Mutagenic and Antimutagenic Activities of *Mitragyna speciosa* Korth

Extract Using Ames Test. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (8): 1345-1348.

Giorgio C. D., Liu W., Sarrazin L., Wafo E., Moreau X., Jong L.D., Thiery A. ve Meo M.D., 2010. Organic Pollution and Genotoxicity of Sediments of the Palun Marshers (Berre Lagoon, France). *Journal of Environmental Quality*, 39 (2): 558-567.

Göksu M.Z.L., 2003. *Su Kirliliği*. Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No:7, 232s.

Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C. ve Gelbart W.M., 1996. *An Introduction to Genetic Analysis*. W.H. Freeman and Company, New York, USA.

Haktanır K. ve Arcak S., 1998. *Çevre Kirliliği*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü, Ankara, No: 1503, 457s.

Hong C.E. ve Lyu S.Y., 2011. Genotoxicity Detection of Five Medicinal Plants in Nigeria. *The Journal of Toxicological Sciences*, 36 (1): 87-93.

Horn R.C., Rocha J.A.V. ve Vargas V.M.F., 2004. Determination of Sediment Mutagenicity and Cytotoxicity in An Area Subjected to Petrochemical Contamination. *Mutagenesis*, 19 (6): 445-451.

Houk V.S., 1992. The Genotoxicity of Industrial Wastes and Effluents. *Mutation Research*, 277: 91-138.

Jarvis A.S., Honeycutt M.E., McFarland V.A., Bulich A.A. ve Bounds H.C., 1996. A Comparison of the Ames Assay and Mutatox in Assessing the Mutagenic Potential of Contaminated Dredged Sediment. *Ecotoxicology and Environmental. Safety,* 33: 193-200.

Johnson B.T., 1992. Potential Genotoxicity of Sediment from the Great Lakes. *Environmental Toxicology and Water Quality,* 7: 373-390.

Karadayı M., 2010. *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*'den Elde Edilen Bazı Etken Maddelerin Ames/*Salmonella* ve *E. coli* Wp2 Test Sistemleri ile Mutajen ve Antimutajen Özelliklerinin Belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Atatürk Üniversitesi, Erzurum.

Keijzer T.H.J.S., Middeldrop P.F., Alphen M., Van Der Linde P.R. ve Loch J.P.G., 2000. Desorption Behaviour of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Harbour Sludge from the Port of Rotterdam, The Netherlands. *Water Air Soil Pollution*, 136: 361-385.

Klug W.S., Cummings M.R. ve Spencer C.A., 2009. *Genetik Kavramlar* (8. Baskı). Öner C., Sümer S., Öner R., Öğüş A. ve Açık L. Eds. Palme Yayıncılık, Ankara. 677 s.

Kool H.J., Van Kreyl C.F. ve Persad S., 1989. Mutagenic Activity in Groundwater in Relation to Mobilization of Organic Mutagens in Soil. *Science of the Total Environment*, 84: 185-199.

Korkmaz B., 2005. Bazı 2-Substutie Perimidin Bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Mutajenite Testi ile Belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.

Kummrow F., Magalhaes D., Franco A. ve Umbuzeiro G.A., 2006. Blue Rayon and *Salmonella*/Microsome Assay in the Evaluation of Coastal Water Quality. *Revista de Saude Publica,* 40 (5): 890-897.

Kutlu M., Aydoğan G., Susuz F. ve Özata A., 2004. The *Salmonella* Mutagenicity of Water and Sediments from the Porsuk River in Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17 (2): 111-116.

Kwan K.K., Dutka B.J., Rao S.S. ve Liu D., 1990. Mutatox Test: A New Test for Monitoring Environmental Genotoxic Agents. *Environmental Pollution,* 65: 323-332.

Lewtas J., 1988. Genotoxicity of Complex Mixtures: Strategies for the Identification and Comparative Assessment of Airborne Mutagens and Carcinogens from Combustion Sources. *Fundamental and Applied Toxicology*, 10: 571-589.

Lippincott R.L., Ibrahim E.A., Louis J.B., Atherholt T.B. ve Suffet I.H., 1990. Continuous Liquid–Liquid Extraction for the Preparation of Chlorinated Water Samples for the Ames Bioassay. *Water Research*, 24: 709–716.

Ma M., Rao K. ve Wang Z., 2003. Mutagenicity of Water and Sediment Extracts from the Yongdinghe Watershed. *Journal of Environmental Science and Health. Part A Toxic/ Hazardous Substances Environmental Engineering*, 38 (9): 1781-1792.

Maccubbin A.E. ve Ersing N., 1991. Mutagenic Potential of Sediment from the Grand Calumet River. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47: 308-315.

Maccubbin A.E., Ersing N. ve Frank M.E., 1991. Mutagenicity of Sediments from the Detroit River. *Journal of Great Lakes Research*, 17 (3): 314-321.

Magdaleno A., Mendelson A., Iorio A.F., Rendina A. ve Moretton J., 2008. Genotoxicity of Leachates from Highly Polluted Lowland River Sediments Destined for Disposal in Landfill. *Waste Management*, 28: 2134-2139.

Maron D.M. ve Ames B.N., 1983. Revised Methods for the *Salmonella* Mutagenicity Test. *Mutation Research*, 113: 173-215.

Mathur N. ve Bhatnagar P., 2007. Mutagenicity Assessment of Textile Dyes from Sanganer (Rajathan). *Journal of Environmental Biology*, 28 (1): 123-126.

McCann J. ve Ames B.N., 1976. Detection of Carcinogens as Mutagens in the *Salmonella*/Microsome Test: Assay of 300 Chemicals: Discussion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73 (3): 950-954.

Mortelmans K. ve Zeiger E., 2000. The Ames *Salmonella*/Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Research*, 455: 29-60.

Mumcu E., 2005. Seydi Çayı (Eskişehir) Çevresinden Toplanan Su ve Toprak Örneklerinde Ames/*Salmonella*/Mutajenite Testi ile Bor Elementinin Mutajenitesinin Araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.

Nielsen P.A., 1992. Mutagenicity Studies on Complex Environmental Mixtures: Selection of Solvent System for Extraction. *Mutation Research*, 276: 117–123.

Oda Y., Makamura S., Oki I., Kato T. ve Shinagausa H., 1985. Evaluation of the New System (UMU Test) for Detection of Enviromental Mutagens and Carcinogens. *Mutation Research*, 147: 219-229.

Oishi S. ve Takahashi O., 1987. Mutagenicity of Tama River Sediments. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 39: 696-700.

Öksüzoğlu E., 1997. Bazı Bitki Büyüme Hormonlarının Mutajenitesinin *Salmonella*/Mikrozom ve SOS Kromotest Sistemleri ile Araştırılması (Bilim Uzmanlığı Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

Parlak H., Arslan Ö.Ç., Boyacıoğlu M. ve Karaaslan M.A., 2011. *Ekotoksikoloji* (2. Baskı). Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir. 339 s.

Pereira T.S., Rocha J.A.V., Duccatti A., Silveira G.A., Pastoriza T.F., Bringuenti L. ve Vargas V.M.F., 2007. Evaluation of Mutagenic Activity in Supply Water at Three Sites in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mutation Research*, 629: 71-80.

Picer M., Kovac T., Britvic S. ve Picer N., 2001. The Chemical and Biogenotoxic Characterization of Organic Xenobiotics in Aquatic Sediment Materials: 1. The Application and Comparison of Chemically Non-Specific and Biogenotoxic Methods. *Chemosphere,* 44 (8): 1673-1683.

Quillardet P. ve Hofnung M., 2005. The SOS Cromotest, A Colorimetric Bacterial Assay for Genotoxins: Procedures. *Mutation Research*, 147: 67-78.

Rainbow P.S., 1995. Biomonitoring of Heavy Metal Availabity in the Marine Environment. *Marine Pollution Bulletin*, 31 (4-12): 183-192.

Rehana Z., Malik A. ve Ahmad M., 1995. Mutagenic Activity of the Ganges Water with Special Reference to the Pesticide Pollution in the River Between Kachla to Kannauj (U.P.), India. *Mutation Research*, 343: 137-144.

Rehana Z., Malik A. ve Ahmad M., 1996. Genotoxicity of the Ganges Water at Narora (U.P.), India. *Mutation Research*, 367: 187-193.

Reifferscheid G., Buchinger S., Cao Z. ve Claus E., 2011. Identification of Mutagens in Freshwater Sediments by the Ames-Fluctuation Assay Using Nitroreductase and Acetyltransferase Overproducing Test Strains. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52: 397-408.

Ribas G., Surralles J., Carbonell E., Xemena A. ve Marcos R., 1996. Genotoxic Evaluation of The Herbicide Trifuralin on Human Lymphocytes Exposed *in Vitro*. *Mutation Research*, 371: 15-21.

Rigaud S., Giorgio C.D., Radakovitch O., Garnier J.M. ve Meo M.D., 2012. Genotoxicity of Sediment Extracts of the Berre Lagoon (France). *Chemosphere*, 88: 937-944.

Sakçali M.S., Yılmaz R., Gücel S., Yarcı C. ve Öztürk M., 2009. Water Pollution Studies in the Rivers of the Edirne Region–Turkey. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 12 (3): 313-319.

Sakura A., Suzuki S. ve Satoh T., 2004. Improvement of the Ames Test Using Human Liver S9 Preparation. In: Yan, Z. ve Caldwell, G., Eds. *Optimization in Drug Discovery: in Vitro Methods*. Humana Press. 325-336.

Sato T., Momma T., Ose Y., Ishikawa T. ve Kato K., 1983. Mutagenicity of Nagara River Sediment. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 118 (4): 257-267.

Sghaier M.B., Bhouri W., Bouhlel I., Skandrani I., Boubaker J., Chekir-Ghedira L. ve Ghedira K., 2011. Inhibitory Effect of *Teucrium ramosissimum* Extracts on Aflatoxin B1, Benzo[a]pyrene, 4-Nitro-o-Phenylenediamine and Sodium Azide Induced Mutagenicity: Correlation with Antioxidant Activity. *South African Journal of Botany*, 77: 730-740.

Siddiqui A.H. ve Ahmad M., 2003. The *Salmonella* Mutagenicity of Industrial, Surface and Ground Water Samples of Aligarh Region of India. *Mutation Research*, 541: 21-29.

Singh A., Chandra S., Gupta S.K., Chauhan L.K.S. ve Rath S.K., 2007. Mutagenicity of Leachates from Industrial Solid Wastes Using *Salmonella* Reverse Mutation Assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66: 210-216.

Singh K.P., Takroo R. ve Ray P.K., 1987. Analysis of Pesticide Residues in Water, ITRC Manual No 1. Industrial Toxicology Research Center, Lucknow.

Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., ve Schneider E.L., 1988. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research*, 175 (1): 184-191.

Song Y.F., Wilke B.M., Song X.Y., Gong P., Zhou Q.X. ve Yang G.F., 2006. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Heavy Metals (HMs) as well as their Genotoxicity in Soil After Long-Term Wastewater Irrigation. *Chemosphere*, 65 (10): 1859-1868.

Soylu H., 2012. Edirne İlindeki Çevresel Sular ve İçme-Kullanma Sularının Bakteriyolojik Ames Testi İle Mutajenitelerinin Araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Trakya Üniversitesi, Edirne.

Sujbert L., Szende B., Schröder H.C., G Müller W.E. ve Török G., 2006. Genotoxic Potential of By-Products in Drinking Water in Relation to Water Disinfection: Survey of Pre-Ozonated and Post-Chlorinated Drinking Water by Ames-Test. *Toxicology*, 15; 219 (1-3): 106-112.

Timbrell J.A., 2008. *Principles of Biochemical Toxicology*, *Biochemical Mechanism of Toxicity: Spesific Examples* (4. Baskı). Informa Healthcare, New York. 293-391.

Uluçam G., 1997. Tunca Nehrinde Kimyasal Kirliliğin Araştırılması ve Sonuçta Ortaya Çıkacak En Yüksek Kimyasal Kirliliğin Giderilmesi için Uygulanacak Arıtma (Yüksek Lisans Tezi). Trakya Üniversitesi, Edirne.

Umbuzeiro G.A., Roubicek D.A., Rech C.M., Sato M.I. ve Claxton L.D., 2004. Investigating the Sources of the Mutagenic Activity Found in A River Using the *Salmonella* Assay and Different Water Extraction Procedures. *Chemosphere*, 54: 1589-1597.

Umbuzeiro G.A., Kummrow F., Roubicek D.A. ve Tominaga M.Y., 2006. Evaluation of the Water Genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in Relation to the Sediment Contamination and Effluent Discharges. *Environment International*, 32: 359-364.

Uslu O. ve Türkman A., 1987. *Su Kirliliği ve Kontrolü*. T.C. Başbakanlık Çevre Genel Müdürlüğü Yayınları, Eğitim Dizisi I, Ankara.

Valente-Campos S., Dias C.L., Barbour E.D.A., Nascimento E.S. ve Umbuzeiro G.A., 2009. The Introduction of the *Salmonella*/Microsome Mutagenicity Assay in A Groundwater Monitoring Program. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 675: 17-22.

Vigano L., Camoirano A., Izotti A., D'Agostini F., Polesello S., Francisci C. ve Flora S.D., 2002. Mutagenicity of Sediments Along the Po River and Genotoxicity Biomarkers in Fish from Polluted Areas. *Mutation Research*, 515: 125-134.

Vincent-Hubert F., Heas-Moisan K., Munschy C. ve Tronczynski J., 2012. Mutagenicity and Genotoxicity of Suspended Particulate Matter in the Seine River. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 741: 7-12.

Vu B., Alves C.A., Gonçalves C., Pio C., Gonçalves F. ve Pereira R., 2012. Mutagenicity Assessment of Aerosols in Emissions from Wood Combustion in Portugal. *Environmental Pollution*, 166: 172-181.

Watanabe T., Takahashi K., Konishi E., Hoshino Y., Hasei T., Asanoma M., Hirayama T. ve Wakabayashi K., 2008. Mutagenicity of Surface Soil from Residential Areas in Kyoto City, Japan, and Identification of Major Mutagens. *Mutation Research*, 649: 201-212.

Yamaguchi Y., Fukushime M., Fujita T. ve Yamada A., 1991. Distribution and Seasonal Variation of Pesticides in Yodo River Basin. *Journal of Environmental Chemistry*, 1: 56-63.

Yıldırım E., 2001. Meriç-Arda-Tunca Nehirlerinin Kirlilik Durumlarının İncelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kocaeli.

Yıldırım A., Bardakçı F., Karataş M. ve Tanyolaç B., 2010. *Moleküler Biyoloji* (2. Baskı). Nobel Yayınları, İstanbul. 685 s.

Zeytinoğlu H., İncesu Z., Tüylü B.A., Türk A.O. ve Barutça B., 2008. Determination of Genotoxic, Antigenotoxic and Cytotoxic Potential of the Extract from Lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. *in vitro*. *Phytotherapy Research*, 22: 118-123.

Zietz B.P., Nordholt G., Ketseridis G. ve Pfeiffer H., 2001. Mutagenicity of Baltic Seawater and the Relation to Certain Chemical and Microbiological Parameters. *Marine Pollution Bulletin*, 42 (10): 845-851.

http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Molelkularis_diagnoszitka_en_book/ch03.html

http://en.wikipedia.org/wiki/Transversion

ÇİZELGELER **Sayfa No**

Çizelge 1. Ames testinde kullanılan *Salmonella typhimurium* mutant suşlarının genetik özellikleri 10
Çizelge 2. Çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* suşlarının genetik özellikleri ... 22
Çizelge 3. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinin hekzan ekstraktlarının *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki etkileri 43
Çizelge 4. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinin kloroform ekstraktlarının *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki etkileri 44
Çizelge 5. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinin DCM ekstraktlarının *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki etkileri 45
Çizelge 6. Tunca Nehri'nden alınan sediment örneklerinin ekstraktlarının *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerindeki etkileri 46

ŞEKİLLER **Sayfa No**

Şekil 1. Baz substitisyon çeşitleri: transisyonlar ve transversiyonlar 5
Şekil 2. Çerçeve kayması mutasyonu 6
Şekil 3. Tunca Nehri'nde örneklerin alındığı istasyonlar 21
Şekil 4. Su örnekleri ekstraktlarının elde edilmesinde kullanılan evaporatör 30
Şekil 5. *S. typhimurium* TA98 suşunun (a) HB ve (b) MGA plaklarında üreme durumu ... 35
Şekil 6. *S. typhimurium* TA100 suşunun (a) HB ve (b) MGA plaklarında üreme durumu 36
Şekil 7. *S. typhimurium* (a) TA98 ve (b) TA100 suşlarına uygulanan kristal viyole hassasiyeti testi sonuçları 36
Şekil 8. *S. typhimurium* (a) TA98 ve (b) TA100 suşlarına uygulanan ultraviyole hassasiyeti testi sonuçları 37
Şekil 10. *S. typhimurium* (a) TA98 ve (b) TA100 suşlarının S9 yokluğundaki pozitif kontrol sonuçları 41
Şekil 11. *S.typhimurium* (a) TA98 ve (b) TA100 suşlarının S9 varlığındaki pozitif kontrol sonuçları 41
Şekil 12. *S. typhimurium* (a) TA98 ve (b) TA100 suşları için negatif kontrol (DMSO) sonuçları 42
Şekil 13. *S. typhimurium* (a) TA98 ve (b) TA100 suşları için spontan kontrol (kendiliğinden geri dönen koloni sayısının kontrolü) sonuçları 42
Şekil 14. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde S9 yokluğundaki etkileri 47
Şekil 15. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde S9 varlığındaki etkileri 47
Şekil 16. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 yokluğundaki etkileri 48
Şekil 17. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 varlığındaki etkileri 48
Şekil 18. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde

S9 yokluğundaki etkileri..... 49
Şekil 19. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde S9 varlığındaki etkileri..... 49
Şekil 20. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 yokluğundaki etkileri..... 50
Şekil 21. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 varlığındaki etkileri..... 50
Şekil 22. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde S9 yokluğundaki etkileri..... 51
Şekil 23. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde S9 varlığındaki etkileri 51
Şekil 24. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 yokluğundaki etkileri..... 52
Şekil 25. Tunca Nehri'nden alınan su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 varlığındaki etkileri 52
Şekil 26. Tunca Nehri'nden alınan sediment örneklerinden elde edilen ekstraktların farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde S9 yokluğundaki etkileri 53
Şekil 27. Tunca Nehri'nden alınan sediment örneklerinden elde edilen ekstraktların farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerinde S9 varlığındaki etkileri..... 53
Şekil 28. Tunca Nehri'nden alınan sediment örneklerinden elde edilen ekstraktların farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 yokluğundaki etkileri 54
Şekil 29. Tunca Nehri'nden alınan sediment örneklerinden elde edilen ekstraktların farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerinde S9 varlığındaki etkileri..... 54

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Didar GÜZEY
Doğum Yeri: EDİRNE
Doğum Tarihi: 16.10.1988

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Eğitim Fakültesi
Fen Bilgisi Öğretmenliği
(2007-2011)

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
(2011-2013)

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

- **Ulusal kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan <u>özet metin</u> olarak yayımlanan bildiri ya da poster veya gösteri**

1) Bozyel M.E., Çakmak D., Güzey D., Deniz İ., Gümüş S., Gönüz A. ve Demir N., 2012. Çanakkale İl Merkezinde Taşıt Egzoz Kirliliğinin Kızılçam (*Pinus brutia, Pinaceae*) Yaprağı Anatomik Yapısı Üzerine Bazı Etkileri. *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 3-7 Eylül, Ege Üniversitesi, İzmir, s. 440-441.

1) Güzey D., Çakmak D., Deniz İ., Gümüş S., Bozyel M.E., Demir N. ve Gönüz A., 2012. Çanakkale İli Yol Kenarı Topraklarının Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi. *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 3-7 Eylül, Ege Üniversitesi, İzmir, s. 1343-1344.

İŞ DENEYİMİ

Staj: Çanakkale Barbaros İlköğretim Okulu Stajyer Fen Bilgisi Öğretmeni
Çanakkale 18 Mart İlköğretim Okulu Stajyer Fen Bilgisi Öğretmeni

İLETİŞİM

E-posta Adresi: didarguz@hotmail.com