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

KARAMENDERES ÇAYI (ÇANAKKALE) SU VE SEDİMENTİNİN MUTAJENİK POTANSİYELİNİN AMES TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Deniz ÇAKMAK

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: **26/06/2013**

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

ÇANAKKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

DENİZ ÇAKMAK tarafından **YRD. DOÇ. DR. NESLİHAN DEMİR** yönetiminde hazırlanan **"KARAMENDERES ÇAYI (ÇANAKKALE) 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. Cüneyt AKI
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.

Deniz ÇAKMAK

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimleri ile her konuda bana yardımcı olan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR'e; çalışmada kullanılan test suşlarının temini ve değerli katkıları için Sayın Prof. Dr. Hülya SİVAS'a; ekstraktların elde edilmesindeki yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Mustafa YILDIZ'a; çalışmada kullanılan cihazların temini için Sayın Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN'a örneklerin toplanmasındaki yardımları için Sayın Doç. Dr. Şükran ÖZDİLEK'e; çalışma boyunca yapmış oldukları değerli katkıları için Sayın Doç. Dr. Cüneyt AKI, Sayın Yrd. Doç. Dr. Tülay TURGUT GENÇ, Sayın Arş. Gör. Dr. Tülay BİCAN SÜERDEM, Sayın Arş. Gör. Dr. Nurcihan HACIOĞLU ve Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarının her aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Didar GÜZEY'e, beni yalnız bırakmayan ve çalışmanın farklı aşamalarında vermiş oldukları desteklerden dolayı değerli arkadaşlarım Merve BALLI, Esen GEREN, Arş. Gör. Selin ERTÜRK, Uzm. Nuray YILDIRIM ve Burak ÖZDEMİR'e, ayrıca katkılarından dolayı Arş. Gör. Nihan AKINCI, Sayın Arş. Gör. Dr. Berrak Damla YAĞAN, Arş. Gör. Aslıhan ÖZBİLEN, Fatih SEZER, Sait GÜRSOY, Ali Rahmi FIRAT ve Nurbanu PARTAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Maddi ve manevi her konuda desteklerini benden esirgemeyen ve varlıklarıyla bana güç veren sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Deniz ÇAKMAK

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
2AF	2-Aminofloren
A	Adenin bazı
C	Sitozin bazı
cm	Santimetre
dk	Dakika
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
g	Gram
G	Guanin bazı
HB	Histidin/biyotin
HBA	Histidin/biyotin/ampisilin
HCA	Heterosiklik amin
hm^3	Hektometreküp
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
kg	Kilogram
KKD	Kardeş kromatit değişimi
kob	Koloni oluşturan birim
lt	Litre
m	Metre
M	Molarite
MA	Molekül ağırlığı
mg	Miligram
MGA	Minimal glukoz agar
ml	Mililitre
MN	Mikronükleus
N	Normalite

NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth
NPD	4-Nitro-*o*-fenilendiamin
ºC	Santigrat derece
OD	Optik yoğunluk
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbon
S9	Sıçan karaciğeri mikrozomal enzimleri
SA, NaN_3	Sodyum azid
sn	Saniye
T	Timin bazı
UV	Ultraviyole
XAD	Polimerik reçine
β-NADP	β-Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

ÖZET

KARAMENDERES ÇAYI (ÇANAKKALE) SU VE SEDİMENTİNİN MUTAJENİK POTANSİYELİNİN AMES TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Deniz ÇAKMAK

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, Karamenderes Çayı'nın Kumkale ve Karaköy mevkileri arasındaki 5 istasyondan alınan su ve sediment örneklerinin mutajenik etkileri kısa zamanlı mutajenite test sistemlerinden Ames testi ile araştırılmıştır. Çalışmada test edilmek üzere, su örneklerinin farklı ekstraktları (hekzan, kloroform ve diklorometan) ve sediment örnekleri hazırlanmıştır. Çalışmada ekstraktların 10^{0}, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} konsantrasyonları kullanılmıştır. Deneyler *Salmonella typhimurium* bakterisinin TA98 ve TA100 mutant suşları ile mikrozomal enzimler içeren S9 varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir.

Yapılan mutajenite çalışmaları sonucunda, su örneklerinin kloroform ekstraktında bütün istasyonlarda baz çifti değişimine neden olan mutajenik etkinin olduğu saptanmıştır. Hekzan ekstraktında 1. istasyonda mutajenite tespit edilmiştir. Diklorometan ekstraktında ve sediment örneklerinde ise farklı istasyonlarda zayıf mutajenik etkilerin olduğu belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Karamenderes Çayı, Ames testi, su, sediment, mutajenite.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF MUTAGENIC POTENTIAL OF WATER AND SEDIMENT FROM KARAMENDERES RIVER (ÇANAKKALE) BY THE AMES TEST

Deniz ÇAKMAK

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Advisor : Assist. Prof. Dr. Neslihan DEMİR

26/06/2013, 68

In this research, the mutagenic effects of water and sediment samples from 5 stations between Kumkale and Karaköy site of Karamenderes River have been investigated by using short-term mutagenicity test system named Ames. In this study for testing, different extracts (hexane, chloroform and dichloromethane) of water samples and sediment samples have been obtained. 10^{0}, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} doses of extracts in studies have been used. Experiments were carried out with *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 mutant strains in absence or presence of S9 which contains microsomal enzymes.

As a result of the mutagenicity studies, it has been determined that chloroform extracts from water samples of all stations have mutagenic effect which can lead to frameshift mutation. In hexane extract mutagenicity has been detected at station 1. In dichloromethane extract and sediment samples, weak mutagenic effects has been determined at different stations.

Keywords: Karamenderes 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 **2**
1.2. Mutasyon Çeşitleri **2**
1.2.1. Kromozom mutasyonları **2**
1.2.1.1. Kromozom sayı değişimleri **3**
1.2.1.2. Kromozom yapı değişimleri **3**
1.2.2. Gen mutasyonları **4**
1.2.2.1. Baz değişimi mutasyonları **4**
1.2.2.2. Çerçeve kayması mutasyonları **5**
1.3. Mutajen Çeşitleri **6**
1.3.1. Kimyasal mutajenler **6**
1.3.2. Fiziksel mutajenler **8**
1.4. Mutajenite Testleri **9**
1.5. Ames (*Salmonella*/mikrozom) Testi **9**
BÖLÜM 2 - ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR **12**
BÖLÜM 3 - MATERYAL VE YÖNTEM **20**
3.1. Materyal **20**
3.1.1. Çalışma bölgesi **20**
3.1.2. Örneklerin toplanması **20**
3.1.3. Test suşları **21**
3.1.4. Kimyasal maddeler **21**
3.1.5. Stok çözeltiler ve besiyerleri **22**
3.2. Yöntem **30**
3.2.1. Su örneklerinin ekstraksiyonu **30**
3.2.2. Sediment örneklerinin ekstraksiyonu **31**
3.2.3. Test suşlarının genetik özelliklerinin kontrol edilmesi **31**
3.2.3.1. Histidin gereksinimi kontrolü **31**

3.2.3.2. *rfa* mutasyonu kontrolü 31
3.2.3.3. *uvrB* mutasyonu kontrolü 32
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 33
3.2.7. Sıvı kültürün ml'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi 33
3.2.8. Ekstraktların sitotoksik etkilerinin belirlenmesi 33
3.2.9. Testin yapılışı 34
3.2.10. Pozitif kontrol 34
3.2.11. Negatif kontrol 34
3.2.12. Spontan kontrol 35
3.2.13. Sonuçların değerlendirilmesi 35
BÖLÜM 4 - ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 36
4.1. Test Suşlarının Genetik Özelliklerin Kontrolü 36
4.1.1. Histidin gereksinimi 36
4.1.2. *rfa* mutasyonu 37
4.1.3. *uvrB* mutasyonu 38
4.1.4. R faktörü 38
4.2. Mutajenite Testi Sonuçları 39
BÖLÜM 5 - SONUÇ VE ÖNERİLER 57
KAYNAKLAR 58
Çizelgeler…… I
Şekiller……. II
Özgeçmiş IV

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Günümüzde hızlı nüfus artışı, plansız sanayileşme, bilinçsiz tarım uygulamaları gibi nedenlerle çevre kirliliği önemli bir sorun haline gelmiştir. Evsel ve endüstriyel atıklar ile tarımsal ilaçlar uygun şartlar sağlanmadan su kaynaklarına deşarj edilmekte ve bu durum zaten kısıtlı olan su kaynaklarının kirlenmesine neden olmaktadır.

Su kaynaklarına karışan atıklarda canlı hayatını tehdit eden toksik ve kanserojenik maddeler bulunabilmektedir. Bu maddelerin bir kısmı parçalanma, çökelme, adsorbsiyon veya herhangi bir şekilde yok olma özelliğine sahip değillerdir. Dolayısıyla bu kimyasallar su kaynaklarında birikerek çevrede bulunan canlıların sağlığını tehdit etmektedir (Ayan, 2005).

Su ekosistemlerine karışan kimyasalların birçoğu canlı DNA'sında değişikliğe neden olarak mutajenik ve kanserojenik etkilere sahiptir (Anonim, 1991). Bu kimyasallar çok düşük konsantrasyonlarda bile etkili olabilmektedirler. Mevcut kimyasal yöntemlerle dokularda biriken bu maddelerin kimyasal yapılarının analitik şekilde tespit edilmesi mümkün değildir. Bu nedenle biyolojik yöntem ve indikatörlerle dokularda kanserojen ve mutajen madde taraması esasına dayanan yöntemler önem kazanmıştır. İnsan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan sucul organizmalarda da kanserojen ve mutajen maddeler bulunabildiğinden, bu maddelerin genotoksik etkilerinin izlenmesi insan sağlığı açısından büyük öneme sahiptir (Kotelevtsev ve Stepanova, 1995).

1980'li yılların başında gelişmeye başlayan çevresel mutajenite çalışmaları ile insanlardaki çeşitli patolojik olgulardan somatik hücre mutasyonlarının sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. Senil katarakt, safra kesesi ve ülser gibi hastalıkların somatik mutasyonlarla ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Yüksek organizmalardaki yaşlanma mekanizmasında ve kanser hastalıklarında çevresel faktörlerin neden olduğu mutasyonların önemli rol oynadığı vurgulanmıştır (Hartman, 1983; Hartman ve Aukerman, 1986).

Kimyasal maddelerin mutajenik aktiviteleri ilk olarak İkinci Dünya Savaşı'ndan hemen sonra araştırılmış ve hardal gazının kuvvetli bir mutajen olduğu bulunmuştur (Pai, 1985). Daha sonraki yıllarda mutajenlerin etki mekanizması aydınlatıldıktan sonra çevrede bulunan mutajenlerin insanda kansere neden olabileceğinden şüphelenilmiştir. Mutajenite ile kanserojenite arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, bilinen 175 kanserojen maddenin 157'sinin mutajen olduğu ve mutajenite ile kanserojenite arasında %90 oranında bir bağlantı olduğu ileri sürülmüştür. Bu ajanların, hücrelerde somatik mutasyonları uyararak kansere neden olması kanserin somatik mutasyon teorisiyle uyuşmaktadır (Griffiths ve ark., 1996).

1.1. Mutasyon

Canlılarda genetik materyalde herhangi bir nedenle meydana gelen kalıtsal değişikliklere mutasyon adı verilmektedir. Eğer mutasyon gamet hücrelerinde meydana geliyorsa gelecek nesillere aktarılabilir. Somatik hücrelerde oluşan mutasyon ise fenotipte etkisini gösterebilir fakat kalıtsal değildir (Ateş, 2002; Campbell ve Reece, 2010).

Mutasyonlar canlılarda kendiliğinden olabildiği gibi mutajen adı verilen fiziksel ve kimyasal etkenler tarafından da meydana gelebilirler. Mutasyonun kendiliğinden oluşabilme potansiyeli çok düşük olmasına karşın mutajenlerin etkisiyle frekans artmaktadır. Normal şartlarda mutasyon frekansı her jenerasyonda 10^{-5}-10^{-10} oranındadır (Oraler, 1990).

X ve UV ışınları gibi fiziksel mutajenler DNA'da zararlı timin dimerlerinin oluşmasına neden olur. Kimyasal mutajenler ise genetik materyalde farklı şekillerde etkide bulunurlar. Baz analogları, DNA bazlarına benzeyen fakat DNA replikasyonu sırasında yanlış çiftler oluşturan kimyasallardır. Diğer birtakım kimyasal mutajenler ise DNA'nın yapısına katılıp çift sarmal yapıyı bozarak replikasyonun doğru yapılmasını engeller. Bazı mutajenler ise bazların yapısını değiştirerek bazların yanlış eşleşmelerine neden olur (Campbell ve Reece, 2010).

Mutasyon çoğunlukla olumsuz bir durum olmasına karşın, nadiren de olsa faydalı olabilir. Uzun vadede canlılar arasında çeşitlilik yaratarak organizmaların gelişmesine ve evrimine olanak sağlar.

1.2. Mutasyon Çeşitleri

Mutasyonları temel olarak iki grupta incelemek mümkündür: kromozom mutasyonları ve gen mutasyonları. Kromozom mutasyonları da kendi içerisinde "kromozom sayı değişimleri" ve "kromozom yapı değişimleri" olarak ikiye ayrılabilir.

1.2.1. Kromozom mutasyonları

Toplam kromozom sayısındaki değişiklikler, gen veya kromozom parçalarında delesyonlar, duplikasyonlar ve aynı kromozom içinde ya da kromozomlar arasında genetik materyalin yeniden düzenlenmesi şeklinde modifikasyonlar görülebilir. Bu tür değişiklikler kromozom mutasyonları olarak adlandırılır (Klug ve ark., 2009).

1.2.1.1. Kromozom sayı değişimleri

Bu tip kromozomal bozukluklar gametlerin üretimi sırasında oluşan rastgele bir hatadan kaynaklanır. Mayozda kromozomların veya kromotidlerin ayrılamaması ve bölünme sırasında ters kutuplara hareket edememesi sonucu kromozomların gametlere normal dağılımı bozulur (Klug ve ark., 2009). Böyle durumlarda, bir gamet aynı kromozom çeşidinden iki tane alırken diğer gamet hiç almaz. Eğer döllenme sırasında bu iki anormal gametten birisi normal bir gametle döllenirse yavrunun kromozom sayısı anormal olur. Bu duruma anöploidi adı verilir. Eğer döllenmiş yumurtada bir kromozomdan 3 tane bulunursa (2n+1 kromozom) bu anöploid hücreye o kromozom için trisomik denir. Eğer bir kromozom eksikse (2n-1 kromozom) monosomik adı verilir (Campbell ve Reece, 2010).

Kromozom takım sayısındaki değişimler ise öploidi olarak adlandırılır. Bir takımdaki kromozomların sayısının hepsinin birden tam katlar şeklinde artması ya da organizmada tek takım kromozom bulunması şeklinde olabilir. Nadir olarak bazı hayvan ve bitkilerde tek takım yani n kromozom bulunması durumu monoploidi olarak adlandırılır. Bir genomdaki kromozom sayısının ikiden daha çok sayıda artması (2n, 3n, 4n, 5n gibi) durumuna ise poliploidi denir. Öploidide temel problem hücrede çekirdek bölünmesi olduğu halde sitoplazma bölünmesinin (sitokinez) olmamasıdır (endomitoz). Bunun sonucunda kromozom sayıları her bölünmede katı kadar artmış olur (Başaran ve ark., 1995).

1.2.1.2. Kromozom yapı değişimleri

Bir ya da daha fazla kromozomun bir bölümünde eksilme, ilave ya da yer değiştirme ile oluşan yapısal değişikliklerdir (Klug ve ark., 2009). Bu değişiklikler sonucu kromozom sayısı değişmez fakat kromozomlarda gerçekleşen yapısal değişiklikler nedeniyle genetik materyal değişime uğrar (Oraler, 1990). Kromozomlar kendiliğinden de kırılabilir fakat kimyasallara ya da radyasyona maruz kalan hücrelerde kromozom kırılma frekansı artar (Klug ve ark., 2009).

Bir kromozomun bir veya birden fazla yerden kırılıp yok olduğu durumda oluşan mutasyona delesyon adı verilir. Delesyon sonucu genetik bilgi kaybı fazla ise, sonuç genellikle ölümcüldür (Klug ve ark., 2009).

Genetik materyalin herhangi bir kısmı genomda birden fazla sayıda bulunduğunda oluşan duruma duplikasyon adı verilir. Duplikasyonlar mayozda sinaps yapan

kromozomlar arasında eşit olmayan krossing over sonucu meydana gelebilir veya mayoz öncesi bir replikasyon hatası sonucu oluşabilir (Klug ve ark., 2009).

Bir kromozomun kopan parçasının 180° dönerek aynı kromozoma bağlanmasına inversiyon denilir. Kırılmadan önce kromozomda halkaya benzer bir yapı oluşur. Kırılmayla oluşan yapışkan uçlar birbirine yaklaşarak yeniden birleşir. Bu durumda gen sayısı aynı olmasına rağmen diziliş sırası değişir (Klug ve ark., 2009).

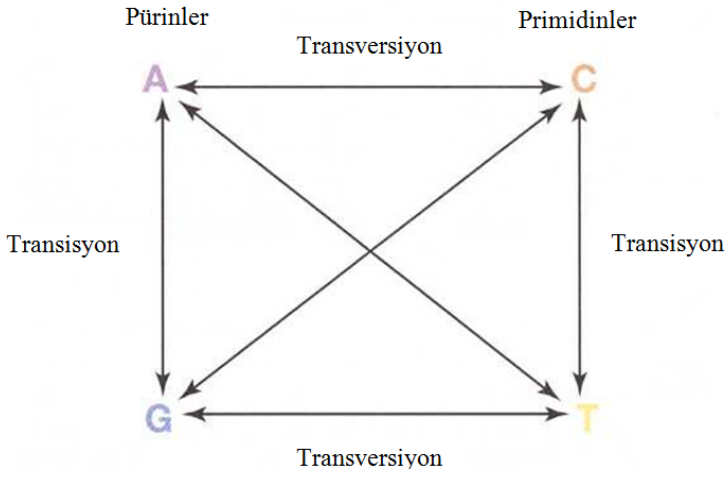
Homolog olmayan kromozomlar arasında kromozom parçalarının yer değiştirmesine translokasyon adı verilir (Temizkan, 1999).

1.2.2. Gen mutasyonları

Gen mutasyonları genetik materyal üzerinde bir ya da birkaç bazı etkileyen küçük ölçekli mutasyonlardır. Buna karşın meydana geldikleri bölgeye bağlı olarak birçok önemli etkiye sebep olabilirler. Gen mutasyonları baz değişimi mutasyonları ve çerçeve kayması mutasyonları olarak iki gruba ayrılır (Karadayı, 2010).

1.2.2.1. Baz değişimi mutasyonları

Bir gen bölgesi içinde bir bazın farklı bir bazla yer değiştirmesi sonucu meydana gelen mutasyonlardır (Şekil 1). Baz değişimi mutasyonları nokta mutasyonları olarak da isimlendirilirler. Bu tip mutasyonlar iki şekilde gerçekleşir. Pirimidin bazının pirimidinle veya pürün bazının pürinle yer değiştirmesi transisyon olarak adlandırılır. Bir pirimidinin bir pürinle karşılıklı yer değiştirmesine ise transversiyon adı verilir (Yıldırım ve ark., 2010).



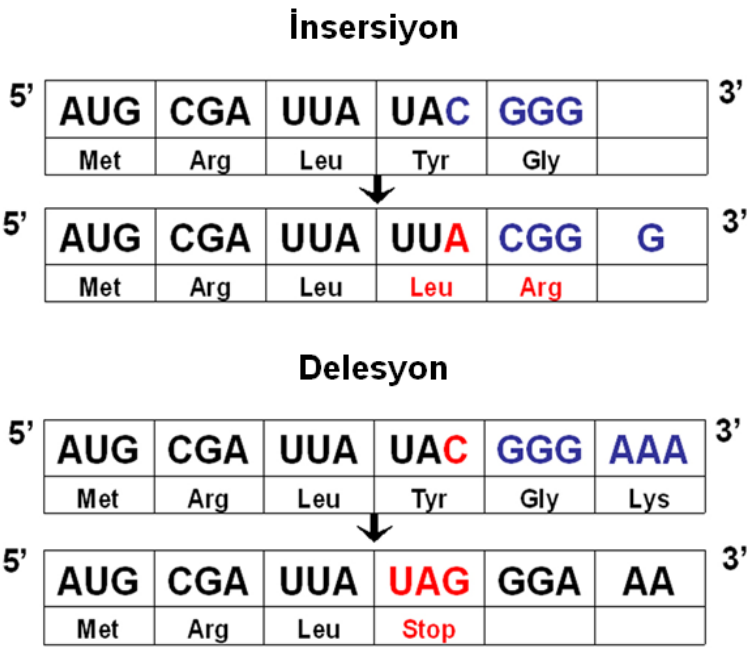
Şekil 1. Baz değişimi mutasyonları: transisyonlar ve transversiyonlar (http://faculty.ycp.edu/~kkleiner/EvolBio/EvolBioImages/Mutation/TransmutationsFH.jpg).

Tek bir nükleotid çiftindeki değişiklikler amino asidin değişimine neden olabilir fakat bu değişiklik protein üzerinde az bir etkiye sahip olabilir. Yeni amino asit değiştirilen amino asitle benzer özelliklere sahip olabilir ya da proteinin işlevinde önemli olmayan bir amino asit bölgesinde bulunabilir. Tam aksine proteinin çok önemli bir yerinde bulunan bir amino asidin değişimi proteinin aktivitesini önemli ölçüde değiştirebilir. Böyle bir durumda nesillerin başarısını artıran, önemli yeteneklere sahip bir protein üretilebilir. Fakat, çoğunlukla bu tip mutasyonlar hücre fonksiyonunu bozan, düşük aktiviteli bir protein yapımına neden olarak zararlı etki gösterir (Campbell ve Reece, 2010).

1.2.2.2. Çerçeve kayması mutasyonları

Gen içerisinde bir noktaya bir ya da daha fazla nükleotidin girmesi (insersiyon) veya çıkması (delesyon) sonucu oluşan mutasyonlardır (Şekil 2). Tek bir bazın eklenmesi veya kaybedilmesi sonucu translasyon sırasında üçlü okuma çerçeveleri değişeceğinden çerçeve kayması mutasyonu adı verilmiştir (Klug ve ark., 2009). Bu tip mutasyonlar eklenen veya eksilen bazın sayısına ve yerine bağlı olarak dramatik sonuçlara neden olabilir. Delesyon veya insersiyonun ilerisinde bulunan tüm nükleotidler yanlış kodonlar şekilde gruplanacağından kısa sürede sonlanarak yanlış anlamlı veya daha sonra sonlanarak anlamsız şeklinde sonuçlanacaktır. Çerçeve kayması mutasyonu genin sonuna çok yakın bir bölgede olmadığı sürece büyük olasılıkla işlevsel olmayan bir protein üretir (Campbell ve Reece, 2010).

İnsanlarda Duchenne Müsküler Distrofi, hemofili B ve β-talasemi hastalıklarının bazı olgularında çerçeve kayması mutasyonunun rol oynadığı belirlenmiştir (Yıldırım ve ark., 2010).



Şekil 2. Çerçeve kayması mutasyonu (http://o.quizlet.com/gyj8MgB9CE-zba8-QhgjyA.jpg).

1.3. Mutajen Çeşitleri

1.3.1. Kimyasal mutajenler

DNA'yı çeşitli biçimlerde etkileyerek bozukluklara neden olan birçok kimyasal madde vardır. Bunlardan bazıları, baz değişimlerine, yanlış baz eşleşmelerine, baz eksilmesine ya da eklenmesine sebep olduğu gibi, bazıları da baz-şeker bağlarının ve bazlar arası hidrojen bağlarının kopmasına neden olarak mutasyonları oluştururlar (Yıldırım ve ark., 2007).

Modern toplumlarda endüstriyel üretim ve tüketim süreçlerindeki aktiviteler sonucunda birçok toksik atık oluşarak su kaynaklarına karışmakta ve bu atıklarda bulunan kimyasal mutajenler çevre ve insan sağlığını tehdit etmektedir. Bu kirlilik kaynaklarının bazıları; fabrikalar, madencilik, savunma sanayi, tarım, enerji santralleri, küçük işletmeler, hastaneler, laboratuvarlar, evsel ve kentsel deşarjlar olarak sıralanabilir. Bu aktiviteler sonucu ağır metaller, pestisitler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, heterosiklik aminler ve aromatik aminler gibi mutajen maddeler su kaynaklarını kirletmektedir (Parlak ve ark., 2011).

Ağır metaller: Ağır metallerin bir kısmı düşük konsantrasyonlarda canlı metabolizması için gerekli olmasına rağmen yüksek konsantrasyonlarda canlı bünyesinde

birikerek toksik etkiye neden olur (Anonim, 1998a). Fosil yakıtların yanması, fabrika bacalarından çıkan dumanların atmosfere, daha sonra yüzey sularına ulaşması, evsel atıklar, tarım faaliyetleri, gemi tamiri, boyanması vb. sebeplerle sularda ağır metal kirliliği gerçekleşmektedir (Bat ve ark., 1999). Arsenik, kadmiyum, krom, nikel ve kurşun gibi ağır metallerin *in vivo* ve *in vitro* testlerde genotoksik etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Codina ve ark., 1994; Sanchez-Galan ve ark., 2001).

Pestisitler: Tarımda verimliliği artırmak için yabani ot, haşereler, böcekler, mantarlar, parazitler gibi zararlıları engellemek için kullanılan pestisitler toksik yapıları nedeniyle hedef alınan zararlı böcek ve hastalığın dışında doğrudan ve/veya dolaylı yollarla insan ve çevresine olumsuz etkiler göstermektedir. Bu maddeler hedef olmayan organizmaya çeşitli yollarla girmekte ve bu organizmada sinir sistemi, endokrin sistem, immün sistem, karaciğer, kas, kalp, kan, boşaltım ve diğer sistemleri etkileyebilmektedirler (Barış, 2007). Yüzey sularında yapılan çalışmalarda tespit edilen bir kısım pestisitlerin genotoksik etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur (Yamaguchi ve ark., 1991; Rehana ve ark., 1995).

Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH'lar): Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, iki ya da daha fazla benzen halkasına sahip hidrofobik karakterli organik bileşiklerdir (Wcisło, 1998). PAH'lar doğal ya da insan kaynaklı olarak organik bileşiklerin eksik yanması sonucu oluşurlar. Doğal şekilde, orman yangınları veya volkanik patlamalarla oluşurken, insan kaynaklı oluşumları ise endüstriyel kaynaklar, motorlu taşıtlar ve sigara ile olmaktadır. Endüstriyel kaynaklar, çöp yakma, çimento fabrikaları, petrol rafinerileri, kok ve asfalt üretimi, alüminyum, demir çelik üretiminden kaynaklanmaktadır (Perry ve ark.,1991; Anonim, 1998b). Isınma ve enerji amaçlı kullanılan kömür, odun gibi katı ve fosil yakıtlar da PAH oluşumuna neden olmaktadır (Dabestani ve Ivanov, 1999; Lee ve ark., 2001; Garban ve ark., 2002; Re N-Poppi ve Santiago-Silva, 2005).

Doğada 100'ün üzerinde PAH bileşiği mevcuttur. Amerika Birleşik Devletleri Sağlık ve İnsan Hizmetleri Bölümü (The Department of Health and Human Services) hayvanlar için benz[a]antrasen, benzo[a]piren, benzo[b]floranten, benzo[j]floranten, benzo[k]floranten, dibenzo[a,h]antrasen ve indol [1,2,3-c,d]pireni kanserojen olarak nitelemiştir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (The International Agency for Research on Cancer, IARC), insanlar için benzo[a]antrasen ve benzo[a]pireni muhtemel

kanserojenler, benzo[b]floranten, benzo[j]floranten, benzo[k]floranten, ve indol[1,2,3-c,d]pireni düşük olasılıkla kansere neden olma ihtimali olan bileşikler olarak sınıflandırmıştır (Anonim, 1995).

Heterosiklik Aminler (HCA'lar): Heterosiklik aminler glutamik asit, fenilalanin, ornitin veya soya globuni içeren proteinlerin ısıl işlem uygulaması sırasında oluşan bileşiklerdir (Ayaz ve Yurttagül, 2008). Özellikle et ve balık gibi proteince zengin gıdaların pişirilmesi esnasında oluşmaktadır (Öz ve Kaya, 2007). Şu ana kadar 20'den fazla HCA tanımlanmıştır (Keating ve ark., 1999). IARC günümüze kadar 8 tane HCA'nın insanda kanserojen olmasının mümkün olduğunu, bir tanesinin ise muhtemelen insan kanserojeni olduğunu test etmiş ve bu bileşiklerin alımının azaltılmasını tavsiye etmiştir (Öztürk, 2012).

Sularda bulunan HCA'ların kaynağı kanalizasyon ve atık su arıtma tesislerinden çıkan maddelerdir. Evsel atıkların genotoksisitesinin %4-70 oranında HCA içeren insan dışkısı kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir (White ve Rasmussen, 1998).

Aromatik Aminler: Aromatik aminler genel olarak, bir ya da daha fazla aromatik halkaya sahip, bir ya da daha fazla amino grubu taşıyabilen kimyasal bileşikler olarak tanımlanır. En basit aromatik amin, modern organik kimya endüstrisi için anahtar organik bileşik olan anilindir. İlk sentetik renklendirici maddeler anilinden hazırlanmıştır (McMurry, 1992). Kalorisiz tatlandırıcılarda, içeceklerde ve çeşitli gıda ürünlerinde, kağıt, deri, kozmetik, ilaç, oyuncak, plastik, matbaa baskıları, tekstil gibi bir çok sanayide anilin, feniletilamin, metilanilin gibi aromatik aminler ve aromatik amin kökenli azo boyaları kullanılmaktadır (Saurina ve Hernández-Cassou, 1999). Aromatik aminlerin birçoğu insan sağlığı açısından zararlı olup, içme sularının klorlanmasıyla oluşan kloroanilinler veya nitrit ve nitratlar ile nitrozolama reaksiyonu sonucu oluşan aromatik nitrozaminler, Amerika Çevre Koruma Birliği (EPA) tarafından öncelikli kirleticiler sınıflandırmasına girmektedir (Laha ve Luthy, 1990).

1.3.2. Fiziksel mutajenler

Ultraviyole, gama ve X-ışınları, gerek doğa koşulları gerekse teşhis, tedavi, bilimsel çalışmalar veya savaş gibi nedenler sonucunda ortaya çıkan ve mutasyona neden olan fiziksel etmenlerdir. Farklı enerji seviyelerine sahip olan bu mutajenlerin DNA'da yarattığı hasar da birbirlerinden farklıdır (Yıldırım ve ark., 2007). Bunlar içerisinde iyonize

radyasyon en önemlisidir. β, α, γ ve X ışınları iyonize radyasyon çeşitleridir ve genotoksik etkiye neden olurlar. Bir iyonize radyasyon mekanizması DNA molekülü ve radyoaktif partiküllerin direkt etkileşmesi ile DNA hasarını tetikleyebilir (Little, 2000). Bu hasar şeker-fosfat diziliminde baz değişmesine veya kırılmalarına neden olabilir. İyonize olmayan radyasyon tiplerinden ultraviyole radyasyon diğer bir önemli genotoksik etkendir. UV ışınlarına maruz kalan DNA'da komşu pirimidin bazları birbirine bağlanarak pirimidin dimerleri oluşur. UV'nin diğer bir genotoksik etkisi oksiradikalleri oluşturmasıdır.

1.4. Mutajenite Testleri

Kimyasal maddelerin kanserojenik risklerini ortaya çıkarmak için en akılcı yaklaşım deney hayvanlarında tümör indüksiyonudur (Commoner ve ark., 1974). Ancak hayvan deneylerinin maliyetinin yüksek olması ve uzun zaman alması kimyasal bir maddenin kanserojenik riskinin ortaya çıkarılmasını dezavantajlı hale getirmektedir (Bridges, 1988; Paolini ve Forti, 1997). Bu nedenle araştırıcılar kanserojenik etki taramalarına esas olabilecek kimyasalların mutajenik etkilerini belirlemeye yönelik, kısa sürede sonuç verebilen ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı mutajenite test sistemi geliştirmişlerdir. En çok kullanılan kısa zamanlı testlerden bazıları; *Salmonella*/mikrozom (Ames) testi, *Umu* testi, Comet testi, Mikronükleus (MN) testi, Kromozom Anormallikleri (KA) testi, Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) olarak sıralanabilir.

Kısa zamanlı test sistemlerinde en yaygın olarak kullanılanları bakteriyel testlerdir. Bakteriyel testlerin tercih edilme nedeni bakterilerin basit üreme ortamlarında hızlı şekilde üreyerek çabuk sonuç vermeleri ve ucuz olmalarıdır (Josephy ve ark., 1997).

1.5. Ames (*Salmonella*/mikrozom) Testi

Ames testi 1970'lerin başında Prof. Dr. B.N. Ames ve Dr. D.M. Maron tarafından geliştirilen ve yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı bakteriyel bir mutajenite testidir (Maron ve Ames, 1983). Ames testi bakteriyel mutajenite testleri içerisinde en yaygın olarak kullanılan, detayları en iyi bilinen ve karakterize edilen, uygulama kolaylığı ve hassaslığı nedeniyle en fazla tercih edilen test sistemlerinden biridir (Gatehouse ve ark., 1998).

Ames test sisteminde *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonla elde edilmiş oksotrofik mutantlar kullanılmaktadır. Bu mutant suşlar histidin operonunda yer alan çeşitli genlerde farklı tiplerde mutasyonlara sahiptirler. Bunun sonucu olarak histidin amino asidi sentezleme yeteneğini kaybetmiş olan suşlar histidinin

bulunmadığı ortamda çoğalamamaktadır. Bu testin temeli; oksotrof his^- suşların kimyasal bir ajanla muamele edilmesi sonucu ikinci bir mutasyon geçirip his^+ hale dönmesine dayanmaktadır (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Her test suşu histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar DNA'daki tek bir bazın değişmesi ile oluşan baz değişimleri veya bir bazın eklenmesi ya da bir bazın çıkarılması ile meydana gelen çerçeve kayması mutasyonlarıdır. Örnek olarak *S. typhimurium* TA98 ve TA1538 suşlarında bulunan *hisD3052* mutasyonu histidinolü histidine çeviren, histidin biyosentezindeki son enzim olan L-histidinol dehidrogenazı kodlayan hisD geni üzerindedir. HisD geni içerisinde 8 kez tekrarlanan GC dizisine yakın bir bazın delesyonu sonucunda çerçeve kayması mutasyonu meydana gelmiştir. *hisD3052* mutasyonunun eski durumuna dönmesi çerçeve kayması mutasyonuna neden olan mutajen maddeler ile mümkün olabilmektedir. *S. typhimurium* TA100 suşunda bulunan *hisG46* mutasyonu ise histidin sentezindeki ilk enzimi kodlayan hisG geninde bir baz çifti değişimi sonucu oluşmuştur. Bu mutasyonla enzim yapısına lösin amino asidi (GAG/CTC) yerine prolin amino asidi (GGG/CCC) katılır. Bu mutasyon, baz çifti değişimine neden olan mutajenler ile eski durumuna çevrilebilmektedir (Maron ve Ames, 1983; Bryan ve ark., 1993; Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Test suşlarında, bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde mutasyon bulunmaktadır. Hücre duvarının lipopolisakkarit bariyerinin kısmen yok olmasını sağlayan *rfa* mutasyonu neticesinde normalde hücre duvarından geçemeyen büyük moleküller hücre içine girebilmektedir.

Ames test sisteminde kullanılan suşlarda DNA onarım sisteminde kesip çıkarma görevini üstlenen enzimi kodlayan uvrB genindeki delesyon sonucu oluşan *uvrB* mutasyonu bulunmaktadır. Bu mutasyon mutajenlerin belirlenmesinde duyarlılığın artmasına neden olur. Ancak uvrB genin uzaklaştırılması sırasında biyotin sentezinden sorumlu bio geni de delesyona uğradığından bakterilerin üreyebilmeleri için biyotine ihtiyaç duyulmaktadır.

Test suşlarına, mutajenleri daha iyi tespit edebilmek için ampisiline dirençlilik geni taşıyan pKM101 R faktörü plazmidi eklenmiştir. pKM101 plazmidi, suşların daha duyarlı olmasından sorumlu olan hata oranı yüksek onarım sistemi (error-prone repair system) ile bağlantılı gen ürünlerini içermekte ve bu sistemin çalışmasını uyararak kimyasalların neden olduğu mutasyonların artmasını sağlamaktadır.

Ames testi, özellikle kimyasal maddelerin mutajenitesini tespit etmek amacıyla tasarlanmıştır (Ames ve ark., 1975). Bu test sistemi ile kısa sürede 5000'den fazla kimyasalın, bitkilerin ve bitkilerden izole edilen biyoaktif bileşenlerin, toprağın, suyun ve havanın mutajenitesi; ayrıca yine bitkilerin, yapay veya doğal kimyasalların ve vitaminler, karotenoidler, flavonoidler ve terpenoidler gibi fitokimyasalların antimutajenik etkisi test edilmiştir (Maron ve Ames, 1983; Lewtas, 1988; Kool ve ark., 1989; Cerná ve ark., 1996, 2000; Aleem ve Malik, 2003; Zeytinoğlu ve ark., 2003; Umbuzeiro ve ark., 2004; Cardoso ve Cólus, 2006; Watanabe ve ark., 2008; Ghazali ve ark., 2011; Hong ve Lyu, 2011; Sghaier ve ark., 2011; Vu ve ark., 2012).

Ames testi sonucunda pozitif sonuç veren bir kimyasal için kesin olarak mutajen/kanserojen olduğunu söylemek mümkün değildir. Test edilen kimyasal için sadece potansiyel bir mutajenik özelliğe sahip olduğu söylenebilir. Sonucun kesinlik kazanabilmesi için mutlaka deney hayvanları ile yapılan çalışmalarla desteklenmesi gereklidir (McCann ve Ames, 1976). Bilinen birçok mutajen madde ilk kez Ames testi ile belirlenmiş olup, daha sonra deney hayvanlarıyla yapılan *in vivo* çalışmalarla bu özellikleri kanıtlanmıştır (Maron ve Ames, 1983).

Bazı kimyasal maddeler canlı yapısında metabolize olduktan sonra aktif hale geçerler. İnsan ve daha alt seviyedeki canlıların karaciğerinde bulunan sitokrom P450 metabolik oksidasyon sistemi bu kimyasalları DNA-reaktif, elektrofilik formlara metabolize etmeye yeteneğine sahiptir. Bakterilerde böyle bir enzim sistemi bulunmadığından dolayı test sistemine mikrozomal enzimler eklenmektedir. Bu enzim karışımı (sitokrom P-450 enzim sistemi ve çeşitli metabolik enzimler) kısaca S9 olarak adlandırılmakta ve genellikle sıçan karaciğerinden elde edilmektedir (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000; Sakura ve ark., 2004).

Çalışma alanımız olan Karamenderes Çayı, çevresindeki tarımsal faaliyetlerde kullanılan pestisitlerin çaya karışması sonucu kirlenmektedir. Ayrıca Bayramiç ve Ezine ilçelerinde faaliyet gösteren birçok deri ve zeytinyağı imalathanesi, mandıra ve mezbahaların atıklarının yetersiz arıtma ile çaya deşarj etmesi sonucu çayda kirlilik meydana gelmektedir (Anonim, 2007).

Literatür taraması sonucunda, daha önce Karamenderes Çayı ile ilgili herhangi bir mutajenik çalışmanın olmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada, Karamenderes Çayı'ndan alınan su ve sediment örneklerinin potansiyel mutajenik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Hollanda'daki Rhine ve Meuse Nehirleri'nden alınan su örneklerinin potansiyel mutajenik etkileri Ames test sistemiyle belirlenmiştir. Polimerik reçine (XAD) kolon kromotografisi yöntemiyle ekstrakte edilen örnekler *Salmonella typhimurium* bakterisinin TA98, TA100 ve TA1535 suşlarına uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Rhine Nehri'nde TA98 suşunda bir örnek haricinde bütün örneklerin mutajenik olduğu tespit edilmiştir. Meuse Nehri'nde ise hiçbir suşun mutajenik olmadığı görülmüştür (Slooff ve Kreijl, 1982).

Brezilya'nın petrokimyasal atıklar ile kirlenmiş Cai Nehri'nden 20 ay boyunca 5 farklı bölgeden su örnekleri alınarak mutajenik etkileri ölçülmüştür. *S. typhimurium* TA98, TA100 ve TA102 suşlarının kullanıldığı çalışmada S9 yokluğunda TA98 suşunda 98 örneğin 14'ünün, TA100 suşunda ise 98 örneğin 21'inin mutajenik olduğu tespit edilmiştir. S9 yokluğunda TA98 suşunun en hassas suş olduğu belirlenmiştir. Elde edilen mutajenik sonuçların %82'sinin endüstriyel alanlara yakın bölgelerde olduğu tespit edilmiştir (Vargas ve ark., 1993).

Amerika Bileşik Devletleri'nin Saginaw ve Buffalo nehirleri ile Indiana Limanı'ndan alınan 29 farklı sediment örneğinden 35 organik ekstrakt hazırlanarak potansiyel mutajenik etkileri incelenmiştir. Dört farklı suşun kullanıldığı çalışmada sadece *S. typhimurium* TA98 suşunda mutajenite tespit edilmiştir (Papoulias ve Buckler, 1996).

Almanya'nın Elba Nehri'nden yedi bölgeden ve nehri besleyen üç farklı koldan alınan su örneklerinde bulunan askıda parçacık maddelerin potansiyel mutajeniteleri Ames testi, Ara-test ve *umu* testleriyle incelenmiştir. Parçacık maddelerin ekstraksiyonu toluen ve metanol ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre altı istasyonda farklı ekstrakt ve test sistemlerinde mutajenik etkinin olduğu gözlenmiştir. Ara-testin mutajeniteyi tespit etmede en hassas test sistemi olduğu ortaya konmuştur. Ames testinde de Ara-teste paralel sonuçlar bulunmakla beraber mutajenite seviyesinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. *Umu* testinde ise çok az sayıda bölgede düşük seviyede SOS cevabın oluştuğu belirlenmiş ve en düşük hassasiyete sahip olduğu tespit edilmiştir (Vahl ve ark., 1997).

İtalya'nın kuzeyindeki bir gölün su sağladığı beş su işleme tesisinden yaz ve kış aylarında işlenmemiş su ve içme suyu örnekleri alınarak mutajenik potansiyeli ölçülmüştür. İşlenmemiş su örneklerinin tamamının *S. typhimurium* TA98 ve TA100

suşlarında mutajen olduğu tespit edilmiştir. Fakat TA98 suşunda daha yüksek seviyede mutajenite gözlemlenmiştir. İçme suyu örneklerinde ise yaz ayında alınan örneklerde dezenfeksiyon için ozon (O_3) ve klordioksit (ClO_2) beraber kullanıldığında TA100 suşunda mutajenitenin arttığı tespit edilmiştir. Sadece ClO_2 dezenfenksiyonu yapıldığında ise mutajenitenin düştüğü saptanmıştır (Monarca ve ark., 1998).

İzmir Körfezi'nden, körfeze akan nehir ve kanalizasyonlardan alınan sediment örneklerinin mutajenitesi Ames test sistemi ile incelenmiştir. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının kullanıldığı çalışmadan elde edilen sonuçlara göre bütün nehirlerin ağzından alınan sediment örneklerinde spontan kontrole göre yüksek oranda mutasyon tespit edilmiştir. Üç nehirden alınan örneklerde en düşük dozda bile mutasyon oluştuğu gözlemlenmiştir. Kanalizasyon örneklerinde de çeşitli seviyelerde mutajenite tespit edilmiştir. İzmir İç Körfezi'ndeki sedimentlerde yüksek oranda mutajenik etkinin olduğu ortaya konmuştur. Dış ve orta kısımlarda ise mutajenik etkini azaldığı belirlenmiştir (Boyacıoğlu, 1999).

İtalya'daki Como Gölü'nün nehir ağzından alınan su örneklerinin genotoksik potansiyeli araştırılmıştır. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanılarak yapılan çalışmada TA100 suşunda mutajenik etki gözlenmezken, TA98 suşunda S9 metabolitinin yokluğunda düşük, varlığında ise çok yüksek mutajenik aktivite gözlenmiştir (Guzzella ve ark., 1999).

Avusturya'nın Viyana Şehri'ndeki Danube Nehri'nden alınan su örnekleri XAD ve blue rayon yöntemiyle ekstrakte edilerek potansiyel mutajenik etkileri araştırılmıştır. Blue rayon ekstraktlarında üç heterosiklik amin tespit edilmiş ve miktarları gaz kromatogrofisi ile belirlenmiştir. XAD ekstraktları *S. typhimurium* TA98 ve YG1024 suşlarında S9 varlığında mutajenik etki göstermiştir. Blue rayon ekstraktlarında da benzer sonuçlar elde edilmiştir ve YG1024 suşunda TA98 suşuna göre daha yüksek mutajenitenin olduğu ortaya konmuştur. TA100 ve YG1024 suşlarında ise mutajenik cevabın olmadığı görülmüştür (Kataoka ve ark., 2000).

Çin'in üçüncü büyük tatlı gölü olan Taihu Gölü'nden su örnekleri alınarak XAD-2 kolon maddesiyle ekstrakte edilmiştir. Sekiz farklı bölgeden alınan örneklerin bir tanesinde yüksek seviyede mutajenite tespit edilmiştir. Bu bölgeye kentsel atıklarla kirletilmiş Grand Kanal ile bağlantısı olan nehrin döküldüğü bildirilmiştir (Shen ve ark., 2000).

Brezilya'nın Rio Grande do Sul eyaletindeki Sinos Nehri'nden alınan su ve sediment örnekleri çalışılmıştır. Kentsel, tarımsal ve endüstriyel kaynaklar tarafından kirletilmiş

nehrin beş noktasından alınan sediment örneklerinin tamamının çerçeve kayması mutasyonuna sebep olduğu saptanmıştır. Su örneklerinde ise mutajenik etkinin olmadığı belirlenmiştir. Yapılan kimyasal analizler sonucunda bu bölgelerdeki ağır metal düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (Vargas ve ark., 2001).

Baltık Denizi'nin Almanya kıyılarından alınan su örnekleri XAD-2/7 kolon maddesiyle ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonucu elde edilen PAH'lar Ames testine tabi tutulmuştur. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının kullanıldığı çalışmada S9 varlığında TA98 suşunda üç bölgede, yokluğunda ise bir bölgede mutajenik etkinin olduğu gözlenmiştir. TA100 suşunda ise mutajenik aktivite saptanmamıştır (Zietz ve ark., 2001).

İtalya'nın Po Nehri boyunca 10 farklı bölgeden yaz ve kış mevsimde sediment örnekleri toplanıp ekstrakte edilerek Ames testi uygulanmıştır. Her iki mevsimde de bütün örneklerin *S. typhimurium* YG1024 suşunda mutajenik olduğu saptanmıştır. TA98, TA100 ve TA102 suşlarında ise mutajenik aktivite tespit edilmemiştir. Kış mevsiminde ve kirlilik kaynaklarına yakın bölgelerde mutajenite seviyesinde artış olduğu görülmüştür (Vigano ve ark., 2002).

Japonya'nın Fukui bölgesinden geçen Mawatari, Asuwa ve Kitsune nehirlerindeki altı bölgeden toplam 52 su örneği blue rayon yöntemiyle ekstrakte edilmiştir. *S. typhimurium* YG1024 ve YG1029 suşlarının kullanıldığı çalışmada toplam 45 numunenin mutajenik olduğu tespit edilmiştir. En yüksek etkinin YG1024 suşunda S9 varlığında olduğu gözlenmiştir. Yaz ve sonbahar mevsimlerinde toplanan örneklerin, kış ve ilkbahar mevsimlerine göre daha yüksek mutajenik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Su örneklerinde yapılan HPLC analizinde 2-feniltriazol (PBTA) tipi mutajenlerin bulunduğu tespit edilmiştir (Watanabe ve ark., 2002).

Brezilya'nın Sao Paulo bölgesindeki nehirden alınan iki farklı su örneği iki farklı yöntemle (XAD-4 ve blue rayon) ekstrakte edilerek çalışılmıştır. Birinci bölge azo boya fabrikasının atıklarının boşaltıldığı, ikinci bölge ise evsel atıkların deşarj edildiği alanlara yakın olarak seçilmiştir. Boya fabrikasının yakınından alınan örnekte diğer bölgeye göre her iki ekstrakta da daha yüksek mutajenite tespit edilmiştir (Kummrow ve ark., 2003).

Kuzey Amerika'nın Providence, Charles, Potomac, St. Lawrance ve Hudson nehirlerinden toplamda 21 bölgeden blue rayon yöntemiyle ekstrakte edilerek alınan su örnekleri çalışılmıştır. Çalışmada *S. typhimurium* TA98, TA100, YG1024, YG1041 ve YG1042 suşları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre YG1041 ve YG1024 suşlarının TA98 suşuna göre daha hassas olduğu ortaya konmuştur. 21 örneğin 15'inin YG1041

suşunda pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. YG1042 suşunun TA100 suşuna göre daha hassas olduğu görülmüştür. Toplamda sekiz örneğin pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir. Kuzey Amerika'nın ana nehirlerinde yapılan bu çalışmada, nehir sularının çerçeve kayması mutasyonuna neden olduğu ve aromatik amin tipinde bileşikler içerdiği bildirilmiştir (Ohe ve ark., 2003).

Hindistan'da yapılan bir çalışmada Yamuna Nehri'nin mutajenik potansiyeli Ames plak inkorporasyon ve Ames fluctuation testleriyle incelenmiştir. Her iki test sisteminde bütün suşlarda mutajenite tespit edilmiştir. Ames plak inkorporasyon testinde *S. typhimurium* TA98, TA102 ve TA104 suşlarının en hassas suşlar olduğu görülmüştür. Ames fluctuation testinde ise TA98 ve TA100 suşlarının daha hassas olduğu belirlenmiştir (Siddiqui ve Ahmad, 2003).

Kütahya'dan Eskişehir'e kadar olan havza içerisinde Porsuk Nehri suyu ve sedimentinin mutajenitesi araştırılmıştır. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanılarak yapılan çalışmada, iki istasyondaki su örneklerinin TA98 suşunda metal konsantrasyonuna bağlı olarak yüksek oranda mutajenik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Sediment örneklerinde ise her iki suşta farklı istasyonlarda mutajenitenin olduğu belirlenmiştir (Kutlu ve ark., 2004).

Brezilya'nın tekstil boyama fabrikası atıklarıyla kirletilmiş Cristais Nehri'nden su ve sediment örnekleri alınarak mutajenik potansiyeli tespit edilmeye çalışılmıştır. Su örnekleri XAD kolon kromotografisi ve blue rayon yöntemleriyle eksrakte edilmiştir. Örnekler *S. typhimurium* TA98, TA100, nitroaromatik-aromatik aminler için hassas olan YG1041 ve YG1042 suşları kullanılarak test edilmiştir. Su örneklerinin TA98 suşunda mutajen, YG1041 ve YG1042 suşlarında ise yüksek seviyede mutajen olduğu belirlenmiştir. Sediment örneklerinin ise S9 varlığında TA98 ve YG1041 suşlarında mutajenik etkiye neden olduğu ortaya konmuştur (Umbuzeiro ve ark., 2004).

Hindistan'da Delhi Şehri'nin ana su kaynaklarından olan evsel ve endüstriyel atıklarla kirletilmiş Yamuna Nehri'nden su örnekleri alınmıştır. XAD kolon maddesinden geçirilen su örneklerinin, *S. typhimurium* TA98 suşları üzerinde S9 varlığında veya yokluğunda yüksek oranda mutajenik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Organokorlu ve organofosforlu pestisitlerin tespit edildiği sıvı-sıvı ekstraksiyonu metodunun uygulandığı örneklerde ise TA98 ve TA97a suşlarında düşük dozlarda dahi yüksek mutajenik etki saptanmıştır (Aleem ve Malik, 2005).

Çin'in en büyük nehri olan ve önemli endüstriyel ve tarımsal bölgelerden geçen Yangtze Nehri'nin denize döküldüğü bölgedeki kirliliğin mutajenik etkisini belirlemek amacıyla su örnekleri alınarak çalışılmıştır. Yapılan kimyasal analiz sonucu su örneklerinde yüksek oranda inorganik azot ve fosfat tespit edilmiştir. Mevsimsel olarak yapılan çalışmada 11 istasyondan örnek alınmış ve bir istasyonun her mevsimde mutajen etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Toplamda ise altı istasyondan toplanan örneklerin mutasyona yol açtığı gözlemlenmiştir (Wu, 2005).

Brezilya'da sanayi tesislerinin deşarj edildiği nehirlerin birleştiği Santos Halici'ndeki dokuz farklı istasyondan alınan su örnekleri XAD-4 kolon maddesiyle, suda bulunan askıda maddeler ise ultrasonikasyon yöntemiyle ekstrakte edilmiştir. Ayrıca bölgede bulunan çelik fabrikasının atıkları sıvı-sıvı ekstraksiyonu metoduyla ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstraktların potansiyel mutajenik etkileri Ames test sistemiyle belirlenmeye çalışılmıştır. Birinci ve beşinci istasyonlarda sıvı ekstrakta, üçüncü istasyonda ise hem sıvı ve hem de partikül ekstraktlarında düşük seviyede mutajenite tespit edilmiştir. Fabrika atıklarında ise *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 varlığında mutajenitenin olduğu belirlenmiştir (Umbuzeiro ve ark., 2006).

Afyon'da bulunan Eber Gölü ve gölü besleyen Akarçay üzerindeki üç istasyondan alınan su örneklerinin mutajenik potansiyeli ölçülmüştür. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının kullanıldığı çalışmada S9 yokluğunda TA98 suşunda tüm istasyonlarda, TA100 suşunda ise iki istasyonda mutajenik etki gözlenmiştir. S9 varlığında ise mutajenik aktivite tespit edilmemiştir (Ciğerci ve ark., 2007).

Brezilya'nın Rio Grande do Sul eyaletindeki üç farklı su kaynağından su örnekleri alınarak mutajenik potansiyelleri değerlendirilmiştir. Birinci istasyon için endüstriyel tesislerin yoğun olduğu bir alan seçilmiştir. Diğer iki istasyon için ise endüstriyel tesislerin olmadığı alanlar seçilmiştir. Farklı zamanda alınan örneklerde birinci istasyonda 2000 yılında alınan işlenmemiş su örneklerinin hepsinde mutajenite tespit edilmiştir. 2004 yılında alınan işlenmiş su örneğinde ise *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında S9 yokluğunda mutajenite tespit edilmiştir. İkinci bölgede ise sadece işlenmiş su örneğinde TA100 suşunda S9 varlığında mutajenik aktivite gözlenmiştir. Üçüncü istasyonda ise mutajenik etkiye rastlanmamıştır (Pereira ve ark., 2007).

Arjantin'in Tucuman Nehri bölgesinden alınan su örneklerinin genotoksik etkisi Ames testi ve *Allium* testi ile araştırılmıştır. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının kullanıldığı Ames testinde mutajenik aktivite gözlenmemiştir. *Allium* testinde ise bütün

örneklerin genotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür (Gana ve ark., 2008).

Arjantin'de bulunan Matanza-Riachuelo Nehri'ndeki üç bölgeden alınan sediment örneklerinin genotoksik potansiyeli Ames, *Saccharomyces cerevisiae* D7 ve *Allium* test sistemleri ile incelenmiştir. Birinci bölge tarımsal faaliyetlerin yapıldığı, ikinci bölge katı atıkların boşaltıldığı, üçüncü bölge ise endüstriyel atıkların deşarj edildiği alanlar olarak seçilmiştir. Ames testinde hiçbir bölgede mutajenik aktivite gözlenmemiştir. *S. cerevisiae* D7 testinde üçüncü istasyonda gen değişimi ve mitotik geri dönüşüm, ikinci istasyonda ise sadece gen değişimi olduğu tespit edilmiştir. *Allium* testinde ise yine üçüncü istasyonda kromozom aberasyonlarında artış olduğu belirlenmiştir (Magdaleno ve ark., 2008).

Brezilya'nın Cai Nehri'ndeki altı istasyondan iki farklı zamanda alınan 10 su örneği Ames ve microscreen phage-induction testleri ile test edilmiştir. Her iki periyotta da petrokimyasal kompleksin yakınındaki istasyonlarda mutajenitenin yüksek olduğunu belirlenmiştir. Ames testinde ağırlıklı olarak *S. typhimurium* TA97a suşunda pozitif sonuçlar elde edilmiştir. İkinci periyotta microscreen phage-induction testinde genotoksik aktivite gözlenmiştir. Ayrıca bu periyottaki örneklerde sitotoksisitenin daha yüksek olduğunu saptanmıştır (Vargas ve ark., 2008).

Brezilya'da yapılan bir çalışmada evsel ve endüstriyel kirliliğe maruz kalmış Sinos Nehri'ndeki üç farklı istasyondan alınan su örneklerinin potansiyel mutajenik etkileri araştırılmıştır. Toplamda yedi farklı zamanda alınan örneklerin ilk altısı direkt olarak uygulanmış, sonuncusu ise XAD kolon maddesiyle ekstrakte edilerek test edilmiştir. Direkt konsantre edilmiş örnekler *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında negatif sonuç vermiştir. Üçüncü örnekleme periyodunda TA1535 suşunda mutajenite tespit edilmiştir. Bütün mevsimlerde alınan örneklerde sitotoksik aktivite gözlenmekle beraber, ekstrakte edilen örneklerde aynı mevsimde alınan diğer örneklere göre yüksek sitotoksisite gözlenmiştir (Lemos ve ark., 2009).

Çin'in endüstriyel ve evsel atıklarla kirlenmiş Songhua Nehri'nden yaz ve kış mevsiminde alınan su örneklerinini genotoksik potansiyelini belirlemek amacıyla Ames, mikronükleus (MN) ve kardeş kromatit değişim (KKD) testleri uygulanmıştır. Ames testinde *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 varlığında yüksek seviyede mutajenite olduğu tespit edilmiştir. Diğer suşlarda mutajenik aktivite gözlenmemiştir. MN ve KKD testlerinde doza bağlı olarak genotoksik etkinin olduğu tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2009).

Çin'in Taihu Gölü'nden alınan sediment örneklerinde bulunan organoklorlu pestistlerin mutajenik potansiyeli araştırılmıştır. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının

kullanıldığı çalışmada, TA98 suşunda örneklerin mutajenik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Sediment örneklerinde yapılan kimyasal analizde organoklorlu pesitistlerin yüksek oranda olduğu belirlenmiştir fakat mutajenite ile pestisit seviyesi arasında bir korelasyon kurulamamıştır (Zhao ve ark., 2010).

Brezilya'da odun koruma endüstrisi atıklarıyla kontamine olmuş Taquari Nehri'nin üç bölgesinden kış ve bahar mevsimlerinde alınan sediment örneklerinin potansiyel genotoksik etkileri Ames ve *Allium* test sistemleri ile araştırılmıştır. *S. typhimurium* TA98, TA97a ve TA100 suşlarının kullanıldığı Ames testinde, bahar mevsiminde alınan örneklerde üçüncü istasyonda TA98 suşunda S9 varlığında yüksek seviyede mutajenite tespit edilmiştir. Kış mevsiminde ise ikinci istasyonda üç suşta da mutajenik aktivite gözlenmiştir. Kış mevsiminde alınan örneklerin yaz mevsimine oranla daha yüksek mutajenik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *Allium* testinde ise sadece yaz mevsiminde birinci ve ikinci istasyonlarda kromozom aberasyonlarında anlamlı bir artışın olduğu ortaya konmuştur (Costa ve ark., 2012).

Fransa'nın endüstriyel atıklarla kirlenmiş Seine Nehri ağzından su ve sediment örnekleri alınarak Ames ve Comet testleri uygulanmıştır. *S. typhimurium* TA98 suşunun kullanıldığı Ames testinde 14 örneğin 11'inin S9 varlığında mutajen olduğunu tespit edilmiştir. Kimyasal boya fabrikası ve atık su işleme tesisi atıklarının döküldüğü bölgelerde en yüksek seviyede mutajenitenin olduğunu belirlenmiştir. Comet testinde ise örneklerin insan hepatosit (HepG2) hücrelerinde genotoksik etkiye neden olduğunu ortaya konmuştur (Vincent-Hubert ve ark., 2012).

Fransa'nın evsel ve endüstriyel atıklarla kontamine olmuş Berre Lagünü'nden alınan sediment örneklerinin genotoksik potansiyeli Ames, Comet ve MN testleriyle incelenmiştir. Ames testinde kontamine olmamış alandan alınan örnekte ve kontamine olmuş bölgelerin birinde mutajenik etki gözlenmiştir. Comet ve MN testlerinde üç bölgede farklı pH seviyelerinde yüksek genotoksik aktivite tespit edilmiştir. Kontamine olmuş bölgelerden alınan örneklerde yüksek ağır metal seviyeleri tespit edilmiştir. Kontamine olmamış bölgede ise demir ve mangan seviyesinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Rigaud ve ark., 2012).

Hindistan'ın Chinhat endüstriyel bölgesindeki pestisit fabrikasından alınan atık su örneklerinin genotoksik potansiyeli üç farklı test sistemiyle (Ames, DNA tamiri hasarlı *Escherichia coli* K-12 mutantları ve bakteriyofaj λ) incelenmiştir. XAD ve sıvı-sıvı ekstraksiyonu metodlarıyla elde edilen ekstraktlardan XAD ekstraktlarında Ames testinde

daha yüksek mutajenite tespit edilmiştir. *S. typhimurium* TA97a, TA98, TA100, TA102 ve TA104 suşları arasında en yüksek mutajenik cevabın TA98 suşunda gerçekleştiği belirlenmiştir. DNA tamiri hasarlı *E. coli* K-12 testi ve bakteriyofaj λ testinde de yüksek genotoksik hasar gözlenmiştir. XAD ekstraktlarının en yüksek seviyede hücre içi hasara neden olduğu saptanmıştır (Anjum ve Malik, 2013).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

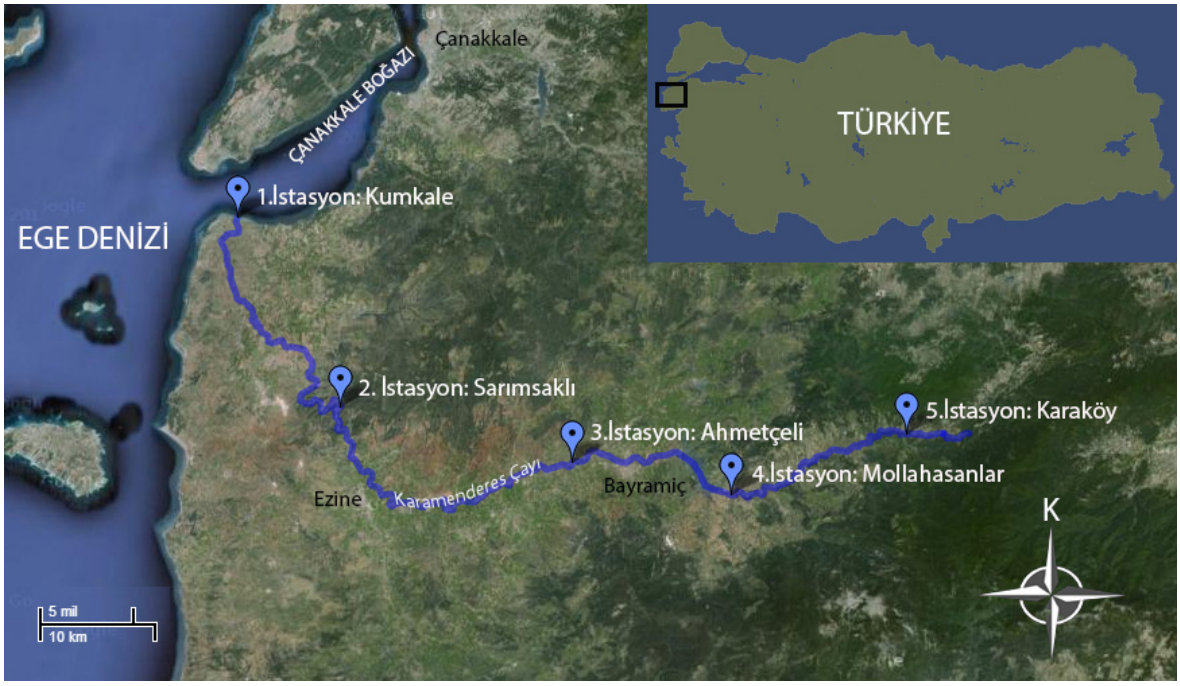
3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma bölgesi

Karamenderes Çayı, Kaz Dağları'nda doğup Çanakkale'nin Bayramiç ve Ezine ilçelerinin yakınından geçerek Kumkale yakınlarında Karanlık Liman'da Çanakkale Boğazı'na dökülür. 110 km uzunluğa ve yıllık 460 hm^3 su potansiyeline sahiptir. Bayramiç ve Ezine ilçeleri ile birçok köy ve tarım alanının su ihtiyacını karşılayan Karamenderes Çayı, bölgede daimi olarak akan tek su kaynağıdır (Kayacan, 2008).

3.1.2. Örneklerin toplanması

Su ve sediment örnekleri Kasım 2012 tarihinde Karamenderes Nehri'nde belirlenen 5 istasyondan alınmıştır. Bu istasyonlar sırasıyla: 1. Kumkale, 2. Sarımsaklı, 3. Ahmetçeli, 4. Mollahasanlar ve 5. Karaköy'dür (Şekil 3). Su örnekleri 5'er lt miktarında akıntının çok yüksek olmadığı bölgeden, sediment örnekleri ise yaklaşık 250 g miktarında akarsu tabanının yüzey kısmından alınmıştır. Su ve sediment örnekleri +4 ºC'de buzdolabında saklanmıştır.



Şekil 3. Karamenderes Çayı'nda örneklerin alındığı istasyonlar.

3.1.3. Test suşları

Çalışmada, Prof. Dr. Bruce N. Ames ve Dr. Dorothy M. Maron tarafından *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlar sonucu geliştirilen TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. TA98 suşu çerçeve kayması, TA100 suşu ise baz çifti değişimi mutasyonlarına neden olan mutajenlerin belirlenmesi için kullanılmıştır (Çizelge 1). Suşlar Prof. Dr. Hülya Sivas (Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından hediye edilmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan *S. typhimurium* suşlarının genetik özellikleri (Mortelmans ve Zeiger, 2000)

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

3.1.4. Kimyasal maddeler

Ekstraktların hazırlanmasında çözücü olarak kloroform ($CHCl_3$) (Kimetsan), aseton (CH_3COCH_3) (Işık Kimya), hekzan (C_6H_{14}) ve diklorometan (CH_2Cl_2) (Tekkim) kullanılmıştır. Pozitif kontrollerde mutajen olarak 4-nitro-o-fenilendiamin (NPD) Sigma-Aldrich'den, sodyum azid (SA, NaN_3) ve 2-aminofloren (2AF) Merck'den temin edilmiştir. Bu kimyasalların dışında, çalışmada magnezyum sülfat ($MgSO_4.7H_2O$), sitrik asit monohidrat ($C_6H_8O_7.H_2O$), potasyum fosfat (K_2HPO_4), sodyum hidroksit (NaOH), sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), magnezyum klorür ($MgCl_2.6H_2O$), sodyum dihidrojen fosfat ($NaH_2PO_4.H_2O$), disodyum hidrojen fosfat ($Na_2HPO_4.2H_2O$) ve dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck); sodyum amonyum fosfat ($NaHNH_4(PO_4.4H_2O)$), glukoz, L-histidin, D-biyotin, glukoz-6-fosfat ve sıçan karaciğeri S9 fraksiyonu (Sigma-Aldrich); agar (Difco) ve nutrient broth (Oxoid) kullanılmıştır.

3.1.5. Stok çözeltiler ve besiyerleri

Vogel-Bonner E ortamı (50X VB çözeltisi)

Kullanımı: Minimal glukoz agar (MGA), histidin/biyotin (HB) ve histidin/biyotin/ampisilin (HBA) agar plaklarında.

1000 ml için

Magnezyum sülfat ($MgSO_4.7H_2O$)…… 10 g

Sitrik asit monohidrat ($C_6H_8O_7.H_2O$)…… 100 g

Potasyum fosfat (K_2HPO_4)……. 500 g

Sodyum amonyum fosfat ($NaHNH_4(PO_4.4H_2O)$)……. 175 g

Distile su (45 ºC)……. 670 ml

Distile su, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerine alınarak yukarıdaki kimyasallar sırasıyla ilave edildi. Kimyasalların biri çözünmeden diğerinin eklenmemesine dikkat edildi. Kimyasallar çözündükten sonra su ileve edilerek 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavda 121 ºC'de 20 dk sürede steril edildi. Steril edilen çözelti oda sıcaklığında saklandı.

%20 Glukoz çözeltisi

Kullanımı: MGA, HB ve HBA plaklarının hazırlanmasında karbon kaynağı olarak.

100 ml için

Glukoz…… 20 g

Distile su……..… 100 ml

Glukoz distile su içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde tamamen çözdürüldü. 121 ºC'de 20 dk otoklavda steril edildikten sonra +4 ºC'de saklandı.

%0,5 Histidin çözeltisi

Kullanımı: HB ve HBA plaklarında.

100 ml için

L-Histidin…… 0.5 g

Distile su……. 100 ml

Histidin distile suda çözündükten sonra 0.2 µm çaplı membran filtre ile steril edildi ve +4 ºC'de saklandı.

0,5 mM Biyotin çözeltisi

Kullanımı: HB ve HBA plaklarında.

	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 suya ilave edilerek çözüldü. 0.2 µm çaplı membran filtre ile steril edildikten sonra +4 ºC'de saklandı.

0,02 N NaOH çözeltisi

Kullanımı: Ampisilin çözeltisinde.

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

NaOH bir miktar su içerisinde çözündü ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

(%0,8/0,02 N NaOH) Ampisilin çözeltisi

Kullanımı: Test suşlarında pKM101 plazmidi varlığının kontrolünde ve bu plazmidi taşıyan suşların master plaklarının hazırlanmasında.

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

Ampisilin trihidrat 0,02 N NaOH içinde çözüldü. 0,2 µm çaplı membran filtre ile steril edildi ve +4 ºC'de saklandı.

Histidin/biyotin/ampisilin (HBA) agar

Kullanımı: Test suşlarının ampisiline dirençlilik özelliklerinin kontrolünde ve master plakların hazırlanmasında.

	500 ml için
Agar……	7,5 g
Distile su……	450 ml
50X VB tuz çözeltisi……..	10 ml
%20 Glukoz 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

Erlen içerisinde agar, su ile çözülerek otoklavda steril edildi. Daha sonra 65 ºC'ye kadar soğutulan karışıma manyetik karıştırıcı üzerinde steril 50X VB tuz, glukoz ve histidin çözeltileri sırasıyla yavaşça ilave edildi. Karışım 45 ºC'ye düştükten sonra ise sırasıyla biyotin ve ampisilin çözeltileri eklendi. Son olarak 500 ml'ye tamamlanan karışım 25 ml olarak steril petrilere paylaştırıldı.

Nutrient broth (NB)

Kullanımı: Test suşlarının gecelik kültürde üretilmelerinde.

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

Nutrient broth distile suya ilave edildi ve manyetik karıştırıcıda ısıtılarak çözüldü ve 20'şer ml olarak erlenlere dağıtıldı. Otoklavda 121 ºC'de 20 dk steril edilip oda sıcaklığında karanlıkta saklandı.

Nutrient agar (NA)

Kullanımı: Gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısının bulunması ve genotip kontrolü (UV ve kristal viyole hassasiyeti).

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

Nutrient broth ve agar, erlen içerisinde distile su eklenerek çözüldü ve 121 ºC'de 20 dk süreyle otoklavda steril hale getirildi. 25 ml miktarında steril petrilere dağıtıldı. Plaklar buzdolabına +4 ºC'de saklandı.

Minimal glukoz agar (MGA)

Kullanımı: Test suşlarının histidin gereksinimi kontrolünde ve mutajenite deneylerinde.

	1000 ml için
Agar……	15 g
Distile su……	880 ml
50X VB tuz çözeltisi…….	20 ml
%20 Glukoz çözeltisi…….	100 ml

Agar ve distile su karıştırılıp otoklavlandı. Biraz soğuduktan sonra 50X VB tuz çözeltisi ve glukoz çözeltisi ilave edildi ve karışım 1000 ml'ye tamamlandı. Sıcaklık 40-45 ºC'ye düşünce besiyeri petrilere döküldü. Ortam katılaştıktan sonra, buzdolabında +4 ºC'de saklandı.

Histidin/biyotin (HB) agar

Kullanımı: Test suşlarının histidin gereksinimi kontrolünde.

	500 ml için
Agar……	7,5 g
Distile su……	420 ml
50X VB tuz çözeltisi……..	10 ml

%20 Glukoz çözeltisi……. 50 ml

%0,5 Histidin çözeltisi……... 5 ml

0,5 mM Biyotin çözeltisi……... 3 ml

Agar ve distile su karıştırılıp otoklavda 121 ºC'de 20 dk steril edildi. Çözelti 45 ºC'ye kadar soğutulduktan sonra, 50X VB tuz, glukoz ve histidin çözeltileri yavaşça eklendi. Biraz daha soğuduktan sonra biyotin çözeltisi ilave edildi ve karışıma distile su eklenerek 500 ml'ye tamamlandı. Son olarak besiyeri petrilere 25 ml miktarında paylaştırıldı.

0,5 mM Histidin/biyotin çözeltisi

Kullanımı: Mutajenite deneyinde top agara ilave olarak.

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

Kaynama noktasına kadar ısıtılan suya biyotin ilave edildi ve tamamen çözündükten sonra histidin eklendi. 0,2 µm'lik membran filtre ile steril edildikten sonra +4 ºC'de saklandı.

Top agar

Kullanımı: Mutajenite deneyinde.

1000 ml için

Agar (Difco)……... 6 g

Sodyum klorür (NaCl)……... 5 g

Distile su……. 1000 ml

Agar ve NaCl, distile suda ısıtıcılı manyetik karıştırıcı yardımıyla ısıtılarak tamamen çözüldü. 2 ml olarak cam tüplere aktarılan agar otoklavlandı. Otoklavdan sonra tüpler su banyosuna (43 ºC) alındı.

%0,1 Kristal viyole çözeltisi

Kullanımı: rfa mutasyonu kontrolünde.

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

Kristal viyole ve distile su karıştırılıp ışık geçirmeyen bir cam şişede +4 ºC'de saklandı.

%0,9 Tuz çözeltisi (serum fizyolojik)

Kullanımı: Bakteri kültürlerinin seyreltilmesinde.

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

Hazırlanan çözelti otoklavda steril edildi.

0,1 µg/µl 4-Nitro-*o*-fenilendiamin (NPD)

Kullanımı: S9 yokluğunda TA98 suşu için pozitif kontrol olarak.

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

DMSO'da çözülerek 0,2 µm'lik membran filtreden geçirildi. Oda sıcaklığında muhafaza edildi. Deneylerde 10 µg/plak olacak şekilde kullanıldı.

0,01 µg/µl Sodyum azid (SA)

Kullanımı: S9 yokluğunda TA100 suşu için pozitif kontrol olarak.

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

Distile suda çözülüp 0,2 µm'lik membran filtreden geçirildi ve 4 ºC'de muhafaza

edildi. Deneylerde 1 µg/plak olacak şekilde kullanıldı.

0,05 µg/µl 2-Aminofloren (2AF)

Kullanımı: S9 varlığında her iki suş için pozitif kontrol olarak.

	10 ml için
2AF…….	0,5 mg
DMSO…….	10 ml

DMSO'da çözülüp 0,2 µm'lik filtre ile steril edildi ve +4 ºC'de muhafaza edildi. Deneylerde 5 µg/plak olacak şekilde kullanıldı.

0,2 M Sodyum-fosfat tamponu (pH=7,4)

Kullanımı: S9'suz deneyde top agara ilave olarak ve S9 karışımında.

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

Ayrı ayrı hazırlanan iki çözelti bir şişede birleştirildi. pH'ı 7,4'e ayarlandıktan sonra, otoklavda 121 ºC'de 20 dk steril edildi.

0,1 M β-NADP çözeltisi

Kullanımı: S9 karışımında.

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

Suda çözülen β-NADP 0,2 µm çaplı filtre ile steril edildi.

1 M Glukoz-6-fosfat çözeltisi

Kullanımı: S9 karışımında.

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

Suda çözülen glukoz-6-fosfat 0,2 µm'lik filtre ile steril edildi.

Tuz çözeltisi (0,4 M $MgCl_2$+1,65 M KCl)

Kullanımı: S9 karışımında.

	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

$MgCl_2$ ve KCl tuzları suda çözüldükten sonra 121 ºC'de 20 dk sonunda otoklavda steril edildi ve +4 C'de saklandı.

S9 karışımı (sıçan karaciğeri mikrozomal enzimleri + kofaktörleri)

Kullanımı: Mutajenite deneyinde metabolik aktivasyon olarak.

	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 Glukoz-6-fosfat çözeltisi……	0,25 ml
$MgCl_2$-KCl tuz çözeltisi…….	1 ml
Sıçan karaciğeri S9 fraksiyonu …….	2 ml

Distile su, tampon ve çözeltiler sırayla ilave edildi. Daha sonra S9 fraksiyonu karışıma eklendi. S9 karışımı çalışmalara başlamadan hemen önce taze olarak hazırlandı ve deney boyunca buz içinde tutuldu.

3.2. Yöntem

Bu çalışmada kullanılan test suşlarının stok kültür ve master plaklarının hazırlanması, genetik kontroller ve mutajenite deneyleri Maron ve Ames (1983)'in geliştirdiği plak inkorporasyon metoduna göre gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Su örneklerinin ekstraksiyonu

Su örneklerinin ekstraksiyonu sıvı-sıvı ekstraksiyonu metoduyla gerçekleştirildi. Her bir bölgedeki 5 litre su örneği, her seferinde 500'er ml alınıp üzerine 25 ml çözücü eklenerek balon jojede hızlı bir şekilde çalkalandı ve bir süre faz oluşması için beklendi. Daha sonra çözücü ayırma hunisiyle ayrılarak ayrı cam şişelere alındı ve bu işlem iki defa tekrar edildi. Ekstraksiyon için sırasıyla n-hekzan, kloroform ve diklorometan çözücüleri kullanıldı. Daha sonra elde edilen ekstraktlar 45 ºC de evaporatör (Spektral, Heidolph, Laborota 4001; Şekil 4) ve su banyosu yardımıyla uçuruldu ve teste başlamadan önce DMSO eklenerek kalan çökelti çözdürüldü (Singh ve ark., 1987).



Şekil 4. Su örneklerinin ekstraktlarının hazırlanmasında kullanılan evaporatör.

3.2.2. Sediment örneklerinin ekstraksiyonu

Belirlenen bölgelerden alınan sediment örnekleri petri içerisinde etüvde 60 °C'de kurutuldu. Kuruyan sedimentler porselen havanda dövülüp toz haline getirilerek 0,1 g miktarında tartıldıktan sonra steril tüplere alındı. Üzerlerine 1 ml hekzan, kloroform, aseton (1:1:1 v:v:v) karışımından ilave edilerek vortekslendi. Daha sonra soğutmalı santrifüjde (Hettich, Universal 320R) +4 °C'de 5600 g'de 10 dakika süre ile santrifüjlenerek süpernatant kısmı steril tüplere alındı, aynı işlem üç defa tekrarlandı. Elde edilen ekstraktların çözücüleri su banyosu yardımıyla uçuruldu. Ekstraktlar buzdolabında +4 °C'de saklandı. Test uygulanacağı zaman kalan çökeltiye DMSO eklenerek çözüldü (Keijzer ve ark., 2000).

3.2.3. Test suşlarının genetik özelliklerinin kontrol edilmesi

Çalışmanın güvenilirliği bakımından, deneylerde istenilen genetik özelliklere sahip suşların kullanıldığının kanıtlanması gerekmektedir. Bu amaçla test suşlarının orjinal mutasyonlara sahip olup olmadıkları aşağıda yer alan testler ile sürekli kontrol edilmiştir.

3.2.3.1. Histidin gereksinimi kontrolü

Ames testinde kullanılacak olan bakterilerin histidin oksotrofu (his^-) olduğunu belirlemek için MGA ve HB plaklarına ekim yapıldı. Histidin sentezleme yeteneğini kaybetmiş mutant suşlar histidin içermeyen MGA plaklarında üreyemezken HB agar plaklarında üreyebilmektedirler. Bu amaçla, bir gece NB'da üretilen taze kültürden HB agar ve MGA plaklarına çizgi ekim yapıldı. Plaklar, 37 ºC'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.3.2. *rfa* mutasyonu kontrolü

Test suşlarının *rfa* mutasyonuna sahip olup olmadıkları kristal viyole hassasiyeti testi ile belirlendi. Bu amaçla, gecelik kültürlerden 100 µl bakteri alınarak NA plaklarına ekildi. Plağın ortasına 0,5 cm çaplı steril filtre kağıdı diskler yerleştirilerek üzerine %0,1'lik kristal viyole çözeltisinden 10 µl alınıp diske emdirildi. Daha sonra plaklar 37 ºC'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda disklerin etrafında şeffaf olarak gözlenen yaklaşık 14 mm'lik bir inhibisyon zonunun oluşup oluşmadığı gözlendi. Bu zon, normalde hücre duvarından geçemeyecek büyüklükteki kristal viyole boya moleküllerinin *rfa* mutasyonu taşıyan bakteri hücresine girmesi sonucu bakterilerin üreyememesi nedeniyle oluşmaktadır (Ames ve ark., 1973).

3.2.3.3. *uvrB* mutasyonu kontrolü

Test suşlarının *uvrB* taşıyıp taşımadıkları UV hassasiyeti testi ile belirlendi. Gecelik kültürden eküvyonla NA plağına paralel çizgiler şeklinde ekim yapıldı. Petrinin yarısı çizgileri kesecek şekilde plastik bir tabaka ile kapatıldı. Plaklar, 30 watt'lık germisidal UV lambası ile 33 cm yükseklikten 8 sn boyunca ışınlara maruz bırakıldı ve 37 ºC'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda sadece plağın UV ışını almayan kısmında üreme olduğu görüldüğünde bakterilerin *uvrB* delesyonu taşıdıkları anlaşılmaktadır (Ames ve ark., 1973).

3.2.3.4. R faktörü kontrolü

Bakterilerdeki ampisilin direnç faktörünü (R faktörü) içeren pKM101 plazmidlerinin varlığının kontrolü için, test suşları HBA plaklarına ekildi. 37 ºC'de 24 saat inkübasyon sonunda, ampisilin içeren HBA plaklarında üremeyi başaran bakterilerin pKM101 plazmidini taşıdıkları anlaşılmaktadır.

3.2.4. Test suşlarının master plaklarının hazırlanması

Bakteri kültürlerinden HBA plaklarına çizgi ekim yapılarak 37 ºC'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, iyi izole olmuş ve normal büyüklüğe sahip bir koloni öze ile alınarak ampisilin çözeltisi (6,3 µl) içeren 2 ml NB ortamına ekildi ve 37 ºC'de 12 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra tekrar HBA plaklarına ekim yapıldı ve 37 ºC'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda elde edilen master plaklar buzdolabında (+4 ºC) muhafaza edildi. Hazırlanan master plaklar iki ay süre ile +4 °C'de saklanabilir ve gerektiğinde kültür hazırlamak için kullanılabilir.

3.2.5. Test suşlarının uzun süre saklanması ve stok kültürlerinin açılması

Genetik kontrolleri yapılarak HBA plaklarına ekilen suşlardan iyi izole olmuş, normal büyüklüğe sahip bir koloni seçilip 2 ml NB'a ekildi ve suşların ampisiline direnç özelliğinin kaybolmaması için 6,3 µl ampisilin çözeltisi ilave edildi. 37 ºC'de 12 saatlik inkübasyondan sonra steril ependorf tüplerine 0,1 ml DMSO ve 0,9 ml bakteri kültürü eklendi. Tüpler önce sıvı azota daldırıldı, daha sonra da derin dondurucuya (-80 ºC) kaldırıldı.

Stok kültürlerinin açılması için öncelikle -80 ºC'de tutulan bakteri kültürünün oda sıcaklığında çözülmesi sağlandı. Öze yardımıyla ampisilin içeren NB ortamına ekilen bakteriler, 37 ºC'de 12 saat inkübe edildikten sonra HBA plaklarına paralel ekimleri

yapılıp 37 ºC'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu plaklardan iyi izole olmuş bir koloni seçilerek gecelik kültür hazırlandı. 37 ºC'de 12 saat inkübe edilen NB tüplerinden tekrar HBA plaklarına ekim yapıldı.

3.2.6. Test suşlarının gecelik kültürlerinin hazırlanması

Test suşlarının gecelik kültürleri, önceden hazırlanan master plaklardan ya da -80 ºC'de saklanan stok kültürlerden elde edildi. HBA plaklarından iyi izole olmuş ve normal büyüklüğe sahip bir koloni öze yardımıyla alınarak, içerisinde 63 µl ampisilin bulunan 20 ml NB'ye ekildi ve 37 ºC'de 140 rpm'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra gecelik kültürden 0,5 ml alınarak taze ortama aktarılan bakteriler, 37 ºC'de 110 rpm'de 6 saat inkübe edildi. Çalışmada, yaklaşık 1-2x10^9 koloni oluşturan birim (kob)/ml yoğunluğa sahip bakteri kültürleri kullanıldı.

3.2.7. Sıvı kültürün ml'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi

Deneyde kullanılan gecelik kültürlerin ml'sinde bulunan bakteri miktarı, spektrofotometre (OD_{540} ~ 0,1-0,2) ve buna paralel olarak yapılan ekimler ile belirlendi. Taze kültürlere %0,9 serum fizyolojik çözeltisi eklenerek 10^{-1}-10^{-7} arasında seyreltme yapıldı. Her seyreltmeden 0,1 ml alınarak 43 ºC'de tutulan 2 ml top agara ilave edildi. Yavaşça karıştırıldıktan sonra NA plaklarına döküldü. Plaklar, 37 ºC'de 24 saat inkübe edildikten sonra koloniler sayıldı ve aşağıdaki formüle göre ml'deki canlı bakteri sayısı tespit edildi.

1 ml'de bulunan canlı hücre sayısı (kob/ml) = sulandırma faktörü x plaktaki koloni sayısı x 10

3.2.8. Ekstraktların sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Elde edilen su ve sediment ekstraktlarının sitotoksik dozunun saptanması amacıyla hazırlanan 5 farklı konsantrasyon DMSO'da çözülerek 2 ml'lik top agar içeren tüplere konulup üzerlerine 100 µl bakteri kültürü ve 100 µl test maddesi eklendi. Daha sonra tüpler karıştırılarak NA plaklarına döküldü ve donması beklendikten sonra 37 ºC'de 48 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda oluşan koloniler spontan kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik etkinin olup olmadığı belirlendi.

3.2.9. Testin yapılışı

Ames testinin amacı histidin amino asidine gereksinim duyan mutant oksotrof suşların test maddesi ile muamele edilmesi sonucu tekrardan histidin sentezleyebilme özelliğini kazanması esasına dayanmaktadır.

Mutajenite deneyi için, histidin-biyotin çözeltisi eklenmiş 2 ml'lik tüplerde bulunan ve 43 ºC'de su banyosunda tutulan top agara (HB ilaveli) S9'suz deneyde 500 µl sodyum-fosfat tamponu, S9'lu deneyde ise S9 karışımı ilave edildi. Daha sonra 100 µl su veya sediment ekstraktı ile 100 µl bakteri kültürü eklenip karıştırılarak MGA plaklarına döküldü. Plaklar, yaklaşık 15 dakika donması beklendikten sonra inkübatöre alındı ve 37 ºC'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda geri dönen bakteri kolonileri (his^+ revertantlar) sayıldı. Çalışmada her konsantrasyon için üç ayrı plağa ekim yapıldı ve çalışmalar birbirinden bağımsız iki deney şeklinde uygulandı.

3.2.10. Pozitif kontrol

Pozitif kontrol için, S9 yokluğunda *S. typhimurium* TA98 suşu için 4-nitro-*o*-fenilendiamin (NPD) ve TA100 suşu için sodyum azid (SA, NaN_3) kullanıldı. S9 varlığında ise, her iki suş için 2-aminofloren (2AF) kullanıldı. NPD 10 µg/plak, SA 1 µg/plak ve 2AF 5 µg/plak miktarlarında kullanıldı.

Pozitif kontrolde, 43 ºC'deki 2 ml top agara (HB ilaveli) sırasıyla 500 µl sodyum-fosfat tamponu veya S9 karışımı, 100 µl mutajen ve 100 µl bakteri kültürü eklenip karıştırılarak MGA plaklarına döküldü. Plaklar, 37 ºC'de 48 saat inkübe edildi ve daha sonra plaklarda oluşan revertant koloniler sayıldı.

3.2.11. Negatif kontrol

Negatif kontrolde ise dimetilsülfoksit (DMSO) kullanıldı. Negatif kontrol, ekstraktları çözmek için kullanılan DMSO'nun revertant koloni sayısının artmasında bir etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla yapıldı.

Negatif kontrolde, 43 ºC'deki 2 ml top agara (HB ilaveli) sırasıyla 500 µl sodyum-fosfat tamponu veya S9 karışımı, 100 µl DMSO ve 100 µl bakteri kültürü eklenip karıştırılarak MGA plaklarına döküldü. Plaklar, 37 ºC'de 48 saat inkübe edildi ve daha sonra plaklarda oluşan revertant koloniler sayıldı.

3.2.12. Spontan kontrol

Çalışmada kullanılan his^- *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının belirli miktarda kendiliğinden his^+ hale geçebilmektedirler. Bu miktarlar TA98 suşu için 20-50 revertant/plak, TA100 suşu için ise 75-200 revertant/plak'tır (Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Spontan kontrolde, 43 ºC'deki 2 ml top agara (HB ilaveli) sırasıyla 500 µl sodyum-fosfat tamponu veya S9 karışımı ve 100 µl bakteri kültürü eklenip karıştırılarak MGA plaklarına döküldü. Plaklar, 37 ºC'de 48 saat inkübe edildi ve daha sonra plaklarda oluşan revertant koloniler sayıldı.

3.2.13. Sonuçların değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan su ve sediment ekstraktlarının mutajenik aktiviteye sahip olup olmadığı negatif kontrolle karşılaştırılarak belirlenmiştir. Test edilen ekstraktların plaklarda oluşturduğu revertant koloni sayısının, negatif kontrolün 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).

BÖLÜM 4

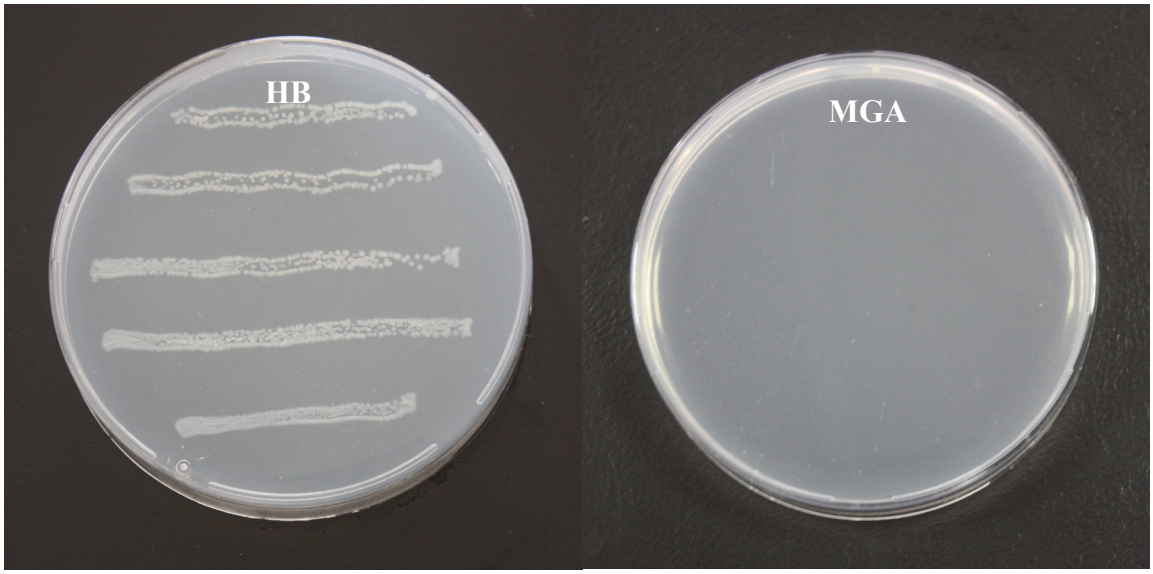
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Test Suşlarının Genetik Özelliklerin Kontrolü

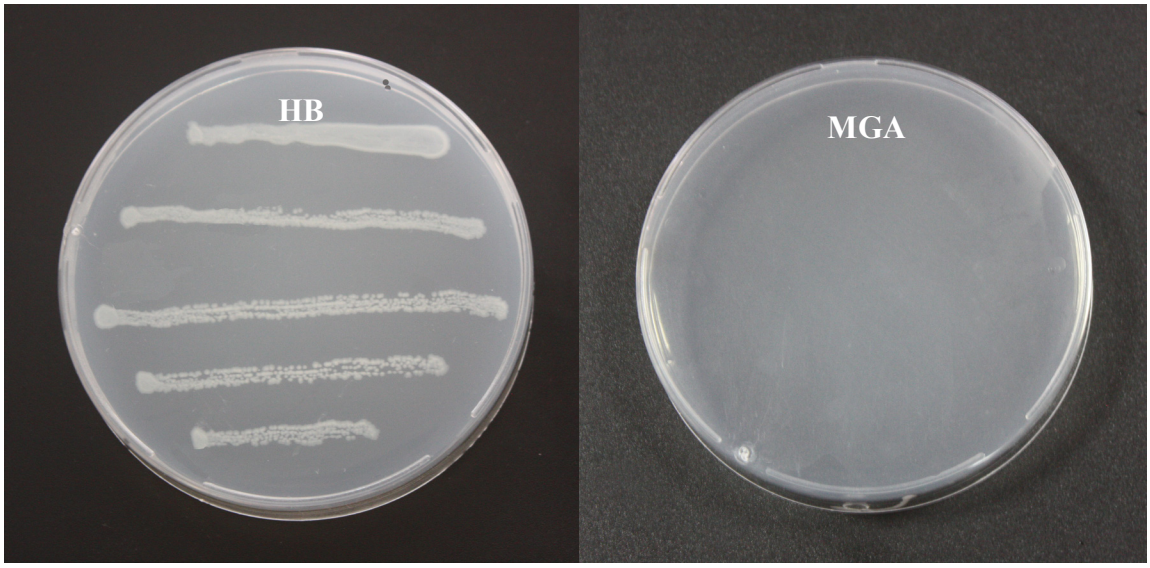
Çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının genetik özellikleri her deney öncesi ve sırasında kontrol edildi. Elde edilen sonuçlara göre her iki suşun da mutajenite çalışmaları için uygun olduğu görüldü.

4.1.1. Histidin gereksinimi

S. typhimurium TA98 ve TA100 suşları, histidin/biyotin agar (HB) ve minimal glikoz agar (MGA) plaklarına ekildi. Suşlar HB plaklarında üreme gösterirken, histidin içermeyen MGA plaklarında üremedi. Böylece, bu suşların his^- mutasyonu taşıdıkları doğrulandı (Şekil 5 ve 6).



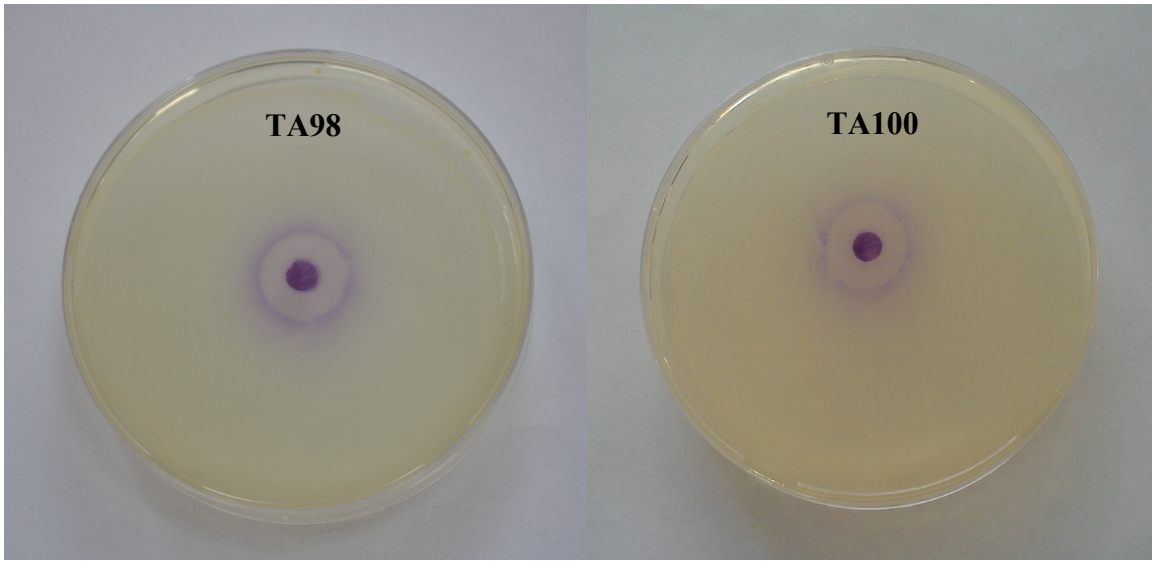
Şekil 5. *S. typhimurium* TA98 suşunun HB ve MGA plaklarındaki üreme durumu.



Şekil 6. *S. typhimurium* TA100 suşunun HB ve MGA plaklarındaki üreme durumu.

4.1.2. *rfa* mutasyonu

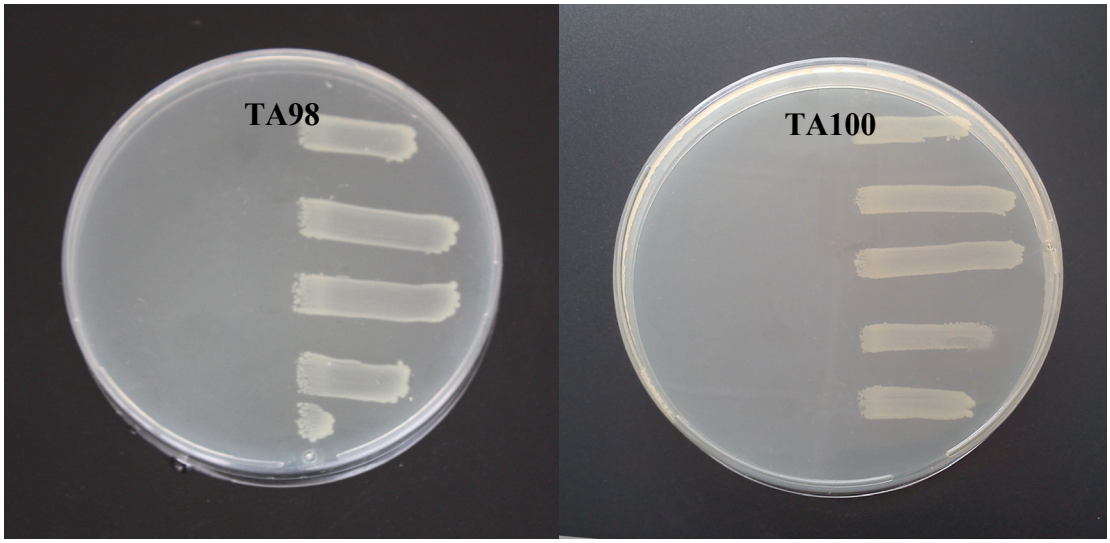
Test suşlarının *rfa* mutasyonunu taşıyıp taşımadığını belirlemek için kristal viyole hassasiyeti testi uygulandı. Test sonucunda kristal viyole çözeltisi damlatılmış disklerin etrafında 14 mm'lik şeffaf zon oluşuğu görüldü. Böylece suşların *rfa* mutasyonuna sahip olduğu doğrulandı (Şekil 7).



Şekil 7. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları *rfa* mutasyonu kontrolü sonuçları.

4.1.3. *uvrB* mutasyonu

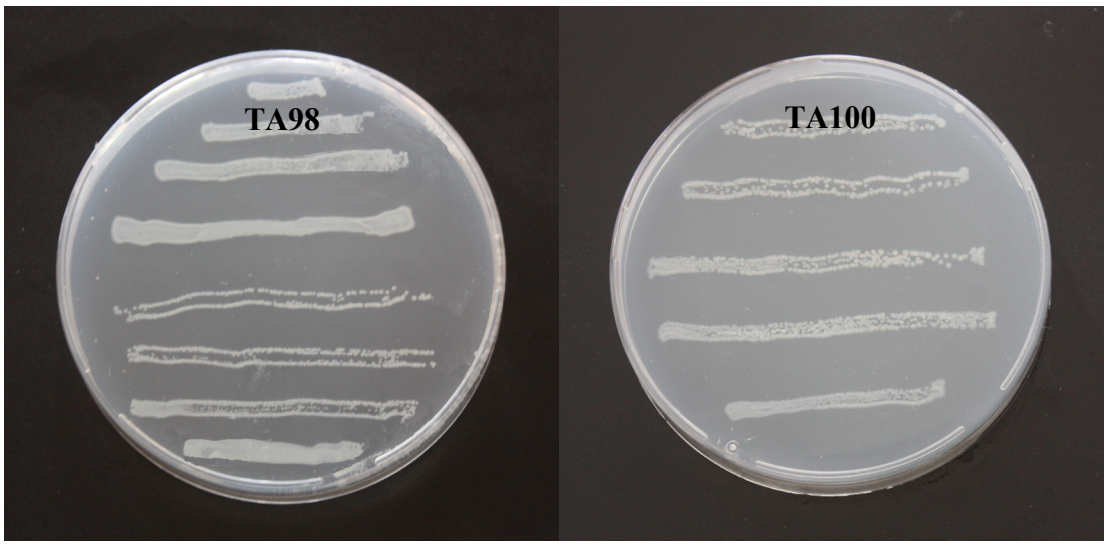
Çalışmada kullanılan test suşları nutrient agar plaklarına ekilip plağın yarısı kapatılarak UV'ye maruz bırakıldı. UV'ye maruz kalan kısımda üreme olmazken, üzeri kapatılan kısımda üreme olduğu görüldü. Böylece suşların *uvrB* mutasyonu taşıdığı belirlendi (Şekil 8).



Şekil 8. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları *uvrB* mutasyonu kontrolü sonuçları.

4.1.4. R faktörü

Test suşlarında ampisilin direnç geni taşıyan pKM101 plazmidlerinin varlığı histidin/biyotin/ampisilin (HBA) plaklarında üremesi sonucu doğrulandı (Şekil 9).

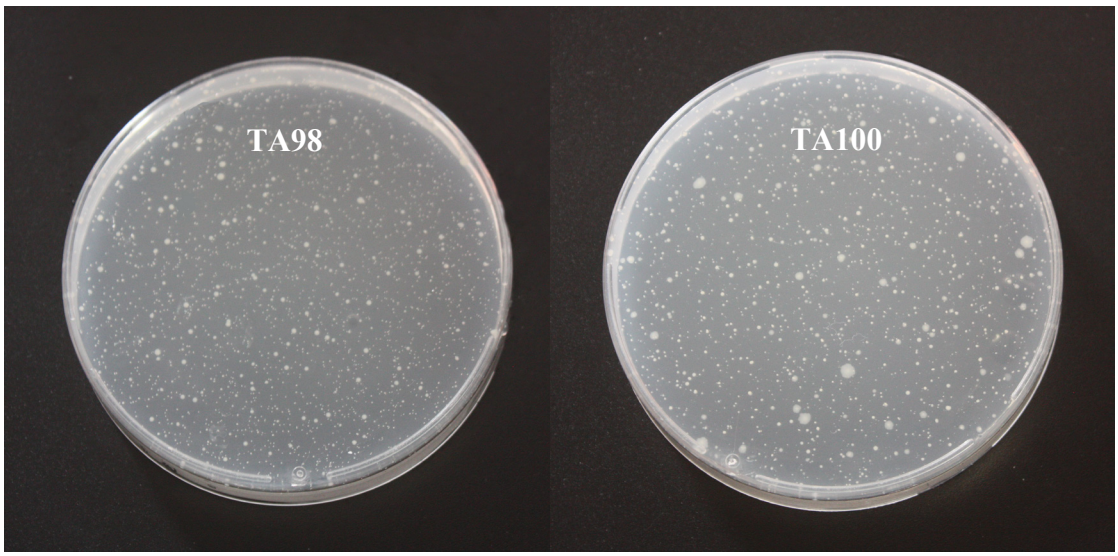


Şekil 9. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları R faktörü kontrolü sonuçları.

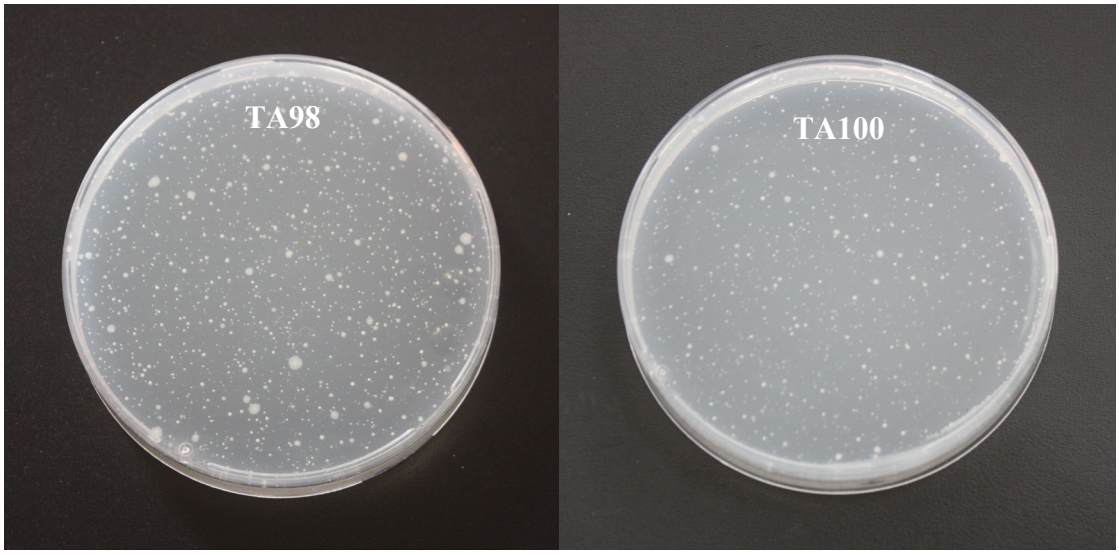
4.2. Mutajenite Testi Sonuçları

Bu çalışmada, Karamenderes Çayı'ndan alınan su ve sediment örneklerinin mutajenik aktiviteye sahip olup olmadığı Ames testi ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, su örneklerinden üç farklı ekstrakt (hekzan, kloroform, diklorometan) ve sediment örneği hazırlandı. Her su ve sediment örneği için 5 farklı konsantrasyon (10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}) hazırlandı. Her konsantrasyondan üç farklı petriye ekim yapıldı ve çalışmalar birbirinden bağımsız iki deneyde gerçekleştirildi. Deneylerde negatif kontrolde dimetilsülfoksit (DMSO), pozitif kontrollerde S9'suz deneyde *S. typhimurium* TA98 suşu için 4-nitro-o-fenilendiamin (NPD), TA100 suşu için ise sodyum azid (SA); S9'lu deneyde ise her iki suş için de 2-aminofloren (2AF) kullanıldı (Şekil 10, 11, 12 ve 13).

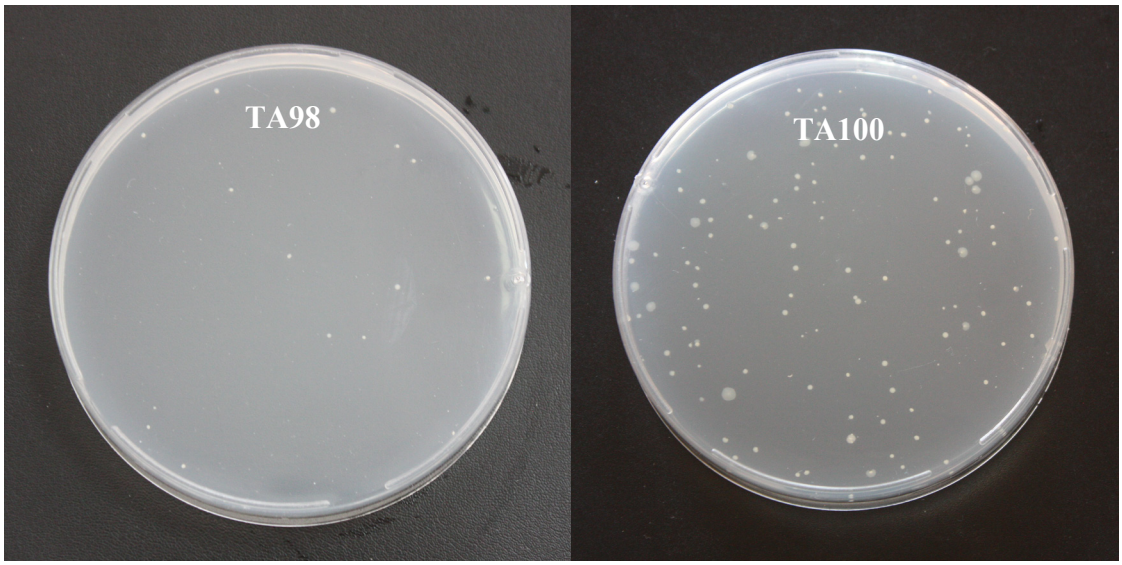
Çalışmada kullanılan *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında test edilen ekstraktlar ile spontan, negatif ve pozitif kontrollere ait revertant koloni sayıları hesaplanarak Çizelge 2-5'de verilmiştir. Elde edilen sonuçların mutajenik sayılabilmesi için revertant koloni sayısının negatif kontrolde elde edilen sayının 2 katı olması gerekli görülmüştür.



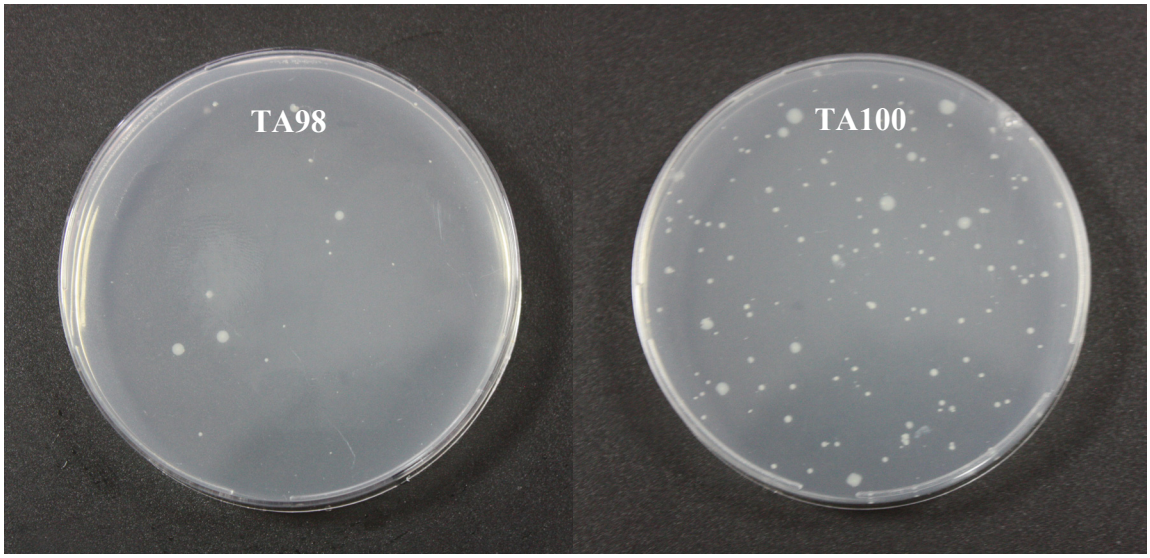
Şekil 10. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının S9 yokluğunda pozitif kontrol sonuçları.



Şekil 11. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının S9 varlığında pozitif kontrol sonuçları.



Şekil 12. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının negatif kontrol sonuçları.



Şekil 13. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının spontan kontrol sonuçları.

Su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarında, S9 yokluğunda 1. istasyonda *S. typhimurium* TA100 suşunda 10^{-2} konsantrasyonunun mutajen olduğu, daha yüksek konsantrasyonlarda ise toksik etkiye paralel olarak revertant koloni sayısında düşüş olduğu görülmüştür (Şekil 16). 4. istasyonda her iki suşta 10^{-4} konsantrasyonu hariç bütün konsantrasyonlarda zayıf mutajenik etkinin olduğu belirlenmiştir (Şekil 14 ve 16). S9'lu deneyde ise negatif kontrole göre anlamlı bir artışın olmadığı görülmüştür (Şekil 15 ve 17).

Kloroform ekstraktlarında, S9'suz çalışmada *S. typhimurium* TA98 suşunda 4. istasyonda 10^{-1} konsantrasyonunda zayıf mutajenitenin varolduğu, 10^{0} konsantrasyonunda ise sitotoksik etkinin olduğu görülmektedir (Şekil 18). TA100 suşunda ise 4. istasyon hariç her istasyonda en yüksek konsantrasyonda (10^{0}) mutajenik aktivitenin var olduğu tespit edilmiştir (Şekil 20). 4. istasyonda 10^{-1} dozunda diğer istasyonlara göre daha yüksek koloni sayısı olmasına rağmen 10^{0} dozunda sitotoksik etki sebebiyle koloni sayısında artış gerçekleşmediği gözlenmiştir. S9'lu çalışmada, TA98 suşunda 4. istasyonda en yüksek konsantrasyonda mutajenik cevabın olduğu görülmüştür (Şekil 19). TA100 suşunda ise en yüksek konsantrasyonda 3. istasyonda mutajenite, 4. ve 5. istasyonlarda yüksek seviyede mutajenitenin olduğu belirlenmiştir (Şekil 21).

Diklorometan ekstraktlarında, S9 yokluğunda *S. typhimurium* TA100 suşunda en yüksek konsantrasyonda 2. ve 3. istasyonlarda zayıf mutajenite, 1., 4. ve 5. istasyonlarda ise konsantrasyona bağlı revertant koloni sayısında artış gözlenmiştir (Şekil 24). TA98 suşunda ise hiçbir istasyonda mutajenik sonuca rastlanmamıştır (Şekil 22). S9 varlığında

TA100 suşunda 3. istasyonda konsantrasyona bağlı koloni sayısında artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 25). TA98 suşunda ise koloni sayısında anlamlı bir artış görülmemiştir (Şekil 23).

Sediment örneklerinde S9'suz çalışmada *S. typhimurium* TA100 suşunda en yüksek konsantrasyonda 2., 3. ve 5. istasyonlarda zayıf mutajenik etkinin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 28). S9'suz deneyde TA98 suşunda (Şekil 26) ve S9'lu deneyde her iki suşta da mutajenik aktivite gözlenmemiştir (Şekil 27 ve 29).

Çizelge 2. Su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarındaki mutajenite sonuçları

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}	25±4,36	26±1,53	180±38,42	137±15,39
		10^{-1}	19±2,08	26±4,73	179±24,06	135±10,39
		10^{-2}	24±6,24	35±8,18	306±7,09	141±9,85
		10^{-3}	15±4,93	29±3,06	248±32,19	160±26,23
		10^{-4}	13±4,16	31±7,23	179±3,61	192±28,00
İstasyon 2		10^{0}	16±5,03	32±1,53	128±9,24	154±12,77
		10^{-1}	22±4,58	34±1,53	115±9,29	194±17,78
		10^{-2}	19±4,58	38±6,56	167±31,01	160±9,29
		10^{-3}	20±3,79	29±3,46	160±2,08	162±15,31
		10^{-4}	15±4,04	29±6,00	132±4,16	139±17,95
İstasyon 3		10^{0}	33±4,58	38±5,13	168±4,73	130±14,57
		10^{-1}	23±1,53	23±5,13	150±10,60	159±10,97
		10^{-2}	25±2,65	26±6,56	210±15,95	180±15,10
		10^{-3}	26±4,58	30±7,64	148±7,00	139±5,29
		10^{-4}	26±1,73	27±3,21	169±26,54	190±15,57
İstasyon 4		10^{0}	38±2,08	29±5,51	213±34,78	163±7,02
		10^{-1}	41±1,53	38±1,73	285±22,19	149±7,81
		10^{-2}	44±7,21	27±6,81	214±31,09	183±14,05
		10^{-3}	37±6,81	31±7,21	266±11,93	137±19,43
		10^{-4}	26±5,51	34±1,53	162±22,68	135±13,50
İstasyon 5		10^{0}	17±3,79	42±6,56	179±27,23	162±21,08
		10^{-1}	24±4,04	28±4,36	134±13,61	125±13,05
		10^{-2}	26±5,29	30±2,65	143±27,39	145±6,56
		10^{-3}	18±3,06	34±3,21	156±17,39	142±5,29
		10^{-4}	34±5,00	31±4,51	143±29,50	165±10,26
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, SA: Sodyum azid, 2AF: 2-Aminofloren, DMSO: Dimetilsülfoksit

** Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma

Çizelge 3. Su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarındaki mutajenite sonuçları

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}	23±2,65	19±2,65	191±17,58	150±14,57
		10^{-1}	28±3,00	24±6,11	166±27,43	171±3,61
		10^{-2}	28±6,24	26±5,69	155±6,00	146±14,74
		10^{-3}	21±4,16	21±4,35	141±4,58	139±15,50
		10^{-4}	19±3,51	22±3,79	120±15,72	132±10,82
İstasyon 2		10^{0}	24±1,53	32±4,93	254±17,06	184±13,05
		10^{-1}	21±3,46	24±4,93	139±9,45	150±15,10
		10^{-2}	22±2,08	27±1,73	108±22,37	182±11,50
		10^{-3}	29±2,65	19±2,52	164±7,64	169±28,57
		10^{-4}	16±3,79	19±3,79	121±5,03	132±3,79
İstasyon 3		10^{0}	29±2,31	17±4,16	227±25,16	206±11,14
		10^{-1}	30±4,04	17±1,15	140±20,03	164±15,52
		10^{-2}	16±2,00	23±4,00	162±30,83	129±6,03
		10^{-3}	30±2,52	20±3,46	143±16,52	132±14,04
		10^{-4}	27±4,73	17±5,86	150±26,91	118±7,55
İstasyon 4		10^{0}	26±2,89	21±3,05	206±26,69	203±9,45
		10^{-1}	18±4,58	22±4,16	157±12,74	123±14,73
		10^{-2}	19±5,51	24±3,21	144±21,45	200±25,94
		10^{-3}	18±3,06	23±4,93	155±4,04	163±11,37
		10^{-4}	21±3,79	23±6,08	140±15,10	153±24,38
İstasyon 5		10^{0}	36±6,11	28±1,53	186±3,79	205±30,02
		10^{-1}	39±3,46	26±3,46	143±12,22	143±7,09
		10^{-2}	25±3,79	21±3,06	137±11,59	161±20,30
		10^{-3}	16±4,93	26±6,08	130±13,58	167±6,66
		10^{-4}	18±3,51	22±3,79	120±12,34	156±16,44
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, SA: Sodyum azid, 2AF: 2-Aminofloren, DMSO: Dimetilsülfoksit

** Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma

Çizelge 4. Su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarındaki mutajenite sonuçları

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}	36±4,51	36±7,55	359±47,15	222±13,89
		10^{-1}	28±4,36	30±8,50	144±12,66	197±5,51
		10^{-2}	20±4,16	21±1,73	127±5,51	115±15,82
		10^{-3}	28±6,08	22±3,51	116±11,55	138±9,00
		10^{-4}	25±6,42	24±2,65	114±7,77	142±24,38
İstasyon 2		10^{0}	20±3,51	36±4,58	277±23,86	199±17,21
		10^{-1}	20±3,21	26±1,53	120±2,08	121±13,65
		10^{-2}	18±3,51	23±6,24	125±8,39	143±14,74
		10^{-3}	15±2,08	28±2,65	147±24,33	129±5,51
		10^{-4}	19±5,13	28±5,29	139±21,07	126±23,52
İstasyon 3		10^{0}	35±6,51	40±2,52	375±26,21	324±20,42
		10^{-1}	23±5,13	32±6,81	153±11,36	163±32,08
		10^{-2}	18±3,21	30±5,69	151±12,42	118±20,98
		10^{-3}	17±2,08	28±7,09	128±4,58	119±25,03
		10^{-4}	19±4,04	28±3,06	124±27,07	151±18,15
İstasyon 4		10^{0}	17±5,51	64±10,69	219±10,58	498±29,82
		10^{-1}	40±5,69	35±4,04	216±14,53	203±22,85
		10^{-2}	26±5,03	35±1,53	135±16,50	184±29,46
		10^{-3}	22±3,79	32±2,31	94±7,09	125±7,09
		10^{-4}	19±3,21	26±3,06	115±10,82	165±9,29
İstasyon 5		10^{0}	21±1,53	38±6,51	302±7,09	514±13,53
		10^{-1}	22±3,79	19±4,58	216±11,00	202±19,14
		10^{-2}	14±1,53	28±0,58	151±16,44	152±25,16
		10^{-3}	18±4,51	28±4,93	152±15,50	129±5,13
		10^{-4}	19±4,93	19±2,08	171±7,55	132±3,79
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, SA: Sodyum azid, 2AF: 2-Aminofloren, DMSO: Dimetilsülfoksit

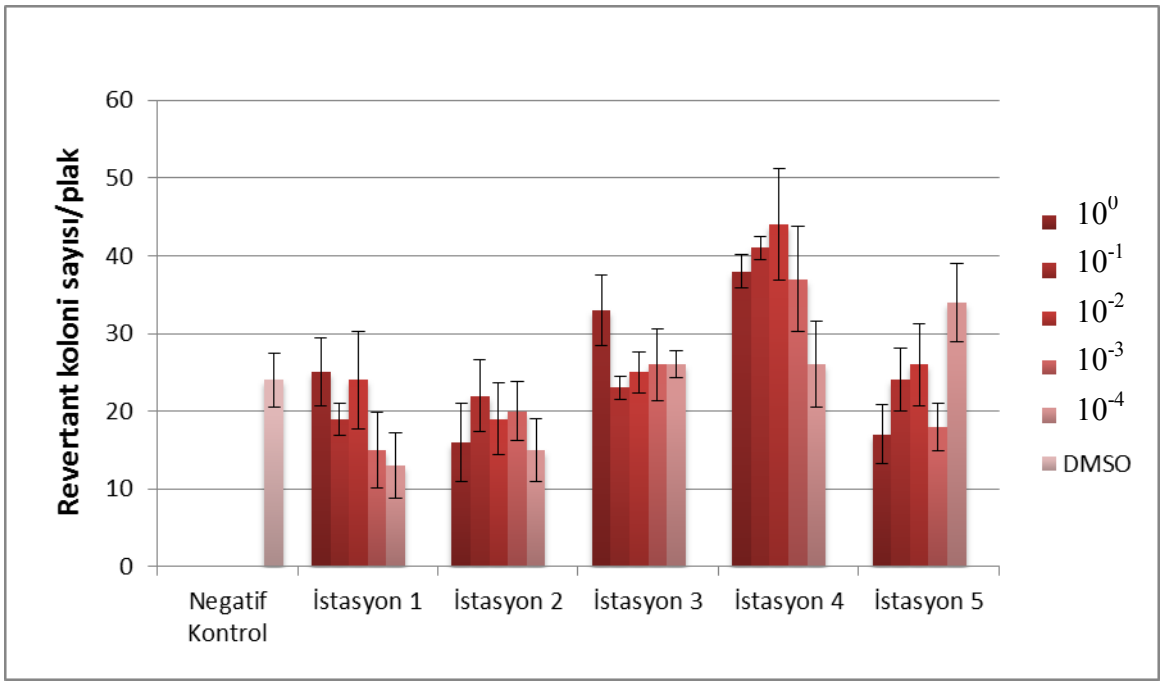
** Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma

Çizelge 5. Sediment örneklerinin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarındaki mutajenite sonuçları

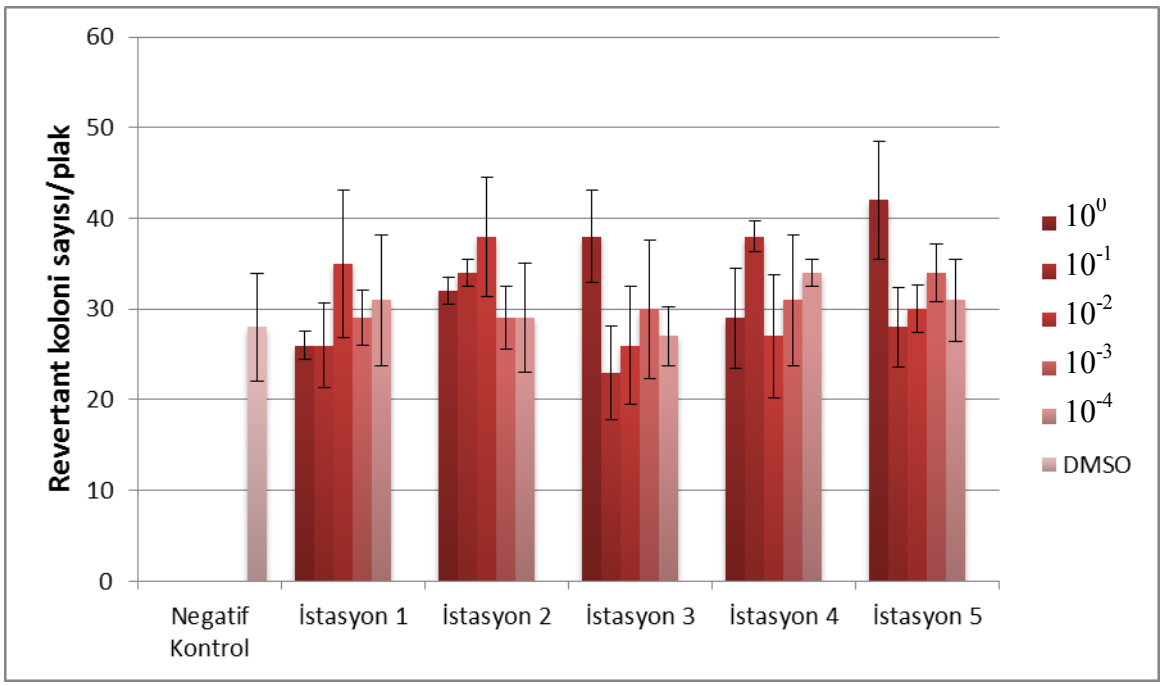
Uygulama		Konsantrasyon	Revertant koloni sayısı/Plak			
			TA98		TA100	
			S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
			Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD
Pozitif kontrol	NPD	10^{-2}	811±94,55			
	SA	10^{-3}			1189±147,33	
	2AF	$5x10^{-3}$		957±107,29		1295±156,70
İstasyon 1		10^{0}	32±2,08	17±2,65	167±14,01	155±9,07
		10^{-1}	25±5,03	17±2,52	174±6,03	146±5,51
		10^{-2}	24±4,16	19±2,00	165±5,03	139±9,07
		10^{-3}	28±4,51	19±1,53	198±26,50	154±14,53
		10^{-4}	22±4,04	18±4,51	157±7,09	141±6,56
İstasyon 2		10^{0}	18±2,65	21±2,00	227±37,17	126±12,06
		10^{-1}	17±2,52	17±2,08	165±21,73	121±10,82
		10^{-2}	22±3,51	21±1,53	146±17,50	120±9,17
		10^{-3}	18±3,51	22±1,73	187±20,52	121±6,56
		10^{-4}	22±6,03	20±2,00	201±13,75	111±16,09
İstasyon 3		10^{0}	24±5,51	23±3,21	228±8,19	138±8,50
		10^{-1}	18±4,04	16±3,00	169±16,52	115±14,98
		10^{-2}	23±1,53	16±2,65	159±19,76	113±9,07
		10^{-3}	27±3,51	18±1,15	151±17,52	117±6,51
		10^{-4}	24±4,58	22±3,21	156±25,03	133±8,19
İstasyon 4		10^{0}	32±4,04	32±8,14	174±31,94	128±9,07
		10^{-1}	17±2,08	24±3,51	148±12,70	139±10,54
		10^{-2}	24±5,51	17±4,16	113±10,02	114±9,54
		10^{-3}	27±6,56	23±4,16	165±24,03	134±8,50
		10^{-4}	27±3,61	20±3,06	114±19,97	114±7,77
İstasyon 5		10^{0}	30±5,69	16±3,51	234±31,01	137±8,33
		10^{-1}	28±1,15	29±5,86	163±30,27	142±9,07
		10^{-2}	26±1,53	24±3,00	186±24,50	128±8,00
		10^{-3}	25±5,50	19±3,61	140±22,11	121±9,17
		10^{-4}	26±1,53	17±4,16	168±22,72	141±9,61
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, SA: Sodyum azid, 2AF: 2-Aminofloren, DMSO: Dimetilsülfoksit

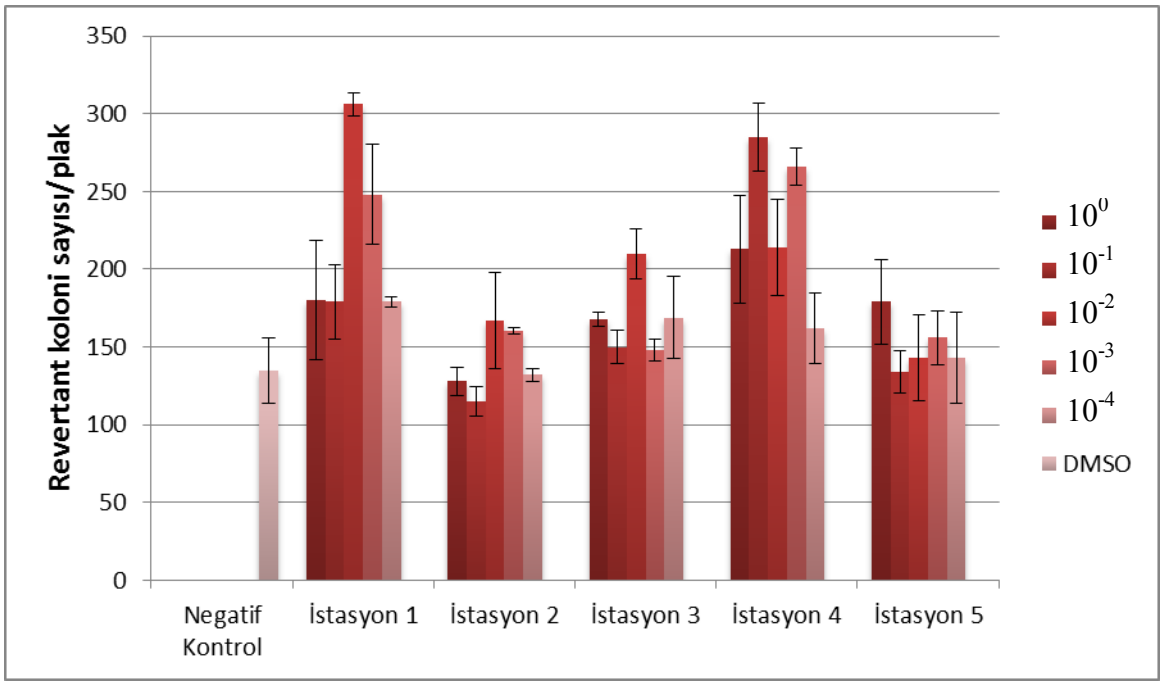
** Ort±SD: Ortalama±Standart Sapma



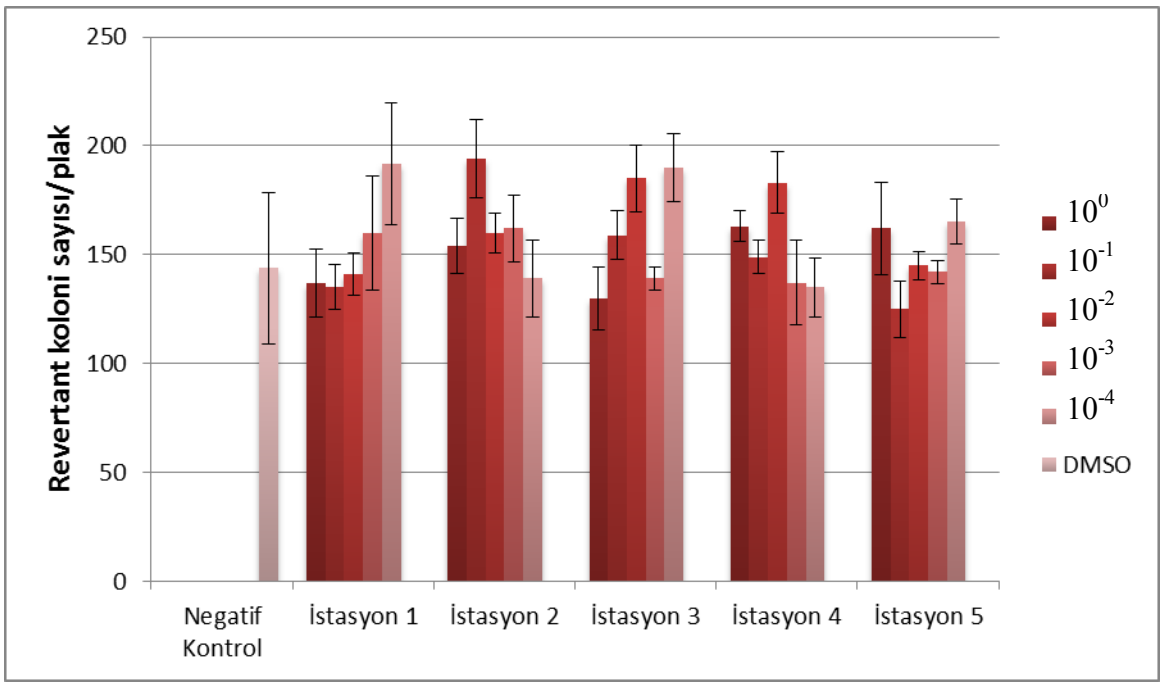
Şekil 14. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 yokluğundaki etkileri.



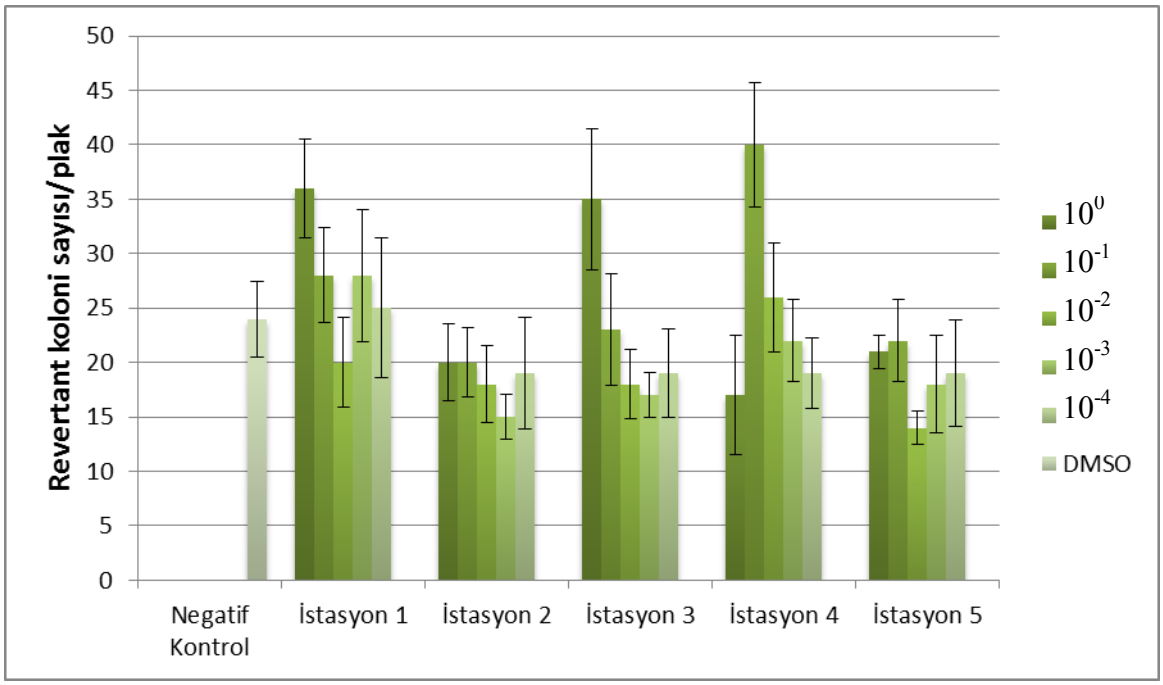
Şekil 15. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 varlığındaki etkileri.



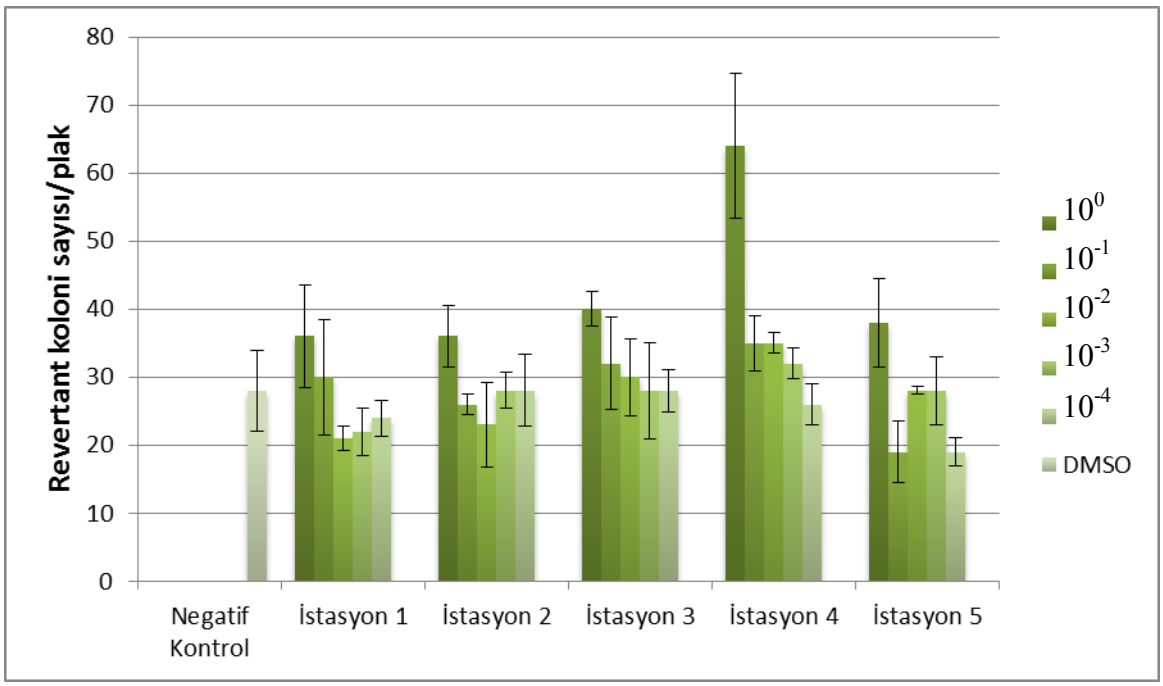
Şekil 16. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşunda S9 yokluğundaki etkileri.



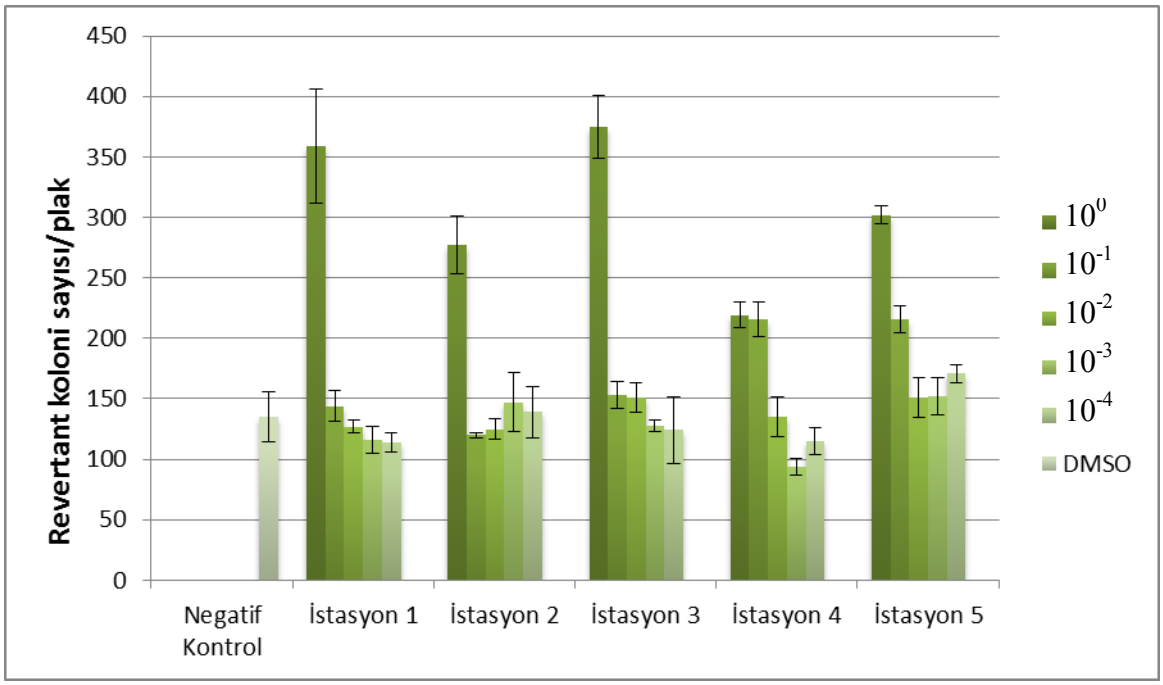
Şekil 17. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 varlığındaki etkileri.



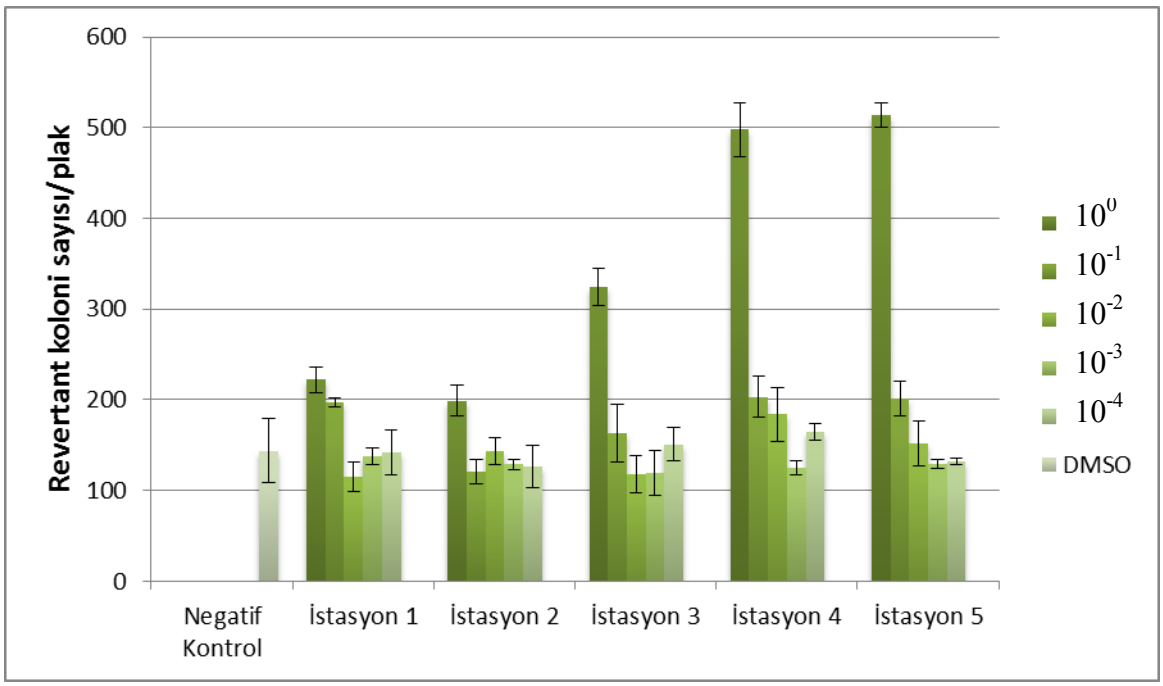
Şekil 18. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 yokluğundaki etkileri.



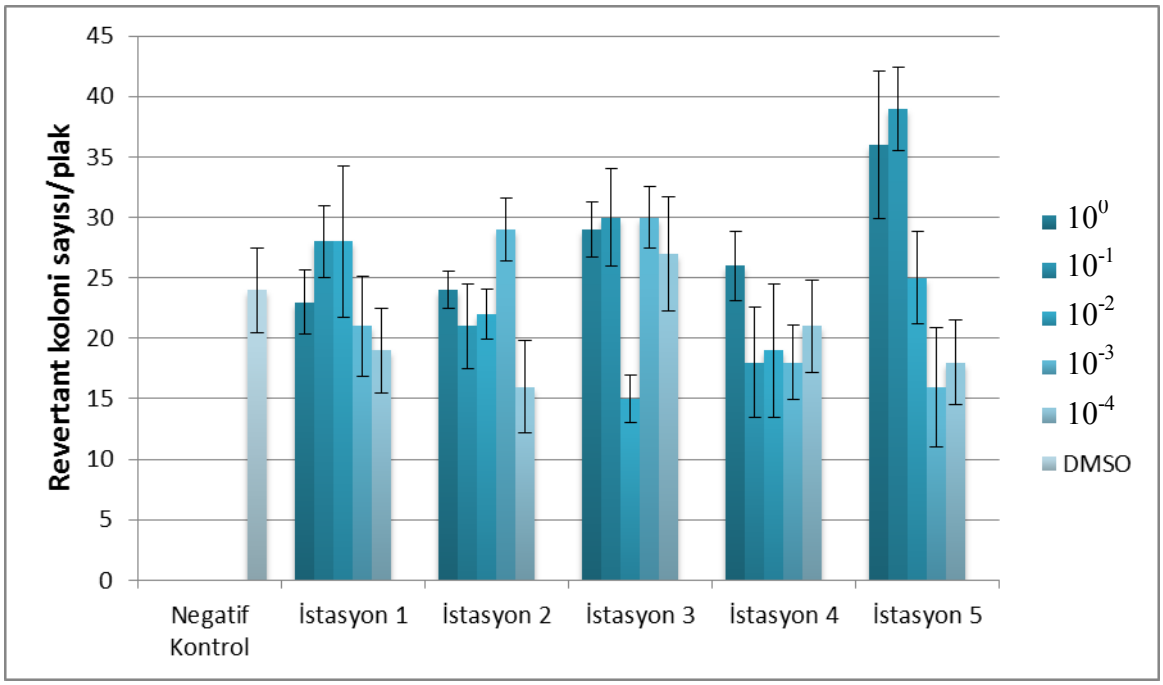
Şekil 19. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 varlığındaki etkileri.



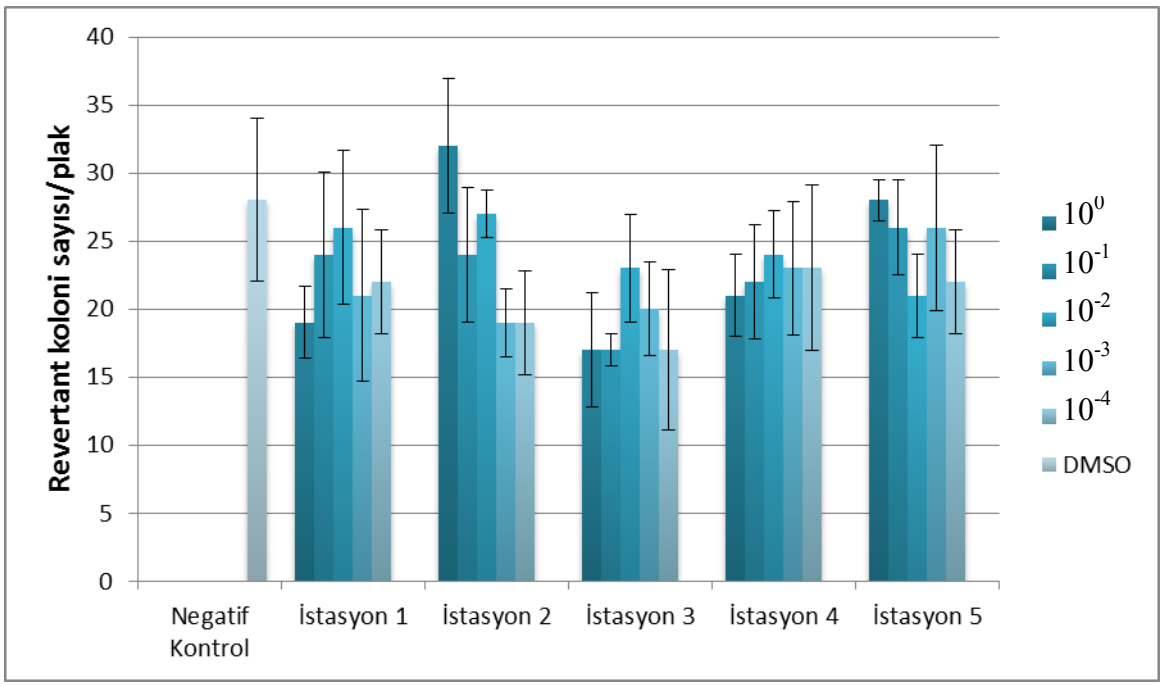
Şekil 20. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşunda S9 yokluğundaki etkileri.



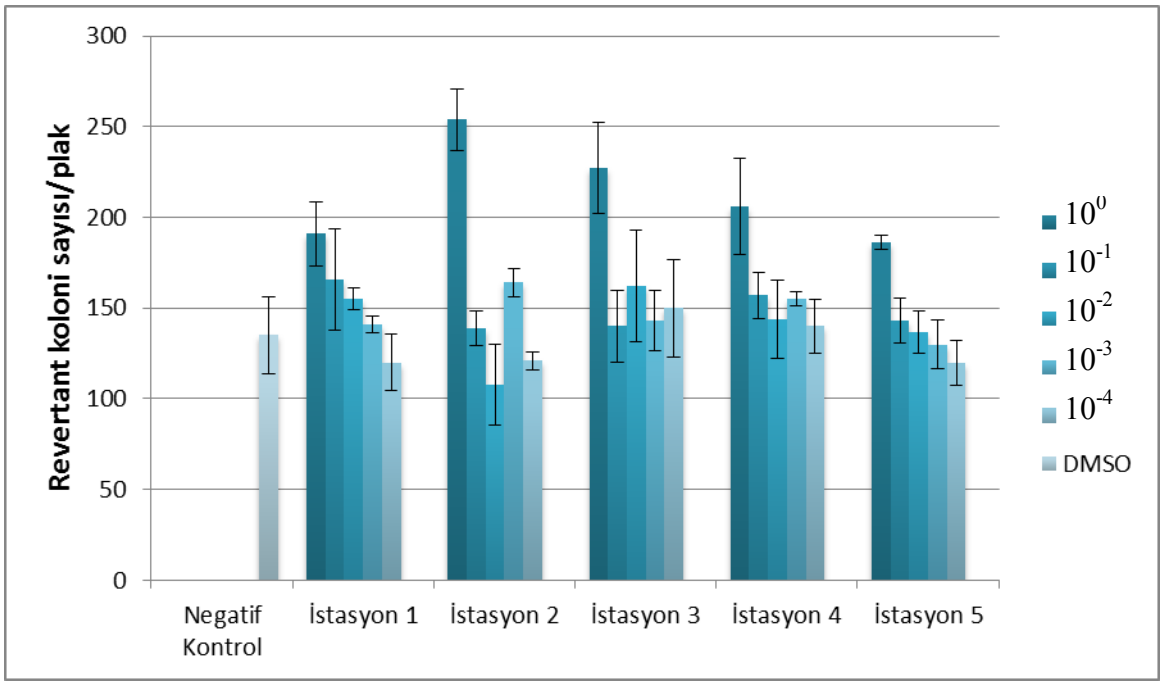
Şekil 21. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşunda S9 varlığındaki etkileri.



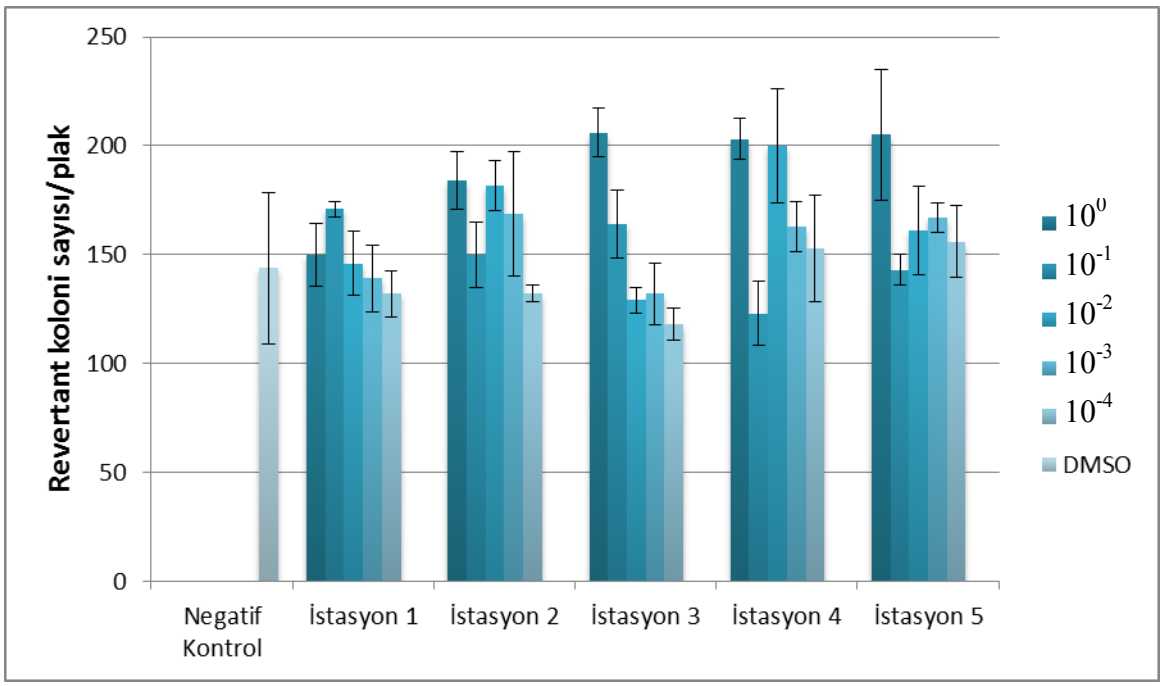
Şekil 22. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 yokluğundaki etkileri.



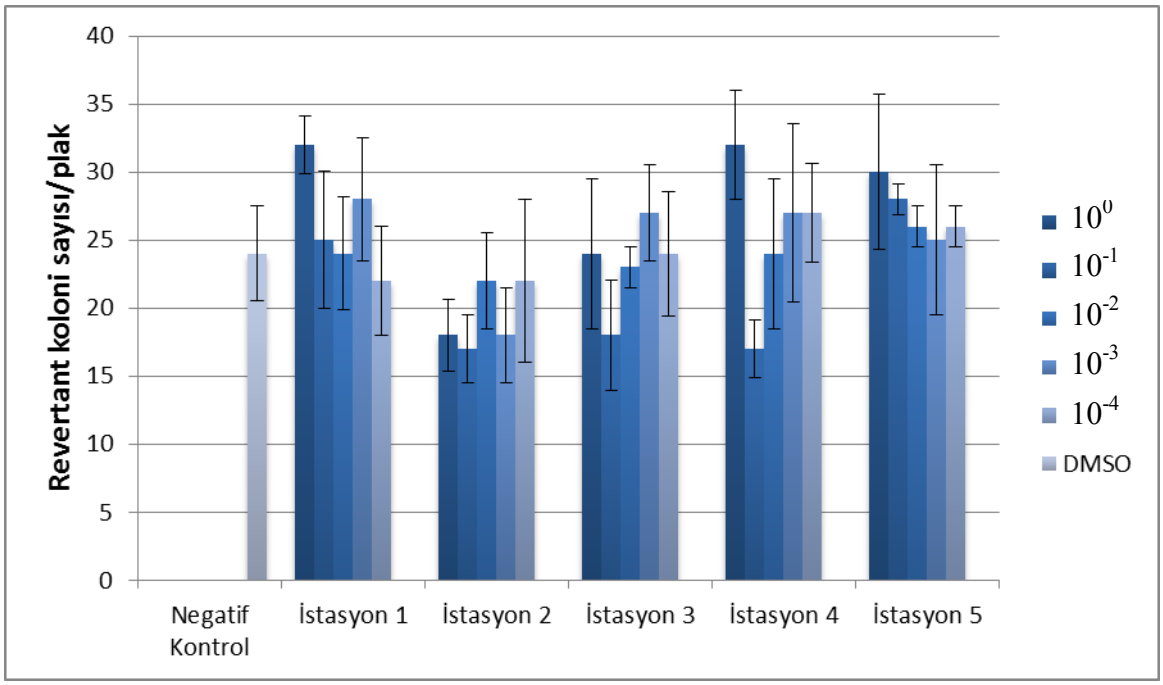
Şekil 23. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 varlığındaki etkileri.



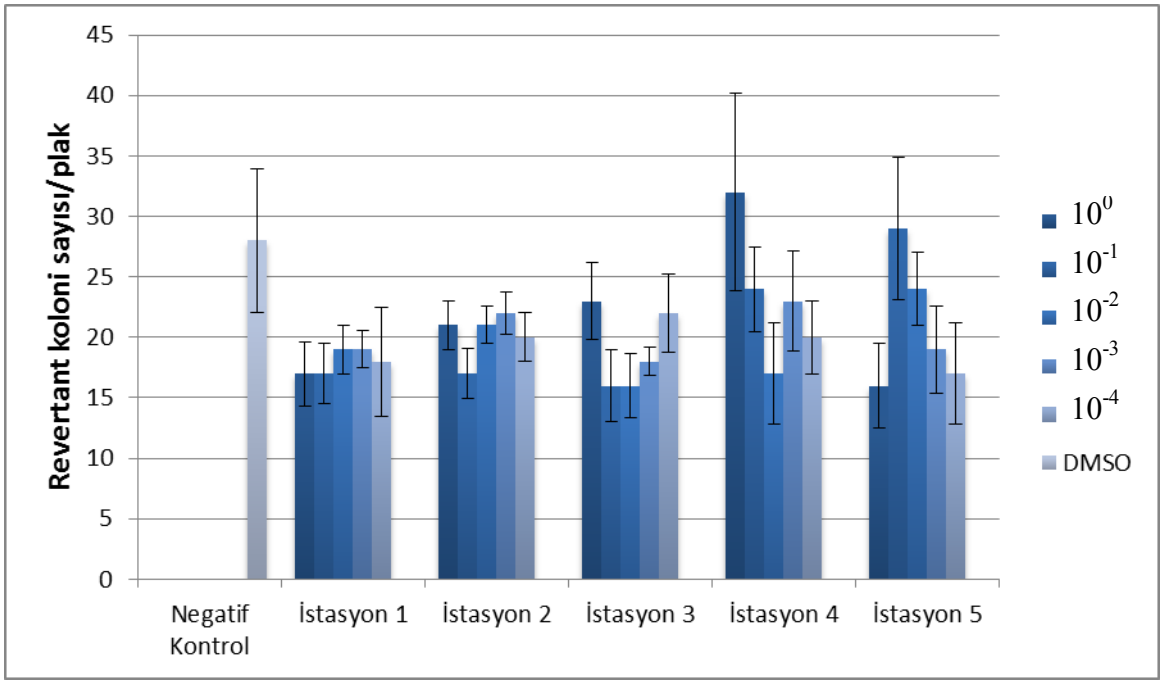
Şekil 24. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşunda S9 yokluğundaki etkileri.



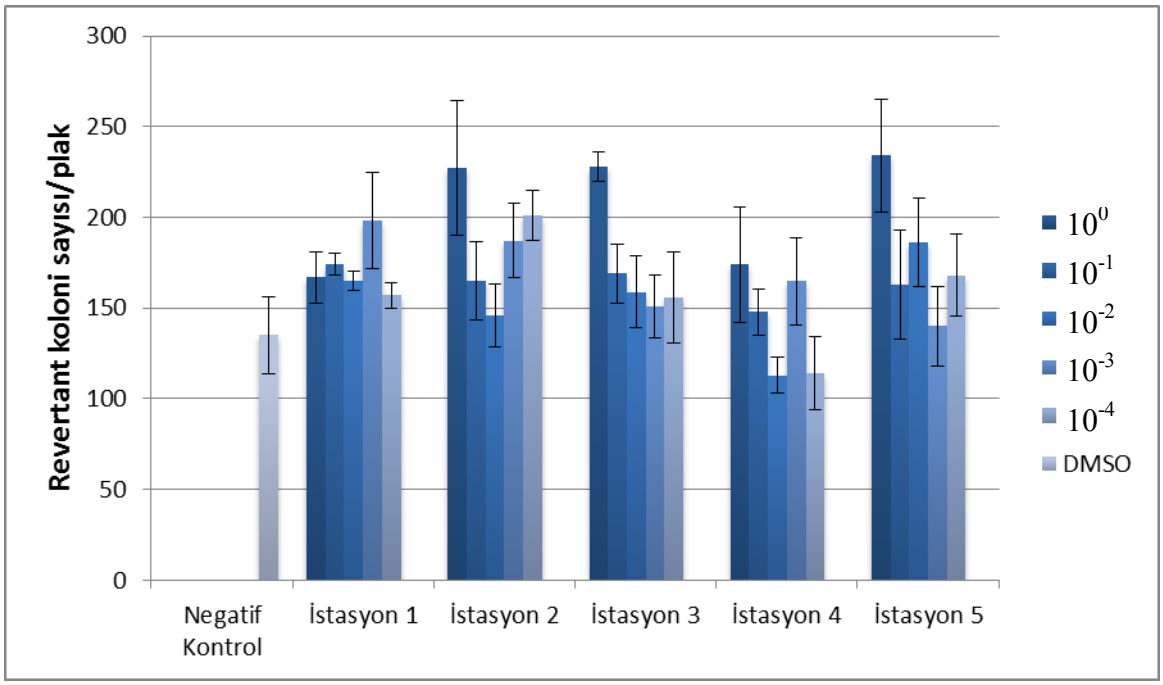
Şekil 25. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşunda S9 varlığındaki etkileri.



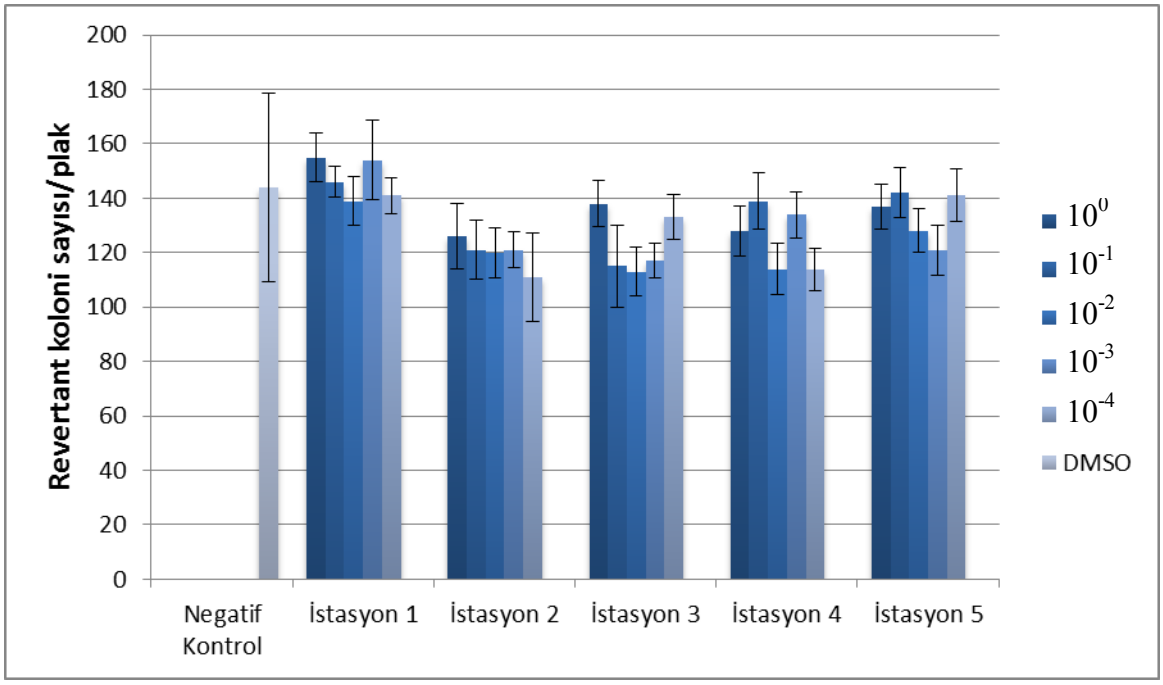
Şekil 26. Karamenderes Çayı'ndan alınan sediment örneklerinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 yokluğundaki etkileri.



Şekil 27. Karamenderes Çayı'ndan alınan sediment örneklerinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 varlığındaki etkileri.



Şekil 28. Karamenderes Çayı'ndan alınan sediment örneklerinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşunda S9 yokluğundaki etkileri.



Şekil 29. Karamenderes Çayı'ndan alınan sediment örneklerinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşunda S9 varlığındaki etkileri.

Araştırma sonuçlarına göre, Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinde mutajenik aktivitenin var olduğu tespit edilmiştir. Su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktında, *S. typhimurium* TA100 suşunda S9 yokluğunda bütün istasyonlarda mutajenitenin var olduğu belirlenmiştir. En yüksek mutajenik cevabın ise kloroform ekstraktında S9 varlığında 4. ve 5. istasyonlarda olduğu görülmüştür. Bu sonuç, bu iki istasyonda suda bulunan kimyasalların canlı vücudunda metabolik aktivasyon sonucu oluşan metabolitlerininin mutajenik etkiye neden olabileceğini göstermektedir. Yine 4. istasyonda hekzan ekstraktında zayıf mutajenik etkinin olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 6). Bu bölgelerde bulunan elma bahçelerinde kullanılan pestisitlerin kalıntılarının çaya karışması sonucunda böyle bir sonucun ortaya çıkması muhtemeldir. Su örneklerinden elde edilen hekzan ve kloroform ekstraktlarında mutajenitenin var olması örneklerde pestisit kalıntılarının olabileceğini göstermektedir. Çünkü suda bulunan organoklorlu ve organofosforlu pestisitler bu iki çözücü tarafından tutulabilmektedir (Aleem ve Malik, 2005).

Yapılan çalışmalar neticesinde birçok pestisitin mutajenik etkiye sebep olduğu ortaya konmuştur (Aleem ve Malik, 2005; Zhao ve ark., 2010). Hindistan'daki bir çalışmada, Ganj Nehri üzerindeki üç istasyondan alınan su örneklerinin mutajenik potansiyeli araştırılmıştır. XAD ve sıvı-sıvı ekstraksiyonu metotlarının uygulandığı çalışmada her iki ekstraktta da mutajenik aktivite görülmüştür. TA98 ve TA100 suşlarında düşük konsantrasyonlarda bile mutajenite tespit edilmiştir. Su örneklerinde yapılan Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) analizinde diklorodifeniltrikloroethan (DDT), β-hekzaklorosiklohekzan (BHC), aldrin, dieldrin gibi bazı pestisitler saptanmıştır (Rehana ve ark., 1995).

Karamenderes Çayı'nda ve yakın toprak yapısında yapılan bir çalışmada, yapılan analizler sonucu başta α-endosülfan ve hekzaklorohekzan olmak üzere birçok pestisitin kirliliğe yol açtığı ortaya konulmuştur (Yıldırım ve Özcan, 2007).

Üçüncü istasyonda, kloroform ekstraktında *S. typhimurium* TA100 suşunda S9 yokluğunda mutajenite, diklorometan ekstraktında ise S9 varlığında ve yokluğunda zayıf mutajenite tespit edilmiştir (Çizelge 6). Gözlenen mutajenik etkinin, çevredeki yerleşim birimlerinin atıklarının ve Bayramiç ilçesinde bulunan deri ve zeytinyağı imalathanesi atıklarının yetersiz arıtma ile çaya boşaltılması sonucu meydana gelen kirlilik sebebiyle olması muhtemeldir. Özellikle diklorometan ekstraktındaki mutajenik aktivite, bu istasyonda kompleks karışımların varlığını kanıtlamaktadır. Çünkü Ames testinde su

örneklerinin ekstraksiyonu için kompleks çevresel karışımların araştırılması ve bazik-nötral bileşiklerin eldesinde diklorometanın uygun bir çözücü olduğu belirtilmiştir (Nielsen, 1992; Lippincott ve ark., 1990).

İkinci istasyonda, yine kloroform ekstraktında mutajenik cevabın olduğu belirlenmiştir. Diklorometan esktraktında ise zayıf mutajenik etkinin olduğu görülmüştür. Mutajenik aktivitenin en düşük olduğu istasyonun 2. istasyon olduğu belirlenmiştir (Çizelge 6). Bu bölgede tarımsal aktivite olmasına karşın, 3. istasyondan gelen kirlilik yükünün seyrelmesi sebebiyle mutajenik potansiyel azalmaktadır.

Birinci istasyonda da aynı şekilde hekzan ve kloroform ekstraktlarında mutajenite gözlenmiştir. Diklorometan ekstraktında ise zayıf mutajenik etkinin olduğu tespit edilmiştir. Çayın denize döküldüğü bu bölgede, kirleticilerin birikmesiyle mutajenik aktivitenin olduğu sonucuna varılabilir.

Slovenya'da yapılan bir çalışmada ise, atık su işleme tesisi, evsel atıklar ve çöp depolama sahasından sızan sularla kirlenmiş Sora Nehri'nden alınan örnekler Ames test sisteminde incelenmiş ve 11 örneğin altısının mutajenik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Filipic, 1995).

Karamenderes Çayı'ndan toplanan sediment örneklerinin hiçbirinde güçlü mutajenik aktivite gözlenmemiştir. 2., 3. ve 5. istasyonlarda zayıf mutajenik etkilerin olduğu saptanmıştır. Bu durum, çay içerisinde suda çözünmeyen ve sedimentte biriken mutajen madde miktarının düşük seviyede olduğunu göstermektedir.

Maccubbin ve arkadaşları (1991) endüstriyel, evsel ve tarımsal atıkların yoğun şekilde karıştığı Amerika Bileşik Devletleri'nin Detroit Nehri'nden 30 ve Michigan Gölü'nden bir istasyondan alınan sediment örnekleri Ames testine tabi tutulmuştur. Mikrozomal enzimler (S9) içeren kimyasalların metabolik aktivasyonu sonucu 16 istasyonda yüksek mutajenik aktivite saptanmıştır. S9 uygulanmadığında ise örneklerin hiçbirinde güçlü mutajenik aktivite tespit edilmemiştir.

Bu çalışma ve daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen mutajenite sonuçlarını tek bir nedene bağlamak doğru değildir. Çünkü bazı kimyasallar tek başına genotoksik etkiye sahip olmamasına rağmen, bir araya geldiklerinde bu etkiyi gösterebildikleri bilinmektedir. Bu sebeple, su ve sediment örneklerinde bulunan kimyasalların analizinin yapılması mutajenik sonuçların doğru şekilde yorumlanması açısından önemlidir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde su kaynaklarının antropojenik aktiviteler sonucunda kirlenmesi büyük bir tehlike arz etmektedir. Sanayileşme ve kentleşme ile birlikte pek çok sulak alan kirlenmekte, bu kirlilik direkt veya dolaylı olarak insan ve diğer canlıların sağlığını tehdit etmektedir.

Yapılan çalışmalar ve kullanılan farklı test yöntemleri neticesinde, su ve sedimentin birçok genotoksik bileşikle kontamine olduğu ve bu bileşiklerin farklı canlılar üzerinde mutajenik etkiye neden olduğu açıkça görülmektedir.

Çanakkale'de bulunan Karamenderes Çayı'ndan alınan su ve sediment örnekleriyle yapılan bu çalışmada, su örneklerinin kloroform ekstraktında S9 yokluğunda bütün istasyonlarda, S9 varlığında ise iki istasyonda en yüksek konsantrasyonda mutajenik aktivitenin var olduğu tespit edilmiştir. Su örneklerinin hekzan ekstraktında ise S9 yokluğunda bir istasyonda mutajenik cevabın olduğu görülmüştür. Ayrıca diklorometan ekstraktlarında ve sediment örneklerinde farklı istasyonlarda zayıf mutajenik etkilerin olduğu ortaya konmuştur.

Bu sonuçlar doğrultusunda, Karamenderes Çayı çevresinde yapılan tarımsal faaliyetlerde çiftçilerin pestisit kullanımı konusunda bilinçlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca çevrede bulunan yerleşim yeri ve sanayi atıklarının arıtılarak deşarj edilmesi çaydaki kirliliğin engellenmesi açısından büyük önem arzetmektedir.

Su kaynaklarında tespit edilenden daha fazla oranda bilinmeyen mutajen ve kanserojen bileşik bulunmaktadır. Kimyasal analizlerle beraber genotoksisite çalışmalarının da yürütülmesi, sulardaki mutajenleri doğru şekilde belirleyerek bu kimyasalların zararlarının ortaya konması açısından önemlidir. Bunun dışında, sonuçların kesinlik kazanabilmesi için diğer *in vitro* ve *in vivo* testlerinin yapılması ve elde edilen sonuçları desteklemesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

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

Ames B.N., Lee F.D. ve Durston W.E., 1973. An Improved Bacterial Test System for The Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70: 782-786.

Ames B.N., McCann J. ve Yamasaki E., 1975. Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the *Salmonella*/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Research*, 31: 347-364.

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

Anonim, 1991. Review of Potentially Harmful Substances Carcinogens, Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution (Gesamp). *World Health Organization, Reports And Studies*, No. 46.; Geneva.

Anonim, 1995. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, USA.

Anonim, 1998a. Kirlilik Deneyleri - Yöntemler ve Sonuçların Değerlendirilmesi. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı, Bodrum Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, No:11.

Anonim, 1998b. Environmental Health Criteria 202, Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. IPCS, International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva.

Anonim, 2007. Çanakkale 2006-2007 Yılı İl Çevre Durum Raporu. T.C. Çanakkale Valiliği, İl Çevre ve Orman Müdürlüğü. 74-80.

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

Ayan T.İ., 2005. Kocabaş Çayında (Çanakkale/Biga) Bazı Bakteriyolojik Kirlilik Parametrelerinin Araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.

Ayaz A. ve Yurttagül M., 2008. *Besinlerdeki Toksik Öğeler-II*. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü. s.29.

Barış A., 2007. Farklı Tipteki Pestisitlerin Muhtemel Mutajenitelerinin Ames/*Salmonella*/Mikrozom Test Yöntemiyle Araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.

Başaran A., Başaran N., Solak M. ve Güneş H., 1995. *Tıbbi Biyoloji ve Genetik*. Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi Yayınları, 117-123.

Bat L., Öztürk M. ve Öztürk. M., 1999. *Akuatik Toksikoloji*. Süleyman Demirel Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 6: 148-165.

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

Bridges B.A., 1988. Genetic Toxicology at the Crossroads A Personal View on the Deployment of Short Term Tests for Predicting Carcinogenicity. *Mutation Research*, 205: 25-31.

Bryan B., Timothy M. ve Poul T., 1993. *General Applied Toxicology*, Macmillan, 2: 897-898.

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

Ciğerci İ.H., Liman R., Kutlu H.M., Aydoğan G. ve Konuk M., 2007. Eber Gölü ve Akarçay Suyunun Mutajenik Özelliklerinin Ames *Salmonella*/Mikrozom Testi ile Araştırılması. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7 (1): 215-223.

Codina J.C., Perez-Garcia A. ve Vicente A., 1994. Detection of Heavy Metal Toxicity and Genotoxicity in Wastewaters by Microbial Assay. *Water Science Technol*ogy, 30: 145–151.

Commoner B., Vithayathil A.J. ve Henry J.I., 1974. Detection of the Metabolic Carcinogens Intermediates in Urine of Carcinogen Fed Rats by Means of Bacterial Mutagenesis. *Nature*, 249: 850-852.

Costa T.C., Brito K.C.T., Rocha J.A.V., Leal K.A., Rodrigues M.L.K., Minella J.P.G., Matsumoto S.T. ve Vargas V.M.F., 2012. Runoff of Genotoxic in River Basin Sediment Under the Influence of Contaminated Soils. *Exotoxicology and Environmental Safety*, 75: 63-72.

Dabestani R. ve Ivanov I.N., 1999. A Complication of Physical, Spectroscopic and Photophysical Properties of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Photochemistry and Photobiology*, 70: 10-34

Filipic M., 1995. Mutagenicity and Toxicity of Water Extracts from the Sora River Area. *Mutation Research*, 342: 1-8.

Gallı 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.

Gana J.M., Ordonez R., Zampini C., Hidalgo M., Meoni S. ve Isla M.I., 2008. Industrial Effluents and Surface Waters Genotoxicity and Mutagenicity Evaluation of A River of Tucuman, Argentina. *Journal of Hazardous Materials*, 155: 403-406.

Garban B., Blanchoud H., Motelay-Massei A., Chevreuil M. ve Ollivon D., 2002. Atmospheric Bulk Deposition of PAH's onto France: Trends from Urban to Remote Sites. *Atmospheric Environment*, 36: 5395–5403.

Gatehouse D.G., Rowland I.R., Wıllox P., Dander R.D. ve Foster, R., 1998. *Bacterial Mutation Assay, Basic Mutagenic Recommended Procedure* (Ed: Kirklandı, D.J.). The Bath, Press, Avon Research. 227-234.

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.

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.

Guzzella L., Ferretti D., Zerbini I. ve Monarca S., 1999. Evaluation of Genotoxicity of Italian Lakewater for Human Consumption: A Case Study in Lombardy. *Toxicological and Environmental Chemistry,* 73: 81-92.

Hartman P.E. ve Aukerman S.L., 1986. *Salmonella* Tester Strains: Mutational Targets and Correlation with Animal Carcinogenicity and Teratogenicity. *In Mechanisms of DNA Damage and Repair*, Eds. M.G. Simic, L. Grossman and A.D. upton. Plenum Press, New York, 407-424.

Hartman P.E., 1983. Mutagens: Some Possible Health Impacts Beyond Carcinogenesis. *Environmental Mutagenesis,* 5: 139-152.

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.

http://faculty.ycp.edu/~kkleiner/EvolBio/EvolBioImages/Mutation/TransmutationsFH.jpg.

http://o.quizlet.com/gyj8MgB9CE-zba8-QhgjyA.jpg.

Josephy P.D., Gruz P. ve Nohmi T., 1997. Recent Advences in the Construction of Bacterial Genotoxicity Assays. *Mutation Research*, 386: 1-23.

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, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Kataoka H., Hayatsu T., Hietsch G., Steinkellner H., Nishioka S., Narimatsu S., Knasmüller S. ve Hayatsu H., 2000. Identification of Mutagenic Heterocyclic Amines (IQ, Trp-P-1 and AαC) in the Water of the Danube River. *Mutation Research*, 466: 27-35.

Kayacan Y.A., 2008. Biga Yarımadası Çanakkale İl Sınırları İçerisindeki Kıyı Sulak Alanların İnsan Çevre Etkileşimi Bakımından Değerlendirilmesi (Yüksek Lisans Tezi). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Çanakkale.

Keating G.A., Layton D.W. ve Felton J.S., 1999. Factors Determining Dietary Intakes of Heterocyclic Amines in Cooked Foods. *Mutation Research*, 443: 149-156.

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.

Kotelevtsev S.V. ve Stepanova L., 1995. Biochemical and Genotoxicological Monitoring of Ecosystems with Special Reference to Lake Baikal and Northern Black Sea. Nato Advanced Study Institute on Molecular Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes: Their Significance in Environmental Toxicology, *Chemical Carsinogenesis and Health,* 99-102.

Kummrow F., Rech C.M., Coimbrao C.A., Roubicek D.A. ve Umbuzeiro G.D.A., 2003. Comparison of the Mutagenic Activity of XAD4 and Blue Rayon Extracts of Surface Water and Related Drinking Water Samples. *Mutation Research*, 541: 103-113.

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: 111–116.

Laha S. ve Luthy R.G., 1990. Oxidation of Aniline and Other Primary Aromatic Amines by Manganese Dioxide. *Environmental Science & Technology,* 24: 363- 373.

Lee S.C., Ho K.F., Chan L.Y., Zielinska B. ve Chow J.C., 2001. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Carbonyl Compounds in Urban Atmosphere of Hong Kong. *Atmospheric Environment*, 35: 5949–5960.

Lemos A.T., Rosa D.P., Rocha J.A.V. ve Vargas V.M.F., 2009. Mutagenicity Assessment in A River Basin Influenced by Agricultural, Urban and Industrial Sources. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 2058-2065.

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.

Little J.B., 2000. Radiation Carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21: 397.

Liu J.R., Dong H.W., Tang X.L., Sun X.R., Han X.H., Chen B.Q., Sun C.H. ve Yang B.F., 2009. Genotoxicity of Water from the Songhua River, China, in 1994-1995 and 2002-2003: Potential Risks for Human Health. *Environmental Pollution*, 157: 357-364.

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

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.

McMurry J., 1992. *Organic Chemistry*, Chap. 26, (3rd Edition). Brooks, Cole, New York.

Monarca S., Zanardini A., Feretti D., Dalmiglio A., Falistocco E., Manica P. ve Nardi G., 1998. Mutagenicity of Extracts of Lake Drinking Water Treated with Different Disinfectants in Bacterial and Plant Tests. *Water Research*, 32 (9): 2689-2695.

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

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

Ohe T., White P.A. ve DeMarini D.M., 2003. Mutagenic Characteristics of River Waters Flowing Through Large Metropolitan Areas in North America. *Mutation Research*, 534: 101-112.

Oraler G., 1990. *Genetik*. İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstanbul, 177-178.

Öz F. ve Kaya M., 2007. Et ve Et Ürünlerinde Heterosiklik Aromatik Amin Oluşumunun Engellenmesi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 38 (1): 121-126.

Öztürk B., (b.t.). Heterosiklik Aminler ve Sağlığımız, 24 Aralık 2012. http://www.beslenmevediyet.org/?intPageStructureNo=12&sintLanguageID=0&bytContentType=2&intPageNo=256&bytRelListId=1&strHitCountParam=3%7C12%7C0%7C%7C276.

Pai C.A., 1985. *Foundation of Genetics. Ascience for Society.* Kefford Press, Singapur.

Paolini M. ve Forti G.C., 1997. On the Metabolizing Systems for Short-Term Genotoxicity Assays A Review. *Mutation Research*, 387: 17-34.

Papoulias D.M. ve Buckler D.R., 1996. Mutagenicity of Great Lakes Sediments. *Journal of Great Lakes Research*, 22 (3): 591-601.

Parlak H., Arslan Ö.Ç., Boyacıoğlu M. ve Karaaslan M.A., 2011. Ekotoksikoloji (2.

Baskı). Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No:79, Ders Kitabı Dizini No:39, 218-236.

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.

Perry R., Baek S.O., Field R.A., Goldstone M.E., Kirk P.W. ve Lester J.N., 1991. A Review of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Fate and Behavior. *Water, Air, and Soil Pollution*, 60: 279–300.

Re N-Poppi N. ve Santiago-Silva M., 2005. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Other Selected Organic Compounds in Ambient Air of Campo Grande City, Brazil. *Atmospheric Environment*, 39: 2839–2850.

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.

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.

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.

Sanchez-Galan S., Linde A.R., Ayllon F. ve Garcia-Vazquez E., 2001. Induction of Micronuclei in Eel (*Anguilla anuilla* L.) by Heavy Metals. *Ecotoxicology and Enviromental Safety*, 49: 139–143.

Saurina J. ve Hernández-Cassou S., 1999. Flow-Injection and Stopped-Flow Completely Continuous Flow Spectrophotometric Determinations of Aniline and Cyclohexylamine. *Analytica Chimica Acta*, 396: 151–159.

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.

Shen L., Lin G.F., Tan J.W. ve Shen J.H., 2000. Genotixicity of Surface Water Samples from Meiling Bay, Taihu Lake, Eastern China. *Chemosphere,* 41 (1-2): 129-132.

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

Slooff W. ve Van Kreijl C.F., 1982. Monitoring the Rivers Rhine and Meuse in the Netherlands for Mutagenic Activity Using the Ames test in Combination with Rat or Fish Liver Homogenates. *Aquatic Toxicology*, 2 (2): 89-98.

Temizkan G., 1999. *Genetik II. Moleküler Genetik.* İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul.

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.

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.

Vahl H.H., Karbe L. ve Westendorf J., 1997. Genotoxicity Assessment of Suspended Particulate Matter in the Elbe River: Comparison of *Salmonella* Microsome Test, Arabinose Resistance Test, and *Umu*-Test. *Mutation Research,* 397 (1-3): 81-93.

Vargas V.M.F., Migliavacca S.B., de Melo A.C., Horn R.C., Guidobono R.R., de Sa Ferreira I.C.F. ve Pestana M.H.D., 2001. Genotoxicity Assessment in Aquatic Environments under the Influence of Heavy Metals and Organic Contaminants.

Mutation Research, 490: 141–158.

Vargas V.M.F., Migliavacca S.B., Horn R.C. ve Terra N.R., 2008. Comparative Temporal Ecotoxicological Study in A River Basin Influenced by Petrochemical Industries. *Science of the Total Environment*, 392: 79-92.

Vargas V.M.F., Motta V.E.P. ve Henriques J.A.P., 1993. Mutagenic Activity Detected by the Ames Test in River Water under the Influence of Petrochemical Industries. *Mutation Research*, 319: 31-45.

Vigano L., Camoirano A., Izzotti A., D'Agostini F., Polesello S., Francisci C. ve De Flora S., 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.

Watanabe T., Takahashi Y., Takahashi T., Nukayab H., Terao Y., Hirayama T. ve Wakabayashi K., 2002. Seasonal Fluctuation of the Mutagenicity of River Water in Fukui, Japan, and the Contribution of 2-Phenylbenzotriazole-Type Mutagens. *Mutation Research*, 519: 187-197.

Wcisło E., 1998. Soil Contamination with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Poland - A Review. *Polish Journal of Environmental Studies*, 7: 267–272.

White P.A. ve Rasmussen J.B., 1998. The Genotoxic Hazards of Domestic Wastes in

Surface Waters. *Mutation Research*, 410: 223–236.

Wu J.Y., 2005. Assessing Surface Water Quality of the Yangtze Estuary with Genotoxicity Data. *Marine Pollution Bulletin,* 50: 1661-1667.

Yamaguchi Y., Fukushima 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 A., Bardakçı F., Karataş M. ve Tanyolaç B., 2007. *Moleküler Biyoloji*. Nobel Yayınları, İstanbul. 295-321.

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

Yıldırım İ. ve Özcan H., 2007. Determination of Pesticide Residues in Water and Soil Resources of Troia (Troy). *Fresenius Environmental Bulletin,* 16 (1): 63-70.

Zeytinoğlu H., Ergene E. ve Tüylü B.A., 2003. Mutagenicity Assay in *Salmonella* for Thirteen 2-Substituted-1H-phenanthro (9,10-d) Imidazoles. *Drug and Chemical Toxicology,* 26 (4): 245-257

Zhao Z., Zhang L., Wu J., Fan C. ve Shang J., 2010. Assessment of the Potential Mutagenicity of Organochlorine Pesticides (OCPs) in Contamined Sediments from Taihu Lake, China. *Mutation Research*, 696: 62-68.

Zietz B.P., Nordholt G., Ketseridis G. ve Pfeiffer E.H., 2001. Mutagenicity of Baltic Seawater and the Relation to Certain Chemical and Microbiological Parameters. *Marine Pollution Bulletin*, 42 (10): 845-85.

ÇİZELGELER **Sayfa No**

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan *S. typhimurium* suşlarının genetik özellikleri 21
Çizelge 2. Su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarındaki mutajenite sonuçları 43
Çizelge 3. Su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarındaki mutajenite sonuçları 44
Çizelge 4. Su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarındaki mutajenite sonuçları 45
Çizelge 5. Sediment örneklerinin *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarındaki mutajenite sonuçları 46

ŞEKİLLER **Sayfa No**

Şekil 1. Baz değişimi mutasyonları: transisyonlar ve transversiyonlar.....4
Şekil 2. Çerçeve kayması mutasyonu.....6
Şekil 3. Karamenderes Çayı'nda örneklerin alındığı istasyonlar.....20
Şekil 4. Su örneklerinin ekstraktlarının hazırlanmasında kullanılan evaporatör.....30
Şekil 5. *S. typhimurium* TA98 suşunun HB ve MGA plaklarındaki üreme durumu. 36
Şekil 6. *S. typhimurium* TA100 suşunun HB ve MGA plaklarındaki üreme durumu.....37
Şekil 7. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları *rfa* mutasyonu kontrolü sonuçları.....37
Şekil 8. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları *uvrB* mutasyonu kontrolü sonuçları...38
Şekil 9. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları R faktörü kontrolü sonuçları. 38
Şekil 10. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının S9 yokluğunda pozitif kontrol sonuçları.....39
Şekil 11. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının S9 varlığında pozitif kontrol sonuçları.....40
Şekil 12. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının negatif kontrol sonuçları.....40
Şekil 13. *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının spontan kontrol sonuçları. 41
Şekil 14. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 yokluğundaki etkileri.....47
Şekil 15. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 varlığındaki etkileri. 47
Şekil 16. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşunda S9 yokluğundaki etkileri.....48
Şekil 17. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 varlığındaki etkileri. 48
Şekil 18. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 yokluğundaki etkileri.....49
Şekil 19. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 varlığındaki etkileri. 49

Şekil 20. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşunda S9 yokluğundaki etkileri. 50
Şekil 21. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen kloroform ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşunda S9 varlığındaki etkileri. 50
Şekil 22. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 yokluğundaki etkileri. 51
Şekil 23. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 varlığındaki etkileri. 51
Şekil 24. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşunda S9 yokluğundaki etkileri. 52
Şekil 25. Karamenderes Çayı'ndan alınan su örneklerinden elde edilen diklorometan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşunda S9 varlığındaki etkileri. 52
Şekil 26. Karamenderes Çayı'ndan alınan sediment örneklerinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 yokluğundaki etkileri. 53
Şekil 27. Karamenderes Çayı'ndan alınan sediment örneklerinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşunda S9 varlığındaki etkileri. 53
Şekil 28. Karamenderes Çayı'ndan alınan sediment örneklerinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşunda S9 yokluğundaki etkileri. 54
Şekil 29. Karamenderes Çayı'ndan alınan sediment örneklerinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşunda S9 varlığındaki etkileri. 54

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Deniz ÇAKMAK
Doğum Yeri: Bakırköy/İSTANBUL
Doğum Tarihi: 14.09.1986

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Karadeniz Teknik Üniversitesi
Giresun Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
(2005-2009)

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 özet metin 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.

2) 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

- **Özel Batı Bahat Hastanesi (Staj)**
  Biyokimya ve Mikrobiyoloji Laboratuvarları (2007)
- **Kültür Dershanesi**
  Biyoloji Öğretmenliği ve Eğitim Danışmanlığı (2010)

İLETİŞİM

E-posta Adresi: denizcakmak1903@gmail.com