

**FARKLI TİPTEKİ PESTİSİTLERİN
MUHTEMEL MUTAJENİTELERİ
Ames/Salmonella/Mikrozom
TEST YÖNYEMİYLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ahmet BARIŞ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Muhsin KONUK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AĞUSTOS 2007

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI TİPTEKİ PESTİSİTLERİN
MUHTEMEL MUTAJENİTELERİNİN
Ames/Salmonella/Mikrozom
TEST YÖNYEMİYLE ARAŞTIRILMASI

Ahmet BARIŞ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Muhsin KONUK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AĞUSTOS 2007

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Muhsin KONUK danışmanlığında, Ahmet BARIŞ tarafından hazırlanan “Farklı Tipteki Pestisitlerin Muhtemel Mutajenitelerinin Ames/Salmonella/Mikrozom Test Yönyemiyle Araştırılması” başlıklı bu çalışma, lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 03/08/2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı, SOYADI	İmza
Başkan	Prof. Dr. Muhsin KONUK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Elif KORCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT	

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetin Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Emine SOYTÜRK
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI TİPTEKİ PESTİSİTLERİN MUHTEMEL MUTAJENİTELERİNİN Ames/Salmonella/Mikrozom TEST YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

Ahmet BARIŞ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muhsin KONUK

Bu çalışmada, günümüz tarımında yaygın olarak kullanılan 4 farklı pestisit (piperophos, fenclorophos, dioxacarb, promecarb) mutajenik etkileri, kısa zamanlı bakteriyel mutajenite test sistemlerinden olan Ames/Salmonella/Mikrozom test yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmada *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Bunun için her iki suş mikrozomal enzimler içeren metabolik aktivasyon (S9) varlığında ve yokluğunda, piperophos için 10 µl/plak, 1 µl/plak, 0,1 µl/plak, 0,01 µl/plak ve 0,001 µl/plak konsantrasyonları, diğer üç madde için ise 100 µg/plak, 10 µg/plak, 1 µg/plak, 0,1 µg/plak ve 0,01 µg/plak konsantrasyonlarında birbirinden bağımsız iki paralel deneyle test edilmiştir. Pozitif kontrol olarak TA 100 için S9 varlığı ve yokluğunda sodyum azid, TA 98 için ise S9 varlığında 2-aminofluorene, S9 yokluğunda 4-nitro-o-fenilendiamine kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise çözücü DMSO ve spontan kontrol grupları kullanılmıştır. Test sonuçları birbirinden bağımsız olarak yapılan iki deneyin ortalaması alınarak değerlendirilip pozitif ve negatif kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Deneyin sonucunda; test edilen bu pestisitlerden sadece piperophos'un TA 98 suşunun S9 varlığında 0,01 µl/plak ve 0,001 µl/plak dozlarında mutajeniteye rastlanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ames test, mutajenite, piperophos, fenclorophos, dioxacarb, promecarb

ABSTRACT

MSc Thesis

A STUDY ON POSSIBLE MUTAGENICITY OF DIFFERENT TYPES OF PESTICIDES BY *Ames/Salmonella/Microsome* TEST SYSTEM

Ahmet BARIŞ

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. Muhsin KONUK

In this study, the mutagenic effect of 4 different pesticides (piperophos, fenclorphos, dioxacarb, promecarb) used in agriculture widely have been investigated by using short time bacterial mutagenicity test system namely *Ames/Salmonella/Microsome* test. In this study, *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 strains were employed. Therefore, both test strains were tested in the absence or presence of S9 metabolic activation. For piperophos, 10 µl/plate, 1 µl/plate, 0,1 µl/plate, 0,01 µl/plate and 0,001 µl/plate concentrations and for other test compounds 100 µg/plate, 10 µg/plate, 1 µg/plate, 0,1 µg/plate and 0,01 µg/plate concentrations were investigated in two paralel independent experiments. At the absence and presence of S9, sodium azid was used as a positive control for TA 100. At the absence of S9, 4-nitro-o-fenilendiamine, at the presence of S9, 2-aminofluorene was used as a positive control for TA 98. DMSO solution and spontaneous control groups were used as a negative control. Results of experiments were compared with positive and negative control groups data. Consequently; among these four pesticides, only 0,01 and 0,001 µl/plate doses of piperophos was found mutagenic in TA 98 with S9.

Key words: Ames test, mutagenicity, mutajenite, piperophos, fenclorphos, dioxacarb, promecarb

TEŐEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca yardım, ilgi ve deneyimlerini esirgemeyen aynı zamanda tüm laboratuvar çalıőmalarında her türlü desteği sağlayan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Muhsin KONUK'a,

Tezimin tamamlanmasında büyük yardımları olan değerli hocalarım Arő. Grv. Recep LİMAN ve Arő. Grv. Dilek AKYIL'a

Tezin yazım aőamasında yardımlarını benden esirgemeyen çok değerli hocalarım; Arő. Grv. Yasin EREN, Arő. Grv. Arzu ÖZKARA ve Arő. Grv. Feyza KUŐ'a

Bu tezi hazırlarken manevi desteğini her zaman hissettiğim ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Nebahat ADSİZ'a

Maddi ve manevi her konuda benden desteklerini esirgemeyen ve varlıkları ile bana güç veren aileme teőekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kromozom Yapısı	4
2.2. Mutasyon	5
2.2.1. Kromozom Mutasyonları.....	6
2.2.1.1. Kromozom Sayısı Değişimleri	6
2.2.1.2. Kromozom Yapı Değişimleri	8
2.2.2. Gen Mutasyonları	10
2.4. Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyonu.....	13
2.5. Mutajenik ve Kanserojenik Maddelerin Saptanması Teknikleri ve Ames Testi	15
2.6. Salmonella / mikrozom Test Sistemi.....	18
2.6.1. Histidin Mutasyonu	20
2.6.2. Rfa Mutasyonu	21
2.6.3. uvrB Mutasyonu	21
2.6.4. R-faktörü.....	22
2.7. Pestisitlerin Tanımı.....	22
2.8. Pestisitlerin Sınıflandırılması	24
2.8.1. İnsektisitler	27
2.8.2. Herbisitler	28
2.8.3. Fungusitler.....	28
2.9. Pestisitlerin Tarihçesi	29
2.10. Pestisitlerin Çevreye Olan Etkileri (Ekotoksik Etkileri)	30
2.11. Türkiye’de Pestisit Kullanımı ve Zehirlenmeleri	32
2.12. Pestisitlerin İnsanlara Etkisi	34
2.13. Pestisitlerin Toprağa, Suya, Bitkilere ve Hayvanlara Etkisi	37
2.14. Ames/Salmonella/mikrozom Test Sistemi Kullanılarak Yapılan Çalışmalar ..	40
3. MATERYAL ve METOD.....	44
3.1. Materyal.....	44
3.1.1. Kimyasal Maddeler	44
3.1.2. Salmonella typhimurium Test Suşları	44
3.1.3. Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları	45
3.1.4. Test Maddeleri (dozları ve hazırlanışı).....	52
3.2. Metod.....	55
3.2.1. Salmonella Suşlarının Kültürlerinin ve Master Plaklarının Hazırlanması ..	55
3.2.2. Salmonella Suşlarının Stoklanması ve Stok Kültürlerin Açılması.....	55

3.2.3. Salmonella Suşlarının Kontrol Testlerinin Yapılması.....	56
3.2.3.1. Bakterilerin Genotiplerinin Kontrol Edilmesi	56
3.2.4. Sıvı Kültürün ml'sindeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi	58
3.2.5. Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması	58
3.2.6. Memeli Karaciğer S9 Fraksiyonunun Hazırlanması	58
3.2.6.1. Rat Karaciğer Enzimlerinin İndüksiyonu ve S9 fraksiyonunu hazırlanması.....	58
3.2.6.2. S9 Karışımının Hazırlanması	59
3.2.7. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı.....	60
3.2.7.1. S9'suz Deney	60
3.2.7.2. S9'lu (+) Deney	60
4. BULGULAR	62
4.1. Genetik İşaretlerin Kontrolü.....	62
4.2. Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü.....	65
4.3. Sıvı Kültürün ml'sindeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi	66
4.4. Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması	66
4.5. S9 Fraksiyonunun Protein Miktarı	66
4.6. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı.....	67
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	69
KAYNAKLAR.....	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kromozomun yapısı	5
Şekil 2.1. Faz-I ve Faz-II biyotransformasyon reaksiyonları	14
Şekil 4.1. <i>S. typhimurium</i> TA 100 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları	62
Şekil 4.2. <i>S. typhimurium</i> TA 98 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları	63
Şekil 4.3. <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşlarının rfa mutasyonu kontrolü sonuçları	63
Şekil 4.4. <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşlarının uvrB mutasyon kontrolü sonuçları	64
Şekil 4.6. <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşlarının spontan olarak geriye dönüş sıklığı kontrolü sonuçları	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kimyasal mutajen/kanserojen maddelerin saptanmasında kullanılan kısa zamanlı testlerden bazıları (Bağcı 1985).	17
Çizelge 2.2. <i>Salmonella typhimurium</i> mutant suşlarının genetik özellikleri (Öksüzoğlu1997).	20
Çizelge 2.3. Türkiye’de yıllara bağlı olarak kullanım oranları	31
Çizelge 2.4. 1988–1993 yılları arasında zehir danışma merkezine yapılan pestisitlerle zehirlenme başvuruları.....	34
Çizelge 2.5. Pestisitlere uzun süre maruz kalındığında oluşan etkiler	37
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan pestisitlerin genel özellikleri.....	54
Çizelge 4.1. <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşları ile denenen pestisitlerin (S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda) plak inkorporasyon testi sonuçları.....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Santigrad derece
mM	Milimolar
ml	Mililitre
mg	Miligram
gr	Gram
mμ	Milimikron
μl	Mikrolitre
dk	Dakika
cm	Santimetre
M	Molar
nm	Nanometre
μm	Mikrometre
μg	Mikrogram
bw/day	Bodyweight/day
g	Gravity
sn	Saniye
dk	Dakika
yy	Yüzyıl

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DDT	Diklor Difenil Trikloretan
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
MGA	Minimal Glukoz Agar
HBA	Histidin/biyotin/ampisilin
NB	Nutrient Broth
NA	Nutrient Agar

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
HB	Histidin/biyotin
rpm	Rotation Per Minute (dakikadaki dönüş)
UV	Ultra Viyole
BIO	β -ionine
LPS	Lipopolisakkarit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
MSS	Merkezi Sinir Sistemleri
PPS	Perifer Sinir Sistemleri
HCB	Hekzaklorobenzenli

1. GİRİŞ

Günümüz teknolojisi ile beraber gelen kolaylık bunun yanında büyük bir sorun olan çevre kirliliğini de beraberinde getirmekte ve bu da bütün canlıları olumsuz şekilde çok yönlü olarak etkilemektedir. Doğadaki tüm canlılar günlük yaşamda doğal ya da yapay kimyasal maddelerle yüzyüze gelmektedir. Canlıların olumsuz yönlerde etkilenmesine neden olan sorunların başında, doğal ya da sentetik kimyasal maddeler gelmektedir. Kirleticilerin pek çoğunun belirli metabolik aktivasyonlardan sonra veya doğrudan doğruya DNA ile etkileşerek mutasyona ve kansere neden oldukları hemen herkes tarafından kabul edilmektedir.

Kimyasal maddelerin olası mutajenik etkilerini araştıran ilk çalışmalar İkinci Dünya Savaşı'ndan hemen sonra bir grup kimyasal üzerinde yapılmış ve ilk olarak mustard gazının etkili bir mutajen olduğu tespit edilmiştir. Ardından dünyanın hemen her yerinde yapılan deneylerle diğer bazı kimyasallara dikkat çekilmiştir. 1972 yılında yapılan bir araştırmada yiyecekleri renklendirme, koruma ve diğer amaçlarla kullanılan 2500 kadar katkı maddesi olduğu tespit edilmiştir. Yiyeceklere bulaşarak vücuda giren pestisitler ve çeşitli amaçlarla kullanılan ilaçlar üzerinde durulmuş ve bu sayede pek çok mutajenite test sistemi geliştirilmiştir (PAI 1985).

Sayıları milyonları bulan kimyasalların çok azının (20.000 civarında) kanserojenik potansiyelleri hakkında bilgimiz vardır. Geriye kalanların ve her gün listeye giren yeni sentezlenen maddelerin seri bir şekilde test edilerek mutajenik/kanserojenik etkilerinin saptanması gerekmektedir. Bu nedenle araştırmacılar karsinogenite taramalarına esas olabilecek kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı mutajenite test sistemleri geliştirmişlerdir. Bu test sistemlerine örnek olarak, *Salmonella typhimurium* (Maron ve Ames 1983), *Escherichia coli* (Leifer et al. 1981), *Bacillus subtilis* (Leifer et al. 1981), *Neurospora crassa* (Brockman 1984), *Drosophila melanogaster* (Vogel and Sobels 1976), Çin hamsteri hücreleri, Çin hamsteri ovaryum ve akciğer hücreleri (Beudet 1973) ile yapılan deneyler verilebilir.

Kimyasal maddelerle karşı karşıya gelme ile mutasyon indüksiyonuna kadar geçen olaylar çeşitli basamakları içermektedir. Bu basamaklar kimyasal madde ile yüzyüze gelme, kimyasal maddenin organizmada biyotransformasyonu, kimyasal madde ile mutasyon indüksiyonu şeklindedir.

Kimyasal maddeyle yüzyüze gelme durumunda bütün organizmalarda hücreleri ve genetik materyali, maruz kalınan yabancı maddelere karşı koruyan mekanizmalar vardır.

Kimyasal maddenin organizmada biyotransformasyonu ile mutasyon indüksiyonu olaylarında ikinci evre, kimyasal maddelerin biyotransformasyonu ve memelilerde görülen metabolik değişimlerdir. Vücuda alınan kimyasal maddeler, esas olarak karaciğerde yerleşmiş olan bazı enzim sistemleriyle metabolize edilirler. Bu metabolizma ile ilgili enzim sistemleri, Faz I ve Faz II olmak üzere iki gruba ayrılır. Faz I'de yer alan reaksiyonlar sonunda, hidrofobik molekülden bir ya da daha fazla polar grup ortaya çıkarılır. Bu reaksiyonlarla ana bileşik, Faz II'de yer alan konjugasyon enzimleri için uygun bir substrat haline gelir.

Kimyasal madde ile mutasyon indüksiyonu ile ise memelilerdeki biyotransformasyon basamakları sonucunda oluşabilen kuvvetli elektrofilik özellikteki metabolitler, genetik materyalin elektronca zengin atomları ile kimyasal olarak etkileşebilirler.

Pestisitler çevre kirleticilerinin sadece bir kısmını oluşturmaktadır; ancak bunlar çok yaygın ve çok fazla miktarda kullanıldıklarından özel bir önem taşırlar. 1971 yılında ABD'de toplam pestisit üretimi yaklaşık 550 milyon kg'dır. Bunun yarısına yakın bir kısmı insektisit, fumigant ve akarisit olup; geri kalanı da herbisitler, bitki büyüme düzenleyicileri ve fungusitler oluşturmaktadır. Kükürt, petrol yağları ve diğer bazı fungusitler bu rakama dâhil edilmemişlerdir (IARC 1980).

İşte bu nedenlerle hangi tipten olursa olsunlar, insan yaşamında önemli yerleri olan tüm kimyasal maddelerin kullanılmadan yani insanlarla temas geçmeden önce oluşabilecek genetik etkileri açısından kontrol edilmeleri büyük bir önem taşımaktadır. Özellikle

uzun bir zamandan beri ve yoğun bir şekilde kullanılan pestisitler gibi maddelerin kontrolü daha önemli ve kaçınılmaz bir görev haline gelmektedir.

Kimyasal maddelerin karsinojenik risklerini ortaya koymak için en akılcı yaklaşım, deney hayvanlarında tümör indikasyonudur. Ancak bu testlerin sonuçlanması uzun zaman almakta ve maliyetleri yüksek olmaktadır (IARC 1980). Bu nedenle araştırmacılar karsinojenite taramalarında esas olabilecek kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı mutajenite test sistemleri geliştirmiştir (Maron and Ames, 1983; Brockman et al. 1984; Quillardet and Hofnung, 1985; Hofnung and Quillardet, 1986).

Kısa zamanlı test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanı bakteriyel testlerdir. Bakteriler, basit üreme ortamlarında hızla ürediklerinde, basit, çabuk ve ucuz uygulanabilir olmalarından ötürü tercih edilmektedir (Venitt et al. 1986; Hofnung and Quillardet, 1986).

Ames testi, 1970'lerin başında Bruce Ames tarafından geliştirilen ve daha sonra yaygın olarak kullanım alanı bulmuş olan kısa zamanlı, bir geri mutasyon testidir (Maron and Ames 1983). *Salmonella* / Mikrozoom testi bakteriyel mutasyon testleri içinde mutajen-karsinojen etkisi en iyi bilinen ve karakterilize edilen geçerliliği, uygulama kolaylığı ve hassaslığı nedeniyle en fazla kabul görerek tercih edilen ve günümüzde de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Gathouse et al. 1998). Test organizması olarak kullanılan *Salmonella typhimurium*, histidin geninde oluşturulan farklı mutasyonlarla (his G, his C ya da his D) gelişmek için histidin gereksinimi duyan değişik tipte oksotrofik mutantlara dönüştürülmüştür.

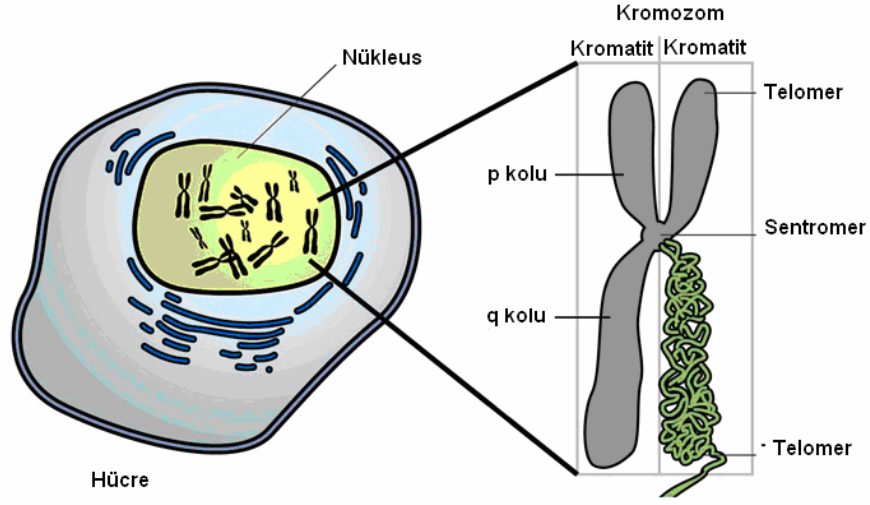
Bu çalışmanın amacını, tarımda insektisit ve herbisit olarak geniş bir kullanım alanına sahip olan 4 farklı pestisit (piperophos, fenclorophos, dioxacarb, promecarb) kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden olan *Salmonella*/mikrozoom testi ile mutajenik etkilerini araştırmak oluşturmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kromozom Yapısı

Yunanca kökenli olup *chromos* = renk ve *soma* = vücut kelimelerinin birleşmesinden oluşmaktadır. Her canlı gibi insan da trilyonlarca hücreden meydana gelir. Hücre, bitkisel ya da hayvansal her türlü yaşam biçiminin en küçük birimidir. Her hücre bir sitoplâzma ve çekirdekten meydana gelir. Çekirdeğin içinde ise kromozom adı verilen iplikçi parçalar bulunur. İnterfaz evresinde kromatin ağı şeklinde bulunan DNA, mitoz bölünmenin profaz evresinde kısalıp kalınlaşmaya başlar ve metafaz evresinde en kısa duruma gelir. Yaklaşık 10.000 kat kısalmış haliyle ışık mikroskopunda 100'lük objektifte incelenebilir. Kromozomlar, I, V, J harfleri gibi biçimlerde görünür ve boyutları mikronla ölçülür. Kromozomların sayısı canlı türlerde değişiklik gösterir. Örneğin sirke sineğinde 8, kurbağada 26, farede 42, köpekte 78 kromozom vardır. İnsanın kromozom sayısı ise 46'dır.

Kromozomlar, molekül yapıları çok iyi bilinen DNA zinciri ile histon denilen protein zincirinden oluşur. DNA zincirleri de özgül proteinleri sentezlemekle görevli gen adı verilen birimlerden oluşur. Kromozonlar aralarında açığı bulunan iki koldan oluşur. Kollar prime boğumla birbirinden ayrılmıştır, bu boğuma sentromer adı verilir. Sentromerler kromozomların iç ipliğine takılmasını sağlarlar. Sentromeri olmayan bir kromozom bölünmeye katılamaz. Kromozom üzerinde primer boğumlardan başka, sekonder boğumlarda bulunabilir. Bazen kromozomun uç kısmını da uydu "satellit" denilen yuvarlak ya da uzunca bir yapı bulunur, kromozomların uçlarına telomer adı verilir. Şekil 1.1'de görüldüğü gibi özel boyama teknikleriyle bir kromozom üzerinde açık ve koyu bantlar şeklinde görülen kromatin kısımları saptanır. Açık bantlar az yoğunlaşmış bölgelerdir ve "eukromotik bölgeler" adını alır. Açık bantlar ise çok yoğunlaşmış bölgelerdir ve "heterokromatik bölgeler" olarak adlandırılır (Klug and Cummings 2002)



Şekil 1.1. Kromozomun yapısı

2.2. Mutasyon

Mutasyon genel anlamda kalıtsal materyaldeki değişimleri ifade eder. Mutasyonlar kendiliğinden meydana gelebildiği gibi fiziksel ve kimyasal dış etkenler tarafından da meydana getirilebilir. Genelde fenotipte ortaya çıkarlar fakat kendini göstermeyen ve hatta öldürücü etki yapan mutasyonlar da vardır. Eşey hücreleri yani germ hücrelerinde meydana gelirse dölden döle aktarılabilir fakat somatik vücut hücrelerinde meydana gelirse dölden döle aktarılamaz yani kalıtsal bir değişim olmaz. Mutasyonlar çeşitlilik doğal seleksiyona materyal sağlaması ve türlerin evriminde büyük bir öneme sahiptir. Aynı zamanda genetik analizde ve genetik çaprazlamalarda kullanılır.

Mutasyon terimi ilk kez 1901 yılında, Hugo De Vries tarafından *Oenatra lamarckiana* (akşamsefası) ile yaptığı çaprazlamalarda gözlemlediği varyasyonu tanımlamak için kullanılmıştır (Öner 2003).

Mutasyonlar doğada kendiliğinden meydana gelebildiği gibi mutajen adı verilen fiziksel ve kimyasal dış etkenler tarafından da meydana gelebilirler. Genelde mutasyonun kendiliğinden meydana gelebilme olasılığının çok düşük olmasına karşın mutajenlerin etkisi ile mutasyon frekansı oldukça yükselmektedir. Normal koşullarda kendiliğinden olan mutasyon frekansı her kuşakta 10^{-5} - 10^{-10} gibi düşüktür. İki ayrı gende aynı anda

iki ayrı mutasyonun oluřma olasılıđı ise 10^{-10} - 10^{-20} gibi çok daha dūřuktur (Oraler 1990).

Mutasyon vūcut hūcrelerinde ya da ūreme hūcrelerinde olabilir. Vūcut hūcrelerinde olan mutasyonlara somatik mutasyonlar denir ve bu mutasyonlar hastalıklara ve dejenerasyonlara yol açarak geliřmeyi ve metabolizmayı olumsuz olarak etkileyebilirler. Ūreme hūcrelerinde gōrūlen mutasyonlara ise germinal mutasyonlar denir. Ūreme hūcrelerinin DNA'sında gōrūlen deđiřmeler genetik içeriđin farklılıđına yol açar ve bu mutasyon kalıtsal olarak yeni nesillere aktarılır.

Bir sınıflama kolaylığı sağlamak ūzere mutasyonlar kromozomların sayı veya yapılarındaki değişiklikler ile sitolojik olarak kromozom dūzeyinde gōzlenemeyen ancak bireyin fenotipindeki farklılıkla saptanabilen gen mutasyonları olarak gruplandırılabilirler (Oraler 1990).

2.2.1. Kromozom Mutasyonları

Kromozomun būyūk parçalarını ilgilendiren mutasyonlara kromozom mutasyonları denir. Kromozom mutasyonları, kromozom sayısı deđiřimleri ve kromozom yapısı deđiřimleri olmak ūzere iki gruba ayılırlar (Bařaran vd. 1995, Ateř 2002, Bahçeci 2002).

2.2.1.1. Kromozom Sayısı Değişimleri

Organizmaların kromozom sayıları cinsten cinse hatta tūrden tūre deđiřkenlik gōsterir ama her tūr için sabittir. Bir bireyin her hūcresi onun ait olduđu tūre ūzgū sayıda kromozom tařır. Kromozomlar mitoz ve mayoz bōlūnme sırasında bazen dūzenli olarak ayrılmaz ve sonuçta kromozom sayısı bakımından farklı hūcreler meydana gelir. Organizmaların hem dođal hem de laboratuvar populasyonlarında kendiliđinden meydana gelen kromozom sayısındaki deđiřmelerdir. Ayrıca izole edilmiř hūcre ya da dokulara çeřitli mutajenik maddelerin uygulanmasıyla da bu mutasyonlar meydana getirilmektedir (Demirsoy 1991). Bu mutasyonlar ūploidi ve anōploidi olmak ūzere iki alt gruba ayrılmaktadır.

Öploid

Bu tip mutasyonlar bir bireyin bütün hücreleri ya gametlerdeki kadar yani (n) sayıda kromozoma sahiptir buna monoploidi denir. Yahutta (n)' in katları halinde 2n, 3n, 5n gibi kromozoma sahiptir buna da poliploidi denir.

Temel kromozom sayısı kadar kromozom içeren bireyler monoploid (n), üç katı içeren bireyler triploid (3n), dört katı içeren bireyler tetraploid (4n) olarak adlandırılır. Öploidide temel kusur, hücrede çekirdek bölünmesi olduğu halde sitoplazma bölünmesinin olmamasıdır (endomitoz). Endomitoz durumunda kromozomlar katı kadar çoğalır fakat mitoz bölünmenin ilk iki evresi (profaz ve metafaz) gerçekleştiği halde anafaz ve telofaz safhası olmaz hücre ve sitoplazma bölünmesi (sitokinez) olmaz. Bunun sonucunda kromozom sayıları her bölünmede katı kadar artmış olur (Başaran vd. 1995).

Anöploid

Bir takımdaki kromozomların birinin ya da birden fazlasının sayısını değiştirmesi olayıdır. Normalde mayoz bölünme sırasında homolog çiftin biri bir kutba diğeri karşı gruba gider. Fakat bazen bir kromozom bir kutba homologu ile birlikte çekilerek aynı gamette yer alırlar. Bu olaya mayotik non-disjunction (homolog kromozom çiftlerinin segregasyon sırasında ayrılmaması) denilir. Ayrılmama ya birinci ya da ikinci mayotik bölünme sırasında ortaya çıkabilir (Erensayın 2000, Falakalı 1993, Öner 2003).

Anöploid bir fert, anöploid yani normal haploid sayıdan daha fazla veya eksik sayıda kromozom içeren gametlerin ürünüdür. Anöploid başlıca üç kısma ayrılır. Bunlardan ilki monosomi olup diploid bir fertle tek bir kromozom eksik olması olayıdır. İkincisi ise nullisomi dir ki bu da bir canlıda bir kromozomun homologu ile beraber eksik olması olayıdır. Son olarak da pollisomi olarak bilinen bir takımda bulunan kromozomlardan birinin veya birkaçının sayısını yükseltmesi olayıdır.

2.2.1.2. Kromozom Yapı Değişimleri

Genetik bilgide değişimlere yol açan olaylar kromozomların yapılarındaki değişimler sonucunda da meydana gelebilirler. Bu olaylarda kromozom sayısı aynı kalır fakat kromozomlarda bazı parçaların kaybolması, fazlaşması veya yer değiştirmesi yoluyla kalıtsal materyal değişime uğrar (Oraller 1990). Kromozomlar kendiliğinden kırılabilir ancak kimyasallara ya da radyasyona maruz kalan hücrelerde kromozomların kırılma oranı daha yüksektir. Kromozom mutasyonları dört grup halinde toplanır (Öner 2003).

Delesyon

Delesyon, DNA yapısından bir ya da daha fazla nükleotid baz çiftinin ayrıldığı mutasyonlara verilen addır. Delesyonlar, kromozomların uç kısmından (terminal delesyon=defisiyens) ya da iç kısmından olabilir. Kopan parça eğer sentromer taşıyorsa yani asentrik ise mayoz ve mitoz bölünmelerdeki kromozomların kutuplara gitmesini sağlayan sentromer olmadığı için kromozomlar kutuplara ulaşmazlar. İçten eksiklik durumunda kromozom iki noktasından kırılır ve kırılan parça ayrılıp serbest uçlar birbirine bağlanır. Kromozomun sarmal yapısından dolayı oluşan halka kopmaları da bu gruba girer. Uçtan kopmalarda ise tek noktadan kırılma olur¹.

Duplikasyon

Duplikasyon, bir kromozomun bir parçasının o kromozom üzerinde iki veya daha fazla sayıda tekrarla görülmesi şeklindeki kromozom anomalisidir. Yani kromozomun bir kısmının kendi kendini eşlemesi olarak da tanımlanabilir.

Duplikasyonlu bir parça sentromerli serbest bir parça veya tamamlayıcı bir kromozom parçası olabilir. Eğer sentromere sahip yani sentrik bir kromozom parçası ise bu parça küçük, ekstra bir kromozom olarak kabul edilir.

Bir kromozom parça değişimi sırasında karşısındakine belirli genleri vermez, sadece alırsa o gen bakımından diploid olur. Bu çoğunlukla düzenli işlemeyen bir krossingoverde meydana gelir. Normal olarak mayozun ilk evrelerinde eş genler

¹ <http://tr.wikipedia.org/wiki/Delesyon> 25.04.2007

sinapsis yapar. Ayrılırken normal bir bölünme olmazsa kromatidlerden biri o gen bakımından diploid olur diğeri ise o genlerden yoksun kalır.

Duplikasyonun değişik özelliği bulunur. Birincisi, duplikasyon geninin birden fazla kopyasının bulunmasını sağlayabilir. İkincisi, delesyonlarda olduğu gibi, duplikasyon sonucu fenotipik çeşitlilik oluşabilir. (Öner 2003).

İnversiyon

İnversiyon, bir kromozomun iki defa kırılması ve kopan parçanın 180° ters dönerek tekrar aynı kromozoma bağlanması şeklindedir (Öner 2003, Falakalı 1993). İnversiyona uğramış kromozomlar normal homologları ile sinapsisle teşkil ederken düzensizliklerinin ortaya çıkmasına nedendir. Çünkü böyle heterozigotik homologlarda allel genler nokta nokta karşılıklı gelmek isteyeceklerdir. Kırılmadan önce kromozomda halkaya benzer bir yapı oluşur. Kırılmayla ortaya çıkan yapışkan uçlar birbirine yaklaşır ve tekrar birleşir. Bu durumda gen sayısı ve özelliği aynı olmasına rağmen diziliş sırası değişir. Ters çevrilen parça eğer sentromer içeriyorsa inversiyon perisentrik, içermiyorsa parasentrik inversiyon olarak isimlendirilir. Parasentrik inversiyonda, gen dizilişi ters çevrildiği halde sentromerden uzanan kolların boy oranı değişmezken perisentrik inversiyonda değişir (Öner 2003).

Translokasyon

Translokasyon, bir kromozomun kaybolan parçasının ya da kopan bir parçasının başka bir kromozoma yapışması şeklinde görülen kromozom anomalilerindedir.

Translokasyonlar, her zaman homolog olmayan parça değişimleridir. Gen sayısının ve niteliğinin aynı kaldığı translokasyonlara "dengeli translokasyon"lar denir. Gen sayısının ve niteliğin değiştiği, çoğunlukla anomalilere neden olan translokasyonlara "Dengesiz translokasyon"lar denir.

2.2.2. Gen Mutasyonları

Genetik materyalin DNA replikasyon sürecinin mükemmel işleyişinden dolayı hücreden hücreye ve nesilden nesile değişmeden aktarıldığını biliyoruz. Bu genellemeye rağmen genetik materyal bazı yollarla değişebilmektedir. Bu yollardan ön önemlileri kendi kendine değişme, replikasyon hataları, bazı kimyasallar ve radyasyondur. Geniş anlamda iki tip genetik materyal değişimi mümkündür: bütün bir kromozomla ilgili değişimler ve bir veya birkaç baz çiftinin değişmesi. Bütün organizmalar baz çifti değişikliklerini tamir eden mekanizmalara sahiptirler. Fakat bütün baz çifti değişimleri her zaman tamir edilemeyebilmektedir. Tamir edilemeyen değişiklikler baz çifti mutasyonları olarak adlandırılır. Baz çifti mutasyonları bir organizmanın genomunun herhangi bir yerinde meydana gelebilir. Organizmaların genomlarının bütün bölgeleri genlere taşımadığından genlerde veya kontrol bölgelerinde meydana gelmedikçe baz çifti mutasyonları belli bir fenotipik değişikliğe neden olmaz. Dolayısıyla genetikçiler için önemli olan mutasyon, genler: etkileyen mutasyonlardır ve gen mutasyonları olarak adlandırılır. Bununda ötesinde hücresel fonksiyon, proteinlerin bir sonucu olduğu için protein kodlayan genlerin ekspresyonunu etkileyen mutasyonlara daha fazla ilgi duyulmuştur.

Mutasyonların tanımlanması; mutasyon DNA baz çifti değişimi veya kromozomal değişimlerdir. Baz dizisi değişimleri baz çifti eklenmesi, silinmesi, baz çifti değişimi, bir baz çifti veya belli bir grup baz çiftinin ters dönüşü veya yeni bir pozisyona transferini içerebilir. Çok hücreli organizmalarda mutasyon eğer somatik hücrelerde meydana geldiyse sadece ilgili bireyin ilgili hücrelerini ve dokusunu etkiler yani yeni nesillere aktarılmaz. Bu tip mutasyonlar somatik mutasyonlar olarak adlandırılır. Eğer mutasyon eşeyli üreyen organizmaların eşey hücrelerinde meydana geldiyse gametler aracılığıyla yeni nesillere aktarılır. Bu tip mutasyonlar eşey hücresi mutasyonları olarak adlandırılır. Somatik mutasyonlar, mutasyonun meydana geldiği bireyi etkiliyorken eşey hücresi mutasyonları gelecek nesilleri etkiler. Eşeysiz üreyen çok hücreli organizmalarda somatik mutasyonlar yeni hücrelere aktarılabilir. Prokaryotlarda ise vücut hücresi-eşey hücresi gibi bir ayırım olmadığından bütün mutasyonlar yeni

hücrelere yani nesillere aktarılır. Bir kromozomun organizasyonundaki bir değişiklik kromozom mutasyonu veya kromozom kusuru olarak adlandırılır. Bir gen dizisi içindeki mutasyon ise gen mutasyonu olarak adlandırılır. Gen mutasyonlarına baz çifti değişimi bir veya daha fazla baz çiftinin eklenmesi veya silinmesi gibi DNA dizisindeki değişiklikler neden olur. Mutasyonlar doğal olarak kendiliğinden meydana gelebilir. Mutajenler uygulanarak mutasyonların uyarılması da mümkündür. Bir mutajen kendiliğinden oluşan mutasyon oranının üzerinde bir mutasyon sıklığını oluşturan fiziksel ve kimyasal ajanlardır. Mutajenlerin uygulanmasıyla oluşan mutasyonlara uyarılmış mutasyon denir. Doğal olarak oluşan mutasyonlarda kendiliğinden mutasyonlar olarak adlandırılır. Uyarılmış ve kendiliğinden mutasyonlar arasında kesin bir sınır oluşturmak mümkün değildir. Bir polipeptitin dördüncü yapısı birincil amino asit dizisi tarafından belirlenir. Bir mutant suş tarafından sentezlenen bir polipeptip yabancı tip polipeptitten yapısal olarak farklı olabilir. Eğer farklı ise mutant polipeptit kısmen-fonksiyonel olabilir, fonksiyonsuz olabilir veya hiç üretilmez .

Kromozom mutasyonlarında birden fazla gen söz konusu iken, gen mutasyonlarında değişiklik bir gen ile sınırlıdır. Genetik materyale etkilerine göre gen mutasyonları çeşitli alt sınıflara ayrılır (Ateş 2002).

Transisyon (Geçiş)

Bir baz çiftinin başka bir baz çiftine değişmesidir. En çok rastlanılan mutasyon tipidir. Bu değişimde, bir pürin bazının yerine başka bir pürin bazı (A'nın yerine G, G'nin yerine A), bir pirimidin bazı yerine başka bir pirimidin bazı (T'nin yerine C, C'nin yerine T) geçer (Ateş 2002, Falakalı 1993).

Transversiyon (Çapraz geçiş)

Transversiyonda bir pürin bazı ile bir pirimidin bazı veya bir pirimidin bazı ile bir pürin bazı (A veya G yerine T veya C'nin geçmesi ya da bunun tersi) birbirlerinin yerine geçer (Ateş 2002, Bahçeci 2002).

Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonları

DNA molekülüne fazladan bir veya daha fazla baz çiftinin girmesi ya da çıkmasıyla oluşan mutasyonlara çerçeve kayması mutasyonları ismi verilir. Bu mutasyonlarda bir veya daha fazla baz çiftinin ilavesine insersiyon (addition), ayrılmasına ise delesyon ismi verilir. Bu durum ise okunan çerçevenin translasyonunu değiştirir. Böylece translasyon sırasında tRNA'ların tanıdığı üçlü baz dizileri değişir. Çerçeve kayması mutasyonları, replikasyon, onarım veya rekombinasyon sırasında DNA'da oluşan boşluklarda ortaya çıkar. Bu işlemler sırasında, bir zincirin diğerine göre kayması ve uygun olmayan bir tarzda baz eşleşme olasılığı vardır (Bahçeci 2002, Ateş 2002).

2.3. Mutajenler

Mutasyona neden olan ajanlara mutajen denir. Bunlar DNA'da değişimlere yol açarlar. Tüm canlı organizmalarda, pek az istisna ile genetik materyalin DNA olması nedeniyle herhangi bir organizma mutajenler için indikatör bir sistem olarak kullanılabilir. Kansere neden olan ajanlar kanserojen olarak ifade edilir ve bunlar da mutajendir (Ames 1971). Kanserojenlerin taranmasında mutajenlerin esas alınması iki önemli nedene dayanır. Bunlardan birincisi, genetik kodun ve genetik sistemin evrensel oluşudur. İkincisi ise karsinojenite ile mutajenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşudur (Ramel and Rannung 1980).

Genellikle kabul edilen bir görüşe göre, doğrudan veya metabolize edildikten sonra kanserojenik etki gösteren tüm maddelerin aynı zamanda mutajenik etki gösterecekleri yani mutajen olabilecekleri vurgulanmaktadır. Bunun aksi, yani tüm mutajenik maddelerin kanserojenik etki göstermeleri beklentisi ise bazı durumlarda gerçekleşmemektedir. Bunun nedeni, mutasyonun genetik materyalin doğrudan etkilenmesiyle ortaya çıkabilmesine rağmen kanserin çok basamaklı karmaşık bir biyolojik olaylar sonucu ortaya çıkması olabilir (Bağcı 1985).

McCann ve arkadaşları (1975a, 1976), karsinojen olan ve olmayan 300 kimyasalı, *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile taradıklarında 175 karsinojen maddenin 157 tanesinin mutajenik etkili, karsinojenik etki göstermeyen 108 maddenin 94 tanesinin mutajenik etkili olmadığını saptamışlardır.

2.4. Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyonu

Genel olarak metabolizma hayatın devamı için gerekli olan organizmada oluşan tüm kimyasal reaksiyonlar olarak tanımlanabilir. Diğer taraftan bir organizma için yabancı olan kimyasal maddelerin (ksenobiyotiklerin) kimyasal değişimleri de metabolizma olarak tanımlanırsa da biyotransformasyon bu anlamda daha uygun bir terim olmaktadır.

İnsanlar, ilaçlar, gıdalardaki katkı maddeleri veya çevre kirliliğine neden olan maddeler vs. şeklinde olsun, giderek artan bir biçimde çeşitli yabancı kimyasal maddelerin etkileri altında kalmaktadırlar. Çeşitli yollarla organizmaya giren kimyasal maddeler enzimlerin katalitik etkisiyle kimyasal reaksiyonlara girerler ve böylece metabolitlere dönüşürler. Pestisitler, ilaçlar, kozmetikler, yiyecek prezervatifleri gibi vücuda yabancı olan maddeler uyarılabilen izozimlerden oluşan detoksifikasyon enzim gruplarıncı metabolize edilirler.

Genellikle lipid çözünen olan bu yabancı maddeleri metabolize etmedeki amaç onları daha polar yaparak suda çözünen hale getirmek ve bu şekilde vücut dışına atılmalarını sağlamaktır (Vural 1984, Bağcı 1985, Murray et al. 1993).

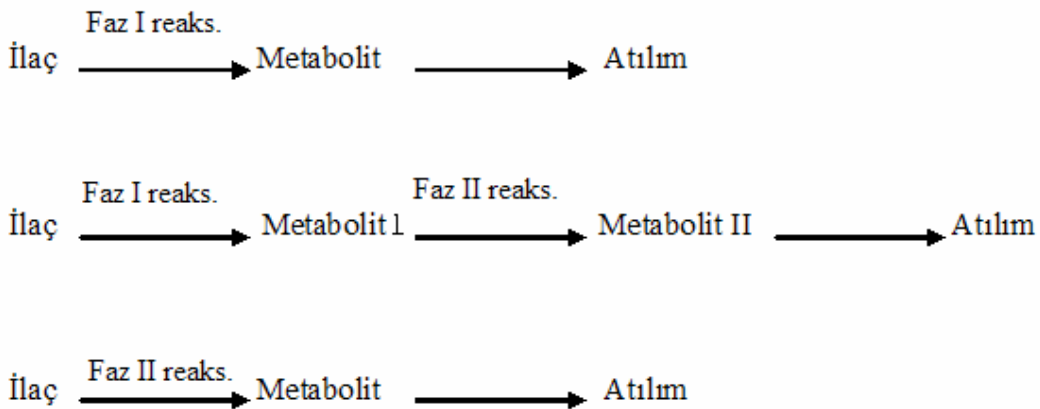
Mikrobiyal mutajenite çalışmalarından elde edilen verilerin insanlara uygulanmasındaki zorluklardan en önemlisi, yabancı bir kimyasal maddenin insanda geçirdiği metabolik reaksiyonlardır. Bu metabolik yolların bilinmesi, memelilerde enzimatik reaksiyonlarla metabolik dönüşümlere uğrayan kimyasal maddelerin potansiyel aktivitelerinin tayininde kullanılabilir, uygun *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerin geliştirilmesine olanak vermiştir. Birçok çevre kirleticisi kendileri mutajen olmadıkları halde memelilerin metabolizmasında karışık fonksiyonlu oksidaz sisteminin etkisi altında aktif metabolitlere dönüşebilmektedir (Asal 1983).

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu genellikle özellikli olan kompleks enzimlerle gerçekleşir. Bu enzimlerin önemli bir kısmı karaciğerlerde yerleşmiştir. Bu nedenle karaciğerin kan dolaşımı ile karaciğere gelen kimyasal maddeleri, depolanma, dağılım ve safra ile atılmalarından önce metabolize etme kapasitesi çok etkindir. Karaciğerdeki mikrozomal enzimler toksik maddelerin metabolizmasında önemli rol oynarlar. Mikrozomal enzimlerin yaptığı oksidasyon olayında P-450 sitokromuna bağlı değişik etkili oksidazlar (monooksijenazlar) rol oynar. Ayrıca biyotransformasyon barsak, böbrek, akciğer, beyin ve deride de olabilir (Vural 1996, Dökmeci 1994).

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyon mekanizmalarında iki enzim grubu yer almaktadır. Bu reaksiyonlar Şekil 2.1’de gösterilmiştir

1- Faz I enzimleri: Faz I reaksiyonları yükseltgenme (oksidasyon), indirgenme (Redüksiyon) ve hidroliz olaylarını içerir. Faz I’de lipid de çözünen ksenobiyotikler daha polar moleküller halin geçerler. Faz I boyunca hidroksil gibi bir veya daha fazla polar grup, hidrofobik moleküller ortaya çıkar. Faz I reaksiyonları ile bileşikler, Faz II için uygun hale gelir ve yeterli derecede polar olan ürünler kolayca hücre ve vücuttan çıkarılır (Vural 1984, Singer et al. 1994).

2- Faz II enzimleri: Faz II reaksiyonları çeşitli konjugasyon veya sentez olaylarını içerir. Faz II’de endojen maddelerle birleşen polar metabolitler inaktif olarak eliminasyona uğrarlar (Vural 1984, Singer et al. 1994).



Şekil 2.1. Faz-I ve Faz-II biyotransformasyon reaksiyonları

Faz I reaksiyonlarının önemli bir kısmı, normal metabolizmanın spesifik enzimlerinden farklı mikrozomal enzimler tarafından katalizlenir (Vural 1984).

Yabancı kimyasal maddelerin biyotransformasyon mekanizmalarından özellikle Faz I reaksiyonlarının önemli bir kısmı, normal metabolizmanın spesifik enzimlerinden farklı mikrozomal enzimler tarafından katalizlenir. Faz I reaksiyonlarını katalizleyen bu enzimler birçok hücrenin sitoplazmasında ağ şeklinde olan endoplazmik retikulumunda yerleşmişlerdir. Bu nedenle bu enzimler membrana bağlı enzimlerdir. Endoplazmik retikulum bir membran olup lipid ve proteinlerden oluşmuştur. İşte bu lipoprotein matriksi içinde yer alan mikrozomal enzimler ancak lipid membranlara geçebilen lipofilik ksenobiyotikleri biyotransformasyona uğrattır (Vural 1996).

Faz I metabolizması büyük ölçüde P-450-enzimleri ile gerçekleşir. Bunlar "heme" içeren proteinlerdir ve birincil olarak karaciğerde bulunurlar (Yüksel 1999). Bu pigmentlere P-450 adı, 450 nm'de absorbanans gösterdiği için verilmiştir. Spesifik sitokrom P-450 formları, 446 ile 452 nm arasında maksimum absorbanans veren dalga boylarına sahiptir (Özerol 1996).

P-450 enzim sistemi; dışarıdan alınan ilaçlar, kimyasal maddeler, insektisitler, petrol ürünleri vb. maddeleri metabolize eden sistemdir. Birçoğunun da bilinmediği sanılmaktadır. Örneğin; tüm canlılarda 1992'de 221 tane P-450 geni tanımlanmışken bu rakam 1995'te 481 olmuştur. İnsanda 1998'e dek saptanan gen sayısı 50'nin altındadır. Bunların hepsi ilaç metabolizmasına karışmamaktadır. Bu enzimler hepatositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar (Yüksel 1999).

2.5. Mutajenik ve Kanserojenik Maddelerin Saptanması Teknikleri ve Ames Testi

Çevremizde bulunan ve biyolojik etkileri henüz bilinmeyen sayıları milyonları bulan sentetik ve doğal maddelerin kanserojenik potansiyelleri açısından test edilmesi sağlığımız açısından gerekmektedir (Bağcı 1985).

Bir maddenin kanserojenik potansiyeli, deney hayvanlarıyla veya insanlarla yapılan uzun zamanlı testler ya da epidomiyolojik çalışmalarla ölçülmektedir (Bağcı 1985, Forman et al. 1991). Uzun zamanlı testler, uygun hayvan türleri seçilerek hayvansal maddenin uygulanmasını takiben yapılan otopside patolojik ve histolojik çalışmalarla ölçülmektedir (Bağcı 1985, Forman et al. 1991). Ayrıca hayvan deneylerinde sex faktörü, yaş, veriliş biçimi ve farklı türler farklı sonuçlara neden olmaktadır. Dolayısıyla sağlıklı sonuçlar elde edilememektedir (Singer et al. 1994).

Kimyasal maddelerin kanserojenik potansiyellerini ölçebilmek için canlı hayvan deneyleri yerine birçok *in vitro* test sistemi geliştirilmiştir. Kısa zamanlı testler (short-term tests) olarak adlandırılan bu test sistemlerinde kimyasal maddelerin belirli genetik sistemlerde belirli sonuçlar verip vermedikleri ölçülmekte ve elde edilen sonuçlarla maddelerin kanserojenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmaktadır (Bağcı 1985). Kısa zamanlı testlerden bazıları Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Kısa dönemli *in vitro* çalışmalara, kimyasal maddenin bakterilerin mutajenik etkisinin hücrelerde değişmeye neden olup olmadığı DNA değişim ve tamiri üzerindeki etkisi ve memelilerde mutajenik etkisinin araştırılmasını kapsar (Vural 1984).

Kısa zamanlı testlerin çoğunda, memelilerdeki metabolik transformasyonlar da göz önüne alınarak ilave edilen metabolik aktivasyon sistemleri yer alır. Bunlar:

- a) Rodent veya insan karaciğerlerinden elde edilen mikrozomlar (Bogen 1995; Fetterman et al. 1997)
- b) Metabolik aktivasyon yapabilen rodent hücreleri
- c) Memeli organizmaların kullanıldığı konakçı aracılığıyla test gibi *in vivo* aktivasyon sistemleridir (Bağcı 1985).

Çizelge 2.1. Kimyasal mutajen/kanserojen maddelerin saptanmasında kullanılan kısa zamanlı testlerden bazıları (Bağcı 1985).

Test	İzlenen Genetiksel Biyokimyasal Yollar	Metabolik aktivasyon	Literatür
<i>Salmonella typhimurium</i>	Histidin okzotrofları	Post- mitokondriyal karaciğer fonksiyonları (S9, mikrozoimler)	Ames vd. 1973a, Maron ve Ames 1983.
<i>Escherichia coli</i>	Arginin-triptofan okzotrofları Profaj indüksiyonu Onarım eksikliği olan suşların büyümelerinin inhibisyonu SOS cevabı	Sıçan karaciğer hücreleri	Green ve Murial 1976 Elesperu ve Yarmolinsky 1979 Moreu vd. 1976 Rosenkranz ve Mermelstein 1980 Slater vd. 1971 Quillardet ve Hofnung 1985 Quillardet vd. 1985
<i>Bacillus subtilis</i>	DNA onarımı hatalı suşlar	–	Kada ve Hirano 1980
<i>Neurospora crassa</i>	Adenin okzotrofları	–	Brockman 1984
Çin hamsteri ovaryum ve akciğer hücreleri	HGPRT (Hipoksantinguanin fosforiboziltransferaz) lokusunda mutasyonlar	–	Beaudet 1973
Fare karaciğeri epitel hücreleri	8-Azaguanine dirençlilik	–	Vogel ve Sobels 1976
<i>Drosophila melanogaster</i>	Kromozomal hatalar	–	Vogel ve Sobels 1976
Suriye hamsteri embriyo hücreleri	Morfolojik transformasyonlar	–	Pienta vd. 1977
Çin hamsteri hücreleri	Kardeş kromatid değişimi	–	Perry ve Evans 1975
İnsan periferik kan lenfositleri testi	Kromozomal hatalar	–	Preston vd. 1981

Memelilerde mutasyon testlerinin yapılmasında en önemli zorluklardan bir tanesi memelilerin bu test sistemlerine karşı duyarlılıklarının az olmasıdır. Bununla birlikte

mikroorganizmalar mutajenlere karşı çok daha fazla duyarlılık göstermektedir (Arı 1998).

Bakteriyel test sistemlerinin kullanım amaçlarından bazılarını şöyle sıralayabiliriz:

- a) Çeşitli kimyasalların potansiyel karsinojenitelerinin taranmasında
- b) Kompleks karışımlardan, biyolojik olarak etkin bileşiklerin ayrıştırılmasında
- c) Prokarsinojenlerin öncül ya da nihai metabolitlerinin saptanmasında
- d) Vücut sıvılarının ve atıklarının test edilmesiyle, insanların mutajen ve karsinojenlere maruz kalma düzeylerinin izlenmesinde
- e) Kimyasalların mutajenik etki mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalarda
- f) Konakçılar üzerinde yapılan (host mediated) deneylerde
- g) Karsinojen ve mutajenlerin neden olduğu özgül DNA hasarlarının tiplerini saptamada bakteriyel test sistemleri kullanılmaktadır (Öksüzoğlu 1997).

2.6. Ames/Salmonella / Mikrozoom Test Sistemi

Çevremizde bulunan ve biyolojik etkileri bilinmeyen sayıları milyonları bulunan sentetik ve doğal maddelerin kanserojenik potansiyelleri açısından test edilmeleri sağlığımız açısından gerekmektedir (Bağcı 1989).

Bir maddenin kanserojenik potansiyeli, deney hayvanlarıyla veya insanlarla yapılan uzun zamanlı testlerle veya epidemiyolojik çalışmalarla ölçülmektedir. Uzun zamanlı testler, uygun hayvan türleri seçilerek hayvansal maddelerin uygulanmasını takiben yapılan otopside patolojik ve histolojik çalışmalarla ölçülmektedir (Forman and Ames 1991, Bağcı 1989).

Bruce Ames tarafından geliştirilen *Salmonella typhimurium* mikrozoomal test sistemi, mutajen ve kanserojen maddelerin tespitinde kullanıldığı gibi, başta antioksidantlar olmak üzere çeşitli antimutajenik ve antikanserojenik etkileri olan inhibitör maddelerin de belirlenebildiği ve etkilerinin izlenebildiği çok önemli kısa zamanlı test sistemlerinden biridir (Kalaycıoğlu ve Öner 1994).

Bu test sisteminde, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla elde edilmiş bir seri *Salmonella typhimurium* mutant suşları kullanılmaktadır (Maron and Ames 1983).

Ames testi genotoksik araştırmalarda hala geniş bir kullanım alanına sahip olan bakteriyel mutajenite testidir (Josephy et al. 1977). Bu testte kısaca test edilen kimyasal maddenin *Salmonella typhimurium* his⁻ (histidin sentezleyemeyen histidin oksotrofu) mutantlarını, his⁺ (yabanıl tip, prototrof) haline çevirme gücü ölçülmektedir.

Ames testinde, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenitesinin belirlenebilmesi için histidine ihtiyaç duyan suşlar kullanılmaktadır. Genel mutajenite testleri için en çok kullanılan test suşları TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535 ve TA 1538'dir. Her bir test suşu histidin operonunda değişik tipte mutasyonlar içermektedir (Maron and Ames 1983). Ames testinde kullanılan suşlar ve onların genetik özellikleri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. *Salmonella typhimurium* mutant suşlarının genetik özellikleri
(Öksüzoğlu1997).

Suş	Histidin Mutasyonu	LPS	Onarım	pKM 101	Mutasyonun Niteliği	Belirlenecek Bileşik Sınıfları
TA 1535	His G46	Rfa	$\Delta uvrB$	-	AT→GC transisyon	Baz çifti değişimine neden olan mutajenler
TA 1537	His C3076	Rfa	$\Delta uvrB$	-	C.....C yanına +1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA 1538	His D3052	Rfa	$\Delta uvrB$	-	CG.....CG yanından -1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA 98	His D3052	Rfa	$\Delta uvrB$	+	CG yanından -1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA 100	His G46	Rfa	$\Delta uvrB$	+	AT→CG transisyon	Baz çifti değişimine neden olan mutajenler
TA 97	His D6610	Rfa	$\Delta uvrB$	+	CCC yanına +4	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA 102	PAQ1 His G428 Δ his	Rfa	$\Delta uvrB$	-	G Ochre AT	Oksidantlar, X- Işınları, U.V., mitomisin C, bleomisin, H O ve kinonlar...

2.6.1. Histidin Mutasyonu

Her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar, ya DNA'daki tek bir bazın değişmesi ile ortaya çıkan baz değişimleri ya da bir bazın eklenmesi ya da çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonlarıdır (Ames et al. 1973b).

Salmonella typhimurium TA 100 ve TA 1535 suşlarında bulunan His G46 mutasyonu, histidin biyosentezinin ilk enzimini kodlayan hisG geni üzerindedir. Bu mutasyon, histidin biyosentezinde rol alan ilk enzimi kodlayan gende l6sin kodonu ^{-GAG-}_{-CTC-} yerine prolin kodonunun ^{-GGG-}_{-CCC-} gelmesine yol a4ar.

His D3052 mutasyonu, *S. typhimurium* TA 1538 ve *S. typhimurium* TA 98 suşlarında bulunur. His D⁺ geni histidinol dehidrogenaz enzimini kodlar. His D3052 mutasyonu (-1) 4er4eve kayması Şeklinde bir mutasyondur ve n6kleotid eksikliği his D⁻ geni i4inde 8 defa tekrarlanan ^{-GCGCGCGC-}_{-CGCGCGCG-} b6lgesindedir. Bu nedenle bu suş daha 4ok 4er4eve kayması tipi mutasyonlara neden olan mutajenik/kanserojenik kimyasallar ile his⁺ hale d6n6Őmektedir.

2.6.2. Rfa Mutasyonu

Bu mutasyon, bakteri h6cre duvarının lipopolisakkarit (LPS) tabakasını kodlayan genlerde meydana gelir. Bu engelin kalkması, yani LPS kusurları mutajenin bakteri i4erisine girmesini kolaylaŐtırarak, h6crenin daha duyarlı olmasına yol a4maktadır. Rfa mutantları, polisakkaritlerin sentezinden sorumlu bir enzim bakımından kusurludurlar. Bu nedenle de b6y6k molek6llere karşı duyarlıdırlar. *S. typhimurium*'un his⁻ ve onarım sistemlerinde mutasyon taşıyan test suşlarından, LPS kusurlu t6revler elde edilmiş bu Şekilde de sistemin mutajenlere duyarlılığı arttırılmıştır (Ames et al. 1973b).

2.6.3. *uvrB* Mutasyonu

DNA onarım sisteminde kesip 4ıkarma g6revini 6stlenen enzimi kodlayan *uvrB* genindeki delesyon sonucu oluşmuştur. *uvrB* mutasyonu, bir4ok mutajenin ortaya 4ıkarılmasında duyarlılığın artmasına neden olur. Ancak, teknik nedenlerden dolayı *uvrB* geninin kesilerek uzaklaŐtırılması sırasında bu delesyon biotin genine kadar uzanmaktadır. Biotin geni ise vitamin H denilen biotinin sentezinden sorumludur. Bu nedenle bakteriler 6reyebilmeleri i4in histidinin yanında biotine de gereksinim duyarlar (Ames et al. 1973b).

2.6.4. R-faktörü

Mutajenlerin daha iyi tayin edilebilmeleri amacıyla *S. typhimurium* TA 1538 ve TA 1535 suşlarına, ampisiline dirençlilik geni taşıyan pKM 101 R faktörü plazmidin eklenmesiyle *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları elde edilmiştir (Ames et al. 1973). Plazmid içeren suşların, mutajenik olduğu gösterilmiş ajanlara karşı cevapları, plazmid içermeyen suşlara göre oldukça yükselmiştir. Plazmid içeren yeni suşlar, orjinal suşlarla zayıf ya da mutajen olmayan ajanlara karşı net bir pozitif cevap vermişlerdir. pKM 101 plazmidi bu suşların daha duyarlı olmasından sorumlu olan hata oranı yüksek onarım sistemi ile bağlantılı gen ürünleri içermektedir (Levin et al. 1982).

Bu plazmid, DNA'nın kesme-çıkarma yoluyla onarım mekanizmasının aktivasyonuna ve dolayısıyla spontan mutasyonların ve kimyasalların neden olduğu mutasyonların artmasına neden olur.

Bunların dışında son olarak *Salmonella*/mikrozom test sistemine daha sonra rat karaciğeri 9000xg süpernatantını ve kofaktörleri içeren metabolik aktivasyon sistemi eklenerek memelilerdeki biotransformasyon olaylarının benzeri sağlanmaya çalışılmıştır. Önceki çalışmalarda mutajenik aktivite göstermeyen birçok prokarsinojenler, test sisteminin metabolik aktivasyonu içeren bu uygulaması ile pozitif sonuç vermişlerdir (Ames et al. 1973b).

2.7. Pestisitlerin Tanımı

Pestisit terimi insan yaşamı için zararlı olan canlıları öldürmek amacı ile kullanılan bileşikleri ya da maddeleri ifade eden genel bir terimdir. Dünyada ve ülkemizde tarım alanındaki zararlıları yok etmek ve daha kaliteli ürün elde etmek amacıyla pestisitler yoğun olarak kullanılmaktadır. Tarımsal savaşında kullanılan pestisitler hedef organizmaları yok ederek ürün artışına neden olabildikleri gibi hedef olmayan canlılarda da hasarlara yol açmaktadırlar.

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.

Türkiye’de tarım ilacı (pestisit) tüketiminde etkili madde olarak, 1979’a göre 2002 yılında %45,29’luk bir artış göstermiştir. Bu artışa karşın ülkemizde pestisit tüketimi gelişmiş ülkelere göre oldukça düşüktür. Ancak, entansif tarım yapılan Akdeniz, Ege gibi bölgelerin tüketimi Türkiye ortalamasının çok üzerindedir. Türkiye’de genel olarak az pestisit tüketilmesine karşın, en yoğun tüketilen pestisitler çevre ve sağlık açısından önemli riskler taşımaktadır (ÇSGB 2006)

Pestisitlerin piyasa ömrünü, insan sağlığını ve çevreye etkililiğini en fazla etkileyen olayların başında pestisitlere organizmaların duyarlılık azalışı gelmektedir. Bir pestisite organizmaların duyarlılığı azaldıkça, o pestisitinin etkililiği de düşmektedir. Uygulayıcı ise, eski etkililiği elde edebilmek için devamlı doz yükseltmesine gitmektedir. Böylece artan dozlara paralel olarak çevrede pestisit kalıntıları daha fazla yoğunlaşmaya başlamaktadır.

Pestisitlere duyarlılık azalışı iki yolla olur; adaptasyon ve dayanıklılık. Adaptasyonda, bir organizmanın genetik yapısında değişiklik olmaksızın, bir kimyasal maddeye uyum göstermesi sonucu duyarlılığın azalmasıdır. Ancak dayanıklılıkta organizmanın duyarlılığı genetik yapısındaki bir değişiklik sonucu azalmaktadır. Buna göre dayanıklılık bir mutasyondur ve genelde geri dönüşümü yoktur. Adaptasyonda ise, söz konusu pestisitinin kullanımının durdurulmasıyla organizma yavaş yavaş tekrar eski duyarlılığını kazanabilir. Türkiye gibi pestisitlerin bir ölçüde bilinçsiz ve kontrolsüz kullanıldığı ülkelerde dayanıklılık kadar adaptasyon da ekonomik açıdan önem taşımaktadır. Dayanıklılığın ortaya çıkışına en fazla etki eden faktörlerin başında, pestisitinin dayanıklılık açısından riski ile pestisitlerin kullanım biçimi gelmektedir. Bilinçsiz ve kontrolsüz kullanım, duyarlılık azalışlarının daha hızlı ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Delen ve Tosun 1996).

Toksik özellik gösteren bir maddenin pestisit olarak kullanılabilmesi için aşağıdaki özellikleri taşıması gerekmektedir.

- 1- Biyolojik olarak aktif olmalı
- 2- Etkili olmalı
- 3- Yeteri kadar kararlı olmalı
- 4- Kullanıcılar, tüketiciler ve üçüncü şahıslar açısından güvenilir olmalı
- 5- Besi hayvanları açısından güvenilir olmalı
- 6- Yaban hayatına ve faydalı organizmalara zararlı olmamalı
- 7- Çevre için kabul edilebilir olmalıdır.

Bir formülasyonda bulunması gereken özellikler Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından esaslara bağlanmış ve bu özelliklerin tayin edilebilmesi için standart metodlar geliştirilmiştir.

2.8. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler; görünüşlerine, fiziksel yapılarına, formülasyon şekillerine, etkiledikleri zararlı ve hastalık grubu ile bunların biyolojik dönemine, içerdikleri aktif madde cins ve grubuna, zehirlilik derecesine ve kullanım tekniğine göre çok değişik şekillerde sınıflandırılabilirler.

Pestisitlerin sınıflandırılmasında; etkili oldukları zararlı grubu ve formülasyon şekillerine göre olan sınıflandırma daha yaygın olarak kullanılmaktadır.

Pestisitlerin formülasyon şekillerine göre sınıflandırılması

1. Toz ilaçlar (Dust)
2. Islanabilir toz ilaçlar (WP)
3. Emülsiyon konsantre ilaçlar (E.C veya E.M.)
4. Solüsyon konsantre ilaçlar (SC)
5. Suda çözünebilir toz ilaçlar (SP)
6. Yazlık ve kışlık yağlar

7. Granüller (G)
8. Peletler
9. Tabletler
10. Toz tohum ilaçları
11. Sıvı tohum ilaçları
12. Aerosoller
13. Zehirli yemler
14. Kapsül şekli verilmiş formulasyonlar
15. Akıcı Konsantreler (FC)
16. Kuru akışkanlar (Anonim 2001).

Pestisitlerin kimyasal tiplerine göre sınıflandırılması

1. Organofosfatlar
2. N-metil karbamatlar
3. Klorlu hidrokarbonlar
4. Bisdiyokarbamatlar
5. Organotinler
6. Botanik kökenli maddeler
7. Arsenikler
8. Fenoksialifatik asitler
9. Piretroidler
10. Fenol türevleri
11. Mikrobiyaller (Güler ve Çobanoğlu 1997).

Pestisitler kalıcılıklarına göre de aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır.

1. Kalıcı olmayanlar: Birkaç günden 12 haftaya kadar etkisini sürdürenler
2. Orta derecede kalıcı: 1–18 ay arasında dayanabilenler
3. Kalıcı olanlar (persistent): Birçok klorlu hidrokarbon bu gruba girmektedir.
DDT, aldrin, dieldrin gibi maddeler 20 yıl kadar dayanabilmektedir.
4. Sürekli kalıcılar (permanent): Civa, kurşun, arsenik (Güler ve Çobanoğlu 1997).

Pestisitlerin Kullanıldıkları Zararlı Grubuna Göre Sınıflandırılması

1. Böcekleri öldürenler (İnsektisit)
2. Fungusları öldürenler (Fungusit)
3. Fungusların faaliyetini durduranlar (Fungustatik)
4. Yabancı otları öldürenler (Herbisit)
5. Örümcekleri öldürenler (Akarisit)
6. Bakterileri öldürenler (Bakterisit)
7. Yaprak bitlerini öldürenler (Afisit)
8. Kemirgenleri öldürenler (Rodentisit)
9. Nematodları öldürenler (Nematosit)
10. Salyangozları öldürenler (Molluskisit)
11. Algleri öldürenler (Algisit)
12. Kuşları öldüren veya kaçırınlar (Avensit)
13. Kaçırıcılar (Repellent)
14. Çekiciler (Atrakant) (Anonim 2001).

Etkilediği Canlının Biyolojik Dönemine Göre Sınıflandırılması

1. Larvasit (Larva öldüren)
2. Ovisit (Yumurta öldüren)
3. Erginleri öldüren

Zararlılara Etki Yollarına Göre Sınıflandırılması

1. Mide zehirliler
2. Değme (Kontakt) zehirliler
3. Solunum zehirlileri

Toksik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

1. Fiziksel zehirliler
2. Protoplazma zehirlileri
3. Sinir sistemi zehirlileri
4. Solunum zehirlileri
5. Antikoagülantlar

Kullanma Tekniğine Göre Sınıflandırılması

1. Doğrudan kullanılanlar
2. Su veya bir başka çözücü ile seyreltilerek kullanılanlar

Etkili Madde Gruplarına Göre Sınıflandırılması

1. Canlı kökenli olanlar (Mikroorganizma kökenliler)
2. Anorganik yapıda olanlar
3. Doğal organik yapıda olanlar
4. Bitkisel kökenli olanlar
5. Petrol yağları
6. Katran yağları
7. Sentetik organik yapıda olanlar
8. Klorlandırılmış hidrokarbonlar
9. Organik fosforlular
10. Karbamatlılar
11. Sentetik piretroitler
12. Benzoyl türevleri
13. Dinitro bileşikler
14. Amin ve hidrazin türevleri
15. Dinitrofenol ve esterleri
16. Halojen ve oksijenler
17. Organik kalaylılar

2.8.1. İnsektisitler

Bitkilere ve diğer canlılara zarar veren hayvansal organizmaları öldürmek için kullanılan kimyasal maddelere insektisit adı verilir.

Kimyasal insektisitlerin hepsi nörotoksikan olup hedef organizmaların sinir sistemlerine toksik etki gösterirler. Böceklerin merkezi sinir sistemleri (MSS) çok gelişmiş olup memelilerinkine benzer. Aynı şekilde perifer sinir sistemleri (PPS) de benzerlik

gösterirler. Bu nedenle insektisitlerin toksik etki mekanizmaları ve hedef aldıkları organlar bütün türlerde aynıdır. Ancak bu toksik etki şiddetli dozla (maruziyet süresi ve düzeyi, biyotransformasyon hızı, absorpsiyon yoluna bağlı olarak) ilgilidir. Sinir sisteminde sodyum, potasyum, klorür iyonlarının membran transportunu interfere ederek; spesifik enzimleri inhibe ederek veya kimyasal nörotransmitterleri etkileyerek nörotoksitelerini gösterirler.

Ülkemizde tarım ilaçlarının tehlikesi konusunda halk tam olarak bilgi sahibi olmadığından bit, pire, sinek, hamam böceği gibi ev haşerelerine karşı ellerine geçen tarım ilaçlarını yatak, yorgan ve evin çeşitli yerlerine serpmektedirler. Yanlışlıkla un, şeker ve tuz sanılarak yenmeleri ya da çamaşırların insektisitli su ile yıkanması sonucu meydana gelen ölümlere sıklıkla rastlanılmaktadır. Özellikle kırsal yerlerde bu tip akut zehirlenmeler daha sık olmaktadır (Dökmeci 1994).

2.8.2. Herbisitler

Yabancı otlarla mücadelede kullanılan kimyasal maddelere ise herbisit denilmektedir. İstenmeyen bitkiler ve yabancı otları yok etmek için kullanılan herbisitlerin önemi gittikçe artmaktadır. Herbisitler tarımsal alanların dışında yol kenarları ve demiryollarında ortaya çıkan zararlı otların temizlenmesinde kullanılırlar (Helvacı 2003).

2.8.3. Fungusitler

Mantarları yok ederek, ürünlerin bozulmasını engelleyen organik ve anorganik yapıda birçok fungusit vardır. Bazıları çok toksiktir ve birçok yaygın zehirlenmeler görülmüştür.

Fungusitler genellikle endüstri, tarım, ev ve bahçelerde çok çeşitli amaçlar için sıklıkla kullanılmaktadırlar. Özellikle tohumların çimlenmesi, depolanması ve taşınması sırasında, doğal ürünlerin, etli meyvelerin tohumları, çiçek ve çimlerin depolanma ve taşınması sırasında, yüzeylere bulaşan küflerin engellenmesi ve evlerde kullanılan halı

ve kumaşların korunması sırasında fungusitler yaygın olarak kullanım alanına sahiptirler².

2.9. Pestisitlerin Tarihçesi

Kimyasal maddeler, tarımda ve halk sağlığına zarar veren mikroorganizmalar ve diğer pestlerin kontrolünde yüzyıllardan beri kullanılmaktadır. Örneğin kükürt ilk kez fumigan olarak M.Ö. 1000 yıllarında Çin'liler tarafından kullanılmıştır. Ancak, pestisit özelliği gösteren kimyasal maddelerin (pestisit aktif maddesi) formülasyonlarının ve sentezinin üretimi kimya endüstrisi devrimi ile birlikte başlamış ve zamanla büyük bir artış göstermiştir. Zamanımızda büyük bir kısmı organik sentetik kimyasal maddeler olmak üzere yaklaşık 1500 pestisit aktif maddesinin 2000 pest türüne karşı kullanıldığı kaydedilmiştir. Gelişmiş ülkelerde pestisit tüketiminin 1972 yılında 3 milyon; 1980 de 12 milyon ve 1990 da ise 50 milyon Amerikan dolarına ulaştığı bilinmektedir (UNIDO, Birleşmiş Milletler Sanai Kalkınma Teşkilatı 1983).

1940'lı yıllara kadar zararlı böceklerin kontrolünde kullanılan doğal bileşikler daha sonraları kararsız olmaları ve pahalı üretimleri nedeniyle yerini yapay bileşiklere bırakmıştır (Uslu ve Türkman 1987).

II. Dünya Savaşı'na kadar doğal yollarla elde edilen kimyasal maddeler tarımda bitkisel ürünleri zararlılara karşı korumada kullanılmıştır. 1874 yılında bir Alman kimyacı olan Othmar Zeidler tarafından bulunan DDT (Diklor Difenil Trikloreten)'nin II. Dünya Savaşı dolayısıyla Amerikan ordusunda bit ve pireye karşı kullanılması bu tür maddelerin sadece bitki koruma alanında kullanılmadığını göstermiştir. DDT'nin 1943–1944 yıllarında İtalya'da baş gösteren tifüs salgınında büyük bir başarıyla kullanılması ve salgının kısa sürede önüne geçilmesi maddeyi mucizevî hale getirmiştir. Kimya sanayininde gelişmesiyle birlikte üretilen sentetik pestisitler yoğun olarak kullanılmıştır (Gündüz 1998).

² http://npic.orst.edu/RMPP/rmpp_ch15.pdf 19.07.2006

Bütün bu araştırmalarda en önemli hedef, pestisitlerin yok edilmesi istenen zararlıya karşı seçici ve spesifik toksisite göstermesi, diğer canlılara (insan, bitki ve hayvanlar) minimum toksisite göstermesi olmuştur. Böylece ilk kez sentez edilen pestisit aktif maddelerinin ikinci ve üçüncü jenerasyonları olarak isimlendirilen daha güvenilir maddelerin sentezi yapılmıştır. Ancak her pestisitlerin bir dereceye kadar toksisitesi vardır ve sağlık açısından “tam güvenceli” bir pestisit yoktur. Bununla beraber, belirli koşullarda kullanıldıklarında riskleri azaltılabilir.

Pestisitler, kullanılmaları ile gerek halk sağlığı ve gerekse de açlıkla savaşta besinlerin korunması bakımından ekonomik faydalar sağlamaktadır. Diğer taraftan geniş bir alanda bıraktıkları kalıntılarla su, toprak, hava ve besin kirlenmesine neden olarak, ekolojik sistemin dengesini bozmaktadırlar. Ayrıca bazıları selektif olarak kullanıldıkları canlı türü için toksik olurken, bir kısmı da insanlar ve diğer memeli hayvanlara zarar verirler. Böylece de endüstride, yakın çevrede akut ve kronik zehirlenmelere neden olurlar. Pestisitlerin bu fayda zarar ilişkisini değerlendirmek ise oldukça güçtür.

2.10. Pestisitlerin Çevreye Olan Etkileri (Ekotoksik Etkileri)

Pestisitlerin büyük bir kısmı uygulandıkları bitki, toprak ve su ortamında uzun süre bozulmadan kalabilen, canlıların bünyesinde birikebilen zehirlerdir. Günümüzde milyarlarca ton araziye tarım ilaçları uygulanmakta ve bunların büyük bir kısmı uygulandıkları yerlerden çeşitli etkiler altında başka yerlere taşınabilmektedirler. Belirli bir alana uygulanan pestisitler; bitki tarafından alınabilir, buharlaşabilir, sürüklenebilir veya böcek, mikroorganizma vb. canlılar tarafından alınabilirler. Kullanılan pestisitler toprak partiküllerine yapışabildiği gibi sulama veya yağmur suyuna karışabilir, yıkanma ile toprağın derinliklerine veya yeraltı su tabakasına ulaşabilirler.

Pestisitlerin taşınımı ve yeraltı sularına karışmasında en önemli etken kimyasal ve biyolojik özellikleridir. Suda çözünürlüğü ve buharlaşma yeteneği yüksek olan pestisitler kolaylıkla su döngüsüne girebilmekte, çözünürlüğü düşük ve biyolojik yarı ömürleri yüksek olan pestisitler ise toprak partiküllerine tutunarak uzun süre

kalabilmekte ve zamanla bu çevrelerde birikmektedirler (Tosun vd. 2000). Çizelge 2.3.'de Türkiye'de yıllara bağlı olarak kullanım oranları (Delen vd. 2005) verilmiştir.

Çizelge 2.3. Türkiye'de yıllara bağlı olarak kullanım oranları (Delen et al. 2005)

Pestisit grupları	1979	1987	1994
İnsektisitler	2.287.658	3.303.446	2.064.991
Akarisitler	203.107	240.360	192.279
Fumigant ve Nematositler	315.665	322.227	530.738
Rodentisit Ve Mollusitler	5.600	2.124	2.509
Fungisitler	1.537.315	2.611.960	2.201.406
Herbisitler	2.451.977	3.495.044	3.902.588
Toplam	6.801.322	9.975.161	8.894.511

Uygulama bölgesindeki şartlar (sıcaklık, nem, basınç, vb.) ve toprak özellikleri de pestisitlerin çevrede dağılımında büyük etkiye sahip olan faktörlerdir.

Tarımsal mücadele amacıyla kullanılan pestisitler yağmur suları ve sulama suları ile yüzeysel sulara ve yeraltı sularına taşınmaktadır. Ayrıca uygulamalar sırasında havaya karışan ilaç zerrecileri rüzgârla o bölgedeki akarsulara taşınarak su kaynaklarını ve denizleri kirletmektedir. Pestisitlerin kimyasal ve fiziksel yapısı, formülasyon tipi, suyun pH derecesi ve stabilitesi, su içinde dağılımlarını etkileyen faktörlerdir. Değişik yollarla su kaynaklarına bulaşan pestisit kalıntıları sudaki organizmaları da etkilemektedir. Ölümler, hastalıklara karşı direnç azalması, üreme ve beslenme bozukluğu şeklinde ortaya çıkan bu etkiler su ekosistemindeki biyolojik tür çeşitliliğini tehdit etmektedir (Akkaya 1996).

Pestisitler insan sağlığını, çevre ve doğal dengeyi olumsuz yönde etkilemesi, ürünlerde, toprakta, suda ve havada kalıntı bırakması, hastalık, zararlı ve yabancı otlarda dayanıklılık meydana getirmesi gibi birçok istenmeyen etkilerinin olmasıyla sorgulanmaya başlanmıştır. Bunun sonucu olarak bir taraftan pestisitlerin bilinçli ve teknik tavsiyelere uygun olarak kullanılmasını sağlamak için gerekli tedbirler alınırken

diğer taraftan 1980’li yıllardan itibaren kimyasal pestisit tüketiminin azaltılması için politika ve stratejiler oluşturulmuş ve eylem planları hazırlanmıştır (Helvacı 2003).

Pestisitler kullanımları sırasında oldukça dikkatli davranılmalı ve olası pestisit zararlarına karşı çeşitli önlemler alınmalıdır. Bunun için içerisinde Türkiye’nin de bulunduğu birçok ülke pestisit kullanımının azaltılmasıyla ilgili çalışmalar yapmaktadır.

Pestisit tüketiminin azaltılmasının sağlayacağı yararları şöyle sıralayabiliriz;

1. Sürdürülebilir tarımsal üretimin sağlanması
2. Pestisit kalıntısı bulunmayan güvenilir gıda elde edilmesi
3. Canlılar arasındaki doğal dengenin ve biyolojik çeşitliliğin korunması
4. Çevrenin korunması
5. İnsanların ve sıcakkanlı hayvanların sağlığının korunması
6. Hastalık, zararlı ve yabancı otların pestisitlere karşı direnç oluşturma riskinin azaltılması
7. İlaç ve ilaçlama masraflarının azaltılması (Bulut ve Tamer 1996).

Pestisite dirençli hale gelme konusunun biyolojik açıklaması, doğal seçilim ve bireyler arası genetik farklılıklara dayanır. Bir böcek popülasyonuna yeni bir pestisit uygulanınca popülasyonun % 99’a yakın kısmı ölür. Kalan %1, bireyler arası genetik farklılık sonucu ve şans eseri olarak bu pestisite direnci olan bireylerdir. Hayatta kalan birkaç dirençli birey ortamda hızla üreyerek kısa zamanda pestisite dirençli yeni bir popülasyon oluşturur. Dolayısıyla sürekli olarak yüksek dozlarda pestisit kullanmak, pestisite dirençli popülasyonların doğal seçilim ile ortaya çıkmalarına neden olmaktadır (Gedikli 2001).

2.11. Türkiye’de Pestisit Kullanımı ve Zehirlenmeleri

Ülkemizdeki pestisit pazarı Avrupa ülkelerine oranla son derece küçüktür. Yıllık tüketim miktarı hektara 400–700 g. civarındadır. Bu pazarın parasal değeri dünya pazarının yüzde birinden azdır. Ülkemizde, pestisitlerin en önemli uygulama alanı “tarım savaş ilaçları” olarak kullanımındadır. Türkiye tarımında tüm kültür bitkilerinde hastalık, zararlı ve yabancı otlar yüzünden oluşabilecek kayıpları engellemek için her

türlü araştırma ve uygulamayı yapmakla görevli “Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Müdürlüğü” 1957’de kurulmuştur. Ülkemizde halen tarımsal amaçla 346 pestisit aktif maddesi içeren 1483 formülasyonu ruhsatlıdır. Bu aktif maddelerin çoğunluğu insektisit, herbisit ve fungusitler oluşturmaktadır (Gedikli 2001).

Türkiye’de tarımsal mücadele için gerekli pestisitlerin teknik maddesi ya yurt içindeki fabrikalarda imal edilmekte ya da dış ülkelerden ithal edilmektedir. Son yıllarda ülkemizde pestisit imal eden bazı tesislerin kurulmuş olması, ithal edilen preparat miktarının kısmen azalmasına ve döviz kaybının önlenmesine yardımcı olmuştur. Türkiye’de 1960–1997 yılları arasında teknik madde ve formülasyon üretimi için işletme izni alan tesis sayısı 17’den 68’e, ithalatçı firma sayısı 10’dan 81’e yükselmiştir (Gedikli 2001).

Ülkemizde çeşitli nedenlerle pestisit zehirlenmesi oluşmaktadır. Tabloda da bu açıkça görülmektedir. Merkeze yapılan başvurularda pestisitler, ilaç zehirlenmelerinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Pestisit zehirlenmelerinin ise en büyük kısmı (1991’de % 32,25, 1992’de %32,7) organik fosforlu insektisitler oluşturmaktadır (Gedikli 2001).

Bununla birlikte çeşitli çalışmalar pestisit kullanılmadan üretim yapılması halinde, ürün miktarında ortalama %65 oranında kayıp olduğunu göstermektedir (Tanık vd. 2000). Çizelge 2.4’de 1988–1993 yılları arasında zehir danışma merkezine yapılan pestisitle zehirlenme başvuruları gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. : 1988–1993 yılları arasında zehir danışma merkezine yapılan pestisitlerle zehirlenme başvuruları

Yıl	Pestisit Zehirlenme Başvuruları	Tüm Zehirlenmelere Göre %
1988	233	13.4
1989	356	10.48
1990	515	9.97
1991	513	9.64
1992	691	10.48
1993*	733	7.25

(*): İlk altı aylık veri

2.12. Pestisitlerin İnsanlara Etkisi

Pestisitler toksik yapıları nedeniyle hedef alınan zararlı böcek ve hastalığın dışında doğrudan ve dolaylı yollarla insan ve çevresine olumsuz etkiler göstermektedir. Pestisitlerle insanların teması; ilaç üretimi, taşıma, depolama, kullanma ve ilaç kalıntısı içeren ürünlerin tüketimi sırasında olmaktadır. Bu etkileşim sonunda pestisit, insan vücuduna ağız, deri ve solunum yoluyla girmektedir. Zararlılık, maruz kalmanın süresine ve alınan doza göre değişir. Ne kadar çok maruz kalınırsa, tehlike o kadar artar. Bu nedenle bir pestisit veya metabolit için oluşan tehlike bileşiğin toksisitesine ve maruz kalma miktarına bağlıdır. Tehlike derecesi:

- Aktif bileşimin toksisitesi
- Aktif bileşimin konsantrasyonu
- Formülasyon tipi
- Giyilen koruyucu giysi tipi
- Uygulama hızı
- Uygulama sıcaklığı
- Uygulama metodu
- Kullanıcının pestisit hakkındaki bilgisi gibi faktörlere bağlıdır.

Pestisit'in insanlara etkisi kendi kimyasal yapısından veya "metabolit" adı verilen parçalanma ürünlerinden ileri gelebilir. Bu maddelerin bir kısmı birikime uğradığı, bir kısmı da birikmediği halde sinir hücrelerinde tahribat yaptığı için çok tehlikeli sonuçlar

doğurabilmektedir. Pestisit buharları ile karışmış havanın solunum yolu ile bünyeye alınması veya ilacın doğrudan cilde teması, bir süre sonra toksik etkilerini göstermektedir.

Pestisitler insanları değişik yollarla etkiler:

1.Direkt Toksik Etkiler: Pestisitlerin direkt etkisi, insan vücuduna ilacın solunum, deri ve ağız yolu ile doğrudan girmesi sonucunda olmaktadır. Pestisit ile bulaşık besinin yenilmesi veya içilmesi ile toksik etki meydana gelmektedir. Ancak intiharlar hariç bu safhada ölüm az olmakta, alınan pestisitlerin toksisite derecesi ve dozuna bağlı olarak zehirlenme belirtileri kısa bir süre sonra başlamaktadır. Pestisitlerin ağızdan alınışı intiharlar dışında ya kaza ile veya küçük çocukların erişebileceği yerlere konulması sonucunda olur. Daha çok da ilacın buharlarının ya da çok ince partiküllerinin solunması veya deri yoluyla penetrasyonu sonucu zehirlenme olur. Bu gruptaki zehirlenmelere AKUT ZEHİRLENME adı verilir.

Akut zehirlenme pestisitlerin bir defada alınan tek bir dozunun absorbe edilmesinden sonra ilacın ani zehirlenme yapma potansiyelidir. Bursa’da 1963 yılında parathionla ilaçlanmış seftali yiyen 32 kişiden 7’si aynı gün ölmüştür.³

İnsanlara öldürücü etkisi olan ilaçların zehirlilik dereceleri LD₅₀ ve LC₅₀ değerleri ile kıyaslanır. LD₅₀ ağız ve deri yolu ile deneme hayvanlarına uygulandığı zaman, bunların % 50’sini öldüren dozdur ve mg/ kg ile ifade edilir. LC₅₀ ise genellikle 4 saatlik süre içinde teneffüs sonrası deneme hayvanlarının % 50 sini öldüren konsantrasyondur. Teneffüs edilen havanın her m³’ünde mg olarak belirtilir.³

2. Seconder toksik etkiler: Pestisit kalıntılarını içeren bitkisel ve hayvansal besin maddelerini yemek suretiyle meydana gelen zehirlenmeler “seconder toksik etkiler” olarak bilinmektedir. Bunlara genelde KRONİK ZEHİRLENME adı da verilmektedir. Kronik zehirlenme belirli bir sürede düşük dozdaki ilacın devamlı olarak alınması ile ortaya çıkar.

³ http://www.tokattarim.gov.tr/bitki_koruma/zehirlenme.htm

Pestisitlerle karışmış veya bekleme süresi bitmeden pestisit kalıntısı içeren besinlerin yenmesi ile de kronik zehirlenme meydana gelebilmektedir. Örneğin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Hekzaklorobenzenli (HCB) Pestisitle ilaçlanmış tohumluk buğdayı yiyen 3000 kişide porfiria (Karayara) hastalığı görülmesi ve % 3-11 oranında ölüm meydana gelmesi, dünya çapında ilgi uyandıran bir zehirlenme olayıdır³.

Pestisitlerin üretim ve kullanımları sırasında meydana gelen iş kazaları, ilaçların insan sağlığına karşı olumsuz etkilerini derhal göstermektedir. Örneğin Hindistan'ın Bhopal kentinde 3 Aralık 1984 tarihinde ABD'ye ait Union Carbide Şirketinin bir fabrikasından çevreye yayılan yaklaşık 45 ton Metil İzosiyanat gazı, civardaki 2500 kişiyi uykularında öldürmüş ve fabrika çevresinde çok geniş bir alanı yaşanmaz hale getirmiştir. Aradan 4 yıl geçtikten sonra bile çevresindeki köylülerden her yıl ortalama 500 kişinin ölmesi tehlikenin boyutlarını göstermesi açısından önemlidir³.

Kentlerde yaşayan kadınların sütlerinde daha fazla pestisit bulunması bu kadınların köylerde yaşayan hemcinslerine göre daha fazla bitkisel besin daha az hayvansal besin tüketmelerine bağlanmıştır. Pestisitlere uzun süre maruz kalındığında oluşan etkiler Çizelge 2.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. Pestisitlere uzun süre maruz kalındığında oluşan etkiler

ORGAN SİSTEMİ	ETKİ
Sinir Sistemi	Beyin dokusunun sertleşmesi, sinir kökü iltihabı, damar gevşemesi, göz küresinin arkasında iltihap, polinevrit vs.
Solunum Sistemi	Kronik soluk borusu iltihabı, bronşial astım, akciğer anfizemi, frotik akciğer
Kalp Damar Sistemi	Kronik toksik kalp kası iltihabı, kronik kroner yetmezliği, kas sertleşmesi, kas gevşemesi
Karaciğer	Kronik sarılık, safra kesesi iltihabı, karaciğer iltihabı
Böbrekler	Üre, Azot ve Kreatin artışı, sıvı madde oluşumunda azalış, düşük temizleme
Mide-Barsak Sistemi	Kronik gastrit, ülser, kronik kolit, hemeroit(Kanamalı) spastik ve polipik formasyonlar, oniki parmak barsağı iltihabı, fazla salgılama veya az asidite, hareket azlığı
Dolaşım Sistemi	Alyuvar azlığı, akyuvar azalışı, monoksit artışı, hemoglobin değişikliği, retikulasit ve lenfositte kriz
Deri	Deri iltihabı, egzama
Gözler	Konjoktivit, göz kapakları iltihabı

2.13. Pestisitlerin Toprağa, Suya, Bitkilere ve Hayvanlara Etkisi

Pestisitler doğrudan bitki üzerine, toprağa ve tohumluğa uygulanır. Her nereye uygulanırsa uygulansınlar sonuçta önemli bir bölümü toprakta kalır. Eğer uygulanan pestisit kalıcı ise çevre yönünden çok büyük sakıncalara yol açar.

Pestisitler toprakta iki yolla dağılırlar;

- 1- Çözünerek ve drenaj sularına karışarak sürüklenme yoluyla
- 2- Mikroorganizmaların biyokimyasal etkileri sonucunda, hidroliz ve oksidasyonla bozulup, çözünebilir bileşikler oluşturarak, karbon gazı ve amonyak çıkartıp basit bir mineral yapıya dönüşmek suretiyle toprakta dağılırlar.

Toprakta kil ve organik madde absorbe edilerek tutunabilen ve aşağıya doğru süzülen su ile hareket edebilen pestisitler, buharlaşabilir, toprak organizmaları veya bitkiler tarafından tutunabilir, erozyon ve yağmur suyu ile yüzeyde hareket edebilir, kimyasal, mikrobiyal veya güneş ışığıyla bozunmaya uğrayabilir.

Pestisitlerin su ekosistemine ulaşmaları değişik yollarla olmaktadır. Örneğin drenaj ve sulama kanalları içindeki ve çevresindeki yabancı otlara veya sivrisinek gibi vektör böceklerin mücadelesi sırasında, bataklıklara doğrudan yapılan pestisit uygulamaları ile sulara çeşitli ilaçlar karışmaktadır. Pestisit kullanılmış alanlardaki ilaçların, yağmur suları ile toprak alt sularını veya ırmaklara karışması yoluyla da çeşitli pestisitler akuatik bitki ve böceklere ulaşmaktadır. Ayrıca havadaki ilaç zerrecilerinin rüzgâr ile sulara taşınması veya pestisit üretimi yapan fabrika artıklarının durgun veya akarsulara boşaltılması sonunda, denizler pestisitlerle kirlenmektedir. Uygulama aletlerinin ve boş ambalaj kaplarının yıkama temizlenmesi sırasında ilaç artıkları sulara karışmaktadır.

Herbisit kalıntıları ile kirlenen suların, sulama suyu olarak kullanıldığı tarlalardaki bazı bitkilere fitotoksik olduğu acrolein (herbisit), rotenon (bitkisel insektisid) ve endosulfan (klorlu hidrokarbon)'ın balıklara çok toksik etki yaptığı bilinmektedir. Sulara çeşitli yollarla karışan düşük yoğunluktaki birçok pestisit kalıntısından balıkların olumsuz şekilde etkilendikleri ve davranışlarında farklılık meydana geldiği anlaşılmıştır.

Bazı balık türlerinde yavruların tarım ilaçlarına karşı çok hassas oldukları belirlenmiştir. Durgun sularda minimal düzeydeki bir pestisit kalıntısının bile sudaki oksijeni hızla azalttığı ve balıkların beslenme ortamını bozduğu konusunda bilgiler saptanmıştır.

Pestisit bakiyelerinin suda eser miktarda bulunması halinde bile akuatik canlıların besin zincirinde çok önemli yeri olan zoo ve phyto planktonun gelişmeleri önlenabilir. Sudaki organizmaların ilacı absorbe veya metabolize etmesi, sudaki pestisit seviyesine, organizmanın fizyolojisine, sıcaklığa ve daha önceden bünyede mevcut ilaç kalıntısına bağlıdır.

Pestisitlerin etkisi ile ölen organizmalar dibe çökerek birikirler. Çürüme esnasında açığa

ıkan CO₂ veya zehirli gazlar diğer akuatik organizmaların bu bölgelere yaklaşmasına engel olurlar.

Toprağa ve bitkilere olan olumsuz etkilerinin yanı sıra pestisitler çeşitli hayvanlarda da olumsuzluklara sebep olmaktadır. Sulara çeşitli yollarla karışan düşük yoğunluktaki birçok pestisit kalıntısından balıkların olumsuz şekilde etkilendikleri ve davranışlarında farklılık meydana geldiği anlaşılmıştır. Bazı balık türlerinde yavruların tarım ilaçlarına karşı çok hassas oldukları belirlenmiştir. Durgun sularda minimal düzeydeki bir pestisit kalıntısının bile sudaki oksijeni hızla azalttığı ve balıkların beslenme ortamını bozduğu saptanmıştır. Pestisit bakiyelerinin suda eser miktarda bulunması halinde bile akuatik canlıların besin zincirinde çok önemli yeri olan zoo ve fitoplanktonun gelişmeleri nlenebilir. Sudaki organizmaların ilacı absorbe veya metabolize etmesi, sudaki pestisit seviyesine, organizmanın fizyolojisine, sıcaklığa ve daha önceden bünyede mevcut ilaç kalıntısına baęlıdır⁴.

Gerek lkemizde ve gerekse dünyada bal arıları pestisitlerden etkilenen en önemli böcek türlerini oluşturmakta, pestisitlerin yoğun ve bilinçsiz kullanımları sonucunda her yıl binlerce kovan zarara uęramaktadır⁵.

Zararlı populasyonunu baskı altına alan, onların aşırı çoğalmalarını önleyen en önemli faktör olan doğal düşmanlar kullanılan pestisitlerden en fazla etkilenen canlılardır. Genellikle avcı böcekler olan doğal düşmanlar fazla hareketlilikleri nedeniyle daha fazla pestisit bulaşmasına uğramakta ve bu uygulamadan çok zarar görmektedirler. Bu nedenle bunların baskı altında tuttuğu ikinci dereceden bazı zararlılar zararlı konumuna geçmektedirler (Sürmeli 2003).

⁴ <http://www.maliye.gov.tr/cevreatlasi/08tarim.pdf> 04.05.2006

⁵ <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/031.pdf> 04.05.2006

2.14. Ames/Salmonella/mikrozom Test Sistemi Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Eber Gölü ve onu besleyen Akarçay üzerindeki 3 farklı istasyondan elde edilen su örneklerinin muhtemel genotoksik etkilerini belirlemek için TA 98 ve TA 100 suşları kullanılarak Ames plak inkorporasyon testi yapılmıştır. Metabolik aktivasyon içermeyen deneylerde, TA 98 suşu için her üç istasyonda, TA 100 suşu için ise 2. ve 3. istasyonlarda mutajenik etkiye rastlanmıştır. Metabolik aktivasyon varlığında yapılan deneylerde ise yalnızca 3. istasyonda çerçeve kayması mutasyonuna neden olan mutajen maddelerin varlığı belirlenmiştir (Ciğerci vd. 2006).

İpek ve arkadaşları (2005) yaptıkları bir çalışmada ise, ilaç, gıda tatlandırıcısı ve madde üretiminde kullanılan ve *Origanum onites*'te yer alan eterik yağ ve carvacrolün genotoksik ve antigenotoksik etkilerini Ames testi ile araştırmışlardır. TA 98 ve TA 100 suşları kullanılarak S9 varlığı ve yokluğunda yapılan çalışmalarda başlangıçta mutajenik aktivite gözlemlenmiştir. Metabolik aktivasyon yokluğunda carvacrolün teşviki ile S9 karışımının varlığı ve yokluğunda ise her iki suş ile yapılan araştırmalarda yağda mutajeniteye rastlanmamıştır. Yağ ve onun yapıtaşı olan carvacrolün son olarak standart 30 dakikalık preinkübasyon çalışması ile antimutajenik aktivitesi test edilmiştir. Sonuçlar göstermiştir ki, S9 varlığı ve yokluğunda 4-nitro-o-phenylenediamine ve 2-aminofluorene ile teşvik edilen suşların her ikisinde de mutajenite güçlü bir şekilde inhibe edilmiştir

Çinko fosfat (Poscals), polycarboxylate (Aqualoxs) ve glass ionomerin gümüş takviyesi ile ve gümüş takviyesi olmaksızın potansiyel mutajeniteleri Ames *Salmonella/microsome* test sistemine göre araştırılmıştır. Materyaller dimetilsülfoxid veya fizyolojik tuz içerisinde çözülmüş olup ya hemen ya da 37°C'de 24 saatlik bir inkübasyondan sonra kullanılmışlardır. Materyallerin mutajenik etkileri, rat karaciğerinin S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda standart plak inkorporasyon deneyi kullanılarak yapılmış olup *Salmonella typhimurium*'un TA 98, TA 100, TA 102 ve TA 1535 suşlarıyla test edilmişlerdir. Poscals ve Aqualox *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 1535 üzerinde mutajenik etkiye sahipken, Meron TA 98 üzerinde mutajenik bir etki göstermiştir. Argionda ise hiç mutajenik etki saptanmamıştır (Kaplan vd. 2004).

Ames/*Salmonella*/Mutajenite testiyle kullanılan TA 98 ve TA 100 suşları kullanılarak Porsuk Nehri'nin genotoksik etkisi araştırılmıştır. Çalışmadan alınan sonuçlar da Porsuk Nehri'nin fabrika etkisi altında bulunan bölgedeki değerler dikkat çekici bulunmuştur. Bu bölgenin baraj alanına yakınlığı ise barajda arıtılan ve şehre dağıtılan suyun sağlık açısından sorgulanması gerektiği ortaya çıkmıştır (Dilek 2004).

Ruiz ve Marzin'in (1997) yaptıkları bir çalışmada, iki *in vitro* test olan *Salmonella* mutajenite testi ve SOS kromotesti 6 çeşit pestisit üzerinde uygulanmış ve bu pestisitlerin genotoksik aktivitesi araştırılmıştır. Deney Sprague Dawley cinsi ratlardan alınmış olan karaciğer homojenatı ile S9 varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir. Pestisitlerden Captan ve Captafol hem Ames hem de SOS kromotestinde genotoksik etki göstermiştir. Bakteriyel test ırkları atrazine, molinate, chlorpyrifosmethyl ve tetrachlorvinphos'a maruz bırakıldığında ise S9 varlığında da yokluğunda da her iki testte de genotoksik etkiye neden olmuşlardır.

İzmir körfezinde akan dere sedimentlerinin mutajenitesi araştırılmıştır. Bu çalışma, Aralık 1995 tarihleri arasında İzmir Körfezi'ne drene olan Mvea, Melez, Laka, Bostanlı, Bornova ve Gediz nehirleri ağızlarından alınan sediment örneklerinde *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları ile Ames'in mutajenite testi uygulanmıştır. Test sonucuna göre körfezin iç kısmına drene olan dereler taşıdıkları kirlilik yükü sebebi ile körfez için mutajenik aktivite kaynağı teşkil etmektedir (Boyacıoğlu ve Parlak 2001).

Diğer bir çalışmada, *Camelia sinensis*'den üretilen, yaygın olarak kullanılan 8 çeşit çay ve rastgele seçilen 6 çeşit bitkisel çayın, heterosiklik aromatik aminlerin (HAA) mutajenitesi üzerine etkileri Ames testi ile araştırılmıştır. Deneylerde TA 98 suşu ve S9 kullanıldı. *Camelia sinensis*'den alınan çay ekstratları, çoğu HAA'e kuvvetli antimutajenik etki göstermiştir. Kafeinsiz çaylarda aynı etkiyi göstermiştir. Bununla beraber, bazı çayların düşük konsantrasyonları 4.7.8-TriMelQx ve Trp-P-2' in mutajenitesini arttırmıştır. Bitkisel çaylar ise farklı HAA' in mutajenitesini değişik şekillerde etkilemiştir. Bazıları etkisiz kalırken, bazıları da IQ' un mutajenitesini durdurucu rol oynamıştır. Yaygın kullanılan çayın aksine bitkisel çaylar Trp-2, 4.7.8-

TriMelQx gibi birkaç HAA' in mutajenitesini önemli ölçüde arttırmıştır (Stavric et al. 1997).

Ames testi plak inkorporasyon metoduyla yapılan bir çalışmada, dokuz sitostatik ilaç, *Salmonella typhimurium*un dört suşu kullanılarak test edilmiştir. Bunların altısı klasik ve genel olarak üçü (kloturin, butasin, oracin) ise gelişmenin farklı basamaklarında kullanılan sitostatiklerdir. Test sonuçları 6-merkaptopurin, kloturin, adriamisin, mitoxantron, siklofosfamid ve lomustin'in mutajenik; butosin, orasin ve tris (2-kloroetin) aminin mutajenik olmadığını göstermiştir (Mahran 1995).

Doğu Afrika ve Arabistan Yarımadası' nda yaygın olarak çiğnenen *Catha edulis*' in taze yapraklarından sıcak su ve kloroform ile elde edilen özütün mutajenitesi Ames testi ile denenmiştir. Özütlerin hepsinde mutajenik temsilciler görülmüştür (Hannon et al. 1995).

Kısa zamanlı test sistemi olan Ames yöntemi ile yapılan farklı bir çalışmada, insan safrasının mutajenitesi incelenmiştir. Bunun için Cholelithiasis, Choledocholithiasis, safra kesesi kanseri, ekstrahepatik safra kanalı kanseri hastaları ve diğer hastaların safra keselerinden safra örnekleri alındı. Mutajenik bileşiklerin ekstraksiyonu için safra örnekleri blue rayon ile muamele edildi. Yirmi dört safra örneğinden on dördün de pozitif mutajenik aktivite bulundu. Mutajenitede belirgin bir doz-cevap ilişkisi gösterilmiştir (Mano et al. 1993).

Bir başka çalışmada, dimetilsülfoksitin (DMSO) potansiyel mutajenitesini değerlendirmede Ames testinin ön inkübasyon metodu kullanılmıştır. Deney *E. coli* ırklarından WP2, WP2UVRA ve 9 farklı *Salmonella* ırkları kullanılarak yapılmıştır. DMSO, *S. typhimurium* TA 1537 ve TA 2637 ve *E.coli* WP2UVRA için mutajenik bulunmuştur (Hakura et al. 1993).

Yapılan diğer bir çalışmada da trichlorfon pestisitinin mutajenitesinin değerlendirilmesi için *Salmonella typhimurium*'un TA 1535, TA 100, TA 97, TA 98 ve TA 104 suşları kullanılmıştır. Trichlorfon baz değişimi mutasyonlarına sebep olmuştur ve onun mutajenik aktivitesi S9 karışımı ile azalmıştır (Barrueco 1991).

Thiram fungusinin mutajenik aktivitesi histidine ihtiyaç duyan 4 *Salmonella typhimurium* (TA 1535, TA 100, TA 1538, TA 98) suşu kullanılarak karaciğer mikrozomu ile aktivasyonlu ve aktivasyonsuz olarak araştırılmıştır. TA 1535 ve TA 100 suşlarında metabolik aktivasyonsuz çalışmalarda thiram mutasyona sebep olmuştur. Rat karaciğer fraksiyonunun varlığında sistein ve glutathion bu suşlarda mutajenik aktiviteyi ortadan kaldırmıştır. Aksine TA 1538 ve TA 98 suşlarında mutajenik aktivitenin ifade edilmesinde thiram metabolik aktivasyona ihtiyaç duymuştur. Sülfidril grubu içeren bileşikler bu suşlarda da thiram'ın mutajenik aktivitesini ortadan kaldırmıştır (Zdzienicka 1979).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan test maddeleri Sigma Aldrich' den temin edilmiştir. 4-nitro-o-fenilendiamine, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 4H_2O$, 2-aminofluorene, L-Histidin HCl, D-Biyotin, Ampisilin trihidrat, D-glukoz 6-fosfat, β -NADP Fluka, Sitrikasit monohidrat, Sodyum hidroksit, Sodyum azid, KCl, NaCl, Dimetilsülfoksit Riedel, Bacto agar, Nutrient Broth No:2 Oxoid, 3-Metilkolantren Sigma Aldrich'den temin edilmiştir. Pozitif Mutajenler; Sodyum azid Riedel'den, 2-aminofluorene ve 4-nitro-o-fenilendiamine ise Fluka'dan temin edilmiştir.

3.1.2. *Salmonella typhimurium* Test Suşları

Deneyde, Prof. Dr. Ames ve arkadaşları tarafından, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirilmiş TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Bu suşlar Dr. Bruce N. Ames (Kaliforniya Üniversitesi Berkeley, CA., USA)'den sağlanmıştır. TA 98 suşu kodon kayması, TA 100 ise baz çifti dönüşümü tipindeki mutasyonların saptanmasında kullanılmışlardır.

3.1.3. Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları

Vogel-Bonner-E Ortamı (50XVB tuzları)

Kullanım: MGA ve HBA (master) plakları

	<u>1000 ml için</u>
Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	10 g
Sitrikasit monohidrat	100 g
Potasyum fosfat (K_2HPO_4)	500 g
Sodyum amonyum fosfat ($NaH_2N_2PO_4 \cdot 4H_2O$)	175 g
Distile su (45 °C)	670 ml

Temiz bir erlen içine dH_2O konularak ısıtıldı. Kaynama seviyesine gelmeden yukarıdaki maddeler sırayla sıcak suyun içine eklendi. Kristallenmeyi önlemek için bir madde iyice çözünmeden diğeri eklenmemelidir. Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanıp otoklavda 121 °C'de 20 dakika sterilize edildi.

(0.5 mM) Histidin/Biyotin Solüsyonu

Kullanım: Mutajenite deneyi (100 ml top agara 10 ml olarak)

	<u>250 ml için</u>
D-Biyotin (F.W. 247,3)	30,9 mg
L-Histidin-HCl (F.W. 191,7)	24,0 mg
Distile su	250 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözüldü ve daha sonra histidin ilave edilerek otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilize edildi. +4°C'de saklandı.

(% 0.8/0.02 NaOH) Ampisilin Solüsyonu

Kullanım: Suşların ampisiline dirençlilik özelliğinin kontrolü ve R-faktör plazmidi taşıyan suşların master plakları

100 ml için

Ampisilin trihidrat 0,8 g

0.02 N Sodyum hidroksit 100 ml

Ampisilin trihidrat, 0.02 N NaOH içinde çözüldü ve sterilizasyon için 0.22 µm çaplı filtreden geçirildi ve +4°C'de saklandı.

(%1) Kristal viyole Solüsyonu

Kullanım: Suşların kristal viyoleye duyarlılıkları, dolayısıyla rfa mutasyonunu taşıyıp taşımadıklarının kontrolü

100 ml için

Kristal viyole 0,1 g

Distile su 100 ml

Kristal viyole ve distile su karıştırıldı ve solüsyon ışık geçirmeyen bir kaba konup +4°C'de saklandı.

(% 0.13) Biotin Çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

50 ml için

D-biyotin 0.65 mg

Distile su 50 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözüldü ve otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilize edildi.

(% 0.5) Histidin Çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

400 ml için

L-Histidin-HCl (F.W. 191,7)

2 g

Distile su

400 ml

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile su içinde çözüldü ve otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilize edildi.

(%20) Glukoz Çözeltisi

Kullanım: MGA ve HBA plakları hazırlanması

100 ml için

Glikoz

20 g

Distile su

100 ml

Glukoz distile su içinde çözülerek otoklavda 110°C'de 15 dakika sterilize edildi ve 0–4°C'de saklandı.

(2µg/µl) 2-aminofluorene (2AF)

Kullanım: Pozitif kontrol

1.0 mg/petri başına olmak üzere dimetilsülfoksitde (DMSO) çözülerek kullanıldı. TA 98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında kullanılan kimyasaldır. 0–4°C'de saklandı.

(2µg/µl) 4- Nitro-o-Fenilendiamine (NPD)

Kullanım: Pozitif kontrol

200 µg/petri olmak üzere DMSO'da çözülerek kullanıldı. TA 98 suşu için S9 fraksiyonu gerektirmeyen kimyasaldır. Oda ısısında saklandı.

(%6.4) 3-Metilkolantren

Kullanım: Metabolik aktivasyonun hızlandırılması

3-metilkolantren 64 mg

Mısır yağı 1 ml

(80 mg/kg olmak üzere) mısır yağında çözülerek 0,5 ml intraperitoneal olarak enjekte edildi.

(0.15 M) KCl çözeltisi

Kullanım: Mikrozom izolasyonu

1000 ml için

KCl 11.275 g

Distile su 1000 ml

KCl, bir miktar distile suda çözüldü ve toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanarak otoklavda sterilize edildi ve 0–4°C'de saklandı.

Top agar

Kullanım: Mutasyon deneyi

1000 ml için

Agar 6 g

NaCl 5 g

Distile su 1000 ml

Agar-su ve tuz manyetik karıştırıcıda ısıtılarak ve karıştırılarak çözüldü ve otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilize edildi.

Histidin/Biyotin plakları (HB Agar)

Kullanım: Histidin gereksinim deneyi

	<u>1000 ml için</u>
Agar	15 g
% 20 glukoz	50 ml
Histidin HCl. H ₂ O	10 ml
0.5 mM Biyotin	6 ml
50XVB	20 ml
Distile su	914 ml

Agar ve su karıştırıldıktan sonra otoklavlanarak sterilize edildi. 45°C'ye soğutulup % 20 glukoz, 50XVB tuzları ve histidin çözeltisi eklendi, solüsyon biraz daha soğuduktan sonra biyotin eklendi, karıştırılıp petri kutularına 30 ml olarak dağıtıldı.

Histidin/Biyotin/Ampisilin plakları (HBA Agar)

Kullanım: Ampisiline dirençlilik testi ve master plak hazırlanması

	<u>1000 ml için</u>
Agar	15 g
Distile su	910 ml
50XVB tuzları	20 ml
% 20 glukoz	50 ml
Histidin HCl.H ₂ O	10 ml
0.5 mM Biyotin	6 ml
(%0.8/0.02 NaOH) Ampisilin	3.15 ml

Agar ve su otoklavlandı, 45°C'ye soğutulup % 20 glukoz, 50XVB tuzları ve histidin bu sıcak solüsyona eklenip karıştırıldı ve biraz daha soğuyunca biyotin ve ampisilin eklenip plaklar petrilere 30 ml olarak aktarıldı. Bu plaklarda bakteriler 4°C'de 2 ay saklanabilir.

Minimal Glukoz Agar Plakları (MGA)

Kullanım: Mutajenite deneyi

	<u>1000 ml için</u>
Agar	15 g
Distile su	930 ml
50X VB	20 ml
% 20 glukoz	50 ml

Agar ve su 1 litrelik kaptaki karıştırılıp çözüldü ve otoklavlanarak sterilize edildi, 45°C'ye soğutulup % 20 glikoz ve 50X VB tuzları eklenir ve besiyeri çalkalanarak karıştırılır. Daha sonra besiyeri, petri kutularına 30 ml olarak aktarıldı.

Nutrient agar plakları (NA)

Kullanım: Gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısını belirleme ve genotip kontrolü
a. Kristal viyole b. UV duyarlılığı

	<u>1000 ml için</u>
Oxoid nutrient broth no:2	25 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Agar, broth ve su 2 litrelik kaptaki karıştırılıp otoklavlandı ve petri kutularına 30 ml olacak şekilde aktarıldı.

Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı (NB)

Kullanım: Bakterilerin gecelik kültürde büyütülmeleri

	<u>200 ml için</u>
Oxoid nutrient broth no:2	5 g
Distile su	200 ml

Broth ve su karıştırılıp otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilize edildi ve 4°C'de saklandı.

Tuz Çözeltisi (1.65 M KCl + 0.4 M MgCl₂)

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

500 ml için

Potasyum klorür (KCl)	61.5 g
Magnezyum klorür	40.7 g
Distile su	500 ml

Maddeler distile suda çözüldü ve 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve 4°C’de ya da oda sıcaklığında saklandı.

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

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

500 ml için

0.2 M Sodyum dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)	13.82 g
0.2 M Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	14,2 g
Distile su	500 ml

Karışım pH 7.4’e ayarlandıktan sonra 121°C’de 20 dakika otoklavda sterilize edildi.

0.1 M β-NADP çözeltisi

Kullanımı: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

5 ml için

β—NADP (F.W. 765,4)	383 mg
Steril distile su	10 ml

Sterilizasyon 0.22 µm delik çaplı filtrelerle yapıldı.

1 M Glukoz–6-Fosfat çözeltisi

Kullanım: Mutajenite deneyi için S9 karışımı

	<u>10 ml için</u>
Glukoz–6-fosfat	2.82 g
Steril distile su	10 ml

Sterilizasyon 0.22 µm delik çaplı filtrelerle yapıldı.

S9 Karışımı (rat karaciğeri mikrozomal enzimleri + kofaktörler)

Kullanım: Mutajenite deneyi

	<u>50 ml için</u>
Steril distile su	19.75 ml
0.2 M fosfat tamponu pH=7,4	25 ml
0.1 M β-NADP	2 ml
1 M Glukoz–6-fosfat	0.25 ml
MgCl ₂ -KCl tuz çözeltisi	1 ml
Rat karaciğeri S9 fraksiyonu	2 ml

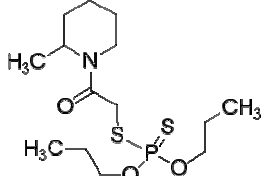
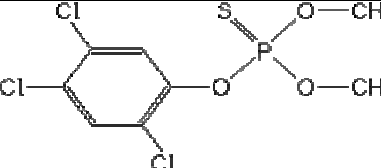
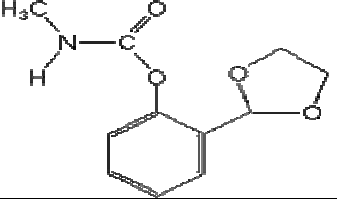
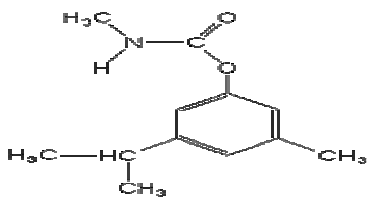
Maddeler yukarıdaki sıra ile daima buz içinde tutulan 100 lük erlene dikkatli bir şekilde konur. Karışım, her zaman taze olarak ve yeterince hazırlandı. İçerikler daima buz içinde tutuldu.

3.1.4. Test Maddeleri (dozları ve hazırlanışı)

Çalışmamızda tarımda ürün kalitesini artırmak ve zararlılardan kurtulmak amacıyla sıklıkla kullanılan pestisitlerden piperophos, fenclorphos, dioxacarb ve promecarb maddelerinin mutajenik etkileri Ames/Salmonella/mikrozom test yöntemiyle araştırılmıştır. Uygulanacak dozları belirlemek için fenclorphos, dioxacarb ve promecarb için test bileşiklerinin 0.01 µg/plak, 0,1 µg/plak, 1 µg/plak, 10 µg/plak, 100 µg/plak ve 1000 µg/plak konsantrasyonları, piperophos için ise 0.01µl/plak, 0,1µl/plak,

1µl/plak, 10 µl/plak, 100 µl/plak ve 1000 µl/plak konsantrasyonları hazırlanmıştır.
Çalışmada kullanılan pestisitler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan pestisitlerin genel özellikleri

Yaygın adı	Kimyasal adı	Kimyasal yapısı	Saflık Derecesi %	Kullanım alanı
Piperophos	<i>S</i> -2-methylpiperidinocarbonylmethyl <i>O,O</i> -dipropyl phosphorodithioate		97.7	Herbisit
Fenclorphos	<i>O,O</i> -Dimethyl- <i>O</i> -(2,4,5-trichlorophenyl) phosphorothioate		99.5	İnsektisit
Dioxacarb	2-(1,3-dioxolan-2-yl)phenyl methylcarbamate		99.4	İnsektisit
Promecarb	5-methyl- <i>m</i> -cumenyl methylcarbamate or 3-isopropyl-5-methylphenyl methylcarbamate		99.5	İnsektisit

3.2. Metod

Çalışmamızda, Moran ve Ames'in (1983) plak inkorporasyon metodu uygulanmıştır. Deneyler S9'lu ve S9'suz olarak iki grup halinde çalışılmıştır. Uygulanan her doz için 3 plak kullanılmış ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca pozitif kontrol, negatif kontrol ve spontan kontroller de belirlenmiştir. Çalışma Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. *Salmonella* Suşlarının Kültürlerinin ve Master Plaklarının Hazırlanması

Bakteri kültürleri HBA plaklarına paralel ekimleri yapılarak 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saatin sonunda iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2 ml NB içerisinde süspanse edilerek bir gece (12–16 saat) 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra steril bir öze ile bir öze dolusu dolusu sıvı kültür alınıp HBA üzerine çizgi ekimi yapılmıştır. Plaklar 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 4°C'de saklanmıştır. Bu şekilde hazırlanan plaklar 2 ay süresince yeniden kültür hazırlamak için kullanılmıştır.

3.2.2. *Salmonella* Suşlarının Stoklanması ve Stok Kültürlerin Açılması

Test suşlarının canlılığını ve mutant özelliklerini uzun süre koruyabilmesi için stoklanması gerekir. Genetik kontrolleri yapılarak HBA'da üremiş olan *Salmonella* suşlarından iyi izole olmuş bir koloni öze ile alınarak alınarak 2 ml NB içinde 37 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda steril ependorf tüplerinin içerisine 1 ml bakteri kültürü ve 90 µl DMSO ilave edilmiş sonra da kapakları sıkıca kapatılarak sıvı azot içerisine daldırılıp çıkartılmış ve böylece şok donmaları sağlanmıştır. Şok dondurulan kültürler stok olarak kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırılmıştır. Bu stok kültürler 1–2 yıl süre ile tazeliklerini korur.

3.2.3. *Salmonella* Suşlarının Kontrol Testlerinin Yapılması

3.2.3.1. Bakterilerin Genotiplerinin Kontrol Edilmesi

Mutasyon testlerinde test maddesinin mutant suşu atasal tipe döndürme gücü ölçüldüğü için, suşun genotip bakımından mutant karakterlere sahip olup olmadığının kontrol edilmesi, testin güvenilirliği açısından gereklidir. Bu nedenle, bakterilerin genotipleri çeşitli testler ile kontrol edilmiştir.

Histidin gereksinimi kontrolü

Bakterilerin his⁻ yapısından his⁺ yapısına geçişi MGA üzerine ekilmeleri sonucu ayırt edilmiştir. Bu kontrol için, bir gece NB içerisinde büyütülen kültürlerden steril öze ile alınan his⁻ bakteriler MGA ve histidin/biyotin (HB) plaklarına çizgi ekim yapılmış ve 37 °C'de 48–72 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmemiştir.

***UvrB* mutasyonu kontrolü**

Bu mutasyon ile bakterilerin ultraviyole (UV) ışınlarının neden olduğu replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan DNA onarım mekanizması engellenmiştir ve bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testiyle kanıtlanmıştır. Bu test için, NB'de bir gece büyütülen bakteri kültüründen steril bir öze yardımıyla bir öze dolusu alınıp NA plağının tamamına paralel ekim yapılmıştır. Plağın yarısı plastik bir plaka ile kapatılıp 33 cm. yüksekten 8 sn süre ile 15 watt gücündeki UV lambasına maruz bırakılmıştır. Bu işlem sonucunda plaklar kapatılıp 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek bakterilerin üreme durumlarına bakılmıştır.

Rfa mutasyonu kontrolü

Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuş olup hücre duvarının geçirgenliği arttırılmıştır. Rfa mutasyonunun varlığı kristal viyoleye

duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için 45 °C’ deki su banyosunda tutulan 2 ml top agara 0,1 ml. gecelik bakteri kültürü ilave edildikten sonra NA plaklarına karışımın homojen dağılması için 8 işareti yapılarak ekilmiştir. 10 dk. donması beklendikten sonra plağın ortasına 0.5 cm çaplı steril disk yerleştirilip diskin ortasına %0.1’lik 10 µl kristal viyole damlatılmıştır. Disk boyayı emdikten sonra plaklar 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda disk çevresinde 14 mm’lik üreme olmayan zon gözlenmiştir.

R-faktör varlığı kontrolü

Deneyde kullanılan her iki test suşuda ampisiline dirençlilik geni içeren R-faktör taşıyan pKM 101 plazmitini içermektedir. Bu plazmitin varlığı suşların ampisiline dirençliliklerinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla, NB içerisinde büyütülen bakteri kültürleri ampisilin (%0,8 Ampisilin/0.02 M NaOH) içeren HBA plaklarına çizgi şeklinde ekimleri yapılmış ve daha sonra 37 °C’deki etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonucunda plazmit içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdüğü gözlenmiştir.

Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his⁻ fenotipinden his⁺ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 98 için 20–50 revertant/plak; TA 100 için 75–200 revertant/plaktır. Bu test için, 37 °C’deki etüvde 110 rpm’de NB’de büyütülen bir gecelik kültürlerden 0,1 ml alınıp, 45 °C’deki su banyosunda tutulan 0.25 ml 0,5 M histidin-biyotin solüsyonu içeren 2,5 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılmış ve 37 °C’deki etüvde 48–72 saat inkübe edilerek plaplarda üreyen koloniler sayılmıştır. Normal sınırlarda revertant sayısı gösteren kültürler deneyde kullanılmıştır.

3.2.4. Sıvı Kültürün ml'sindeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Deneyde kullanılan gecelik kültürün ml'sinde bulunan bakteri sayısını belirlemek için HBA plaklarından iyi üremiş bir koloni öze yardımı ile alınarak 20 ml NB içerisine eklenmiştir. Daha sonra, kültür çalkalamalı inkübatörde 37 °C' de 110 rpm' de 12–16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gecelik kültürden 100 µl alınıp 20 ml NB içerisine eklenerek taze kültürleri hazırlanarak 140 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda taze kültürün %0,9 serum fizyolojik ile 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} olacak şekilde sulandırmaları hazırlanmıştır. Bu seyreltmelerden NA plaklarına her bir konsantrasyondan 3 petri olacak şekilde 100 µl' lik miktarlarda alınarak 45 °C' deki su banyosunda tutulan 2,5 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra test tüpü çalkalanarak NA plaklarına 8 işaretli yapılarak yavaşça yayılmış ve 37 °C' de 24 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır.

3.2.5. Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması

Test bileşenlerinin sitotoksik etkilerinin saptanması Dean et al. (1985) göre yapılmıştır. Buna göre, 2 ml top agara TA100 suşunun gecelik kültüründen 100 µl ve DMSO içerisinde çözülmüş test bileşiklerinin değişik konsantrasyonlarından (Fenchlorphos, dioxacarb ve promecarb için 0.01 µg/plak, 0,1 µg/plak, 1 µg/plak, 10 µg/plak, 100 µg/plak ve 1000 µg/plak konsantrasyonları, piperophos için ise test 0.01µl/plak, 0,1µl/plak, 1µl/plak, 10 µl/plak, 100 µl/plak ve 1000 µl/plak) 100 µl ilave edilerek NA plaklarına ekilmiştir. Plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra plaklardaki ortalama koloni sayısı belirlenmiş ve kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir. Her bir doz için 3 plak kullanılmıştır.

3.2.6. Memeli Karaciğer S9 Fraksiyonunun Hazırlanması

3.2.6.1. Rat Karaciğer Enzimlerinin İndüksiyonu ve S9 fraksiyonunu hazırlanması

Rat karaciğer enzimlerinin indüksiyonu ve S9 fraksiyonunun hazırlanması Ames et al. (1973a) göre yapılmıştır. Test maddelerinin metabolik ürünlerinin mutajen olup

olmadığını anlamak için kullanılması gereken karaciğer mikrozomal yapısı Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'ndan etik kurul raporu alınmış yaklaşık 150 g ağırlığında olan Sprague-Dawley ırkından olan erkek ratlardan ekstre edilmiştir. Ratların karaciğer mikrozomal enzimlerinin miktarını arttırmak için mısır yağında çözülmüş 3-metilkolantren tek doz halinde 125 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde verilmiştir. Böylelikle 5 gün süre ile enzim artışı uyarılmıştır. Ratlar 5 gün süresince su ve yemle beslenmiş fakat öldürülmeden 12 saat önce yem verilmesi kesilerek sadece su verilmiştir. İndüksiyonun 5. gününde ratların boyunları kırılarak (servikal dislokasyon) öldürülmüştür. Öldürülen ratlar diseksiyon masasında açıldıktan sonra karaciğer zedelenmeden çıkarılmış ve net ağırlığı bulunmuştur. İşlemin bütün basamakları, 0-4 °C'de, soğuk steril çözeltiler ve steril cam malzeme kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Steril koşullarda çıkarılan karaciğer tartıldıktan sonra beher içerisinde 1 g karaciğere 1 ml soğuk 0.15 M KCl olacak şekilde birkaç kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra 1 g. karaciğere 3 ml 0.15 M KCl olacak şekilde behere alınmış ve steril pens ve makas yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Karaciğer 24000 rpm'de homojenize edilerek koyu pembe renk görülene kadar bu işleme devam edilmiştir. Daha sonra 9000 ×g'de 4 °C'de 8700 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant soğuk steril ependorf tüplerine 1 ml olacak şekilde aktarılmıştır. Hazırlanan tüpler önce kuru buz içerisinde ani olarak dondurulup, daha sonra -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.6.2. S9 Karışımının Hazırlanması

Salmonella/mikrozom test sistemi için standart S9 karışımı bileşenleri 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM glukoz-6-fosfat, 4 mM β-NADP, 100 mM Na-fosfat pH:7,4 ve bu karışımın her ml'si için 0.04 ml. derişimindeki S9 fraksiyonudur. Karışım daima her mutajenite deneyi için taze hazırlanmış ve deney süresince buz içerisinde tutulmuştur.

3.2.7. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı

Deneydeki amacımız, daha önceden büyümesi için histidin amino asidine gereksinim duyan mutant oksotrofik suşların, kullandığımız test maddeleri ile tekrar histidin sentezleyebilir hale dönüştürme gücünü ölçme temeline dayanmaktadır. Ayrıca test bileşenlerinin etkilerinin metabolik aktivasyonları sonucunda değişip değişmediğini belirlemek amacı ile deneyler S9' lu ve S9'suz olmak üzere iki grup halinde yapılmıştır.

3.2.7.1. S9'suz Deney

Bu deneyde, 45 °C'lik su banyosunda tutulan ve içerisinde 0.25 ml histidin biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2,5 ml'lik top agara test maddelerinin değişik konsantrasyonlarından 100 µl ve 5 saatlik taze bakteri kültürlerinden 100 µl eklenmiştir. Tüpler düşük hızdaki vorteks ile yavaşça karıştırılarak daha önce 37 °C'de bekletilen MGA plaklar üzerine 8 işareti yapılarak karışımın homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. 15 dakika agarın donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilerek 37 °C'lik etüvde 48–72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petrilerdeki koloniler sayılmıştır. Deney TA98 ve TA 100 için her bir doz 3 ayrı plağa ekilmiştir. Bağımsız iki deney yapılmış ve sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır. Sonuçların değerlendirilebilmesi için deneylere paralel olarak spontan kontrol, solvent kontrol (DMSO) ve pozitif (diagnostik) kontrol olarak TA 100 suşu için 0,1 µg/µl sodyum azid (NaN₃), TA 98 suşu için ise 2 µg/µl 4-nitro-o-fenilendiamine (NPD) kullanılmıştır.

3.2.7.2. S9'lu (+) Deney

Bu deneyde, 45 °C'lik su banyosunda tutulan ve içerisinde 0.25 ml histidin biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2,5 ml'lik top agara test maddelerinin değişik konsantrasyonlarından 100 µl, 5 saatlik taze bakteri kültürlerinden 100 µl ve S9 karışımından 0,5 ml eklenmiştir. Tüpler düşük hızdaki vorteks ile yavaşça karıştırılarak daha önce 37 °C'de bekletilen MGA plaklar üzerine 8 işareti yapılarak karışımın homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. 15 dakika agarın donması beklendikten

sonra plaklar ters çevrilerek 37 °C'lik etüvde 48–72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petriyelerdeki koloniler sayılmıştır. Deney TA98 ve TA 100 için her bir doz 3 ayrı plağa ekilmiştir. Sonuçların değerlendirilebilmesi için deneylere paralel olarak spontan kontrol, solvent kontrol (DMSO) ve pozitif (diagnostik) kontrol yapılmıştır. TA 100 suşu için 0,1 µg/µl sodyum azid (NaN₃), TA 98 suşu için 2 µg/µl 2-aminofluorene (2AF) kullanılarak, pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olarak uygulanmış ve iki bağımsız deney yapılmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesi SPSS 11,0 for Windows paket programında One-Way ANOVA Testi ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

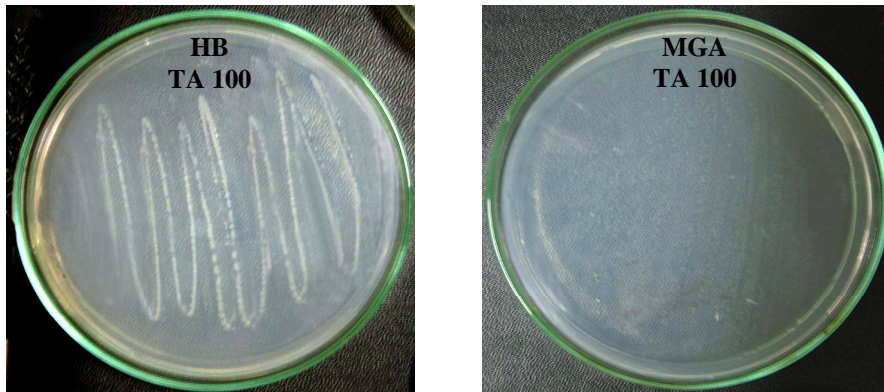
Çalışmamızda tarımda ürün kalitesini artırmak ve zararlılardan kurtulmak amacıyla sıklıkla kullanılan pestisitlerden piperophos, fenclorphos, dioxacarb ve promecarb maddelerinin mutajenik etkileri *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşları ile araştırılmıştır.

4.1. Genetik İşaretlerin Kontrolü

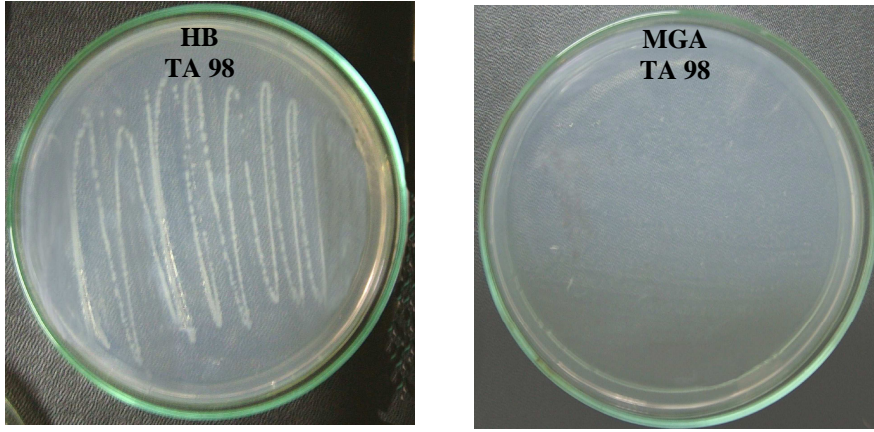
TA 98 ve TA 100 suşlarının histidin gereksinimi, *uvrB* mutasyonu, *rfa* mutasyonu, R-faktör varlığı ve spontan olarak geriye dönen koloni sayısı bakımından genetik işaretlerinin kontrolü yapılmıştır.

Histidin gereksinim kontrolü

Bakterilerin his⁻ yapısından his⁺ yapısına geçişi MGA üzerine ekilmeleri sonucu ayırt edilmiştir. Bu kontrol için, bir gece NB içerisinde büyütülen kültürlerden steril öze ile alınan his⁻ bakteriler MGA ve HB plaklarına çizgi ekim yapılmış ve 37 °C'de 48–72 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmemiştir. Bu sonuçta bize TA100 ve TA98 suşlarının his⁻ mutasyonunu taşıdığını göstermiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



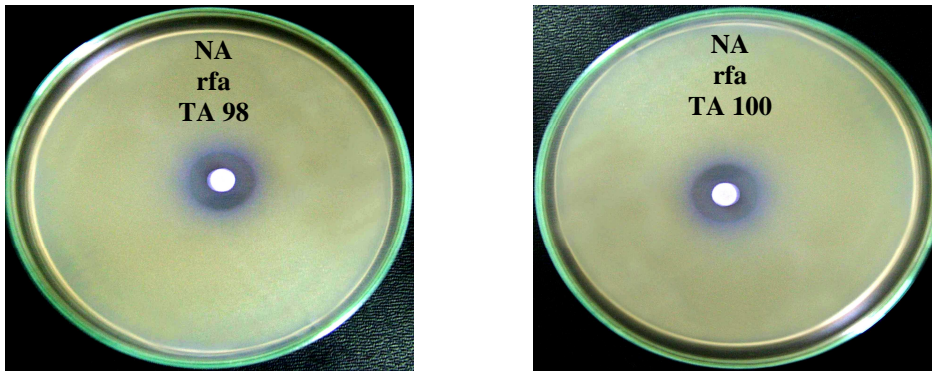
Şekil 4.1. *S. typhimurium* TA 100 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları



Şekil 4.2. *S. typhimurium* TA 98 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları

Rfa mutasyon kontrolü

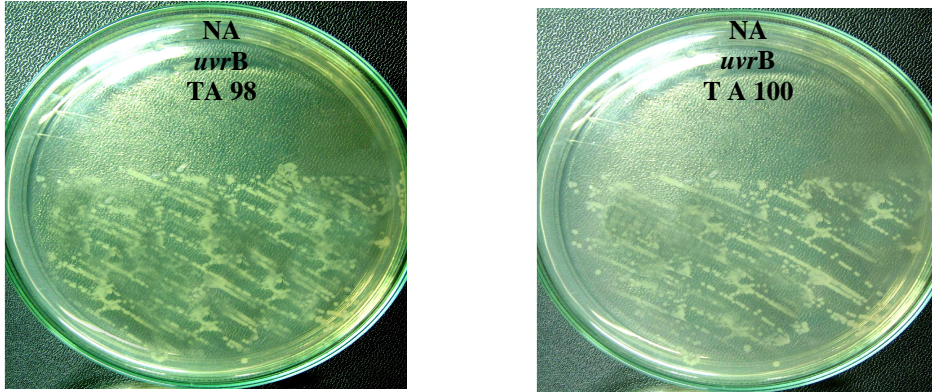
Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuş olup hücre duvarının geçirgenliği arttırılmıştır. Rfa mutasyonun varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Bu test için 45 °C’ deki su banyosunda tutulan 2 ml top agara 0,1 ml. gecelik bakteri kültürü ilave edildikten sonra NA plaklarına karışımın homojen dağılması için 8 işareti yapılarak ekilmiştir. 10 dk. donması beklendikten sonra plağın ortasına 0.5 cm çaplı steril disk yerleştirilip diskin ortasına %0.1’lik 10 µl kristal viyole damlatılmıştır. Disk boyayı emdikten sonra plaklar 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda disk çevresinde 14 mm’lik üreme olmayan zon gözlenmiştir. Bu zonda bize kullandığımız bakteri suşlarının Rfa mutasyonunu taşıdıklarını göstermiştir.



Şekil 4.3. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının rfa mutasyonu kontrolü sonuçları

***uvrB* mutasyon kontrolü**

UvrB mutasyon kontrolü Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Bu mutasyon ile bakterilerin ultraviyole (UV) ışınlarının neden olduğu replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan DNA onarım mekanizması engellenmiştir ve bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testiyle kanıtlanmıştır. Bu test için, NB'de bir gece büyütülen bakteri kültüründen steril bir öze yardımıyla bir öze dolusu alınıp NA plağının tamamına yüzey ekim yapılmıştır. . Plağın yarısı plastik bir plaka ile kapatılıp 33 cm yüksekten 8 sn süre ile 15 watt gücündeki UV lambasına maruz bırakılmıştır. Bu işlem sonucunda plaklar kapatılıp 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek bakterilerin üreme durumlarına bakılmıştır. Bu süre sonucunda UV'ye maruz kalan bölgede üreme gözlemlenmezken diğer kısımlarda gözlenmiştir. Bu sonuçta bize TA98 ve TA100 suşlarının *uvrB* mutasyonunu taşıdığını göstermektedir

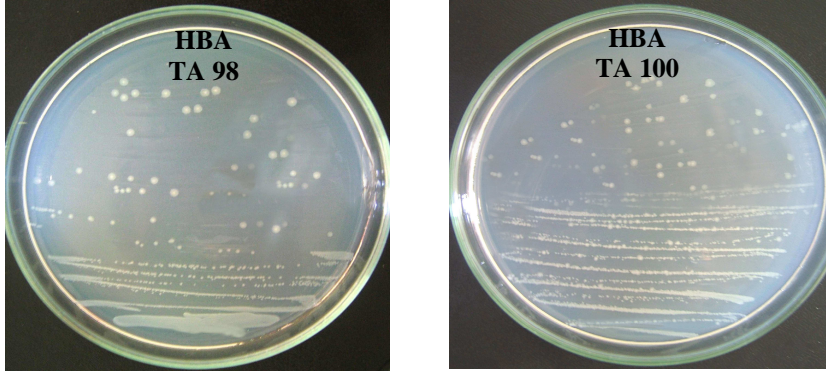


Şekil 4.4. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının *uvrB* mutasyon kontrolü sonuçları

R-Faktör varlığı kontrolü

Deneyde kullanılan her iki test suşuda ampisiline dirençlilik geni içeren R-faktör taşıyan pKM 101 plazmitini içermektedir. Bu plazmitin varlığı suşların ampisiline dirençliliklerinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Bu amaçla, NB içerisinde büyütülen bakteri kültürleri ampisilin (%0,8 Ampisilin/0.02 M NaOH) içeren HBA plaklarına çizgi şeklinde ekimleri yapılmış ve daha sonra 37 °C'deki etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonucunda, plazmit içeren mutant

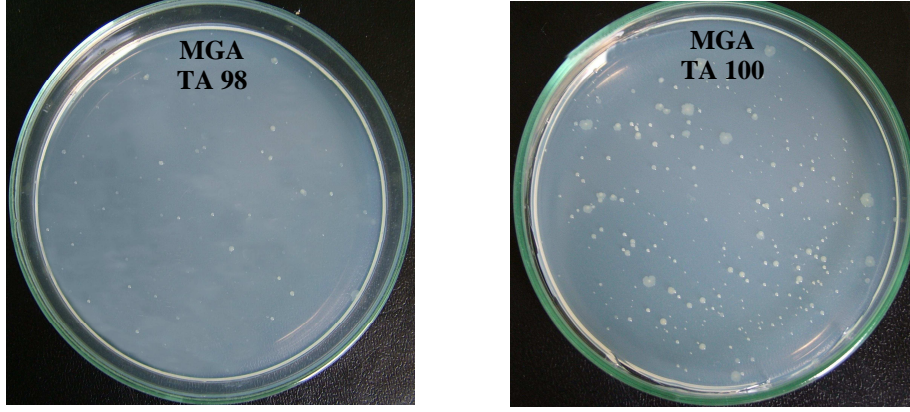
bakterilerin ampisilinli ortamda üremeleri kullandığımız suşların R-faktörü taşıyan pKM 101 plazmitini içediğini göstermiştir.



Şekil 4.5. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının R-faktör mutasyonu kontrolü sonuçları

4.2. Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his^- durumundan his^+ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 98 için 20–50 revertant/plak; TA 100 için 75–200 revertant/plaktır. Yaptığımız çalışma sonucunda spontan olarak geriye dönüş sıklığı TA 98 suşu için S9'suz ortamda 26.83 ± 2.9 , S9 varlığında 25.50 ± 2.7 bulunmuşken, TA 100 suşu için sırasıyla 116 ± 5.5 ve 147 ± 6.9 değerleri bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar da her iki suş içinde bu değerlerin arasında çıkmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının spontan olarak geriye dönüş sıklığı kontrolü sonuçları

4.3. Sıvı Kültürün ml'sindeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Salmonella typhimurium TA98 ve TA100 suşlarının kullanılarak yapıldığı mutajenite deneylerinde ml'deki bakteri sayısının $1-2 \times 10^9$ ml/bakteri olması gerekmektedir. Yaptığımız deney sonucunda ml'deki bakteri sayısı $1,2 \times 10^9$ ml/bakteri olarak belirlenmiş ve bu sayıda istenilen değerler arasında çıkmıştır.

4.4. Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması

Test bileşenlerinin sitotoksik etkilerinin saptanması Dean et al. (1985) göre yapılmıştır. Deneysel sonucunda piperophos'da $10 \mu\text{l/plak}$ üzerindeki dozlar diğer üç madde içinde $100 \mu\text{g/plak}$ üzerindeki dozlar sitotoksik bulunmuştur. Çalışmada uygulanacak dozların sitotoksik etki göstermemesi gerekmektedir. Bu yüzden piperophos için $0.001 \mu\text{l/plak}$, $0.01 \mu\text{l/plak}$, $0.1 \mu\text{l/plak}$, $1 \mu\text{l/plak}$ ve $10 \mu\text{l/plak}$ dozları diğer üç test bileşiği için ise $0.01 \mu\text{g/plak}$, $0.1 \mu\text{g/plak}$, $1 \mu\text{g/plak}$, $10 \mu\text{g/plak}$ ve $100 \mu\text{g/plak}$ dozları kullanılmıştır.

4.5. S9 Fraksiyonunun Protein Miktarı

Memeli karaciğer S9 fraksiyonunun hazırlanması materyal ve metottaki gibi yapılmıştır. Rat karaciğeri $9000 \times \text{g}$ süpernatantının ml'sinde bulunan protein miktarı ise Bradford'a (1976) göre yapılmış olup, protein miktarı 27.81 mg/ml olarak Jenway 6305 marka spektrofotometre ile bulunmuştur.

4.6. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı

Revertant sayısındaki değişiklikler *Salmonella typhimurium* TA 98 için S9 fraksiyonu yokluğunda negatif kontrol grubuna göre artışlar ve azalışlar şeklinde olup bu değerler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. *Salmonella typhimurium* TA 98 için S9 fraksiyonu varlığında ise revertant sayısındaki değişiklikler negatif kontrol grubuna göre *Salmonella typhimurium* TA 98 için S9 fraksiyonu varlığında ise Dioxacarb'ın 10 µg/plak uygulaması hariç revertant sayısındaki değişiklikler negatif kontrol grubuna göre artış şeklinde olup bu değişiklikler de istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Piperophos'un 0.01 ve 0.001 µl/plak dozlarında mutajenik etkiye rastlanılmıştır. Her iki deneyde de test suşlarının geriye dönüş sıklığını ve S9 karışımının etkisini doğrulamak için mutajenik etkileri bilinen pozitif kimyasal maddeler kullanılarak pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. TA 98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında 2-aminofluorene ve S9 fraksiyonu yokluğunda 4-nitro-o-fenilendiamine kullanıldığında revertant koloni sayısı artmış ve bu artışlar istatistiksel açıdan kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur.

Salmonella typhimurium TA 100 suşunda ise revertant sayısındaki değişiklikler S9 fraksiyonu yokluğunda kontrol grubuna göre artış ve azalış düzeyinde olup bu değerler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. S9 varlığında ise Fenclorophos'un 10 ve 100 µg/plak, Promecarb'ın 100 µg/plak dozları hariç uygulanan bütün dozlar negatif kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. TA 100 suşunda da suşların geriye dönüş sıklığını ve S9 karışımının etkisini doğrulamak için mutajenik etkileri bilinen pozitif kimyasal maddeler kullanılarak pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. TA 100 için S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda pozitif mutajen olarak sodyum azid kullanıldığında revertant koloni sayısı her ikisinde de artmış ve bu artışlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 4.1. *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları ile denenen pestisitlerin (S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda) plak inkorporasyon testi sonuçları

Test Maddesi	Denenen Doz (µg/plak)	Revertant Sayısı			
		Aritmetik Ortalama ± Standart Sapma			
		TA 98		TA 100	
		S9'suz	S9'lu	S9'suz	S9'lu
Piperophos	10a	21±1.7	28.5±2.5	96.16±3.4	166.16±8*
	1a	27.33±1.5	32.8±2.9	102.83±7.9	200.66±3.8*
	0.1a	21.83±1.4	27±3.2	88.16±4	238.16±4.2*
	0.01a	24±0.8	36.33±4.9	93.33±4.5	233.83±7.8*
	0.001a	27.16±0.7	44.33±5.3	119±3.7	224.66±5*
Fenclorophos	100	24.33±1.7	31.16±2.8	82.83±4.9	141±7
	10	24±1.7	32±4.1	120.5±5.3	146.33±10.2
	1	19.50±2	33.16±3.1	103±5.2	179.16±5.7*
	0.1	22.83±2.2	24.5±3.3	93.66±6.4	218.33±9.3*
	0.01	19.33±0.8	31.33±2.2	103.33±8.1	240.66±6.6*
Dioxacarb	100	20±2	22.83±2.4	95±8.1	152.33±11.5*
	10	21.66±2.1	20.5±4.9	121.66±4.5	198.00±7.9*
	1	22.16±2.1	28.83±1.6	103.16±8.1	177.00±15.5*
	0.1	22.66±1.3	25.66±3.5	94.66±4.3	187.83±10.6*
	0.01	19.00±1.4	33.83±3.7	94.33±5.5	220.00±15.7*
Promecarb	100	20.33±2.6	22.5±5	118.83±6.	141.00±7.7
	10	23±4	22.16±3.7	99.5±6.8	168.33±10*
	1	23.83±1.7	28.33±4.7	104.33±5	192±6.9*
	0.1	21.66±2.6	28.66±3.2	95.16±4.6	198.16±9.6*
	0.01	19.16±5.3	23.66±2.7	102.66±7.7	196.33±9.6*
Kontrol		26.83±2.9	25.5±2.7	116±5.5	147±6.9
DMSO		22.66±2.2	21.66±2	97.5±4.9	131.5±6.9
Sodyum azid	10			1032.83±6*	1300.33±13.5*
2-aminofluorene	200		1343.5±58.2*		
4-nitro-o-fenilendiamine	200	850.5±95.1*			

* Negatif kontrol grubuna (DMSO) göre revertant sayısı $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı (One-Way ANOVA Testi)

a µl/plak

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gün geçtikçe yaşamın bizlere sunduğu olanaklar nerdeyse tükenme aşamasına gelmeye başladı. Buna gerek insanoğlunun öfkeli dünya tahribatı gerekse de kullanılan kimyasal maddelerin çokluğu olanak sağlar hale geldi. Günlük yaşamla beraber sık sık yüz yüze kaldığımız doğal ya da yapay kimyasal kirleticilerin bir kısmı karsinojenik ve mutajenik etkileriyle dengeyi biz farkında olmadan etkilemeye başladı. Bu maddelerin karsinojenlik ve mutajenlik etkinliğinin ne düzeyde olduğu uzun zamanlardır tartışılmaktadır. “Acaba bu etkiler Dünya Sağlık Örgütünün belirlediği sınırlar içinde mi?” şeklindeki sorulara bazı test yöntemleriyle araştırılarak sonuç bulunmaya çalışılıyor.

Pestisitler, modern tarımın tamamlayıcı bir bileşenidir. Ürün artışına bağlı olarak, sebze ve meyvelerde yılda 10–15 pestisit uygulaması normal karşılanabilmektedir. Birçok uygulamada birden fazla aktif madde kullanılabilir. Bu aktif maddeler özellikle hastalık, zararlı ve yabancı otları öldürmek üzere oluşturulmuşlardır. Hastalık, zararlı ve yabancı otların tarımsal üretimde neden olduğu kayıp ortalama % 20–40 arasında değişmektedir. Bu kayıplar hasat, kurutma, depolama, işleme aşamalarında da devam etmektedir. Dünya hububat üretiminin yaklaşık % 20’si hasat öncesi ve sonrası aşamalarda kaybolmaktadır. Pestisitler; hastalık, zararlı ve yabancı otların zararlarını azaltmaktadır, bunun sonucunda üretim artmakta, kalite yükselmekte, ekonomik geri dönüş yükselmektedir. Pestisit kullanımı 1940’lı yıllardan beri tarımsal üretimi arttıran en önemli bileşendir⁶.

Pestisitlerin zararlı etkisi, insan vücuduna ilacın solunum, deri veya ağız yoluyla doğrudan girmesi sonucunda olmaktadır. Pestisit ile bulaşmış besinin yenilmesi veya içilmesi ile toksik etki meydana gelmektedir. Pestisit kalıntılarını ihtiva eden bitkisel ve hayvansal besin maddelerini yemek suretiyle meydana gelen zehirlenmeler ise kronik zehirlenmelerdir⁷. Pestisitler insanlar üzerinde olumsuz etkilere sebep oldukları gibi hayvanlar, bitkiler, toprak ve su üzerinde de doğrudan ya da dolaylı bazı etkiler meydana getirmektedir. Pestisitler yağmur, rüzgâr gibi çeşitli etkenlerle toprağa dolaylı

⁶ <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/031pdf> 21.04.2007.

⁷ <http://www.maliye.gov.tr/cevreatlasi/08tarim.pdf> 10.03.2007

yolla ulaşabilmektedir. Toprağa ve bitkilere olan olumsuz etkilerinin yanı sıra pestisitler çeşitli hayvanlarda da olumsuzluklara sebep olmaktadır. Sulara çeşitli yollarla karışan düşük yoğunluktaki birçok pestisit kalıntısından balıkların olumsuz şekilde etkilendikleri ve davranışlarında farklılık meydana geldiği anlaşılmıştır.

Karsinogen ve mutajen maddelerin oluşumu ile birçok sağlık sorunu oluşmuş ve günümüz hastalığı haline gelen kanser riskleri artmıştır. Kanserojen ve mutajen maddelerin araştırılmasında farklı test yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları DNA hasarına sebep olan kimyasal mutajen ve kanserojenlerin test edildiği sitogenetik metodlardır. Bu testler, kardeş kromatid değişimi (SCE = sister chromatid exchange) (Trosko, J.E. 1997 ve Hamasaki et al. 1992), mikronükleus testi (MN) (Wyszynska et al. 1991 ve Majone et al. 1990), kromozom bozulma testi (CA = chromosome aberration) (Bakale et al. 1990), Ames testi (Ames 1983) ve comet testi (gen konversiyonları ve DNA kırılmaları) (Hayashi et al. 1994, Zhuleva et al. 1994) olarak bilinmektedir.

Salmonella/mikrozom test sistemi, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenik özelliklerini bulmak adına geliştirilmiş ve birçok ülkede yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı test sistemlerinden biridir. Çünkü bu test, test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş ve mutajen-karsinogen etkisi en iyi bilinen kimyasallar ile geçerliliği en fazla kabul edilmiş kısa zamanlı test sistemlerinden birisidir (Maron ve Ames 1983, Kaplan vd, 2004, Watanabe-Akanuma 2005, Reid 2006, Mathur 2005, İpek vd 2005, Kutlu 2005).

Deneyde *Salmonella typhimurium* bakterisinin LT-2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlar sonucu elde edilen TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Bu mutantlar his⁻ bakteriler olup, his operonun değişik bölgelerinde farklı birer mutasyon içerirler. *Salmonella*/mikrozom testi ile kimyasal maddelerin bu test suşlarını his⁺ revertantlar haline dönüştürme özellikleri belirlenmektedir. TA 98 suşu çerçeve kayması mutasyonlarına (frameshift), TA 100 suşu ise baz-çifti değişim mutasyonlarına (base-pair) karşı duyarlıdır. Deneylerde bu bakterileri kullanmamızın nedeni baz-çifti değişim

mutasyonları ve çerçeve kayması tipi mutasyonların diğer mutasyonlara göre daha fazla sıklıkta görülmesidir.

Bu çalışmada tarımda yaygın olarak kullanılan dört farklı pestisit (piperophos, fenclorophos, dioxacarb, promecarb) mutajenik aktiviteleri kısa zamanlı test sistemlerinden biri olan Ames/*Salmonella*/mikrozom test yöntemi ile araştırılmıştır. Ames/*Salmonella*/mikrozom testinde bir maddeye mutajen denilebilmesi için histidin protroflarının sayısının kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının en az iki katı olması ya da iki katından az olduğu durumlarda doza bağlı bir artış göstermesi gerekmektedir (Maron and Ames 1983).

Yaptığımız çalışma sonucunda TA 98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında ortalama revertant koloni sayısı 25.50 ± 2.7 , yokluğunda ise 26.83 ± 2.9 olarak bulunmuştur. TA 100 suşu için ise bu değerler sırasıyla $147,00 \pm 9,1$ ve $116,00 \pm 5,5$ olarak bulunmuştur. Ames'e (1973) göre mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his⁻ durumundan his⁺ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 98 için 20–50 revertant/plak; TA 100 için 75–200 revertant/plaktır. Bizim çalışmamızdaki sonuçlar da bu değerler arasındadır. Bu sayı değerleri; minimal ortamın tipi, glukoz–6-fosfat, β -NADP, fosfat tamponu, glukoz ve tuz çözeltisinin derişimi, petrillerdeki minimal agarın hacmi, top agarın miktarı ve yayılma şekli, ortamdaki hava sirkülasyonu ve sıcaklığı, etüvdeki nem oranı, S9 fraksiyonunun miktarı, minimal agarın bileşimi ve hazırlanmasındaki farklılıklar gibi etkilerinden dolayı değişebilmektedir (Belser et al. 1981, Boath et al. 1980).

Yapılan diğer çalışmalara baktığımızda bizim çalışmamızda da olduğu gibi genellikle *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları daha çok kullanılmaktadır. Bunun sebebi de bu iki suşun çeşitli mutajenlere karşı duyarlılığının diğer suşlara göre daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır (Asal 1985).

Piperophos maddesinin TA 98 suşu ile S9 fraksiyonu yokluğunda yapılan çalışmada maddemizin 1 μ l/plak, 0,1 μ l/plak, 0,01 μ l/plak, 0,001 μ l/plak konsantrasyonları geri dönüşüm sayılarını aşmış ve bu aşmalar mutajenik etki göstermemiştir. Çünkü Ames

test sisteminde bir maddeye mutajen denilebilmesi için elde edilen revertant koloni sayısının, negatif kontrol grubunun iki katından fazla olması ya da doza bağımlı bir artış olmalıdır. TA 98 suşu ile S9 fraksiyonu varlığında ise Piperophos'un 0.01 ve 0.001 µl/plak dozlarında sırasıyla $36.33 \pm 4,9$ ve $44.33 \pm 5,3$ değerleri elde edilmiş ve bu değerlerde mutajenik etki göstermiştir. Bu madde ile yapılan çalışmalarda en yüksek değere S9 varlığında 0.001 µl/plak, en düşük değere ise S9 yokluğunda 10 µl/plak konsantrasyonunda rastlanılmıştır. TA100'ün S9 yokluğunda elde edilen kendiliğinden geriye dönüş koloni sayıları istatistiksel açıdan negatif kontrol grubuna göre anlamlı bulunmazken TA 100 suşunun S9 yokluğunda elde edilen ortalama revertant koloni sayıları istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

Cholinesteraz inhibitörü olan piperophos, yüksek dozda toksik etkiye sahiptir. Organofosfat bileşiminden olup zehirlenme durumunda bazı rahatsızlıklara (tükrük salgısının artması, titreme, karın ve baş ağrısı) yol açar. Su ile insan sağlığını ciddi derecede etkileyebilir. Genelde sucul organizmalarda toksik etki yaratır. Özellikle Havuz balığı (*Carassius carassius*), Kanal yayın balığı (*Ictalurus punctatus*), Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ve Lepistes (*Poecilia reticulata*) türlerindeki balıklarda 48 saatlik araştırmalarda LC_{50} değerleri 8µg/L olarak bulunurken aynı balıklarda 96 saatlik uygulama sonucunda ise LC_{50} değerleri 5µg/L olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar piperophos maddesinin orta seviyede toksik olduğu ortaya çıkarmıştır (Bathe et al. 1975).

Fenclorphos yapılan çalışmalarda en yüksek değere TA 100 suşunun S9 varlığında 0.01µl/plak konsantrasyonunda, en düşük değere ise S9 yokluğunda 0.01µl/plak konsantrasyonunda rastlanılmıştır. S9 varlığında 1µg/plak, 0,1µg/plak ve 0.01 µg/plak yapılarında elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuşken diğerleri anlamlı bulunmamıştır. Fenclorphos maddesinin TA 98 suşu ile S9 fraksiyonu yokluğunda yapılan çalışmada maddemizin 100µg/plak ve 10µg/plak konsantrasyonları dışındaki hiçbir konsantrasyon geri dönüşüm sayılarını aşmadığından bu madde TA 98 suşu üzerine direkt mutajenik etki göstermemiştir. Bu madde ile yapılan çalışmalarda en yüksek değer S9 varlığında 10 µg/plak, en düşük değer ise S9 yokluğunda 0.01 µg/plak konsantrasyonunda bulunmuştur.

Erime noktası 34–37°C olan fenclorophos hafif bir kokuya sahiptir. Zehirlenme etkileri ishal, kas, karın ve boğaz ağrıları şeklindedir. Sucul organizmalarda toksik etkiye sahiptir. Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ve *Poecilia reticulata* (Lepistes) türleriyle yapılan çalışmalarda 48 saatlik uygulama sonucunda LC₅₀ değerleri 9µg/L olarak bulunmuşken 96 saatlik uygulama sonucunda 5µg/L olarak bulunmuştur. (Wells 1967).

Dioxacarb maddesinin TA 100 suşu ile S9 varlığı ve yokluğunda yapılan deneylerde elde edilen ortalama revertant koloni sayıları kendiliğinden geriye dönen ortalama revertant koloni sayısı değerlerine yakın olarak saptanmıştır. Bu madde ile yapılan çalışmalarda en yüksek değer S9 varlığında 0,1 µg/plak, en düşük değer ise S9 yokluğunda 0,1 µg/plak konsantrasyonunda bulunmuştur. Bu da bize bu maddenin her iki suşta da mutajenik bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir. Dioxacarb maddesi ile TA 98 suşu kullanılarak S9 yokluğunda yapılan deneylerde kullanılan dozların değerlerine yakın olarak saptanmıştır. S9'lu deneyde ise bu değerler spontan değerlerin çok az üzerinde çıkmıştır. Bu madde ile yapılan çalışmalarda en yüksek değer S9 varlığında 0,1 µg/plak, en düşük değer ise S9 yokluğunda 0.01 µg/plak konsantrasyonunda bulunmuştur.

Dioxacarb, toksik etkiye sahip bir insektisittir. Dioxacarb'ın insan üzerindeki semptomları mide bulantısı, zayıflama, eklem ağrıları, uyuşukluk ve ishal şeklindedir. Sazan balığı (*Cyprinus carpio*), Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Lepistes (*Poecilia reticulata*) türlerindeki balıklar üzerinde yapılan 48 ve 96 saatlik araştırmalar, toksik etkileri konusunda bilgi vermiştir. LC₅₀ değerleri 48 saatlik araştırmada ortalama 23 µg/L, 96 saatlik uygulamada ise 25µg/L olarak bulunmuştur. Maddelerin türler üzerindeki toksik doz etkisi minimum 19 µg/L iken maksimum 33 µg/L olarak bulunmuştur. (Hejduk and Svobodova, 1980).

Promecarb maddesinin TA 98 suşu ile S9 fraksiyonu yokluğunda yapılan çalışmada maddemizin 10 µg/plak ve 1µg/plak konsantrasyonları geri dönüşüm sayılarını aşmış ve bu aşmalar mutajenik etki göstermemiştir. TA 98 suşu ile S9 fraksiyonu varlığında ise

Promecarb'ın herbir konsantrasyon değeri çok az üzerinde çıkmıştır. Bu da mutajenik etkinin olmadığını göstermiştir. Bu madde ile yapılan çalışmalarda en yüksek değere S9 varlığında 0,1 µg/plak, en düşük değere ise S9 yokluğunda 0.01 µg/plak konsantrasyonunda rastlanılmıştır. TA100'ün S9 yokluğunda elde edilen kendiliğinden geriye dönüş koloni sayıları istatistiksel açıdan negatif kontrol grubuna göre anlamlı bulunmazken TA 100 suşunun S9 yokluğunda elde edilen ortalama revertant koloni sayıları istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

Terleme, gözyaşı salgılama ve farkında olmadan idrar yapma gibi etkilere maruz bırakan promecarb, kolinesteraz inhibitörüdür. Renksiz, kokusuz ve kristalimsi bir maddedir. Deri yolu ile merkezi sinir sistemini etkileyen yüksek derecede toksik etki gösteren bir maddedir. İnsan sağlığı ve çevre için tehlikelidir. Çocuklar için 15-30 g'ı yetişkinlerde ise 50-100 g'ı 200 ml suda öldürücü etki yapmaktadır⁸.

Test edilen 4 maddeninde TA 98 ve TA 100 suşlarında ortalama revertant sayılarının doza bağlı bir ilişki göstermediği tespit edilmiştir.

S. typhimurium TA 98 ve TA 100 suşu ile yaptığımız çalışmada uygulanan tüm dozların S9 varlığında elde edilen ortalama revertant koloni sayılarının S9 yokluğundaki revertant koloni sayılarına göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçta bize test edilen 4 maddenin de canlı vücuduna girdiğinde metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan metabolitlerinin DNA ile etkileşimini bir miktar artırdığı düşüncesini akla getirmiştir.

Literatür araştırmalarına baktığımızda test edilen kimyasal maddelerin bazılarında mutajenik etkiye rastlanılırken bazılarında rastlanılmamıştır. Bizim deneylerimizde ise Piperophos'un 0.01 ve 0.001 µl/plak konsantrasyonlarında mutajenik etkiye rastlanırken diğer uygulanan tüm dozlarda mutajenik etkiye rastlanılmamıştır.

⁸ <http://www.epa.gov/SW-846/pdfs/8318a.pdf>, 21.01.2007

Sonuç olarak; yaptığımız deneyde uygulanan maddelerden piperophos'un TA 98 suşunun S9'lu fraksiyonunun 0,1 ve 0.01 µl/plak dozları dışındaki diğer dozların hiç birinde mutajenik bir etkiye rastlanılmamıştır. Ancak, kimyasal bileşiklerin mutajenik özelliklerinin belirlenmesinde, tek bir test sistemi yerine, birkaç kısa zamanlı test sisteminin bir kombinasyonunun kullanılması sonuçları daha güvenilir hale getirmektedir. Bu yüzden bu maddelerin farklı test sistemleriyle de değerlendirilerek sonuçların karşılaştırılması ve daha güvenilir bir sonuca varılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Akkaya, A. 1996, "Pestisit Uygulamalarından Kaynaklanan Toprak, Su, Hava Kirliliği ve GAP'ta Pestisit Uygulamaları", II. Ulusal Zirai Mücadele İlaçları Sempozyumu, Ankara, 219–226.
- Akman, Y. 2000, "Çevre Kirliliği", Çevre Biyolojisi, 144–167.
- Ames, B. N., Lee, F. D. ve Durston, W. E., 1973b, "An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens", The Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 70, 782-786.
- Ames, B.N. 1972, "A bacterial system for detecting mutagens and carcinogens, in: Sutton, E.H. and Harris, I.M., (Eds.)", Mutagenic Effects of Environmental Contaminants Academic Press, New York, pp.57-66.
- Ames, B.N. 1979, "Identifying environmental chemicals causing mutation and cancer", Science, Vol.204, pp.587–793.
- Ames, B.N. 1983, "Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test", Mutation Research 113:173–215.
- Ames, B.N. Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D., 1973a, "Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection", The Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., Vol.70, pp.2281-2285.
- Anonim 2001, Kimya Sanayi Özel İhtisas Komisyonu Raporu Tarım İlaçları Alt Komisyonu Raporu, Ankara, Türkiye.
- Arı E. 1998, "Ames/Salmonella/mikrozom ve Ames-Fluktasyon Test Yöntemleri ile Kinoksalin Türevlerinin Mutajenik Aktivitesinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Ateş, A. 2002, "Moleküler Biyoloji", 9. Bölüm, Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Konya, 113–121 p.
- Bağcı, H. 1985, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları.
- Asal, S. 1985, "Bazı pestisitlerin mutajenik etkileri üzerinde araştırmalar", Doğa Bilim Dergisi, 9(1) :72-78

- Başaran, A. Başaran, N., Solak, M., Güneş, H., 1995, "Tıbbi Biyoloji ve Genetik", Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi Yayınları, 117-123.
- Bakale, G. Mc Creary, R.D., 1990, Response of k_e Test to NCI/NTP-Screened Chemicals. Non- Genotoxic Carcinogens and Genotoxic Non-Carcinogenenes. Carcinogenesis, Vol. 11, No. 10, 1811–1818.
- Barrueco, C., Herrera., A., De la Pena, E., 1991, "Mutagenic evaluation of trichlorfon using different assay methods with Salmonella typhimurium" Mutagenesis., Jan; 6(1):67-71
- Bathe, R., K. Sachsse, L. Ullmann, W.D. Hormann, F. Zak, and R. Hess, Proc. Eur. Soc. Toxicol. 16: 113–124, 1975
- Beudet, A.L., Roufa, A.J., Cassay, C.T., 1973, "Mutations effecting the structure of hypoxanthine: guanine phosphoribosyltransferase in cultured Chinese Hamster cells", The Proceedings of the National Academy of Sciences, USA., Vol.70, pp.320-324.
- Belser, Jr., Shaffer, W.B., Bliss, S.D., Hynds, E.D., Yamamoto, H.M., Pitts L., Winer, J.A., 1981, "A standardized procedure for quantification of the Ames/Salmonella/Mammalian-Microsome mutagenicity test", Environmental Mutagenesis, Vol.3 pp.123-139
- Boath, S.C., Welch, A.M., Garner, R.C., 1980, "Some factors affecting mutant numbers in the Salmonella/microsome assay", Carcinogenesis, 1(11):911-923.
- Boath, S.C., Welch, A.M., Garner, R.C., 1980, "Some factors affecting mutant numbers in the Salmonella/microsome assay", Carcinogenesis, 1(11):911-923.
- Boyacıoğlu, M., Parlak, H., 2001, "İzmir Körfezi'ne akan dere sedimentlerinin mutajenitesi", Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 18(3-4):325-331.
- Bradford, M.M., 1976, "A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Analytical Biochemistry, Vol.72, pp.248-254.
- Brams, A., Buchet, J.F., Crutzen-Fayt, M.C., Meester, D.E., Lauwerys, R., Leonard, A., 1987, "A comparative study, with 40 chemicals, of the efficiency of the Salmonella assay and the SOS chromotest (kit procedure)", Toxicology Letters, Vol.38, pp.23-133.

- Bulut, H., Tamer, A., 1996, "Pestisit Kullanımının Azaltılması ile İlgili Politika ve Stratejiler", II. Ulusal Zirai Mücadele İlaçları Sempozyumu, Ankara,12-24.
- Ciğerci, İ.H., Liman, R., Kutlu, H.M., Aydoğan, G., Konuk, M., 2007, "Eber Gölü ve Akarçay suyunun mutajenik özelliklerinin Ames Salmonella/mikrozom testi ile araştırılması", Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi.
- Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı, 2006, Zirai Mücadele İlaçları Üretimi Yapılan İş Yerlerinde İş Sağlığı ve Güvenliği Poje Denetimi Değerlendirme Raporu, Türkiye.
- Dean, B.J., Brooks, T.M., Hodson-Walker, G., Hutson, D.H., 1985, "Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals", Mutation Research, Vol.153, pp.57-77.
- Delen, N., Tosun, N., Toros, S., Öztürk, S., Yücel, A., Çallı, S., 1995, "Tarım İlaçları Kullanımı ve Üretimi", T.M.M.O.B. Ziraat Müh. Odası, Türkiye Ziraat Mühendislik Teknik Kongresi, 2. cilt, , Ankara, 1015-1028.
- Demirsoy, A., 1991, "Biyoloji Genetik", Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, Lisans Tamamlama Programı.
- Diril, N., Sümer, S., İzbirak, A., 1988, "Türkiye'de çevre kirliliğine neden olan bazı pestisitlerin Salmonella/mikrozom test sistemi kullanılarak mutajenitelerinin saptanması", Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Deniz Bilimleri ve Çevre Araştırmaları Grubu, Ankara.
- Douglas, G.R., Nestmann, E.R., Grant, C.E., Bell, R.D., Wytsma, J.M., Kowbel, D.J., 1981, "Mutagenic activity of diallate and triallate determined by a battery of in vitro mammalian and microbial tests" Mutation Research, Apr; vol: 85(2), pp.45-56.
- Dökmeci, I., 1994, "Toksikoloji, Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi", Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 364-547p.
- Dökmeci, I., 1994, "Toksikoloji, Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi", Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 364p.
- Erensayın, C., 2000, "Genetik", Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 165-183p
- Falakalı, B., 1993, "Genel Genetik", Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, İzmir, 84-97p
- Gajewska, J., Szczycka, M., Tudek, B., Szymczyk, T., 1990, "Studies on the effect of ascorbic acid and selenium on the genotoxicity of nitrofurans:nitrofurazone and furazolidone", Mutation Research, 232(2):191-197.

- Gathouse, D., G., Rowland, I.R., Willox, P., Dander, R.D. and Foster, R., 1998, Bacterial Mutation Assay, Basic Mutagenic Recommended Procedure The Bath, Press, Avon Research, 227-234.
- Gedikli S., 2001, "Kayseri İli İçme Sularında Organoklorlu Pestisit Kalıntılarının Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Gren, M.H.L., Muriel, W.J., 1976, "Mutagen testing using Trp⁺ reversion in E. coli", Mutation Research, 38, 3-32.
- Güler, Ç., Çobanoğlu, Z., 1997, "Pestisitler", Bölüm I, Sağlık Bakanlığı Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi No: 52, I. Baskı, Ankara, Türkiye.
- Gündüz, T., 1998, "Çevre Sorunları", 160-175, Ankara.
- Hakura, A., Mochida, H., Yamatsu, K., 1993., Dimethyl Sülfoxide is Mutagenic for Bacterial Mutagenicity Tester Strains, Mutation Research, 303(3), 127-33.
- Hamasaki, T., Sato, T., Nagase, H., Kito, H., The Genotoxicity of Organotin Compounds in SOS Chromotest and Rech-Assay. Mutat. Res., 280, 195-203, 1992.
- Hannon, A. M., Aboul-Enein, Y.H., Al Dakan, A., 1985, Histidine Reversion in Ames Salmonella Strains Induced by Extract of 'Khat' a Substance of Abuse, Research Communication in Substances of Abuse, 6(3), 179-187.
- Hayashi, M., Tice, R.R., Mac Gregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Volders, M.K., Oleson, F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutov, S., Vannier, B., 1994, in vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. Mutat. Res., 312, 293-304.
- Hejduk, J. and Z. Svobodova, 1980, Acute Toxicity of Carbamate-Based Pesticides for Fish, Acta Vet. Brno 49(3/4):251-257.
- Helvacı N.D., 2003, "Methidathion İnektisinin Allium cepa L. Kök Ucu Hücrelerinde Mitoz Bölünme ve Kromozomlara Etkisi", Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- IARC, 1980, Monographs on the evaluation of the corcinogenic risk of chemicals to humans, Suppl.2, Long Term and Short Term Screening Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal, IARC Monographs Supplement 2. IARC Lyon, International Agency for Research on Cancer.

- Isono, K., Yourna, J., 1974, "Chemical carcinogens as frame shift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens", The Proceedings of the National Academy of Sciences, USA., 71, 1612-1617.
- İpek, E., Zeytinoğlu, H., Okay, S., Tüylü, B., Kürkcüoğlu, M., Can Başer, K.H., 2005, "Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test", Food Chemistry, Vol.93, pp.551-556.
- Kalaycıoğlu A., Öner C., 1994, "Bazı bitki özütlerinin antimutajenik etkilerinin Ames/Salmonella test sistemi ile araştırılması", Doğa. Turkish Journal of Botany, 117-122.
- Kalkan N., 1996, "Ames Test Yöntemi ile Dört Ayrı Sentetik Quinoxalin Türevinin Farklı Dozlardaki Mutajenik Aktivitesinin ve Mutajenliğinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Kaplan, Ç., Diril, N., Şahin, S., Cehreli, M.C., 2004, "Mutagenic potentials of dental cements as detected by the Salmonella/microsome test", Biomaterials, Vol.25, pp.4019-4027.
- KLUG, W.S and CUMMINGS, M.R., Concept of Genetics, 6 th Edition, 0-13-081626-4 (Çev: ÖNER, C. Genetik Kavramlar, Palme yayıncılık, 816, 2002)
- Kutlu, M., Aydoğan, G., Susuz, F., Özata, A., 2004, "The Salmonella mutagenicity of water and sediments from the Porsuk River in Turkey", Environmental Toxicology and Pharmacology, 17:111-116.
- Lee, H., Bian, S.S., Chen, Y.L., 1994, Genotoxicity of 1,3-dithiane and 1,4-dithiane in the CHO/SCE Assay and the Salmonella/Microsomal Test. Mutat. Res., 312, 213-218.
- Leite, A.C.L., Vieira, R.F.F., Moreira, D.R.M., Brondani, D.J., Srivastava, R.M., Silva, V.F., Junior, M.A.M., 2005, "Genotoxic activity of 3-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl) propionic acid and its peptidyl derivatives determined by Ames and SOS response test", Mutation Research, 30,588(2):166-71.
- Leonard, A., Gerber, G.B., 1996, Mutagenicity, carcinogenicity and Teratogenicity of Antimony Compounds. Mutat. Res., 366,1-8.
- Levin, D. E., Yamasaki, E., Ames, B.N., 1982, A new Salmonella tester strain, TA 97 for the detection of framshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hot-spot, Mutat. Res., 94, 315-330.

- Majone, F., Brunetti, R., Fumagalli, O., Gabriela, M., and Levis, A.g., 1990, Induction of Micronuclei by Mitomycin C and Colchicine in the Marine Mussel *Mytilus Galloprovincialis*. *Mutat. Res.*, 244, 147-151.
- Mano, H., Yamamoto, M., Araya, J.C., Kato, K., Tsutsui, M., Ohta, T., Yoshida, K., Kinebuchi, H., Hayatsu, H., 1993, Mutagenicity of Blue rayon Extracts of Human Bile in the Ames Test, *Mutation Research*, 290, 303-309.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983, "Revised methods for the mutagenicity test", *Mutation Research*, Vol.113, pp.173-215.
- Mc Cann, J., Ames, B.N., 1976, "Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion", *The Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.*, Vol.73, pp.950-954.
- Mercangöz, A., Ayaz Tüylü, B., 2000, "2, 4, 5 tri (süstitüe) fenil imidazol ve türevlerinin mutajenik etkilerinin Ames/Salmonella test sisteminde saptanması", *Turkish Journal of Biology*, Vol.24, pp.57-64.
- Oraler, G., 1990, *Genetik*, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 177-122.
- Öksüzöğlü E., 1997, "Bazı Bitki Büyüme Hormonlarının Mutajenitesinin Salmonella/mikrozom ve SOS Kromotest Sistemleri ile Araştırılması", *Bilim Uzmanlığı Tezi*, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Öner, C., 2003, "Genetik Kavramlar", Palme Yayıncılık, 6. baskıdan çeviri, Türkiye, 455-467p
- Özerol, E., 1996, "Sitokrom P-450 monoooksijenaz enzim sistemleri", *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 3(3), 257-275.
- PAI, C.A., 1985, *Foundation of genetics, A Science for Society*, Keyford Press, Singapur.
- Pandey, N., Gundevia, F., Ray, P.K., 1990, "Evaluation of the mutagenic potential of endosulfan using the Salmonella /mammalian microsome assay", *Mutation Research*, Oct, 24, 2(2):121-5.
- Perry, P., Evans, H., 1975, "Cytological detection of mutagens-carcinogens exposure by sister chromatid Exchange", *Nature (London)*, 258, 121-125.
- Pienta, R.J., Poiley, J.A., Leebheiz, W.B., 1977, "Morphological transformation of early passage golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary

- cultures as a reliable in vitro bioassay for identifying diverse carcinogens”, *International Journal of Cancer*, 19, 624-655.
- Preston, R.J., Bender, A.W., Breven, J.G., Carrano, A.V., Heddle, J.A., McFee, A.F., Wolf, S., Wassom, J.S., 1981, “Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays”, *Mutation Research*, 143-188.
- Ramel, C., Rannung, U., 1980, “Short- term mutagenicity test”, *Environmental Health*, Vol.6, pp.1065-1076.
- Reid, K.A., Maes, M.A., Staden, J.V., Kimpe, N.D., Mulhollve, D.A., Verschaeve, L., 2006, “Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants”, *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.106, pp.44-50.
- Sarrif, A.M., Arce, G.T., Krahn, D.F., O’Neil, R.M., Reynolds, V.L., 1994, “Evaluation of carbendazim for gene mutations in the Salmonella/Ames plate-incorporation assay: the role of aminophenazine impurities”, *Mutation Research, Genetic Toxicology*, 321(1):43-56.
- Stavric, B., Matula, T.I., Klassen, R., Downie, R.H., 1996, The effect of teas on the in vitro mutagenic potential of heterocyclic aromatic amines, *Food Chem. Toxicol*, 34(6), 515–523
- Singer, B., Gerunbeger, D., 1994, *Molecular Biology of Mutagenesis and Carcinogenesis*, 335.
- Sümer, S., İzbirak, A., Diril, N., 1991, “Bazı klorlu insektisitlerin mutajenik etkilerinin Ames testi ile saptanması” *Doğa-Türkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*, Vol.5, pp.114-121.
- Sürmeli, A., 2003, “Organik tarım ve gelişim ilkeleri”, *Dev.Maden-Sen*, Ankara.
- Svehu, S.S., Waters, M.D., Mortelmans, K.E., Evans, E.L., Jotz, M.M., Mitchell, A.D., Kasica, V., 1984, “Evaluation of diallate and triallate herbicides for genotoxic effects in a battery of in vitro and short-term in vivo tests” *Mutation Research*, Jun, 136(3):173-183.
- Trosko, J.E., 1997, Challenge to the Simple Paradigm that ‘Carcinogens’ are ‘mutagens’ and to the in vitro and invivo Assay Used to Test the Paradigm. *Mutat. Res.*, 373,245-249.
- Tutgun,S., 1996, Kadın ve Erkeklerde Yaşlanmayla Birlikte Artan Mikronükleus Oranının Saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.

- UNIDO, Birleşmiş Milletler Sanayi Kalkınma Teşkilatı, 1983
- Uslu, O., Türkman, A., 1987, "Su kirliliği ve kontrolü", T.C. Başbakanlık Çevre Genel Müdürlüğü Yayınları Eğitim Dizisi:1, Ankara, 118-125.
- Varella, S.D., Pozetti, G.L., Vilegas, V., Varvea, E.A., 2004, "Mutagenic activity in waste from an aluminum products factory in Salmonella/microsome assay", *Toxicology in vitro*, Vol.18, pp.895-900.
- Vogel, E., Sobels, F.H., 1976, "The function of Drosophila in genetic toxicology testing, chemical mutagens, principles and methods for their detection", New York, London, Plenum Press, Hollaender, A., 4.
- Vural, N., 1984, "Toksikoloji", Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, No. 56, Ankara, 32-81p.
- Vural, N., 1996, "Toksikoloji", Ankara Üniversitesi Basımevi, , Ankara, 344-363p.
- Yücer, M.M., 1996, "Zirai Mücadele İlaçları", Yenilik Basımevi, Ankara, 44p.
- Zdzienicka, M., Zielenska, M., Tudek, B., Szymczyk, T., 1979, "Mutagenic activity of thiram in Ames tester strains of Salmonella typhimurium" *Mutation Research*, Sep, 68(1):9-13.
- Zhuleva, L.Y. and Dubinin, N.P., 1994, Use of the Micronucleus Test For Ecological Monitoring In Astrachan Oblast. Vol. 30, No.7, 999–1004.
- Quillardet, P., Hofnung, M., 1985, "The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins:procedures", *Mutation Research*, 147, 65-78.
- Watanabe-Akanuma, M., Ohta, T., Sasaki, Y.F., 2005, "A novel genotoxic aspect of thiabendazole as a photomutagen in bacteria ve cultured human cells", *Toxicology Letters*, 158:213-219.
- Wells, C. E. Validation study of a method for pesticide residues in foods and animal feeds. *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 50: 1205-1215, 1967.
- Wyszyn'ska, K., Liro, W.C., 1991, The Use of Cytogenetic Tests For Evaluation of Mutagenic Properties of Selected Dyes Applied in Textile and Cosmetic Industry. *Genetica Polonica*, Vol. 32, No.3.
- Wyszyn'ska, K., Przybojewska, B., Spiechowicz, E., Liro, W.C., Dziubaltowska, E., Ryzdzynski, K., 1994, Cyanuric Chloride Has No Genotoxic and Mutagenic Properties in Bacteria and Bone Marrow Cells. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, Vol. 7, No. 3, 281–289.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	Ahmet BARIŞ
Doğum Yeri	Eskişehir
Doğum Tarihi	21.01.1982
Medeni Hali	Bekâr
Yabancı Dili	İngilizce
	Eğitim Durumu
Lise	Bilecik-Bozüyük Anadolu Öğretmen Lisesi
Lisans	Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi-
Yüksek Lisans	Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi-