

FARKLI TİPTEKİ FUNGUSİTLERİN
MUHTEMEL MUTAJENİTELERİ
ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dilek AKYIL

Danışman
Prof. Dr. Muhsin KONUK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Eylül 2006

“Bu tez çalışması 051.FENED.01 numaralı proje olarak A.K.Ü BAPK tarafından desteklenmiştir.”

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI TİPTEKİ FUNGUSİTLERİN
MUHTEMEL MUTAJENİTELERİ
ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Dilek AKYIL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman
Prof. Dr. Muhsin KONUK

AFYON
2006


Dilek AKYIL'ın yüksek lisans olarak hazırladığı "Farklı Tipteki Fungusitlerin Muhtemel Mutajeniteleri Üzerine Bir Çalışma" başlıklı bu çalışma, lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

19 / 09 /2006

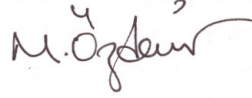
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Muhsin KONUK
(Başkan, Danışman)



Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Elif KORCAN



Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nunGün
vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI TİPTEKİ FUNGUSİTLERİN MUHTEMEL MUTAJENİTELERİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Dilek AKYIL

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muhsin KONUK

Bu çalışmada, tarım sektöründe oldukça sık kullanılan 4 farklı pestisit (fluoroglycofen-ethyl, fenoxanil, pyracarbolid ve benodanil) mutajenik etkileri, kısa zamanlı bakteriyel mutajenite test sistemlerinden olan *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile araştırılmıştır. Çalışmada *Salmonella typhimurium*'un iki suşu olan TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Bunun için her iki suş mikrozomal enzimler içeren metabolik aktivasyon (S9) varlığında ve yokluğunda, ilk üç madde için test bileşiklerinin 0.1 µg/plak, 1 µg/plak, 10 µg/plak, 100 µg/plak ve 1000 µg/plak konsantrasyonları, benodanil için ise 0.05 µg/plak, 0.5 µg/plak, 5 µg/plak, 50 µg/plak ve 500 µg/plak konsantrasyonlarında iki bağımsız paralel deneyde test edilmiştir. S9 yokluğunda pozitif kontrol olarak TA 98 için 4-nitro-o-fenilendiamine, S9 varlığında ise 2-aminofluorene, TA 100 için ise S9 varlığı ve yokluğunda sodyum azid kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise çözücü DMSO ve spontan kontrol grupları kullanılmıştır. Test sonuçları iki deneyin ortalaması alınarak değerlendirilmiş, pozitif ve negatif kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak; test edilen bu pestisitlerden sadece fenoxanil'in TA 100 suşunun S9 varlığında ve yokluğunda 100 ve 1000 µg/plak dozlarında mutajeniteye rastlanılmıştır.

2006, 98 sayfa

Anahtar Kelimeler: Ames test, mutajenite, pestisitler, fluoroglycofen-ethyl, fenoxanil, pyracarbolid, benodanil

ABSTRACT

M.Sc

A STUDY ON POSSIBLE MUTAGENICITY OF DIFFERENT TYPES OF FUNGUCIDES

Dilek AKYIL

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 (fluoroglycofen-ethyl, fenoxanil, pyracarbolid ve benodanil) used in agriculture widely have been investigated by using short-term bacterial mutagenicity test system namely *Salmonella*/microsome. In the *Salmonella*/microsome test system the mutant strains used are *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100. Therefore, both test strains were tested in the absence or presence of S9 metabolic activation. For this, the first three test compounds 0.1 µg/plate, 1 µg/plate, 10 µg/plate, 100 µg/plate and 1000 µg/plate concentrations, and for benodanil; 0.05 µg/plate, 0.5 µg/plate, 5 µg/plate, 50 µg/plate and 500 µg/plate concentrations were tested in two paralel independent experiments. 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. At the absence and presence of S9, sodium azid was used as a positive control for TA 100. 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 100 and 1000 µg/plate doses of fenoxanil was found mutagenic in TA 100 with or without S9.

2006, 98 pages

Key words: Ames assay, mutagenicity, pesticides, fluoroglycofen-ethyl, fenoxanil, pyracarbolid, benodanil

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	3
2.1. Mutasyon	3
2.1.1. Kromozom Mutasyonları	4
2.1.1.1. Kromozom Sayısı Değişimleri	4
2.1.1.2. Kromozom Yapı Değişimleri	5
2.1.2. Gen Mutasyonları	8
2.2. Mutajenler	10
2.3. Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyonu	10
2.4. Mutajenik ve Kanserojenik Maddelerin Saptanması Teknikleri ve Ames Testi ..	13
2.5. Salmonella/ mikrozom Test Sistemi	17
2.5.1. Histidin Mutasyonu	19
2.5.2. Rfa Mutasyonu	20
2.5.3. uvrB Mutasyonu	20
2.5.4. R-faktörü	20
2.6. Pestisitlerin Tanımı	21
2.7. Pestisitlerin Sınıflandırılması	22
2.7.1. Herbisitler	25
2.7.2. İnsektisitler	25
2.7.3. Fungusitler	26
2.8. Pestisitlerin Tarihçesi	27
2.9. Pestisitlerin Yayılımı	29
2.10. Türkiye’de Pestisit Kullanımı	33
2.11. Pestisitlerin İnsanlara Etkisi	34
2.12. Pestisitlerin Toprağa, Suya, Bitkilere ve Hayvanlara Etkisi	36
2.13. Ames/Salmonella/mikrozom Test Sistemi Kullanılarak Yapılan Çalışmalar ...	38
3. MATERYAL ve METOD	49
3.1. Materyal	49
3.1.1. Kimyasal Maddeler	49
3.1.2. Salmonella typhimurium Test Suşları	49
3.1.3. Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları	50
3.1.4. Test Maddeleri (dozları ve hazırlanışı)	58
3.2. Metod	60
3.2.1. Salmonella Suşlarının Kültürlerinin ve Master Plaklarının Hazırlanması	60
3.2.2. Salmonella Suşlarının Stoklanması ve Stok Kültürlerin Açılması	60
3.2.3. Salmonella Suşlarının Kontrol Testlerinin Yapılması	61
3.2.3.1. Bakterilerin genotiplerinin kontrol edilmesi	61
3.2.4. Sıvı Kültürün ml’indeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi	63
3.2.5. Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması	64
3.2.6. Memeli Karaciğer S9 Fraksiyonunun Hazırlanması	64

3.2.6.1. Rat Karaciğer Enzimlerinin İndüksiyonu	64
3.2.6.2. Karaciğer S9 Fraksiyonunun Hazırlanması	65
3.2.6.3. S9 Karışımının Hazırlanması	65
3.2.7. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı.....	66
3.2.7.1. S9'suz (-) Deney	66
3.2.7.2. S9'lu (+) Deney	67
4. BULGULAR	68
4.1. Genetik İşaretlerin Kontrolü	68
4.2. S9 Fraksiyonunun Protein Miktarı.....	71
4.3. Çalışmada Kullanılan Pestisitlere Ait Bulgular	71
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	75
KAYNAKLAR.....	82
TEŞEKKÜR.....	91
ÖZGEÇMİŞ	92

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>S. typhimurium</i> TA 98 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları	69
Şekil 2. <i>S. typhimurium</i> TA 100 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları	69
Şekil 3. <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşlarının <i>uvrB</i> mutasyonu	
kontrolü sonuçları.....	69
Şekil 4. <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşlarının <i>rfa</i> mutasyonu	
kontrolü sonuçları	70
Şekil 5. <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşlarının R-faktör mutasyonu	
kontrolü sonuçları	70
Şekil 6. <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşlarının spontan olarak geriye	
dönüş sıklığı kontrolü sonuçları	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Mutajenlerin saptanması için geliştirilmiş kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetiksel ve biyokimyasal yollar	15
Çizelge 2. <i>Salmonella typhimurium</i> mutant suşlarının genetik özellikleri	18
Çizelge 3. Bileşimindeki etkili madde grubuna göre pestisitlerin sınıflandırılması	24
Çizelge 4. Pestisitlerin 1979'dan 2002'ye kadar, etki ettikleri canlı gruplarına göre tüketimleri	34
Çizelge 5. Çalışmada kullanılan pestisitlerin genel özellikleri	59
Çizelge 6. <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşları ile denenen pestisitlerin (S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda) plak inkorporasyon testi sonuçları	72

1. GİRİŞ

Son yıllarda giderek artan nüfus ve buna bağlı olarak da çevre kirliliği, yaşayan bütün canlıları olumsuz yönde etkilemekte ve canlıların sağlıklarını her yönden tehdit etmektedir. Sanayileşme, kullanılan çeşitli ilaçlar, gıdalara katılan tatlandırıcı ve renklendiriciler, tarımda bitkileri zararlılardan korumak için kullanılan çeşitli kimyasallar çevre kirliliğine büyük ölçüde sebep olan etmenlerdir. Sonuçta bu kirlenmeler tüm canlıların günlük yaşamlarında doğrudan ya da dolaylı olarak canlılara zarar vermekte ve çevre kirliliği toplumlarda önemli bir sorun haline gelmektedir. Canlıların olumsuz yönlerde etkilenmesine neden olan sorunların başında doğal ya da sentetik kimyasal maddeler gelmektedir.

Endüstri devriminin ardından, I. Dünya Savaşı ve özellikle II. Dünya Savaşı'ndan sonra sentetik kimyasal maddelerin sayısı ve üretiminde büyük bir gelişme olmuştur. Bugün 5.000.000 kimyasal madde bilinmektedir. Tıp, tarım, endüstri ve ev gereksiniminde kullanılanların sayısı 70.000'e ulaşmıştır. Son 50-100 yıl içerisinde tıp, endüstriyel, tarımsal ve ev gereksinimleri için kullanılan kimyasal maddelerin sayı ve miktar olarak hızla artması, nükleer enerjinin kullanılması ile ortaya birçok toksikolojik olaylar çıkmıştır (Vural 1996).

Çevresel faktörlerin, kalıtsal doğum bozuklukları, kalp hastalıkları, yaşlanma, katarakt ve gelişimsel doğum bozukluklarına neden olmalarının yanı sıra kanserin temel nedeni olduklarına ilişkin hipotez, gün geçtikçe destek kazanmaktadır. Üreme hücrelerinin DNA'sında ortaya çıkan hasar, gelecek kuşaklarda kendini gösterecek genetiksel bozukluklara neden olabilir. Somatik hücrelerin DNA'sında ortaya çıkan mutasyon, normal hücresel mekanizmaları değiştirerek, kanserli hücrelerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Vural 1996).

Mutasyonlar kendiliğinden veya kimyasal maddeler ya da iyonize radyasyon gibi dış faktörlerin etkisiyle meydana gelmektedirler. Sıklıkla genetik toksisiteye sebep olan çevredeki bu mutajenik maddelerin aktivitelerinin gözlemlenmesi ve değerlendirilmesi oldukça önemlidir (Sato ve Tomita 2001).

İnsan çevresindeki kimyasal kirlilik tamamen kontrolümüz dışında hızla artmaktadır. Pestisitler de, bu kimyasal çevre kirleticilerinden bir kısmını oluşturur. Fazla miktarda ve yaygın olarak pestisit kullanımı büyük tarımsal ürün kayıplarını azaltırken, bir yandan da insanlar için giderek artan bir sağlık riski oluşturmaktadır. Pestisitler ve bunların kalıntıları çeşitli zaman ve yerlerde biyolojik besin zincirine girerek akut ve kronik zehirlenme tehlikesinden başka, muhtemelen mutajenik etkileri gelecek nesillerin genetik sağlığını tehdit etmektedir (Kalkan 1996).

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 karsinojenite 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 vd. 1981), *Bacillus subtilis* (Leifer vd. 1981), *Neurospora crassa* (Brockman 1984), *Drosophila melanogaster* (Vogel ve Sobels 1976), Çin hamsteri hücreleri, Çin hamsteri ovaryum ve akciğer hücreleri (Beaudet 1973) ile yapılan deneyler verilebilir.

Dr. Bruce Ames tarafından geliştirilmiş ve Ames testi olarak da adlandırılan *Salmonella*/mikrozom test sistemi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında en yaygın olarak kullanılan, mutajen-karsinojen etkisi en iyi bilinen ve geçerliliği en fazla kabul edilmiş kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden birisidir (Maron ve Ames 1983).

Bu çalışmanın amacını, tarımda çok geniş bir kullanım alanına sahip olan 4 farklı pestisit (fluoroglycofen-ethyl, fenoxanil, pyracarbolid ve benodanil) kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden olan *Salmonella*/mikrozom testi ile mutajenik etkilerini araştırmak oluşturmaktadır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1. Mutasyon

Birçok genetik kavramın geliştirilmesinde, kalıtsal materyalin yapı ve içeriğinin dölden döle geçerken değişmediği kabul edilir. Her ne kadar genler dikkati çekecek kadar kararlı ve yeni döllere bütün özelliklerini koruyarak katılıyorsa da, zaman zaman doğal ve yapay koşullar altında mutasyon dediğimiz değişikliklere uğrarlar (Oraler 1990).

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

Birçok araştırmacı çok çeşitli mutasyon tanımlamaları yapmışlardır: Genlerin nükleotid dizisinde herhangi bir nedenle meydana gelen ve kalıtsal olan değişikliklere (Ateş 2002), canlılarda, gen rekombinasyonu dışındaki nedenlerle meydana gelen kalıtsal değişikliklere (Bahçeci 2002), genetik materyali oluşturan nükleotidlerin sıralanması, sayısı ya da çeşidinde ortaya çıkan kalıtsal değişikliklere mutasyon denir (Oraler 1990, Demirsoy 1991). Mutasyon terimi daha geniş anlamda kromozom mutasyonları ve gen mutasyonları olarak 2 büyük gruba ayrılmaktadır (Ateş 2002, Bahçeci 2002, 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 jenerasyonda 10^{-5} - 10^{-10} gibi düşüktür. İki ayrı gende aynı anda iki ayrı mutasyonun oluşma olasılığı ise 10^{-10} - 10^{-20} gibi çok daha düşüktür (Oraler 1990).

Bir sınıflama kolaylığı sağlamak üzere mutasyonlar kromozomların sayı veya yapılarındaki değişiklikler ile sitolojik olarak kromozom düzeyinde gözlenemeyen, ancak bireyin fenotipindeki farklılıkla saptanabilen gen mutasyonları olarak gruplandırılabilirler (Oraler 1990).

2.1.1. Kromozom Mutasyonları

Kromozomun büyük parçalarını ilgilendiren mutasyonlara kromozom mutasyonları denir. Kromozom mutasyonları, kromozom sayısı değişimleri ve kromozom yapısı değişimleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Başaran vd. 1995, Ateş 2002, Bahçeci 2002).

2.1.1.1. Kromozom Sayısı Değişimleri

Kromozom sayısındaki çeşitlilik, bir ya da daha fazla haploit kromozom takımının ilavesinden, bir ya da daha fazla kromozom ilavesi ya da kaybına kadar değişkenlik gösterir (Öner 2003). Organizmaların hem doğal hem de laboratuvar popülasyonlarında kendiliğinden meydana gelen kromozom sayısındaki değişimlerdir. Ayrıca izole edilmiş hücre ya da dokulara çeşitli mutajenik maddelerin uygulanmasıyla da bu mutasyonlar meydana getirilmektedir (Demirsoy 1991). Bu mutasyonlar öploidi ve anöploidi olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır.

Öploidi

Kromozom sayısındaki artış ve azalışlar temel kromozom sayısının tam katları kadar oluyorsa buna öploidi ve sayıya da öploid denir (Başaran vd. 1995). Poliploidi de bir öploid durumudur ve temel kromozom sayısının ikiden daha çok artması durumunda oluşur (2n, 3n, 4n, 5n gibi). 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).

Anöplöidi

Anöplöidi, bazı kromozomların genomdaki kaybı (eksilmesini) veya çoğalmasını (ilavesini) ifade eder. Bu durum gametogenezde hatalı bir kromozom ayrılması ile ortaya çıkmaktadır. Normalde mayoz bölünme sırasında homolog çiftin biri bir kutba diğeri karşıt gruba gider. Fakat bazen bir kromozom bir kutba homologu ile birlikte çekilerek aynı gamette yer alırlar. Bu olaya mayotik non-disjunction (homolog kromozom çiftlerinin segragasyon sırasında ayrılmaması) denilir. Ayrılmama, ya birinci ya da ikinci mayotik bölünme sırasında ortaya çıkabilir (Erensayın 2000, Falakalı 1993, Öner 2003). Anöplöidi sonucunda ($n+1$) ve ($n-1$) gametler gelişir. Böyle gametler normal gametlerle birleştikleri zaman çeşitli bozukluklara yol açarlar (Başaran vd. 1995).

2.1.1.2. Kromozom Yapı Değişimleri

Kromozom yapı değişikliklerinin çoğu, genetik materyalin kaybı ya da yer değiştirmesi sonucu ortaya çıkan bir ya da daha fazla kromozom kırıklarından kaynaklanır. Kromozomlar kendiliğinden kırılabilir, ancak kimyasallara ya da radyasyona maruz kalan hücrelerde kromozomların kırılma oranı daha yüksektir (Öner 2003).

Bir kromozom kırılmasını, kromozom segmentlerinin tekrar birleşmesi işlemi izleyebileceği gibi bu şekilde tekrar birleşme olayı meydana gelmeyebilir. Segmentler, orijinal yapı halinde tekrar birleşirse normal kırılma da farkedilemez

olur. Kromozomlardaki bu değişikler çeşitli şekillerde meydana gelebilir (Erensayın 2000).

Delesyon

Delesyon ya da eksilme, bir kırılma sonucu, kromozomun küçük bir parçasının kopması demektir (Başaran vd. 1995).

Kopan parça eğer sentromer taşıyorsa yani asentrik ise canlılığını devam ettiremez. Çünkü mayoz ve mitoz bölünmelerde kromozomların kutuplara gitmesini yani hareketini sağlayan merkez olan sentromer olmadığı için kutuplara ulaşamaz. Böylece parça kaybolur ve üzerindeki genlerde eksilmiş olur (Falakalı 1993). Kopan parçanın sentromeri olduğu zaman ise, parça ne kadar küçük olursa olsun iğ ipliklerine tutunarak kutuplara çekilir ve hücrede kendini gösterir. Kopma iki türlü olabilir; ya bir darbe sonucu kırılan kromozom kopar (terminal delesyon) ya da iki darbe sonucu kopan parça aradan çıktıktan sonra iki parça yeniden kaynaşır (insersiyonel delesyon) (Erensayın 2000).

Duplikasyon

Duplikasyon, bir kromozom parçasının o kromozom üzerinde iki veya daha fazla tekrarla görülmesidir (Erensayın 2000). Duplikasyonlu parça, sentromerli serbest bir parça veya tamamlayıcı bir kromozom parçası olabilir. Eğer sentromere sahip, yani bir kromozom parçası ise bu parça, küçük ekstra bir kromozom olarak kabul edilir.

Duplikasyonlar, mayozda sinaps yapan kromozomlar arasında eşit olmayan crossing over sonucu meydana gelebilir ya da mayozdan önce bir replikasyon hatası sonucu oluşabilir. Birinci durumda hem duplikasyon hem de delesyon oluşmaktadır (Öner 2003).

Duplikasyonun üç değişik özelliği bulunur. Birincisi, duplikasyon geninin birden fazla kopyasının bulunmasını sağlayabilir. İkincisi, delesyonlarda olduğu gibi, duplikasyon sonucu fenotipik çeşitlilik oluşabilir. Üçüncüsü, güvenilir bir teoriye göre, duplikasyonlar evrim sürecinde genetik çeşitliliğin önemli bir kaynağıdır (Öner 2003).

İnversiyon

İnversiyon, bir kromozomun iki defa kırılması ve kopan parçanın 180° ters dönerek tekrar aynı kromozoma bağlanması şeklidir (Öner 2003, Falakalı 1993). İnversonların, sinapsis işlemi sırasında bir kromozomun bir lop oluşturduğu yerde kırılmalar olduğu zaman meydana geldiği kabul edilmektedir. 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 diziliş ters çevrildiği halde sentromerden uzanan kolların boy oranı değişmezken perisentrik inversiyonda değişir (Öner 2003).

Translokasyon

Translokasyon, bir kromozomun bir parçası (segmenti) ile homolog olmayan bir başka kromozomun bir parçasının yer değiştirilmesi olayıdır. Basit translokasyon ve resiprokal (karşılıklı) translokasyon olmak üzere ikiye ayrılır. Basit translokasyon, kırılmayı müteakip bir kromozom segmentinin homolog olmayan diğer bir kromozoma transfer edilmesi olayıdır. Resiprokal translokasyonda homolog olmayan iki kromozomun parçaları karşılıklı olarak yer değiştirilir. Bu olayın gerçekleşmesi için, en basit şekli ile homolog olmayan iki kromozom kolu değiş tokuşu sağlayabilmek için birbirine yaklaşır. Değiş tokuş kromozomun içindeki parçaları içeriyorsa, her iki kromozomda, ikişer kırık olmak üzere, dört kırılma noktası oluşmalıdır (Erensayın 2000).

2.1.2. Gen Mutasyonları

Gen mutasyonları veya başka bir deyişle nokta mutasyonları kromozomların yapısında herhangi bir değişikliğe sebep olmaz ve mikroskopla da görülmezler. DNA'da bulunan nükleotid ya da bazlarının değişmesinden ileri gelirler. Baz sırasının veya AT/GC oranının değişmesi, o gene özgü enzimin tamamen kaybolmasına ya da etkisinin azalmasına neden olur. Bir gen, binlerce baz çiftinden meydana gelmiş bir birim olduğundan ve kuramsal olarak her bazda mutasyon olabileceğinden dolayı bir genin en azından baz çifti kadar mutasyon çeşidi olabilir (Demirsoy 1992).

Gen mutasyonları hem somatik hücrelerde, hem de gametlerde veya onları verecek olan ana hücrelerde meydana gelebilir. Fakat somatik hücrelerde oluşan mutasyonlar, eşeyli üreme ile çoğalan canlılarda yeni döllere geçemezler. Mutasyonla, genellikle dominant genler resesif hale geçerler yani resesif alleller meydana getirirler. Çok seyrek olarak, mutasyonla meydana gelmiş olan resesif bir gen, başka bir mutasyonla tekrar kendisini veren dominant gene dönebilir. Bu olaya ters mutasyon veya geri mutasyon adı verilir. Geri mutasyonun meydana gelme olasılığı, mutanlığı oluşturan ileri mutasyonun olasılığından daha düşüktür (Bilge 1981, Oaler 1990).

Gen mutasyonları da ya kendiliğinden meydana gelirler ya da mutajenler tarafından meydana getirilirler. Mutajenler gen mutasyonlarının meydana geliş frekansını yükseltir (Oaler 1990).

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).

2.2. Mutajenler

Mutasyona neden olan ajanlara mutajen denir. Kansere neden olan ajanlar ise kanserojen olarak ifade edilir ve bunlar da mutajendir. 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 ve 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).

Mc Cann 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.

2.3. Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyonu

Metabolizma, yaşam için gerekli olan ve organizmada meydana gelen bütün kimyasal reaksiyonlar olarak tanımlanabilir. Organizmaya yabancı olan kimyasal maddelere ksenobiyotik adı verilir. Bunların organizmadaki kimyasal değişimlerine de metabolizma denmektedir fakat biyotransformasyon bu anlamda daha uygun bir terim olarak kullanılmaktadır (Vural 1996).

Çeşitli yollarla organizmaya giren lipofilik kimyasal maddeler enzimlerin katalitik etkisi ile kimyasal reaksiyonlara girerler ve böylece hidrofilik metabolitlere dönüşürler. Bir ksenobiyotığın canlı organizmada uğradığı kimyasal değişmelerin tümüne biyotransformasyon adı verilir. Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu organizma için birçok açıdan önem taşımaktadır (Vural 1996).

İnsanlar ilaçlar, gıdalardaki katkı maddeleri veya çevre kirliliğine neden olan maddelerin giderek artan bir biçimde etkileri altında kalmaktadırlar. Çeşitli yollarla organizmaya giren kimyasal maddeler enzimlerin katalitik etkisi ile kimyasal reaksiyonlara girerler ve böylece metabolitlere dönüşürler. Pestisitler, ilaçlar, kozmetikler, yiyecek koruyucuları gibi vücuda yabancı olan maddeler uyarılabilen izozimlerden oluşan detoksifikasyon enzim gruplarıncaya 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 1996).

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 spesifik 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, Dökmeçi 1994).

Xenobiyotiklerin biyotransformasyon mekanizmalarında iki enzim grubu yer almaktadır.

1- Faz I enzimleri: Öncelikli olarak oksidasyon, redüksiyon, hidroksilasyon ve demetilasyon işlemlerini yaparlar. Bu fazda 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. Konjuge edilmiş ürünler, yeterli derecede polar olup, hücre ve vücuttan kolayca dışarı atılırlar.

2- Faz II enzimleri: Bu fazda endojen maddelerle birleşen polar metabolitler inaktif şekilde eliminasyona uğrarlar (Vural 1996, Yüksel 1999).

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 ađ 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 xenobiyotikleri biyotransformasyona uğratırlar (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 absorbans gösterdiği için verilmiştir. Spesifik sitokrom P-450 formları, 446 ile 452 nm arasında maksimum absorbans 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).

2.4. 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 gerekmele birlikte laboratuvar hayvanları ile yapılan kanserogenezis deneylerinin hem çok zaman almaları hem de çok pahalı olmaları nedeniyle başaramayacak bir durum arz etmektedir (Bağcı 1985).

Karsinojenlerin saptanmasında genellikle sıçan ve farelerin kullanıldığı hayvan testleri yapılır. Ancak bu testler çok pahalıdır ve çok uzun zaman alırlar (Ames 1979a). Ayrıca fazla sayıda kalifiye iş gücü gerektirmeleri, besinlerdeki doğal kimyasal maddelerle, su ve hava kirleticileri gibi kompleks bileşiklerin testine uygun olmamaları ve kullanılan hayvan sayısının azlığı nedeniyle, test duyarlılığının düşük oluşu gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Asal 1983).

Bu nedenle, kimyasal maddelerin kanserojenik potansiyellerini ölçebilmek için, canlı hayvan deneyleri yerine birçok *in vitro* test sistemi geliştirilmiştir. Kısa zamanlı testler (short-term tests) diye bilinen bu testlerle kimyasal maddelerin belirli genetik sistemlerde belirli sonuçlar verip vermedikleri ölçülmekte ve elde edilen sonuçlarla maddelerin kanserojenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmaktadır (Bağcı 1985).

Mutajenlerin saptanması için geliştirilmiş kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetiksel ve biyokimyasal yollar Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Mutajenlerin saptanması için geliştirilmiş kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetiksel ve biyokimyasal yollar (Diril, 1988).

Kısa Zamanlı Testler	İzlenen Genetiksel Biyokimyasal Yol	Literatür
1. <i>Salmonella typhimurium</i>	Histidin okzotrofları	Ames vd. 1973a, Maron ve Ames 1983.
2. <i>Escherichia coli</i>	Arginin-triptofan okzotrofları	Green ve Murial 1976
	Profaj indüksiyonu	Elesperu ve Yarmolinsky 1979 Moreu vd. 1976
	Onarım eksikliği olan suşların büyümelerinin inhibisyonu	Rosenkranz ve Mermelstein 1980 Slater vd. 1971
	SOS cevabı	Quillardet ve Hofnung 1985 Quillardet vd. 1985
3. <i>Bacillus subtilis</i>	DNA onarımı hatalı suşlar	Kada ve Hirano 1980
4. <i>Neurospora crassa</i>	Adenin okzotrofları	Brockman 1984
5. Çin hamsteri ovaryum ve akciğer hücreleri	HGPRT (Hipoksantinguanin fosforiboziltransferaz) lokusunda mutasyonlar	Beaudet 1973
6. Fare karaciğeri epitel hücreleri	8-Azaguanine dirençlilik	Vogel ve Sobels 1976
7. <i>Drosophila melanogaster</i>	Kromozomal hatalar	Vogel ve Sobels 1976
8. Suriye hamsteri embriyo hücreleri	Morfolojik transformasyonlar	Pienta vd. 1977
9. Çin hamsteri hücreleri	Kardeş kromatid değişimi	Perry ve Evans 1975
10. İnsan periferik lenfositleri	Kromozomal hatalar	Preston vd. 1981

Memelilerde mutasyon testlerinin yapılmasında en önemli zorluk sebebi, memelilerin bu test sistemlerine oldukça az duyarlı olmaları yüzündendir. Bunun yanında mikroorganizmalar mutajenlere karşı çok daha fazla duyarlıdır (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).

DNA ile etkileşerek kanserojenik etki gösteren kimyasal maddeler genotoksik kanserojenler olarak sınıflandırılır. Ames, bu amaçla çok duyarlı bir yöntem geliştirmiştir. *Salmonella* bakterileri kullanarak yapılan bu yöntem genotoksik kanserojenik etkinin araştırılmasında, mutajenezis kanserojenesis ilişkisinden yararlanarak, birçok çevre kirleticileri ve ilaçlara uygulanmaktadır (Vural 1984).

Bruce Ames tarafından geliştirilen *Salmonella typhimurium* mikrozomal 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).

2.5. *Salmonella*/ mikrozom Test Sistemi

Dr. Bruce Ames tarafından geliştirilmiş ve Ames testi olarak da adlandırılan *Salmonella*/mikrozom test sistemi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında en yaygın olarak kullanılan, mutajen-karsinojen etkisi en iyi bilinen ve geçerliliği en fazla kabul edilmiş kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden birisidir (Maron ve Ames 1983).

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

Bu testin temeli, yapay mutasyon oluşturulmuş olan *Salmonella typhimurium*'un histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş (his^-) olan suşlarının test bileşeni ile muamelesinden sonra tekrar bir mutasyon geçirip his^+ haline dönüşmesi esasına dayanır (Ames 1973a).

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 ve Ames 1983). Ames testinde kullanılan suşlar ve onların genetik özellikleri Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. *Salmonella typhimurium* mutant suşlarının genetik özellikleri (Öksüzoğlu 1997).

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...

2.5.1. 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 vd. 1973b).

Salmonella typhimurium TA 100 ve TA 1535 suşlarında bulunan His G46 mutasyonu, histidin biyosentezinin ilk enzimini kodlayan hisG geni üzerindedir.

Bu mutasyon, his G geninde lösin amino asidinin kodonu olan ^{-GAG-}~~-CTC-~~ yerine prolin amino asidinin kodonu olan ^{-GGG-}~~-CCC-~~'nin gelmesine neden olur. *Salmonella typhimurium* TA 1535 ve *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu, özellikle G-C baz çiftlerinde baz çifti değişimlerine neden olan mutajenlerin keşfinde kullanılan suşlardır (Maron ve Ames 1983).

His D3052 mutasyonu, *S. typhimurium* TA 1538 ve *S. typhimurium* TA 98 suşlarında bulunur ve histidinolu histidine çeviren histidin biyosentezindeki son enzim olan histidin dehidrogenazı kodlayan his D geni üzerindedir. His D3052 mutasyonu, His D geni içinde, ^{-GCGCGCGC-}~~-CGCGCGCG-~~ dizilimi olan, 8 defa tekrarlanan GC dizisine sahiptir ve bu dizi -1 çerçeve kayması mutasyonunun yanındadır (Isono ve Yourno 1974). His D 3052 mutasyonu çerçeve kayması tipinde bir mutasyon olup çerçeve kaymasına neden olan mutajenler DNA'nın tekrarlanan diziler ya da sıcak noktalar denilen bölgelerinde görülen kodon kaymalarını geri dönüştürerek bu kodonların yeniden doğru okunmalarını sağlarlar (Ames vd. 1972). *S. typhimurium* TA 1538 ve *S. typhimurium* TA 98 suşları, çerçeve kayması mutasyonlarına neden olan mutajenler maddeler ile tekrar his⁺ hale geri dönüştürülmektedir (Maron ve Ames 1983).

Başlangıçta geliştirilen his⁻ mutantlarının çeşitli kimyasallara karşı duyarlılığını artırmak üzere, bu suşlara bazı mutasyonlar eklenmiştir. Bunlar:

2.5.2. Rfa Mutasyonu

S. typhimurium'da normal olarak mutajenlerin hücre membranına ulaşmalarında kısmi bir engel olarak iş gören bir kapsül bulunmaktadır. Bu kapsül lipopolisakkarit (LPS) yapısındadır. Bu engelin kalkması, yani LPS kusurları mutajenin bakteri içerisine girmesini kolaylaştırarak, hücrenin daha duyarlı olmasına yol açmaktadır. Rfa mutantları, polisakkaritlerin sentezinden sorumlu bir enzim bakımından kusurludurlar. Bu nedenle de büyük moleküllere karşı duyarlıdırlar. *S. typhimurium*'un his⁻ ve onarım sistemlerinde mutasyon taşıyan test suşlarından, LPS kusurlu türevler elde edilmiş, bu şekilde de sistemin mutajenlere duyarlılığı artırılmıştır (Ames vd 1973b).

2.5.3. uvrB Mutasyonu

DNA onarım sisteminde kesip çıkarma görevini üstlenen enzimi kodlayan *uvrB* genindeki delesyon sonucu oluşmuştur. *uvrB* mutasyonu, birçok mutajenin ortaya çıkarılmasında duyarlılığın artmasına neden olur. Ancak, teknik nedenlerden dolayı *uvrB* geninin kesilerek uzaklaştırılması sırasında bu delesyon biotin genine kadar uzanmaktadır. Biotin geni ise vitamin H denilen biotin sentezinden sorumludur. Bu nedenle, bakteriler üreyebilmeleri için histidin yanında biotine de gereksinim duyarlar (Ames vd 1973b).

2.5.4. R-faktörü

TA 1535, TA 1537, TA 1538 LT2'den mutajenize edilmiş plazmid taşımayan suşlardır. Ancak, bunlardan mutajenler pek iyi tayin edilememektedir. Bu yüzden bu suşlara R-faktör plazmidi, yani ampisiline dirençlilik geni taşıyan bir plazmid olan pKM 101 plazmidi yerleştirilmiştir. Bu plazmid, TA 1535'e eklenerek TA 100 suşu, TA 1537'ye eklenerek TA 97 ve TA 1538'e eklenerek TA 98 suşları elde edilmiştir. Bu iki suşun çeşitli mutagen/karsinogenlere karşı duyarlılığı, tüm diğer TA serisi bakterilerinden daha fazladır.

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 (Ames vd. 1973b). Önceki çalışmalarda mutajenik aktivite göstermeyen birçok prokarsinojenler, test sisteminin metabolik aktivasyonu içeren bu uygulaması ile pozitif sonuç vermişlerdir (Ames vd 1973b).

2.6. Pestisitlerin Tanımı

Tarım ürünlerine veya hayvansal gıdalara; üretim, hasat, depolama ve taşıma esnasında zarar veren herhangi bir zararlıyı (yabancı ot dahil) kontrol etmek ya da bunların zararlarını önlemek üzere uygulanan veya hayvanların vücutlarında bulunan herhangi bir böcek veya zararlının kontrolü amacıyla hayvanlara verilen madde veya maddelere pestisit denilmektedir (Helvacı 2003).

Pestisitler, modern tarımın tamamlayıcı bir bileşeni halindedir ve dünyanın tüm ekosistemlerinde üretim süreci bir veya daha fazla pestisit uygulamasına gereksinim duymaktadır. 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 dizayn edilmişlerdir. Hastalık, zararlı ve yabancı otların tarımsal üretimde neden olduğu kayıp ortalama olarak % 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 bileşendir ¹.

2.7. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler, fiziksel yapılarına ve formülasyon şekillerine, biyolojik dönemine, içerdikleri aktif maddeye, zehirlilik derecesine ve kullanım tekniğine göre çok değişik şekillerde sınıflandırılabilir. En yaygın kullanılan sınıflandırma şekli, formülasyon şekillerine ve kullanıldıkları zararlı grubuna göre olanıdır (Öztürk ve Özge 1978).

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 formülasyonlar
15. Akıcı Konsantreler (FC)
16. Kuru akışkanlar (Anonim 2001).

¹ <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/031pdf> 04.05.2006.

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).

Pestisitlerin kimyasal tiplerine göre sınıflandırılması

1. Organofosfatlar
2. N-metil karbamatlar
3. Klorlu hidrokarbonlar
4. Bisditiyokarbamatlar
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).

Bileşimindeki etkili madde grubuna göre yapılan sınıflandırma en bilimsel olanıdır (Öztürk ve Özge 1978). Çizelge 3'de gösterildiği bu sınıflandırmada pestisitler üç gruba ayrılmaktadır.

Çizelge 3. Bileşimindeki etkili madde grubuna göre pestisitlerin sınıflandırılması (Öztürk ve Özge 1978).

Anorganik Pestisitler	Sentetik Organik Pestisitler	Doğal Organik Pestisitler
Arsenikli Pestisitler	Organoklorürler	Rotenonlar
Civalı Pestisitler	Organofosfatlar	Pyrethrum
Florürlü Pestisitler	Organosülfürler	Nikotin
Bakırlı Pestisitler	Karbamatlar	Allethrin
Elementer Kükürt		

2.7.1. Herbisitler

Yabancı otlar verimi düşüren, kaliteyi bozan, zararlı mikroorganizma ve böceklere konukçuluk yapan, toprak işleme sayısını arttırarak toprağın yapısını bozan ve zehir etkisi olan bitkilerdir. Yabancı otlarla mücadelede kullanılan kimyasal maddelere ise herbisit denilmektedir. Herbisitler tarımsal alanların dışında yol kenarları ve demiryollarında ortaya çıkan zararlı otların temizlenmesinde kullanılırlar (Helvacı 2003).

2.7.2. İnsektisitler

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

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).

Organoklor insektisitlerin metabolizmaları ve böbrekten eliminasyonları yavaştır. İnsektisit üretiminde ve kullanımında çalışanların vücutlarında organoklorlu insektisitler birikip zehirlenmelere yol açabilmektedir. Ayrıca genel popülasyonda vücutta biriken insektisit oranı oldukça yüksek düzeylere ulaşabilmektedir (Dökmeci 1994).

2.7.3. Fungusitler

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.

Ayrıca, kültür bitkilerine zarar veren pas ve küf gibi hastalıklara karşı da fungusitler kullanılmaktadır. Bu hastalıkların etkisi mikroskobik mantar misellerinin çeşitli bitki dokularını örtmesi ile gerçekleşmektedir. Bu hastalıklara karşı mücadele, fungusitlerin yapraklara uygulanması ve böylece sporların gelişiminin önlenmesiyle olmaktadır (Akman 2000).

Fungusitlerin de diğer pestisitler gibi çevre ve canlılar üzerinde olumsuz etkileri mevcuttur. Ancak bu kimyasal bileşikler insektisit ve herbisitlere oranla daha az miktarlarda tüketilirler. Bu nedenle çevre kirliliğine olan etkileri diğer iki gruptan daha azdır. Bu grup içerisinde insan sağlığı yönünden en zararlı olan kimyasal grup civalı fungusitler grubundan olan organik civalı bileşiklerdir. Tohum ilaçlamasında kullanılan bu kimyasal bileşikler, ancak bulaştırılmış tohumların yanlışlıkla çiftlik hayvanlarına yedirilmesi ile bazı zehirlenmelere neden olmaktadır (Çelik 2003).

Fungusitlerin bazıları çok toksiktir ve birçok yaygın zehirlenmeler görülmüştür. Civalı bileşikler, bakır bileşikleri, pentachlorophenol, ditiyokarbamatlar, tetrametilthiuram disülfür (thiram) ve hexachlorobenzene sıklıkla kullanılan fungusitlerdir (Vural 1996).

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

Civalı fungusitlerin uygulandığı besinler, yanlış kullanılmaları nedeni ile birçok ölümlere ve devamlı nörolojik bozukluklara yol açmaktadır. Bu nedenle kullanımları 1970’li yıllarda yasaklanmıştır (Vural 1996).

2.8. Pestisitlerin Tarihçesi

Pestisitlerin kullanımı Roma ve eski Yunan’dan beri süregelenmektedir. Fakat 19. yüzyılın son dönemlerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. İkinci Dünya Savaşı sonrasında hastalık, zararlı ve yabancı otların kimyasal savaşımı konusunda önemli ilerlemeler olmuştur³.

Pestisit olarak kullanılan ilk maddeler arsenik ve kükürttür. Daha sonra krizantemden elde edilen pyrethrum 19. yy’dan itibaren kullanılmaya başlanmıştır. Colorado patates böceğine karşı ABD’de Paris yeşili gibi bakır arsenik bileşikleri kullanılmıştır. Bu kullanım 1860’lı yıllara kadar uzanmaktadır. Daha sonra civa ve kurşun metal bileşikleri de kullanılmaya başlanmıştır (Güler ve Çobanoğlu 1997).

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 Trikloretan)’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 mucizevi hale getirmiştir. Kimya sanayininde

³ <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/031.pdf> 04.05.2006

gelişmesiyle birlikte üretilen sentetik pestisitler yoğun olarak kullanılmıştır (Gündüz 1998).

II. Dünya Savaşı'na kadar kimyasal kontrolde sınırlı bir kaç madde kullanılmaktaydı. Bunlar bakır ve civa tuzları ve kükürdün fungusit olarak kullanılması, böceklere karşı ise arsenik, siyanür gibi genel zehirlerden yararlanılması biçimindeydi. Böceklere karşı savaşta pestisitlerin yaygın kullanımı 1940'lı yılların ortalarında başladı. 1939 yılında İsviçreli kimyacı Paul Mueller DDT'nin pestisit özelliklerini belirledi. 1942 yılında piyasaya çıkan DDT hızla yaygın kullanıma girdi. İkinci Dünya Savaşı'nda yeni bir sinir gazı üzerinde çalışan Alman bilim adamları organofosforlu bir insektisiti, parathionu buldular. Parathion 1943 yılında pazara sunuldu. Yine fenoksi herbisitlerin 2, 4-D, ve 2, 4, 5-T herbisitlerin kullanımı 1940'lı yılların başlangıcında devreye girdi. II. Dünya Savaşı'nda botanik kökenli pestisitlerin ülkeye sağlanması güçleştğinde ABD'de ve diğer ülkelerde organik kimyasallara yönelinmiştir. 1940 yılında benzen heksaklorür İngiltere'de ve Fransa'da insektisit olarak kabul edilmiştir (Güler ve Çobanoğlu 1997).

1943'de ilk fungusit olan zineb, 1945'de ilk herbisit amonyum sülfamat, 1949'da captan ve allethrin, 1951'de insektisit olan isolan, dematen, pyromat ve pyrolan sentezlenmiş ve insanların hizmetine sunulmuştur (Anonim 2001).

Daha sonraki yıllarda bu kimyasal maddelerin, bitki koruma alanında, hastalıklarla mücadelede, salgınların önlenmesinde, haşerelerin yok edilmesi gibi birçok alanda başarılı bir şekilde kullanılmasıyla üretimleri ve tüketimleri oldukça artmıştır (Helvacı 2003).

Pestisitlerin bu yararlarının yanı sıra kullanılmaları sırasında meydana getirdiği bazı zararlar da vardır. Bu pestisitler sadece hedef alınan ve istenmeyen canlılara ulaşmaz. Canlı ve cansız faktörlerin etkisiyle ekosistemde dolaşıma girerek hava, yeraltı ve yer üstü suları, toprak ve çok çeşitli tipteki yiyecekler bu pestisitler veya bunların metabolitleri ile kirlenmektedirler. Sonuçta tahıl ve sebze yetiştiricileri

ve tüketicileri, bu maddelerin üretiminde çalışan ve uygulayan işçiler, bunların kirlettiği hava, su ve toprağı kullanan bütün canlılar, hedef alınmadıkları halde, bu kimyasalların etkilerine maruz kalmaktadırlar (Çelik 2003).

Pestisitlerle ilgili ilk ciddi eleştiri Rachel Carson'un 1962 yılında yayımladığı Silent Spring kitabıyla ortaya çıkmıştır. DDT ve klorlu hidrokarbonların çevredeki dayanıklılığını, insan ve hayvanların yağ dokularında birikimini, hedef olmayan veya olmaması gereken türler üzerindeki toksik etkisiyle, ekolojik ve insan sağlığıyla ilgili yıkıcı etkilerini dile getirmiştir (Güler ve Çobanoğlu 1997).

Birçok ülke 1970'li yıllarda çevrede kalıcı olan organoklorlu bileşiklerin kullanımını kısıtlamak ya da tamamen yasaklamak konusunda kanuni düzenlemelere gitmiştir. Amerika'da DDT kullanımı 1972'de yasaklanmıştır. Türkiye'de ise 1982'den sonra organoklorlu pestisit etken maddelerinden sadece DDT, endosülfan, heptaklor, quintozen ve toksafenin kısıtlı kullanımına izin verilmiştir. 1985 yılında endosülfan, quintozen ve toksafen dışındaki klorlu pestisitlerin kullanımı yasaklanırken, 1989 yılında toksafen dışındaki klorlu pestisitlerin kullanımı yasak olan klorlu pestisitler içine alınmıştır (Vural 1996, Yücer 1996).

2.9. Pestisitlerin Yayılımı

Pestisitler çok çeşitli uygulama alanlarına sahip olduklarından dolayı oldukça fazla miktarda kullanılmaktadırlar. Kullanım sıklığına bağlı olarak yayılımları da geniş bir alana sahiptir. Pestisitler doğrudan ya da dolaylı olarak havaya, sulara, toprağa, yiyeceklere karışmakta ve en son olarak insanlar üzerinde zararlı etkilere sebep olabilmektedir.

Hiç pestisit uygulaması yapılmayan kutuplardaki penguenlerde, ayı balığı ve eskimolarda DDT'nin varlığının saptanması, bazı tarım ilaçlarının dünyadaki sirkülasyonunun ne kadar güçlü olduğunu göstermesi bakımından önemlidir ⁴.

Bitki koruma ilaçlarının çevredeki sirkülasyonu, çok yönlü karmaşık bir yapıya sahiptir. Örneğin tarla, bahçe veya orman ağaçlarının hastalık veya zararlılara karşı ilaçlanması sırasında ilaç zerreleri havaya, toprağa, topraktan yağmurlarla yeraltı sularına ve dolayısıyla su ekosistemine karışabilmektedir. Bitkiler üzerindeki kalan pestisit kalıntıları ise bazen besin yoluyla insan ve hayvanlara geçmekte ve ani zehirlenmeler, hatta genetik yapıyı etkileyecek ve kansere sebep olabilecek düzeyde tehlikeler yaratabilmektedir ⁴.

Pestisitler havaya; püskürtme, sis ve duman makineleri, basınçlı kutulardan bireylerin püskürtmesi yoluyla karışmaktadır. Parçacıkların büyüklüğüne, dağılan hacme, hava akımının hızına, havanın sıcaklığına, diğer bazı faktörlere bağlı olarak belirli bir süre alanda kalabilir veya istenmeyen bölgelere kayabilir. Pestisitlerin hava yoluyla uygulanmalarında çok dikkatli olunması gerekmektedir. Hava koşullarına bağlı olarak bölgeden kaymalar dikkatle değerlendirilmelidir. İnsanlara geçişi solunum, deriden emilim, pestisit in yiyecek ve suyla alımı şeklinde gerçekleşir. Hava yolu bütün bu etkilenim yollarının devreye girmesini sağlayabilir. Pestisitler havadaki toz partiküllerine bağlanarak kilometrelerce uzaklara gidebilmektedir. Havadaki diğer kimyasallarla birleşerek ikincil kirleticiler oluşturabilir (Güler ve Çobanoğlu 1997).

Belirli bir bölgeye uygulanan pestisitler biyolojik ve fiziksel yollarla çevreye yayılarak, tüm canlıların çeşitli şekillerde bunlarla temasına yol açarlar. Bu maddeler ve bunların kalıntıları çok çeşitli yerlerde ve farklı zamanlarda biyolojik besin zincirine girerler (Asal 1983).

Pestisitler topraktan yayılımla su kütlelerine girebilir. Bu doğrudan toprak yüzeyinden akıntılarla veya evlerden, bitkilerden ve tarımsal bölgelerden olabilir.

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

Bazı pestisitler su akımı, toprağa enjekte edilmeleriyle, yağmur ve karla yıkanarak yeraltı sularına sızabilir. Pestisitlerin kullanılması bu nedenle mutlaka denetim altında olmalı, su kütlelerinin denetimi düzenli olarak yapılmalıdır. Pestisit ve su yosunlarının kontrolünden önce yüzeysel su kütleleri, göller dikkatle değerlendirilmelidir. Eğer bu değerlendirme yapılmayacak olursa pestisitler verdikleri yararın çok üzerinde zarar meydana getirebilmektedir (Güler ve Çobanoğlu 1997).

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 sağlığı, 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).

Çevre kirlenmesinin önlenmesi, biyolojik dengenin bozulmaması, insan ve diğer canlıların sağlığının tehlikeye düşmemesi için pestisit tüketiminin azaltılması yeterli değildir. Bitki hastalıklarıyla savaşta enfeksiyonlar ortaya çıkmadan, koşullar ne olursa olsun kimyasal savaş dışı önlemler öncelikle alınmalıdır. Örneğin, güneş enerjisinden yararlanılarak solarizasyonla topraktaki patojenler ve

yabancı ot tohumları yok edilmeli, seralarda iyi bir havalandırma ile nem düşürülmeli, gübreleme, sulama ve diğer bakım işlemleri hastalıklara dayanıklılığı teşvik edecek biçimde yürütülmelidir (Delen vd. 1995).

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).

Pestisitlerin piyasa ömrünü, insan sağlığını ve çevreye etkililiğini en fazla etkileyen olayların başında pestisitlere organizmaların duyarlılık azalışı gelmektedir. Bir pestisite organizmaların duyarlılığı azaldıkça, o pestisitin etkililiği de düşmektedir⁵.

Kısa yaşam döngülü ve yıllık döl sayıları fazla olan zararlı türlerde direnç probleminin ortaya çıkışı çok kısa sürede olmaktadır. Dirençli populasyonlar üreticilerin daha sık aralıklarla ve yüksek dozda ilaçlama yapmalarına neden olmaktadır. Bu davranış hem direnç probleminin artışına neden olurken, hem de çevrede kirliliğe neden olmaktadır. Aynı zamanda yoğun ve fazla pestisit kullanımı kısa süre ekosistemdeki doğal baskı unsurlarını artırmakta ve bunun sonucu olarak o güne kadar populasyonları ekonomik olarak zarar oluşturamayan

⁵ <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/030.pdf> 04.05.2006

bazı zararlı organizmaların populasyon yoğunluklarının artışına neden olmaktadır⁶.

Pestisite dirençli hale gelme olgusunun biyolojik açıklaması, doğal seçim ve bireyler arası genetik farklılıklara dayanır. Bir böcek populasyonuna yeni bir pestisit uygulanınca populasyonun % 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 populasyon oluşturur. Dolayısıyla sürekli olarak yüksek dozlarda pestisit kullanmak, pestisite dirençli populasyonların doğal seçim ile ortaya çıkmalarına neden olmaktadır (Gedikli 2001).

2.10. Türkiye’de Pestisit Kullanımı

Türkiye’de tarım ilaçları sanayi 1951 yıllarında kurulmaya başlamıştır. Özellikle 6968 Sayılı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Kanunu’nun 1957’de yayınlanması ve ilgili tüzüklerin 1958’de devreye girmesi; ülkemizde kullanılacak tüm ilaçların, ister yerli, ister ithal olsun kalitelerinin uluslararası standartta olma zorunluluğunu getirmiştir⁷.

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 formulasyon üretimi için işletme izni alan tesis sayısı 17’den 68’e, ithalatçı firma sayısı 10’dan 81’e yükselmiştir (Gedikli 2001).

1979’dan 2002’ye kadar, etki ettikleri canlı gruplarına göre pestisitlerin tüketimleri, Çizelge 4’de özetlenmiştir (Delen vd. 2005).

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

⁷ <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/5tk02/40.pdf> 06.06.2006

Çizelge 4. Pestisitlerin 1979'dan 2002'ye kadar, etki ettikleri canlı gruplarına göre tüketimleri (Delen vd. 2005).

Pestisit grupları	1979	1987	1994	1996	2002
İnsektisitler	2.287.658	3.303.446	2.064.991	3.027.380	2.250.898
Akarisitler	203.107	240.360	192.279	223.857	296.809
Fumigant ve nematositler	315.665	322.227	530.738	1.076.661	1.559.489
Rodentisit ve mollusitler	5.600	2.124	2.509	3.268	1.794
Fungusitler	1.537.315	2.611.960	2.201.406	2.951.191	1.964.292
Herbisitler	2.451.977	3.495.044	3.902.588	3.643.971	3.697.397
Toplam	8.395.84	12.112.267	10.871.792	13.797.488	12.198.917

2.11. Pestisitlerin İnsanlara Etkisi

Pestisitlerin insanlara etkilerinin değerlendirilmesi oldukça güçtür. Çünkü problemin tam niteliğiyle ilgili bilmediğimiz birçok etmen bulunmaktadır. Yaş, cins, ırk, sosyoekonomik durum, beslenme düzeni, sağlık durumu, etkilenim süresinin uzunluğu ve biçimi, pestisit konsantrasyonu, pestisitlerin etkisi altında kalan kişilerin etkilenimlerini ve sonuçlarını önemli boyutlarda değiştirmektedir (Güler ve Çobanoğlu 1997).

Pestisitlerin direkt 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. Ancak intiharlar hariç bu safhada ölüm genellikle az olmakta, alınan pestisitlerin toksisite derecesi ve dozuna bağlı olarak zehirlenme belirtileri kısa bir süre sonra başlamaktadır⁸.

Pestisitlerin üretimi veya kullanılışı sırasında meydana gelen iş kazaları, ilaçların insan sağlığına karşı olumsuz etkilerini derhal göstermektedir. Örneğin Hindistan'ın Bhopal kentinde 3 Aralık 1984 tarihinde ABD'ne ait Union Carbide Şirketi'nin bir böcek ilacı fabrikasından çevreye yayılan yaklaşık 45 ton metil izosiyanit gazı, civardaki 250 kişiyi uykularında öldürmüş ve fabrika çevresindeki

⁸ <http://www.maliye.gov.tr/cevreatlasi/08tarim.pdf> 04.05.2006

çok geniş bir alanı yaşanmaz hale getirmiştir. Aradan 4 yıl geçmiş olmasına rağmen, fabrika çevresindeki köylülerden her yıl ortalama 500 kişinin ölmesi tehlikenin boyutlarını göstermesi açısından önemlidir⁸.

Pestisitlerin zehirlilik etkileri akut ve kronik etkiler olarak iki şekilde ortaya çıkar: Pestisitlerin akut etkileri irritasyondan, dermatite, sistemik emilime bağlı olarak ölüme kadar değişmektedir (Güler ve Çobanoğlu 1997).

Tarımsal kesimde çalışmakta olan işçiler diğer endüstriyel sektörlerde çalışanlara göre dört kez daha yüksek risk altındadır. Pestisit nedenli etkilenim sonuçlarının çoğu irritasyon ve değme dermatitidir (Güler ve Çobanoğlu 1997).

Pestisit kalıntılarını ihtiva eden bitkisel ve hayvansal besin maddelerini yemek suretiyle meydana gelen zehirlenmeler ise kronik zehirlenmelerdir⁸.

2.12. Pestisitlerin Toprağa, Suya, Bitkilere ve Hayvanlara Etkisi

Pestisitler insanlar üzerinde olumsuz etkilere sebep oldukları gibi hayvanlar, bitkiler, toprak ve su üzerinde de doğrudan ya da dolaylı bazı etkiler meydana getirmektedir.

Bitki hastalık ve zararlılarına karşı kullanılan pestisitler yağmur, rüzgâr gibi çeşitli etkenlerle toprağa dolaylı yolla ulaşabilmektedir. Topraktaki zararlı böceklere, nematodlara ve tohum ilaçlamaları sırasında tohuma uygulanan pestisitler ise direkt olarak toprağa karışmaktadır. Bu şekilde toprakta devamlı birikim halinde olan pestisitler, tüketilen ürünler aracılığı ile insan, evcil hayvanlar ve yaban hayatına ulaşarak çevre sağlığını olumsuz yönde etkileyebilmektedir⁹.

Pestisit uygulamalarının bitkilerde meydana getirdiği morfolojik ve anatomik farklılıklar yanında bitkinin geliştiği topraklarda bakteri, aktinomiset ve fungusları da etkilemesi söz konusudur. Pestisitler doğrudan toprağa uygulandığı gibi, dolaylı olarak bitkilere püskürtülürken bir miktarı da toprağa karışmaktadır. Ayrıca, bitkinin yeşil kısımlarındaki pestisitler sulama ve yağmur suları ile de toprağa geçebilmektedir. Böylece toprak için faydalı olan pek çok mikroorganizma grubu pestisitlerden etkilenmektedir (Dığrak vd. 1997).

Bilindiği gibi bitki korumada kullanılan bazı ilaçlar doğrudan toprağa uygulanmakla birlikte uygulamaları sırasında atılan ilacın yaklaşık % 50'si toprağa ulaşmaktadır. Sonuçta toprak solucanlarının doğrudan ya da dolaylı da olsa ilaç uygulamalarından etkilenmemesi düşünülemez. Toprak solucanlarının ilaç uygulamalarına maruz kalması esas olarak toprak gözeneklerinde bulunan ilaçla bulaşık su vasıtasıyla olmaktadır. Uygulama sonrası yağışın fazla olduğu durumlarda etkilenme çok daha yüksek olmaktadır¹⁰.

Pestisitlerin belki de en önemli sorunu; gıda zincirine hangi aşamada ve konsantrasyonda gireceğine ilişkin bilgilerin sağlıklı olmamasıdır. Örneğin çiftlik

⁹ <http://www.maliye.gov.tr/cevreatlasi/08tarim.pdf> 04.05.2006

¹⁰ <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/030> 04.05.2006

hayvanları pestisitlerce kirlenmiş bitkileri yiyerek sindirmekte ve pestisit kalıntıları hayvan vücudunda yer almaktadır. İnsanlar da bu hayvanları besin olarak tükettiğinden kimyasalların insan vücudunda (özellikle çocuklarda) birikmesi olasıdır (Karaer ve Gürlük 2003).

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 önenebilir. Sudaki organizmaların ilacı absorbe veya metabolize etmesi, sudaki pestisit seviyesine, organizmanın fizyolojisine, sıcaklığa ve daha önceden bünyede mevcut ilaç kalıntısına bağlıdır ¹¹.

Gerek ülkemizde ve gerekse dünyada bal arıları pestisitlerden etkilenen en önemli böcek türlerini oluşturmakta, pestisitlerin yoğun ve bilinçsiz kullanımları sonucunda her yıl binlerce kovan zarara uğramaktadır ¹².

Zararlı popülasyonunu 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).

¹¹ <http://www.maliye.gov.tr/cevreatlasi/08tarim.pdf> 04.05.2006

¹² <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/031.pdf> 04.05.2006

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

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.

İlk defa 1967 yılında Brezilya'da hummaya sebep olan bir sivrisinek olan *Aedes aegypti* için kullanılan organofosforlu bir pestisit olan temephosun tek hücre jel elektroforezi (SCGE), SOS/*umu* ve Ames/*Salmonella* test sistemleri ile mutajenitesi araştırılmıştır. Bu pestisit SCGE de toksik bulunmuşken, SOS/*umu* test sisteminde mutajenik ancak toksik bir etkiye sahip olmamıştır. Ames testinde ise metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz deneylerin her ikisinde de *Salmonella typhimurium* suşları ile yapılan çalışmalarda TA 97, TA 98, TA 100 ve TA 102 de mutajenik bir etkiye rastlanmamıştır. Ancak TA 98NR, YG 7104 ve YG 7108 suşları ile yapılan deneylerde metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz çalışmalarda temephosun 3.33 µM'in üzerindeki konsantrasyonları mutajenik bulunmuştur (Aiub vd. 2002).

Yoon ve arkadaşları (2001), dünyada böcek ve nematodların kontrolü için oldukça yaygın olarak kullanılan bir pestisit olan carbofuran ve onun metaboliti olan *N*-nitrosocarbofuranın Ames testi ile mutajenitesini incelemişlerdir. Çünkü bu pestisit tarımda ve evlerde oldukça sık olarak kullanılmaktadır ve yiyeceklere, suya ve havaya karışmasından dolayı birçok canlıda ciddi sağlık problemlerine neden olabilmektedir. Bu pestisit Ames testinde TA 100 suşu ile metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda çalışılmıştır. Sonuç olarak; *N*-nitrosocarbofuran metabolik aktivasyon yokluğunda mutajenik bir etkiye sahipken

carbofuran mutajenik değildir. Metabolik aktivasyon varlığında ise ne *N*-nitrosocarbofuran ne de carbofuran mutajenik bulunmamıştır.

Brams ve arkadaşlarının (1987) yaptığı bir çalışmada ise farklı kimyasal sınıflara ait olan 40 adet bileşik Ames/*Salmonella* testi ve SOS Kromotesti ile karşılaştırılmıştır. Ames testinde kullanılan 3 suş ile (TA 97, TA 98, TA 100) test materyallerinin 3 farklı konsantrasyonu sonucunda bileşiklerin büyük çoğunluğu (%78) mutajen/karsinojen olarak tanımlanmıştır. Ticari olarak satılan mevcut kitlerle yapılan SOS kromotestinde ise, *E. coli* PQ 37 suşu kullanılmış ve sadece Ames testindeki 4 pozitif bulunan bileşik bu testte mutajenik olarak tespit edilmiştir.

İlaç yapımında başlangıç maddesi olarak kullanılması amaçlanan 2,4,5 trifenil imidazol ve dokuz türevinin mutajenik etkileri Ames/*Salmonella*/mikrozom test yöntemi ile araştırılmıştır. Test bileşenlerinin özellikle TA 98 suşunda etkili olduğu belirlenmiş olup bağlanan metil ve metoksi gruplarının pozisyonu ile mutajenik etki arasında bir ilişki saptanmıştır (Mercangöz ve Tüylü 2000).

Buğdaylar içerisindeki yabancı yulafların kontrolünü sağlamak amacıyla kullanılan ve seçici bir herbisit olan triallate *in vivo* ve *in vitro* çalışmaları içeren çok yaygın bir veritabanına sahiptir. Bu kimyasal *in vitro* çalışmalarda çok karma sonuçlar meydana getirmiştir. Triallate Ames testinde, çoğunlukla S9 varlığında TA 100 ve TA 1535 suşlarında genotoksiktir. S9 yokluğunda ise aynı suşlarda daha zayıf bir cevap gözlenmiştir. TA 1537 ve TA 1538 suşlarında genotoksisiteye rastlanmazken TA 98 suşunda ise karma bir sonuç elde edilmiştir. S9'un varlığı ve yokluğu bakterinin kimyasal maddeye karşı verdiği cevapta rol oynamaktadır (Healy vd. 2003).

İki thiocarbamate herbisiti olan diallate ve triallate'e, mutajenik potansiyellerinin belirlenebilmesi amacıyla en az birer hafta aralıklarla tekrarlanmak şartıyla kısa dönem testlerinden olan Ames testi metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda uygulanmıştır. *Salmonella*/mikrozom testi her iki herbisite de 0.59-

118.0 µg/plak ve 6.37-1273 µg/plak aralığındaki dozlarda TA 1535, TA 98 ve TA 100 suşlarında sadece metabolik aktivasyonlu çalışmalarda genotoksik etkiye rastlanılmıştır (Svehu vd. 1984).

Yine aynı kimyasal maddeler olan diallate ve triallate'in mutajenik aktivitesi, Douglas (1981) tarafından *Salmonella*/mikrozom testi ile çalışılmış ve TA 1535, TA 100 ve TA 98 suşlarında metabolik aktivasyonsuz deneylerde doza bağlı bir artış gözlenmiş ve bu suşlarda çerçeve kayması ve baz değişimi mutasyonları saptanmıştır. Her iki herbisidin mutajenitesi rat karaciğer S9'unun Aroclor 1254 ile teşvik edilmesi sonucunda büyük ölçüde artmıştır.

20 carbamate herbisit ve fungusitlerinin mutajenik özelliklerinin saptanması amacıyla *Salmonella*/mikrozom testi uygulanmıştır. Sonuç olarak, TA 1535 ve TA 100 suşlarında, thiocarbamate bileşiklerinden olan diallate, triallate ve sulfallate karaciğer mikrozomal fraksiyon varlığında mutajenik olarak tespit edilmiştir. Bu da göstermiştir ki thiocarbamatların metabolik ürünleri baz değişimlerine sebep olmaktadır. 2-chloro-allyl gruplarından 3 bileşik mutajenik bulunurken diğer 17 bileşikte herhangi bir mutajenik etkiye rastlanmamıştır (De Lorenzo 1978).

Tetrachlorvinphos pestisitinin mutajenik aktivitesi *Escherichia coli* WP2 ve WP2 uvrA, *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA 1538, TA 98 ve TA 100 suşları ile araştırılmıştır. Deneyler rat ve farelerden elde edilmiş olan karaciğer homojenatları varlığında ve yokluğunda, ayrıca Aroclor 1254 ile muamele edilmiş ve edilmemiş olarak iki şekilde gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, bakteri suşları tetrachlorvinphosun 0-2000 µg/plak aralığında uygulanması sonucunda herhangi bir mutajenik etkiye rastlanmamıştır (Brooks 1982).

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

sebepe olmuştur ve onun mutajenik aktivitesi S9 karışımı ile azalmıştır (Barrueco 1991).

Bir insektisit olan endosülfanın potansiyel mutajenitesi oldukça yüksek bir duyarlılığa sahip olan *Salmonella* TA 97(a), TA 98, TA 100 ve TA 102 suşları ile araştırılmıştır. Bu insektisit 50 µg/plak ve bunun üstündeki dozlarda toksik bir etki sergilemiştir. Plak inkorporasyon testinde kullanılan hiçbir test suşu mutajenik etki göstermemiştir. Bir pre-inkübasyon işlemi kullanılarak yapılan deneyde sadece TA 97 ile metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz çalışmalarda mutajeniteye rastlanmıştır. S9 karışımını teşvik eden phenobarbitol ortama eklendikten sonra toksisitede artış gözlenmiştir (Pandey 1990).

Bir dithiocarbamate fungusiti olan mancozeb'in muhtemel mutajenik aktivitesi *Salmonella typhimurium* test suşlarından TA 97, TA 98, TA 100 ve TA 102 ile araştırılmıştır. Sonuç olarak 40 µg/plak ve onun üstündeki dozlarda bütün suşlarda mancozeb toksik bir etki göstermiştir. Mancozeb, aseton ve DMSO ile çözüldüğünde TA 97 suşunda metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz çalışmalarda revertant koloni sayısında doza bağlı bir artış gözlenmiştir (Shukla 2004).

Thiram fungusitinin 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).

Yurdumuzda yaygın olarak kullanılan organoklorlu insektisitlerden aldrin, endosulfan, heptaklor ve tetradifonun Ames test sistemi ile mutajenik etkileri

araştırılmıştır. Endosulfan, *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarına mutajenik etkili bulunmuş, aldrin, heptaklor ve tetradifonun sadece TA 100 suşunda zayıf mutajenik etki gösterdiği saptanmıştır (Sümer vd. 1991).

Diril ve arkadaşları (1988), Türkiye’de yaygın olarak kullanılan bazı pestisitlerin *Salmonella typhimurium*/mikrozom mutajenite test sistemi ile mutajenik etkilerini araştırmışlardır. TA 100 suşu için endosulfan, azinfosetil ve diklorvos (DDVP)’un mutajenik; diptereks ve trifluralin’in ise zayıf mutajenik etki gösterdiği belirlenmiştir. Trifluralinin *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu için mutajenik; endosulfanın ise zayıf mutajenik etkili olduğu saptanmıştır.

Türkiye’de ruhsatlı bulunan 10 pestisidin mutajenik aktiviteleri *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında spot test ile incelenmiştir. Araştırılan pestisitlerin konsantrasyonları hekmalin 20 EC, rogor 40, hekthion 20 EM, hektavin 50 WP, akar 338, tetrafon EC ve hyvar X için 2, 20, 500, 1000 ve 3000 µg/plak; orthocide 50 WP için 1, 5, 10, 20, 30, 40 ve 50 µg/plak, benlate için 2, 20 ve 500 µg/plak ve dikotan M-22 için ise 2 ve 20 µg/plaktır. Testi yapılan pestisitler içinde sadece orthacide 50 WP, hem baz çifti dönüşümleri ve hem de kodon kayması tipinde mutasyonlara neden olmuş, diğerleri ise bu sistemde negatif sonucu vermişlerdir (Asal 1985).

Toplam 228 pestisit (88 insektisit, 60 fungusit, 62 herbisit, 12 bitki büyüme düzenleyicisi, 3 metabolit ve 3 diğer bileşikler)’in mutajenitesi bakteriyel test sistemlerinden Ames testi ile 5 suş (TA 100, TA 98, TA 1535, TA 1537 ve TA 1538) kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca *E. coli* ile de bir suş (WP2 hcr) kullanılarak aynı maddeler mutajenite bakımından araştırılmıştır. Bu kimyasal maddelerden 50 tanesi mutajenik bulunmuştur. Bunlardan 5 tanesi aktiviteleri için metabolik aktivasyona (S9) ihtiyaç duymaktadır. Çeşitli kimyasal gruplar arasından, organik fosfatlar, halojenat alkanlar ve dithiocarbamatlar yüksek mutajenite göstermektedirler. Test edilen 22 pestisit karsinojenik olarak saptanmasına rağmen, onların 7 tanesi; captain, dibromochlorpropane, ethylene dibromide, ethylene dichloride, ethylenethiourea, 2-hydrazinoethanol ve nitrofen

bu deneyde mutajen olarak tespit edilmiştir. Diğer 15 non-mutajenik karsinojenlerin çoğu chlorobenzilate, p,p'-DDT, dieldrin ve quintozene gibi organoklorlu pestisitler grubuna girmektedir (Moriya vd. 1983).

Son yıllarda geliştirilen ve çeşitli ajanların genotoksisitesini belirleyen Ames test, *Bacillus subtilis* repair test ve SOS Kromotesti oldukça önemli test sistemleridir. Bu kısa dönem test sistemleri kullanılarak formaldehide, glutaraldehide ve resorcinal'in mutajenik etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar formaldehide ve glutaraldehid'in genotoksik olduğunu doğrularken resorcinal sadece mutajenik değil bunun yanında bazı genotoksik ajanlara karşı antimutajenik bir etki de göstermiştir (Yue vd. 1995).

Nitrofurazone ve furazolidone'un genotoksik özellikleri Ames test ve SOS Kromotesti kullanılarak araştırılmıştır. Bileşimlerin her ikisi de *Salmonella typhimurium*'um TA 97 ve TA 102 suşlarında ve SOS Kromotestinde *E. coli* PQ 37 suşunda güçlü mutajenik etkiye sahip olmuşlardır. Sonuçlar SOS Kromotesti ve Ames testi arasında iyi bir uyum olduğunu göstermektedir. Askorbik asit ve selenit ise her iki test sisteminde de çalışılmış olan 2 nitrofurans üzerinde oldukça düşük bir genotoksik etki göstermiştir (Gajewska vd. 1990).

Brezilya'da ilaç yapımında kullanılan 7 türün (*Achyrocline satureoides*, *Iodina rhombifolia*, *Desmodium incanum*, *Baccharis anomala*, *Tibouchina asperior*, *Luehea divaricata*, *Maytenus ilicifolia*) sulu ekstraktları Ames testinde mutajenik etki varlığında araştırılmıştır. Pozitif sonuçlar *Achyrocline satureoides*, *Baccharis anomala* ve *Luehea divaricata*'da mikrozomal aktivasyon varlığında elde edilmiştir (Vargas vd. 1991).

Bir organofosfat insektisiti olan *Chlorpyrifos phosphorothioate*'in genetik toksisitesi birçok mutajenite testinin yanı sıra Ames testi ile de incelenmiş ve bu incelemelerin hiçbirinde chlorpyrifos için genotoksik aktivite göstergesi bulunamamıştır (Gollapudi vd. 1995).

Fenitrothion insektisitinin mutajenitesi *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli*'nin suşlarında tespit edilmiştir. Fenitrothion'da zayıf mutajenite, sadece *Salmonella typhimurium* TA 100'de gözlenirken ve S9 karışımının ilavesiyle mutajenite artmıştır. *Salmonella typhimurium*'un TA 98, TA 1535 ve TA 1537 suşlarında ve hem S9 varlığı ve hem de S9 yokluğunda *E. coli* WP2 uvrA suşlarında fenitrothion'un mutajenik olmadığı tespit edilmiştir (Hara 1989).

Mc Daniels ve arkadaşları (1990) 7 kimyasal sınıfa ait olan 10 adet genotoksinin mutajenitesini 2 test suşu kullanarak Ames testi, 2 standart kolorimetrik test olan *umu* test ve SOS Kromotesti ve bu iki testin modifikasyonları ile belirlemeye çalışmışlardır. Bu çalışmanın amacı her 6 methodunda hassaslığını ve tekrarlanabilirliğini göstermektir. Yapılan çalışmada TA 98 ve TA 100 suşu kullanılarak uygulanan Ames testi diğer testlere oranla daha hassas bulunmuştur. Ancak sonuçlar *umu* testin de Ames testiyle aynı sonuçlara sahip olduğunu göstermiştir.

Diğer bir çalışmada 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).

Bilgin (1992) organofosforlu bir insektisit olan triklorfon'un mutajenik potansiyelinin belirlenmesi için prokaryotik ve ökaryotik mutajenisite test sistemlerini kullanmıştır. Ön çalışma olarak uygulanan Ames testi triklorfonun $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ve $1 \times 10^{-12} \text{M}$ kadar küçük dozlarda bile metabolik aktivasyon gerektirmeksizin mutajenik etkisi olduğunu göstermiştir.

Reifferscheid ve Heil (1996), 486 tane kimyasal maddeyi *umu* test ve Ames testi sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak Ames ve *umu* test arasında yaklaşık olarak %90 civarında bir uyum saptamışlardır. *Umu* testteki pozitif bileşiklerin %

97'si en az 5 suş kullanılarak yapılan Ames testi ile belirlenebilirken, Ames testindeki mutajenlerin de % 90'ı umu test ile belirlenebilmektedir. Ames testinden TA 102 suşunun elimine edilmesi umu testteki sonucun yüzdesini % 97'den % 86'ya kadar düşürmektedir.

Tarımda sıklıkla kullanılan Benomyl (methyl [1-[(butylamino)carbonyl]-1 *H*-benzimidazol-2-yl]carbamate) ve onun metaboliti olan carbendazim (methyl 2-benzimidazolecarbamate) sırasıyla 0-500 µg/plak ve 0-1200 µg/plak konsantrasyonlarda mutajenik aktiviteleri *Salmonella typhimurium*'un TA 1535, TA 100, TA 98 ve TA 1537 suşlarında S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda araştırıldığında herhangi bir mutajenik aktiviteye rastlanılmamıştır (Sarrif vd. 1994).

Tzoneva ve arkadaşlarının 1985 yılında yapmış olduğu çalışmada, endodan fungusinin 7.5 ve 12.0 µg/plak konsantrasyonlarında TA 100 suşunda S9 varlığında zayıf mutajenik etkiye sahipken, kilacar insektisit-akarisitinin S9 varlığında 2.5 ve 5.0 µg/plak konsantrasyonlarının ağır mutajenik etki gösterdiği tespit etmişlerdir.

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.

Diğer bir çalışmada ise, *Salmonella*/mikrozom testi ile TA 100, TA 98 ve YG 1024 suşları kullanılarak bir alüminyum fabrikasından çıkan atık materyallerin mutajenik aktivitesi belirlenmeye çalışılmıştır. Materyaller mesai sonunda fabrikanın zemininin süpürülmesi ile elde edilmiştir. Fabrikadan alınan bütün ekstraktların, özellikle de YG 1024 suşunda, kimyasal analizlerle de doğruluğu kanıtlanan aromatik aminlerin varlığında mutajenik aktivite gösterdiği ifade edilmiştir. YG 1024 suşunda gözlemlenen yüksek mutajenik aktivite kadar olmasa da TA 98 suşunda da mutajenik aktiviteye rastlanmıştır. TA 100 suşunda ise mutajenik aktivite saptanmamıştır. Bu çalışma göstermiştir ki bu maddelere maruz kalan kişiler uyarılmalı ve bu atıklar kontrolsüz bir şekilde çevreye bırakılmamalıdır (Varella vd. 2004).

Mathur ve arkadaşları (2005) diğer bir çalışmada Hindistan'ın tekstil ve boya endüstrisi ile ünlü Sanganer Kasabası'nda yaklaşık 400 endüstri fabrikasının atıklarının toplandığı havuz ve göl kenarlarından su örnekleri alarak Ames testi ile mutajenik aktivitesini araştırmışlardır. Sonuçlar Amani Shah drenajının yüzey suları ve atıklarının yüksek mutajenik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Dahası bu drenaj suları tarımsal amaçlı olarak kullanıma uygun değildir. Sanganer yeraltı sularındaki düşük mutajenite seviyesi bu bölgedeki kirliliğin yeniden gündeme gelmesine sebep olmuştur.

Lah ve arkadaşları (2005), Lubliljana bölgesindeki 3 farklı bölgeden alınan içme sularını toplayarak 3 genotoksik test ile mutajenitesini değerlendirmeye çalışmışlardır. Ames testi TA 97(a), TA 100 ve TA 1535 suşları kullanılarak bu sulara uygulanmıştır. Yine aynı örnekler metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda *Saccharomyces cerevisiae* D7 suşu kullanılarak Zimmerman testi ile değerlendirilmiştir. Paralel genotoksisite çalışması yine aynı örneklerle comet deneyi ile çalışılmıştır. Orijinal ve konsantre su örnekleri pestisit ve nitratların belirlenmesi için de kimyasal analizleri yapılmıştır. Ames ve Zimmerman testine göre içme sularında hiçbir genotoksik aktivite gözlemlenmemiştir. Aksine Comet deneyinde ise, içme suyu örneklerinin çoğunda düşük genotoksisite tespit edilmiştir.

Kutlu ve arkadaşları (2005) tarafından ilaç hammaddesi olarak kullanılması düşünülen iki tetrahidrobenzimidazol türevi bileşiğin kimyasal sentezi yapılmış, yapısal analizleri analitik metodlarla belirlenmiş ve Ames *Salmonella*/mikrozom testi ile mutajenik özellikleri araştırılmıştır. TA 98 ve TA 100 suşları kullanılarak, metabolik aktivasyonlu ve metabolik aktivasyonsuz olarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda, negatif kontrolle karşılaştırıldığında bileşiklerin mutajenik özellik göstermediği belirlenmiştir. Ancak, doza bağlı artış göz önüne alındığında bileşiklerin her ikisinin de kullanılan suşlardan biri veya her ikisi için zayıf mutajeniteye sahip olduğu gözlenmiştir (Kutlu vd. 2005).

Diğer bir çalışmada ise, Ames testi ile Porsuk Nehri'nden alınan su ve sediment örneklerinde genotoksik etki araştırılmıştır. TA 98 ve TA 100 suşları kullanılarak yapılan çalışmada mutajenlerin varlığı çerçeve kayması ve baz değişimi mutasyonlarına neden olmuştur (Kutlu vd. 2004).

Thiabendazole (TBZ), turuncgiller üzerinde kullanılan önemli bir fungusittir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda TBZ'ün Ames testi ile UVA ışınları ile fotomutajenite gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışmada ise, bakteri ve insan hücrelerinde UVA ışınlarına maruz kalan TBZ'ün, 10 dakikalık kısa muameleler sonucunda klastojenite, mutajenite ve DNA'daki hasar oluşumu aktivitesi araştırılmıştır. *S. typhimurium* ve *E. coli* kullanılarak uygulanan Ames testi sonucunda baz değişimi mutasyonlarının yanı sıra çerçeve kayması mutasyonları da tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda TBZ tek başına hiçbir genotoksik aktiviteye sahip değildir. Buna rağmen TBZ anöploidiye sebep olan etken bir maddedir. Sonuç olarak UVA'ya maruz kalan TBZ bakteri ve insan hücrelerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda genotoksik bulunmuştur (Watanabe-Akanuma 2005).

1,2,4-oxadiazole'den türevlenen bileşiklerin anti-inflamatuar aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir. Buna rağmen bu bileşiklerin hiçbir genotoksik etkiye sahip olmadığı saptanmıştır. Bir başka çalışmada ise, 1,2,4-oxadiazole'ün türevleri olan peptidomimetisin genotoksik aktivitesi Ames ve SOS kromotesti kullanılarak test

edilmiştir. Sonuçlar, Ames testinde propionic asit için hiçbir mutajenite göstermezken SOS kromotestinde zayıf aktivite gözlenmiştir (Leite 2005).

42 Güney Afrika bitkisinin diklorometan ve %90 metanol ekstraktları, metabolik aktivatör S9'un varlığı veya yokluğunda, TA 98 ve TA 100 *S. typhimurium* bakteriyel suşlarına karşı *Salmonella*/mikrozom mutajenite analizi (Ames) kullanımıyla mutajenite ve antimutajenite için incelenmiştir. *Helichrysum simillimum*, *Helichrysum herbaceum* ve *Helichrysum rugulosum* bitkilerinin tümünden elde edilen metanol ekstraktları mutajenite göstermiştir. *Bauhinia galpinii*'nin yaprak metanol ekstraktları ve *Bauhinia galpinii*, *Clerodendrum myricoides*, *Datura stramonium*, *Milletia sutherlandii*, *Sutherlandia frutescens* ve *Buddleja saligna* 'nın diklorometan yaprak ekstraktları S9 varlığında antimutajenik özellikler göstermiştir. (Reid 2006).

β -ionine (BIO), aromatik ve yenilebilen bitkilerin bir çeşidinde bulunan parçalanmış bir bileşiktir. BIO ve diğer ionin türevleri, güzel kokulu ürünler ve çeşitli yiyeceklerde kullanılmıştır. Bu çalışmada mutajenite, S9 karışımı ilave edilerek ve S9 karışimsız, TA 100, TA 98, TA 97a ve TA 1535 *Salmonella typhimurium* bakteriyel suşları ile iki test uygulanarak değerlendirilmiştir. Her iki testte de, *Salmonella* analizinde BIO'nun genotoksik olmadığından dolayı, 4 test edici suşun herhangi biriyle not edilen negatif (çözücü) kontrol değerleri boyunca, *his*⁺ revertant kolonilerinin sayısında artış olmamıştır (Gomes-Carneiro 2005).

Diğer bir çalışmada 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).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler

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-glikoz 6-fosfat, β -NADP Fluka, Sitrikasit monohidrat, Sodyum hidroksit, Sodyum azid, KCl, NaCl, Dimetilsülfoksit Riedel, Bacto agar, Nutrient Broth No:2 Oxoid, 3-Metilkolantren 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 gr
Sitrikasit monohidrat	100 gr
Potasyum fosfat (K_2HPO_4)	500 gr
Sodyum amonyum fosfat ($NaH_2N_2PO_4 \cdot 4H_2O$)	175 gr
Distile su (45 °C)	670 ml

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile distile suya ilave edildi. 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, 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 gr

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 gr

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-biotin 0.65 mg

Distile su 50 ml

Biotin 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 gr

Distile su

400 ml

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

(%20) Glikoz Çözeltisi

Kullanım: MGA ve HBA plakları hazırlanması

100 ml için

Glikoz

20 gr

Distile su

100 ml

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

(0.1 µg/µl) Sodyum Azid Çözeltisi

Kullanım: Pozitif kontrol

1.0 mg/petri başına olmak üzere distile suda çözülerek kullanıldı. TA 100 suşu için S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda kullanılan kimyasaldır. 0-4 °C'de saklandı.

(2 µg/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.

(2 µg/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: Mikrozoim izolasyonu

1000 ml için

KCl 11.275 gr

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

	<u>1000 ml için</u>
Agar	6 gr
NaCl	5 gr
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 gr
% 20 glikoz	50 ml
Histidin HCl. H ₂ O	10 ml
0.5 mM Biotin	6 ml
50XVB	20 ml
Distile su	914 ml

Agar ve su karıştırıldıktan sonra otoklavlanarak sterilize edildi. 45 °C’ye soğutulup % 20 glikoz, 50XVB tuzları ve histidin çözültüsü 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 gr
Distile su	910 ml
50XVB tuzları	20 ml
% 20 glikoz	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 glikoz, 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 Glikoz Agar Plakları (MGA)

Kullanım: Mutajenite deneyi

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

Agar ve su 2 litrelik kapta karıştırılıp çözüldü ve otoklavlanarak sterilize edildi, 45 °C'ye soğutulup % 20 glikoz ve 50X VB tuzları eklenip petri kutularına 30 ml olarak aktarıldı.

Nutrient Agar Plakları (NA)

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

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

	<u>500 ml için</u>
Potasyum klorür (KCl)	61.5 gr
Magnezyum klorür	40.7 gr
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 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 13.82 gr

0.2 M Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) 14.2 gr

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 Glikoz-6-Fosfat Çözeltisi

Kullanım: Mutajenite deneyi için S9 karışımı

10 ml için

Glikoz-6-fosfat 2.82 gr

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>
Rat karaciğeri S9 fraksiyonu	2 ml
MgCl ₂ -KCl tuz çözeltisi	1 ml
1 M Glikoz-6-fosfat	0.25 ml
0.1 M β-NADP	2 ml
0.2 M fosfat tamponu pH=7.4	25 ml
Steril distile su	19.75 ml

Karışım, her zaman taze olarak ve yeterince hazırlandı. İçerikler daima buz içinde tutuldu.

3.1.4. Test Maddeleri (dozları ve hazırlanışı)

Bu çalışmada tarımda yaygın olarak kullanılan çeşitli pestisitlerin (sırasıyla fluoroglycofen-ethyl, fenoxanil, pyracarbolid ve benodanil) mutajenik etkileri Ames/Salmonella/mikrozom test yöntemiyle araştırılmıştır. Denenen maddeler dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülmüşler ve +4 °C'de saklanmışlardır. Uygulanacak dozları belirlemek için fluoroglycofen-ethyl, fenoxanil ve pyracarbolid için test bileşiklerinin 0.1 µg/plak, 1 µg/plak, 10 µg/plak, 100 µg/plak, 1000 µg/plak, ve 10000 µg/plak konsantrasyonları, benodanil için test bileşiklerinin 0.05 µg/plak, 0.5 µg/plak, 5 µg/plak, 50 µg/plak, 500 µg/plak ve 5000 µg/plak konsantrasyonları hazırlanmıştır. Araştırmanın materyalini oluşturan bu pestisitler Çizelge 5'de verilmiştir.

Deneyde kullanılan pestisitler tarımda ürün kalitesini artırmak ve zararlılardan kurtulmak amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır.

Çizelge 5. Çalışmada kullanılan pestisitlerin genel özellikleri

Yaygın adı	Kimyasal adı	Kimyasal yapısı	Saflık Derecesi %	Kullanım alanı
Fluoroglycofen-ethyl	Carboxymethyl 5-[2-chloro-4-(trifluoromethyl) phenoxy]-2-nitrobenzoate		97.7	Herbisit (nitrofenil ether)
Fenoxanil	<i>N</i> -(1-cyano-1,2-dimethylpropyl)-2-(2,4-dichlorophenoxy)propanamide		99.5	Fungisit (amide fungusit)
Pyracarbolid	3,4-dihydro-6-methyl- <i>N</i> -phenyl-2 <i>H</i> -pyran-5-carboxamide		99.4	Fungisit (anilide fungusit)
Benodanil	2-iodo- <i>N</i> -phenylbenzamide		99.5	Fungisit (benzanilide fungusit)

3.2. Metod

Bu çalışmada, USA'dan elde edilen test bakterilerinin stok kültürlerinin hazırlanması, bakterilerin genetik özelliklerinin kontrol edilmesi, mikrozomal fraksiyonun hazırlanması ve Ames/*Salmonella*/mikrozom testi Maron ve Ames yöntemine uygun olarak plak inkorporasyon metodu ile yapılmıştır. Deneyle S9'lu ve S9'suz olarak iki grup halinde çalışılmıştır. Her doz paralel 3 plak halinde denenmiş ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca pozitif kontrol, solvent kontrol ve spontan kontroller deneye paralel olarak denenmiştir.

3.2.1. *Salmonella* Suşlarının Kültürlerinin ve Master Plaklarının Hazırlanması

Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi'nden getirilen bakteri plakları histidin biyotin ampisilin (HBA) plaklarına paralel ekimleri yapıp 37 °C'de 48 saat inkübasyona alınmıştır. Sürenin sonunda iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2 ml nutrient broth (NB) ortamı içinde süspansiyon edilerek bir gece (12-16 saat) 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra platin öze ile bir öze dolusu sıvı kültür alınıp Histidin/biyotin/ampisilin agar (HBA) üzerine çizgi ekim yapılarak plaklar 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Bu plaklar +4 °C'de 2 ay süre ile saklanmış ve pasajlar yapılmıştır.

3.2.2. *Salmonella* Suşlarının Stoklanması ve Stok Kültürlerin Açılması

Genetik kontrolleri yapılarak HBA'ya ekilmiş olan bakterilerden tek koloniler 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 eklenerek yavaşça karıştırılmıştır. 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

Testin güvenilirliği açısından test suşlarının orijinal mutasyonlara sahip olup olmadığını bilmek gerekir. Bu nedenle bakterilerin genetik özellikleri bazı testlerle kontrol edilmiştir.

Histidin gereksinimi kontrolü

Bakterilerin minimal glikoz agar (MGA) üzerine ekilmeleri sonucu his⁻ bakteriler his⁺ lardan ayırt edilir. Bu amaçla NB'da, bir gece üretilen bakterilerden MGA ve histidin/biyotin (HB) plaklarına çizgi ekim yapılmıştır. 37 °C'de 48-72 saat inkübasyondan sonra HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmemiştir. Böylece kullanacağımız bakterilerin his⁻ mutasyonunu taşıdığı anlaşılır.

***uvrB* mutasyonu kontrolü**

Bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için, NB'da bir gece büyütülen bakteri kültüründen 1 öze dolusu alınıp nutrient agar (NA) plağının tamamına paralel ekim yapılmıştır. Plakın yarısı (çizgileri kesecek şekilde) plastik bir plaka ile kapatılıp 15 watt gücünde bir UV lambası ile 33 cm. yüksekten 8 sn. süre ile ışınlanmıştır. Işınlanmadan sonra petri kapakları kapatılıp 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan UV ışığı dozu, *uvrB* mutasyonu taşıyan bakterileri öldürecek dozdadır. Çünkü DNA kesme tamir etme mekanizması engellenmiştir. Bundan dolayı UV'ye maruz kalan kısımda üreme olmazken, plastik kapakla kapatılan kısımda normal bir üreme gözlenmiştir. Bu da bize kullanılacak bakterilerin *uvrB* mutasyonu taşıdığını göstermiştir.

Rfa mutasyonu kontrolü

Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuştur ve hücre duvarının geçirgenliği arttırılmıştır. Varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için bakteri kültürü NB'da bir gece büyütülen 0.1 ml sıvı kültür, 45 °C su banyosunda tutulan 2.5 ml top agar üzerine ilave edilip daha sonra NA plaklarına dökülerek plaklara 8 işareti yaptırılmıştır. 10 dk. donması beklendikten sonra plağın ortasına 0.5 cm çaplı steril filtre kağıdı diski yerleştirilip diskin ortasına %0.1'lik kristal viyole karışımından 10 µl damlatılmıştır. Kâğıdın boyayı emmesi beklenilmiş, sonra plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda disk çevresinde 14 mm'lik üreme olmayan zon gözlenmiştir. Bu zonda, boya maddesi bakterilerin içine kolayca girip etkilediği için bakterilerin üremesini engellediği için bakterilerin Rfa mutasyonunu taşıdıkları anlaşılmıştır.

R-faktör varlığı kontrolü

Test bakterilerinin içerdiği, R-faktör taşıyan pKM 101 plazmidlerinin kaybolup kaybolmadıkları, ampisiline dirençliliğinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla, büyütülen NB içinde bakteri kültürü (%0.8 Ampisilin/0.02 M NaOH) ampisilin içeren HBA plaklarına çizgi ekim yapılarak, 37 °C'de 24 saat inkübasyonu sonunda, plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdükleri gözlenmiştir. Yani bakteriler R-faktör plazmidini içermektedirler.

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. Bu test için, 37 °C'de, NB'da büyütülen bir gecelik kültürden 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'de 48-72 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır.

3.2.4. Sıvı Kültürün ml'sindeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Deneyde kullanılan gecelik kültürün ml'sinde bulunan bakteri sayısını bulmak için HBA plaklarından iyi üremiş bir koloni öze yardımı ile alınarak 20 ml nutrient broth içerisinde süspanse edilmiştir. Süspansiyon işleminden sonra kültür çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de 110 rpm'de 12-16 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda gecelik kültürden 100 µl alınmış ve 20 ml NB bulunan erlen içerisinde eklenerek taze kültürleri hazırlanarak 140 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda taze kültürün %0.9 serum fizyolojik ile 10⁰, 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ ve 10⁶ olacak şekilde bir dizi 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 yavaşça çalkalanarak NA plaklarına yayılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır. *S. typhimurium* ile yapılan mutajenite testlerinde kullanılan bakteri kültürünün 1 ml'sinde 1-2 x 10⁹ ml/bak. olması öngörülmektedir.

3.2.5. Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması

Sitotoksik etkinin saptanması deneyi Dean ve arkadaşlarına (1985) göre yapılmıştır. Kullanılan test bileşiklerinin, test bakterileri için öldürücü dozunun saptanması amacıyla 2 ml top agara 0.1 ml bakteri kültürü ve 0.1 ml değişik konsantrasyonlarda test bileşiği ilave edilmiştir. Fluoroglycofen-ethyl, fenoxanil ve pyracarbolid için test bileşiklerinin 0.1 µg/plak, 1µg/plak, 10 µg/plak, 100 µg/plak ve 1000 µg/plak ve 10000 µg/plak konsantrasyonları, benodanil için test bileşiklerinin 0.05 µg/plak, 0.5 µg/plak, 5 µg/plak, 50 µg/plak, 500 µg/plak ve 5000 µg/plak konsantrasyonları test tüpüne eklenmiştir. Tüpteki karışım 3 ayrı NA plağına dökülerek 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.

3.2.6. Memeli Karaciğer S9 Fraksiyonunun Hazırlanması

3.2.6.1. Rat Karaciğer Enzimlerinin İndüksiyonu

Deneyde Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'ndan etik kurul raporu alınmış olan Sprague-Dawley ırkından ve ağırlıkları yaklaşık 150 gr olan erkek ratlar kullanılmıştır. Karaciğer enzimlerinin indüksiyonu için 3-metilkolantren tek doz halinde 125 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde verilmiştir. Ratlar 5 gün süresince su ve yemle beslenmiş, fakat öldürülmeden 12 saat önce yem verilmesi kesilerek sadece su verilmiştir. İndüksiyonun 5. gününde, ratlar servikal dislokasyon ile öldürülmüştür (Ames vd. 1973a).

3.2.6.2. Karaciğer S9 Fraksiyonunun Hazırlanması

Rat karaciğeri, aseptik koşullarda ve aseptik araç-gereçler kullanılarak çıkarılmıştır. 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 gr karaciğere 1 ml soğuk 0.15 M KCl olacak şekilde birkaç kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra karaciğer gram başına 3 ml 0.15 M KCl olacak şekilde behere alınmış ve steril pens ve makas yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Homojenat kontamisyonu önlemek amacı ile 0.25 µm çaplı selüloz filtreler ile filtre edilmiştir. Karaciğer 24000 rpm'de homojenize edilerek koyu pembe renk görülene kadar bu işleme devam edilmiştir. Homojenat 0-2 °C'de 9000 g'de (8700 rpm) 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant soğuk steril ependorf tüplere 1 ml olacak şekilde aktarılmıştır. Hazırlanan tüpler önce kuru buz içerisinde ani olarak dondurulup, daha sonra -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.6.3. S9 Karışımının Hazırlanması

Salmonella/mikrozom test sistemi için standart S9 karışımı bileşenleri 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM glikoz-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 her mutajenite deneyi için taze hazırlanmakta ve deney süresince buz içerisinde saklanmaktadır.

3.2.7. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı

Deneyin amacı, daha önceden büyümesi için histidin aminoasidine gereksinim duyan oksotrofik suşların, kullandığımız test maddeleri ile tekrar histidin sentezleyebilir hale dönüşmesi temeline dayanır.

3.2.7.1. S9'suz (-) Deney

Bu amaçla, içlerine 0.25 ml histidin biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2.5 ml'lik top agar içeren deney tüpleri 45 °C'lik su banyosunda ısıtılıp içlerine 0.1 ml test maddesi ve 0.1 ml 5 saatlik taze bakteri kültürü eklenmiştir. Tüpler çalkalanarak 37 °C'ye ısıtılmış MGA plaklarına dökülmüş, plaklara hızla 8 işareti yaptırılarak top agarın plak üzerine homojen dağılması sağlanmıştır. 15 dakika donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilerek 37 °C'lik etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilerdeki koloniler sayılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olmak üzere hazırlanarak iki bağımsız deney yapılmış ve 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

Plak inkorporasyon testinde, test bileşigi, bakteriyel test suşu, S9 karışımı top agara karıştırılarak minimal glikoz agarlı plaklara dökülmüştür. Plaklar 37 °C'de 48-72 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda plaklardaki his⁺ revertant bakteri kolonileri sayılmıştır.

Bu yöntemde, 0.25 ml histidin biyotin eklenmiş 45 °C'deki 2.5 ml'lik top agara, test suşu kültüründen 0.1 ml, test edilecek kimyasaldan 0.1 ml ve S9 karışımından 0.5 ml eklenip düşük hızda 3 saniye vorteksenerek oda sıcaklığındaki minimal glikoz agarlı plaklara yayılmıştır. Top agarın plağın bütün yüzeyine donmadan yayılmasını sağlamak için karıştırma, dökme, yayma işleminin tümü, 20 saniyeden az bir sürede yapılmıştır. Her deneyde, her suşun geri dönme özgülüklerini ve S9 karışımının etkisini doğrulamak için pozitif mutajen olarak TA 100 suşu için 0.1 µg/µl sodyum azid (NaN₃), TA 98 suşu için 2 µg/µl 2-aminofluorene (2AF) kullanılarak rutin olarak, pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. Bakteriyi, S9 karışımını ve kullanılan çözücüyü içeren fakat test edilen kimyasalı içermeyen negatif kontrol plakları her suş için kendiliğinden geriye dönen bakteri sayısının saptanmasında kullanılmıştır. 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.

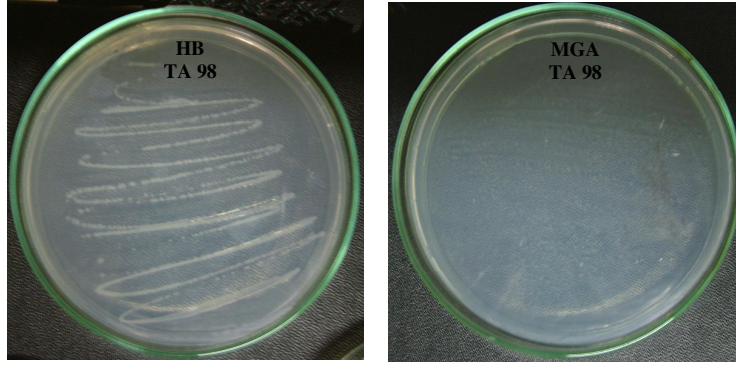
4. BULGULAR

Bu çalışmada tarımda sıklıkla kullanılan 4 çeşit pestisit (fluoroglycofen-ethyl, fenoxanil, pyracarbolid ve benodanil) mutajenik aktivitesi *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 mutant suşları ile araştırılmıştır.

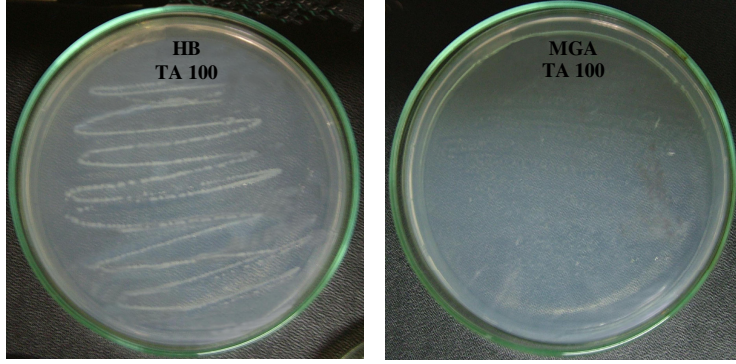
4.1. Genetik İşaretlerin Kontrolü

Çalışmada kullanılan standart test suşlarından TA 98 suşunun histidin gereksinimi (Şekil 1), TA 100 suşunun histidin gereksinimi (Şekil 2), *uvrB* mutasyonu (Şekil 3), *rfa* mutasyonu (Şekil 4), R-faktör varlığı (Şekil 5) ve spontan olarak geriye dönen koloni sayısı (Şekil 6) bakımından genetik işaretlerinin kontrolü yapıldı.

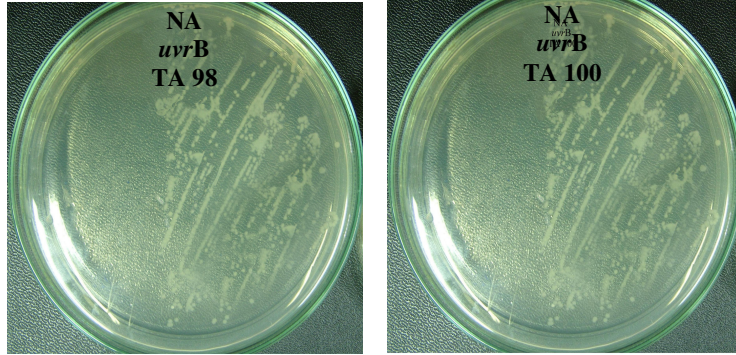
S. typhimurium ile yapılan mutajenite testlerinde kullanılan bakteri kültürünün 1 ml'sinde $1-2 \times 10^9$ ml/bak. olması öngörülmektedir. Yaptığımız çalışmada bu sayıya taze kültürün 5 saatlik inkübasyonu sonunda ulaşılmış ve ml'deki bakteri sayısı 1.4×10^9 olarak hesaplanmıştır.



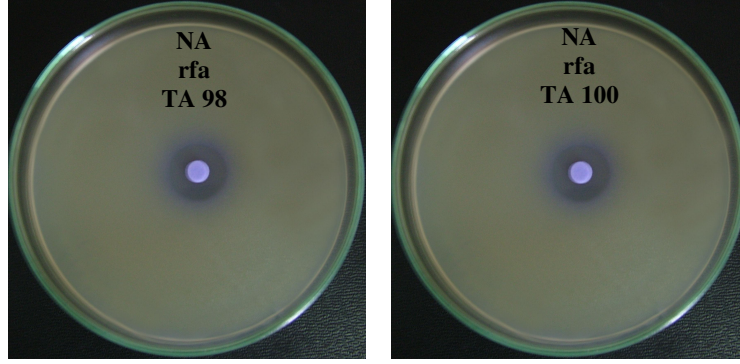
Şekil 1. *S. typhimurium* TA 98 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları



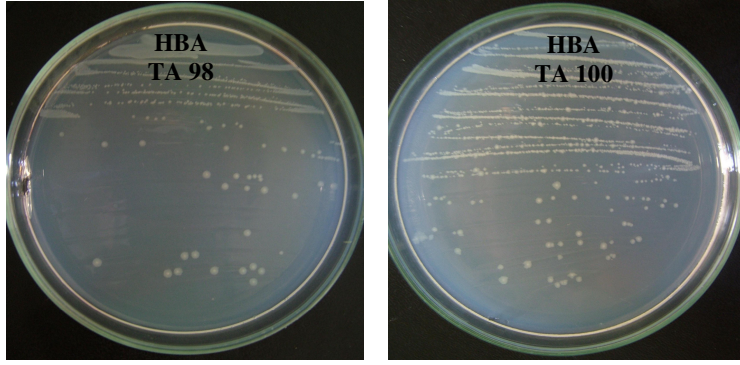
Şekil 2. *S. typhimurium* TA 100 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları



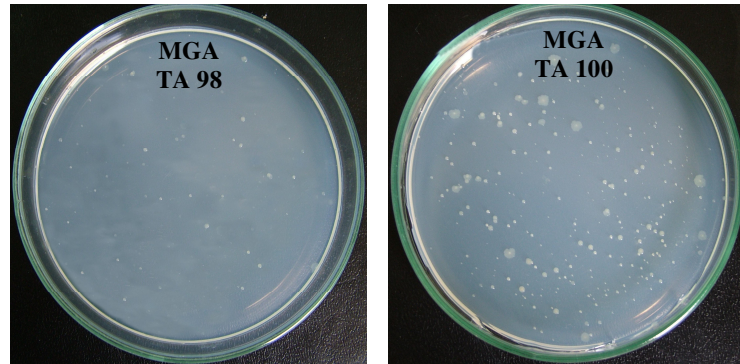
Şekil 3. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının *uvrB* mutasyonu kontrolü sonuçları



Şekil 4. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının rfa mutasyonu kontrolü sonuçları



Şekil 5. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının R-faktör mutasyonu kontrolü sonuçları



Şekil 6. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının spontan olarak geriye dönüş sıklığı kontrolü sonuçları

4.2. S9 Fraksiyonunun Protein Miktarı

Rat karaciğeri 9000xg süpernatantının ml'sinde bulunan protein miktarı Bradford (1976)'a göre yapılmış, Jenway 6305 marka spektrofotometre ile protein miktarı 27.81 mg/ml olarak bulunmuştur.

4.3. Çalışmada Kullanılan Pestisitlere Ait Bulgular

Çalışmada kullandığımız pestisitlerin tümü DMSO içerisinde çözülmüştür. Kullandığımız pestisitlerin sitotoksik etki gösterdikleri dozlar belirlenmiştir. Buna göre; Fluoroglycofen-ethyl, fenoxanil ve pyracarbolid test bileşiklerinin 10000 µg/plak dozunun, benodanil için ise 5000 µg/plak dozunun toksik olduğu bulunmuştur. Mutajenite deneylerinde, toksik dozun altındaki dozlarla çalışılmıştır. Bu yüzden bu üç test bileşiğinin 0.1 µg/plak, 1µg/plak, 10 µg/plak, 100 µg/plak ve 1000 µg/plak konsantrasyonları, benodanil için ise 0.05 µg/plak, 0.5 µg/plak, 5 µg/plak, 50 µg/plak ve 500 µg/plak konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verilmiştir.

Kullanılan pestisitlerin TA 98 ve TA 100 suşları ile S9'lu ve S9'suz olarak plak inkorporasyon testleri yapılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olarak uygulanmış ve birbirinden bağımsız iki deney yapılmıştır. Deney sonuçları standart hata ile birlikte ortalamaları alınarak Çizelge 7'de verilmiştir.

Çizelge 6. *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
Fluoroglycofen-ethyl	0.1	17.50±5.2	27.50±5.4	85.33±7.8	96.66±8.3
	1	18.66±5.8	28.83±7.1	93.83±9.7	104.16±8
	10	19.33±5.2	32.83±3.8	102±25.9	111.00±23
	100	24.33±4.2	26.33±2.4	95.33±13.7	105.50±14
	1000	15.00±5.0	25.00±3.7	105±11	114.5±8.4
Fenoxanil	0.1	19.16±6.4	34.33±6.6	89.66±5.8	102.16±5.8
	1	20.16±5.3	34.00±7.6	104.50±1	116.00±13.8
	10	18.00±2.4	33.83±8.1	170±20.9	181.66±22.2
	100	21.66±7.3	29.66±5.4	204.66±29.4	215.00±26.9
	1000	18.66±2.8	33.66±9.7	188.33±27.7	196.83±24.9
Pyracarbolid	0.1	21.00±4.2	31.00±6.1	94.66±1	107.5±10.9
	1	19.50±5.9	33.00±5.4	96.50±15.9	104.5±10.7
	10	21.33±6.6	26.33±3.7	92.66±9.0	101.00±13
	100	16.00±5.4	21.83±4.6	113.66±9.5	127.33±6.4
	1000	24.66±3.8	30.83±6.7	99.83±11.1	108.66±11.1
Benodanil	0.05	17.50±3.9	28.16±5.3	105.5±25.0	115.5±21.5
	0.5	16.33±4.9	28.00±4.1	101.66±9.7	112.83±9.6
	5	15.00±2.5	28.16±8.1	110.16±19.5	118.66±13.4
	50	17.83±5.1	28.50±7.5	125.83±12.4	141.00±14.29
	500	19.16±5.3	27.16±2.9	95.66±6.4	107.5±7.7
Kontrol		26.66±8.5	29.66±5.9	107.33±9.3	116.16±9.1
DMSO		22.00±2.8	22.00±3.5	88.83±5.9	97.66±6.8
Sodyum azid	10			1121.33±229.4*	1147.66±171.4*
2-aminofluorene	200		950.66±245*		
4-nitro-o-fenilendiamine	200	1396.83±202.2*			

* Kontrolle göre revertant sayısı p< 0.05 düzeyinde anlamlı (One-Way ANOVA Testi)

Pestisitlerin *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşunda S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğundaki revertant koloni sayılarındaki değişimler One-Way ANOVA testi ile incelenmiştir. Kullanılan pestisitler ve farklı dozları revertant sayısını değişik şekillerde etkilemiştir. TA 98 için ortalama revertant koloni sayısı S9 fraksiyonu varlığında 29.66±5.9, yokluğunda ise 26.66±8.5 bulunmuştur. TA 100 için ise ortalama revertant koloni sayıları S9 fraksiyonu varlığında 116.66±9.1 iken S9 fraksiyonu yokluğunda 107.33±9.3 olarak bulunmuştur.

Test maddeleri suda çözünmediği için DMSO'da çözülmüş ve bu çözücünün etkisi de TA 98 için S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda kontrol edilerek her

ikisinde de 22 koloni sayısı olarak bulunmuştur. TA 100 suşunda ise bu değer S9 fraksiyonu varlığında 97.66 ± 6.8 olarak, S9 yokluğunda ise 88.83 ± 5.9 olarak bulunmuştur. *Salmonella typhimurium* TA 98 için S9 fraksiyonu yokluğunda en düşük revertant sayısı fluoroglycofen-ethyl'in 1000 µg/plak konsantrasyonunda, en yüksek revertant sayısı ise pyracarbolid'in 1000 µg/plak konsantrasyonunda saptanmıştır. *Salmonella typhimurium* TA 98 için S9 fraksiyonu varlığında en düşük revertant sayısı pyracarbolid'in 100 µg/plak ve en yüksek revertant sayısı ise fenoxanil'in 1000 µg/plak konsantrasyonunda elde edilmiştir.

Salmonella typhimurium TA 100 için S9 fraksiyonu yokluğunda en düşük revertant sayısı ise, fluoroglycofen-ethyl'in 10 µg/plak konsantrasyonunda, en yüksek revertant sayısı ise fenoxanil'in 100 µg/plak konsantrasyonunda saptanmıştır. *Salmonella typhimurium* TA 100 için S9 fraksiyonu varlığında en düşük revertant sayısı fluoroglycofen-ethyl'in 0.1 ve 10 µg/plak konsantrasyonları ile pyracarbolid'in 10 µg/plak konsantrasyonunda, en yüksek revertant sayısı ise fenoxanil'in 100 µg/plak konsantrasyonlarında elde edilmiştir.

Revertant sayısındaki değişiklikler *Salmonella typhimurium* TA 98 için S9 fraksiyonu yokluğunda kontrol grubuna göre azalmış olup bu azalmalar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. *Salmonella typhimurium* TA 98 için S9 fraksiyonu varlığında ise revertant sayısındaki değişiklikler kontrol grubuna göre artış ve azalış şeklinde olup bu değişiklikler de istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. 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 olarak saptanmıştır. *Salmonella typhimurium* TA 100 suşunda ise revertant sayısındaki değişiklikler S9 fraksiyonu yokluğunda da varlığında da kontrol grubuna göre artış ve azalmalar göstermiş olup bu değerler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. 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.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

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 (Vural 1996).

Salmonella/mikrozom test sistemi, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenik potansiyellerini saptamak üzere geliştirilmiş ve çeşitli ülkelerde oldukça yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı test sistemlerinden biridir. Çünkü bu test, test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş ve mutajen-karsinojen 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 vd 2005, İpek vd. 2005, Kutlu 2005).

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).

Bu çalışmada, günümüzde oldukça yaygın olarak kullanılan 4 farklı pestisit (fluoroglycofen-ethyl, fenoxanil, pyracarbolid ve benodanil) mutajenik etkileri kısa zamanlı test sistemlerinden biri olan Ames testi ile belirlenmeye çalışılmıştır. Yaptığımız çalışma sonucunda TA 98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında ortalama revertant koloni sayısı 29.66 ± 5.9 , yokluğunda ise 26.66 ± 8.5 olarak bulunmuştur. TA 100 suşu için ise bu değerler sırasıyla 116.16 ± 9.1 ve 107.33 ± 9.3 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. Çalışmamızda elde ettiğimiz sayılar bu değerler arasındadır. Bu değerlerin bu derece farklı olmaları çeşitli parametrelerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle her mutant suş için, kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı tek bir

sayı olarak değil de, belirli bir aralıkta verilir. Bu parametreler arasında minimal ortamın tipi, glikoz-6-fosfat, β -NADP, fosfat tamponu, glikoz ve tuz çözeltisinin derişimi, petrilerdeki minimal agarın hacmi, top agarın miktarı ve yayılma şekli, etüvdeki nem oranı, S9 fraksiyonunun miktarı, minimal agarın bileşimi ve hazırlanmasındaki farklılıklar gibi etkileri sayabiliriz (Belser vd. 1981, Boath vd. 1980).

Fluoroglycofen-ethyl maddesinin TA 98 suşu ile S9 fraksiyonu yokluğunda yapılan çalışmada maddemizin hiçbir konsantrasyonu 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 μ g/plak, en düşük değer ise S9 yokluğunda 1000 μ g/plak konsantrasyonunda bulunmuştur.

TA 100 suşunda ise deney S9 fraksiyonu varlığı ve yokluğunda yapılmış ve elde edilen ortalama revertant koloni sayıları, kendiliğinden geriye dönen ortalama revertant koloni sayısı değerlerine yakın bulunmuştur. Bu madde ile yapılan çalışmalarda en yüksek değer S9 varlığında 10 μ g/plak, en düşük değer ise S9 yokluğunda 10 μ g/plak konsantrasyonunda bulunmuştur. Fluoroglycofen-ethyl maddesinin Ames testinde verdiği koloni sayıları, TA 98'de de TA 100'de de spontan değerlerin üzerine çıkmamıştır. Sonuç olarak bu madde hem TA 98 suşu ile hem de TA 100 suşu ile yapılan deneylerde herhangi bir mutajenik etki göstermemiştir.

Bu çalışmadan farklı olarak, fluoroglycofen-ethyl (%97.8 saflıkta) lastik bir sonda ile gebelik süresinin 8-18. günlerinde 1, 10, 30 ve 90 mg/kg vücut ağırlığı/gün konsantrasyonlarında Yeni Zelanda beyaz tavşanlarına verilmiştir. Hayvanlar 29. günde öldürülmüş ve 90 mg/kg vücut ağırlığı/gün uygulanan gruplarda 10-29. günlerde açık olarak toksisitenin belirtileri görülmüştür. Bu hayvanlarda az, kırmızı ve yumuşak feçes, ince görünüm, kırmızı vajinal sıvı, adalelerde uyum

bozukluğu ve uyuşukluk olma sıklığı artmıştır. 90 mg/kg vücut ağırlığı/gün gruplarda anneye ait vücut ağırlıkları gebeliğin son 12 gününde azalmıştır¹³.

Diğer bir çalışmada ise, fluoroglycofen-ethyl'in muhtemel teratojenik ve maternal toksisitesi sıçan ve tavşanlarda araştırılmıştır. Sıçanlarda bu madde 200 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozunun üstünde embriyotoksik, fitotoksik ve teratojenik değildir. Bu madde 60 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozunun üstünde ise maternal toksik etkiye sahiptir ve vücut ağırlığında bir azalma ile kendini gösterir. Tavşanlarda ise bu madde 900 mg/kg vücut ağırlığı/gün konsantrasyonunda düşük riskini artırır, fitotoksik ve embriyotoksik (resorbsiyonda artış ve fetal boyutunda ve yaşama yeteneğinde azalma)'tir. Tavşanlarda herhangi bir teratojenik etkiye rastlanılmamıştır¹³.

Fenoxanil maddesinin TA 98 suşu ile S9'suz ortamda uygulanması sonucunda, elde edilen değerlerin hiç biri spontan olarak geriye dönüş değerlerini aşmamıştır. S9'lu olarak yapılan deneylerde ise, hiçbir dozda spontanı çok aşan bir değere rastlanmamıştır. Bu madde ile yapılan çalışmalarda TA 98 suşu için en yüksek değer S9 varlığında 1000 µg/plak en düşük değer ise S9 yokluğunda 0.1 konsantrasyonunda tespit edilmiştir.

Deney TA 100 suşu üzerinde uygulandığında ise, elde edilen değerler kendiliğinden geriye dönen ortalama revertant koloni sayısı değerleri arasında çıkmıştır. S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında yapılan deneyde bu maddenin 100 ve 1000 µg/plak olan dozlarında kontrol grubunun iki katını aşan değerler bulunmuştur. Deneylerimiz fenoxanil maddesindeki bu iki dozun TA 100 suşunda mutajenik etki ettiğini göstermektedir. Bizim yaptığımız çalışmaya benzer bir şekilde Asal'ın 1985 yılında yaptığı bir çalışmada da 10 pestisite uygulanan Ames testi sonucunda testi yapılan pestisitler içinde sadece orthacide 50 WP pestisiti, TA 100 suşunda mutajenik bir etkiye neden olurken TA 98 suşunda negatif sonuç elde edilmiştir. TA 100 ile yaptığımız çalışmalarda en yüksek değer S9 varlığında 100 µg/plak, en düşük değer ise S9 yokluğunda 0.1 µg/plak konsantrasyonunda bulunmuştur.

¹³ <http://www.fluoridealert.org/pesticides/epage.fluoroglycofen-ethyl.htm>13.08.2006

Yapılan diğler bir çalışmada da fenitrothion insektisitinin mutajenitesi Ames testi ile araştırılmış ve fenitrothion'da zayıf mutajenite, sadece *Salmonella typhimurium* TA 100'de gözlenirken, S9 karışımının ilavesiyle mutajenite artmıştır. Bizim alışmamızda da bu çalışmaya paralel olarak TA 100 suşunda fenoxanil maddesinde mutajenik aktiviteye rastlanırken, TA 100 suşunda S9 yokluğunda yapılan deneylere göre S9 varlığundaki deneylerin sonuçlarındaki koloni sayılarında bir artışa rastlanmaktadır (Hara 1989).

Pyracarbolid maddesi ile TA 98 suşu kullanılarak S9 yokluğunda yapılan deneylerde kullanılan dozların hiç biri spontan kontrol değlerlerinin üzerinde değildir. S9'lu deneyde ise bu değlerler spontan değlerlerin çok üzerine çıkmamıştır. Bu madde ile yapılan çalışmalarda en yüksek değler S9 varlığında 1 µg/plak, en düşük değler ise S9 yokluğunda 100 µg/plak konsantrasyonunda bulunmuştur.

Pyracarbolid maddesinin TA 100 suşu ile S9 varlığı ve yokluğunda yapılan deneylerde elde edilen ortalama revertant koloni sayıları kendiliğinden geriye dönen ortalama revertant koloni sayısı değlerlerine yakın olarak saptanmıştır. Bu madde ile yapılan çalışmalarda en yüksek değler S9 varlığında 100 µg/plak, en düşük değler ise S9 yokluğunda 1 µg/plak konsantrasyonunda bulunmuştur. Bu da bize bu maddenin her iki suşta da mutajenik bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir.

Benodanil maddesinin TA 98 suşu ile S9 yokluğunda yapılan deneylerde elde edilen ortalama revertant koloni sayıları kendiliğinden geriye dönen ortalama revertant koloni sayısı değlerlerine göre düşük iken S9 varlığundaki deneylerde bu değlerler geriye dönen ortalama revertant koloni sayısına yakın olarak bulunmuştur. Hem S9'lu hem de S9'suz olarak uygulanan çalışmalardaki bütün dozlarda mutajenik etkiye rastlanmamıştır. Bu madde ile yapılan çalışmalarda en yüksek değler S9 varlığında 5 µg/plak konsantrasyonunda, en düşük değler ise S9 yokluğunda 0.5 µg/plak konsantrasyonunda elde edilmiştir. S9 varlığında yapılan çalışmalarda elde edilen ortalama revertant koloni sayılarının S9 yokluğundaki revertant koloni sayılarına göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Benodanil maddesinin TA 100 suşu ile S9 varlığı ve yokluğunda yapılan deneyleri sonucunda bulunan değerler spontan kontrol değerlerine çok yakın rakamlardır. Bu madde ile yapılan çalışmalarda en yüksek değer S9 varlığında 50 µg/plak, en düşük değer ise S9 yokluğunda 0.05 µg/plak konsantrasyonunda bulunmuştur. Yine TA 98 ile yapılan deneyde olduğu gibi TA 100 suşunda da S9 varlığında yapılan çalışmalarda elde edilen ortalama revertant koloni sayılarının S9 yokluğundaki revertant koloni sayılarına göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

1982 yılında Udeogalanya tarafından yapılan bir çalışma da ise, benodanilin bitkiler üzerindeki etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır. Benodanil eğer ürüne erken büyüme evresinde uygulanırsa mantar hastalığının oluşmasında önemli derecede azalma olduğu gözlenmiştir. Bu Tyra, Emir ve Vada gibi mantar hastalığı oluşumu yavaş olan varyetelerde olduğu gibi Midas, Zephyr ve Mazurka'da da bulunmuştur. Benodanil bitkideki sürgün ve yaprak sayısında azalmalara neden olmasına rağmen hastalığa yakalanmayan bitkinin büyümesini artırmaktadır.

Bir başka çalışmada ise, Yeoman ve arkadaşları 1986 yılında içlerinde benodanilinde bulunduğu birçok fungusit çeşidini fasülye ekili alanlardaki mantar hastalığının kontrolü için kullanmışlardır. Ve sonuçta bütün fungusitlerin mantar hastalığının olma sıklığını azalttıklarını tespit etmişlerdir.

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).

Tzoneva ve arkadaşlarının 1985 yılında yapmış olduğu çalışmada, endodan fungusitinin 7.5 ve 12.0 µg/plak konsantrasyonları TA 100 suşunda S9 varlığında zayıf mutajenik etkiye sahipken, kilacar insektisit-akarisitinin S9 varlığında 2.5 ve 5.0 µg/plak konsantrasyonlarının ağır mutajenik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu çalışmadan farklı olarak, fenoxanil ile TA 100 suşunda yaptığımız çalışmada hem S9 varlığı hem de yokluğunda mutajeniteye rastlanılmıştır.

Shukla 1994 yılında yapmış olduğu çalışmada, bir dithiocarbamate fungusiti olan mancozeb'in muhtemel mutajenik aktivitesini *Salmonella typhimurium* test suşlarından TA 97, TA 98, TA 100 ve TA 102 ile araştırmıştır. Sonuç olarak 40 µg/plak ve onun üstündeki dozlarda bütün suşlarda mancozeb toksik bir etki göstermiştir. Mancozeb, aseton ve DMSO ile çözüldüğünde TA 97 suşunda metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz çalışmalarda revertant koloni sayısında doza bağlı bir artış gözlenmiştir. Bu çalışmanın aksine bizim yaptığımız çalışmaların hiç birinde doza bağlı bir artış gözlenmemiştir.

Diril ve arkadaşları (1988), Türkiye'de yaygın olarak kullanılan bazı pestisitlerin *Salmonella typhimurium*/mikrozom mutajenite test sistemi ile mutajenik etkilerini araştırmışlardır. TA 100 suşu için endosulfan, azinfosetil ve diklorvos'un mutajenik; diptereks ve trifluralin'in ise zayıf mutajenik etki gösterdiği belirlenmiştir. Trifluralin'in *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu için mutajenik; endosulfanın ise zayıf mutajenik etkili olduğu saptanmıştır.

S. typhimurium TA 98 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 sonuca TA 100 suşu ile yapılan çalışmalar sonucunda da rastlamaktayız. Buna dayanarak test ettiğimiz 4 maddenin de canlı vücuduna girdiğinde metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan metabolitlerinin DNA ile etkileşimini bir miktar artırdığı düşünülebilir.

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

Sonuç olarak; yaptığımız deneyde uygulanan maddelerden fenoxanil'in TA 100 suşunda 100 ve 1000 µg/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 değerlendirilerek sonuçların karşılaştırılması ve bu şekilde güvenilir bir sonuca varılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Aiub, C.A.F., Coelho, E.C.A., Sodr , E., Pinto, L.F.R. and Felzenszwalb, I., 2002, "Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos", Genetics and Molecular Research. 1 (2): pp.159-166.
- 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.
- Asal S., 1983, "Türkiye'de yaygın olarak kullanılan bazı pestisitlerin mutagen etkilerinin *Salmonella typhimurium* histidin mutantlarıyla saptanması üzerinde araştırmalar", Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu, Ankara.
- Asal, S., 1985, "Bazı pestisitlerin mutajenik etkileri üzerinde araştırmalar", Doğa Bilim Dergisi, 9(1) :72-78.
- 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.
- Bahçeci, Z., 2002, "Moleküler Biyoloji", 2. Baskı, 10. Bölüm, Gazi Üniversitesi, Kırşehir Eğitim Fakültesi, Ankara, 209-216 p.
- 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.
- Başaran, A., Başaran, N., Solak, M., Güneş, H., 1995, "Tıbbi Biyoloji ve Genetik", Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi Yayınları, 117-123.
- Beaudet, 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.
- Bilge E., 1981, "Genetik", İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstanbul, 221.
- Bilgin, M., 1992, "Studies on the mutagenicity of an organophosphorus pesticide trichlorfon", Yüksek Lisans Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Ankara.
- 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.
- Brockman, H.E., de Serres, I.J., Ong, T., et all., 1984, "Mutation test in *Neurospora crossa*: a report of the US environmental production agency genetoc program1", Mutation Research, Vol.133, pp.87-134.

- Brooks, T.M., Dean, B.J., Hutson, D.H., Potter, D., 1982, "Microbial mutation studies with tetrachlorvinphos (Gardona)", *Mutation Research*, Oct,105(4):211-221.
- Bulut, H., Tamer, A., 1996, "Pestisit Kullanımının Azaltılması ile İlgili Politika ve Stratejiler", II. Ulusal Zirai Mücadele İlaçları Sempozyumu, Ankara,12-24.
- Gomes-Carneiro-, M.R., Dias, D.M.M., Paumgarten, F.J.R., 2005, "Study on the mutagenicity and antimutagenicity of β -ionone in the *Salmonella*/microsome assay", *Food and Chemical Toxicology*.
- Ciğerci, İ.H., Liman, R., Kutlu, H.M., Aydoğan, G., Konuk, M., baskıda, "Eber Gölü ve akarçay suyunun mutajenik özelliklerinin Ames *Salmonella*/mikrozom testi ile araştırılması", Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi.
- Çelik M., 2003, "Dinocap Fungusitinin *Allium cepa* L. Kök Ucu Hücreleri ve İnsan Periferik Lenfositlerinde Sitogenetik Etkileri", Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- De Lorenzo, F., Staiano, N., Silengo, L., Cortese, R., 1978, "Mutagenicity of diallate, sulfallate, triallate and relationship between structure and mutagenic effects of carbamates used widely in agriculture" *Cancer Research*, Jan; 38(1):13-5.
- 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., Çalı, 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.
- Demirsoy, A., 1992, "Yaşamın Temel Kuralları/Genel Biyoloji", Cilt 1, Kısım 1, Ankara, 196-200 p.
- Dığrak, M., Kırbağ, S., Özçelik, S., 1997, "Bazı pestisitlerin toprak mikrobiyotası üzerine etkisi" *Journal of Qafqaz University*, Vol.1, pp.10-25.
- 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.
- Elesperu, E., Yarmolinsky, M.B., 1979, “A colorimetric assay of lizogenic induction designed for screening potential carcinogenic and carcinostatic agents”, Environmental Mutagenesis, 1, 65-78.
- Erensayın, C., 2000, “Genetik”, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 165-183p.
- Falakalı, B., 1993, “Genel Genetik”, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, İzmir, 84-97p.
- Gajewska, J., Szczypka, 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.
- Gedikli S., 2001, “Kayseri İli İçme Sularında Organoklorlu Pestisit Kalıntılarının Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Gollapudi, B.B., Mendrala, A.L., Linscombe, V.A., 1995, “Evaluation of the genetic toxicity of the organophosphate insecticide chlorpyrifos”, Mutation Research, Mar; 342(1-2):25-36.
- 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.
- Hara, M., Kogiso, S., Yamada, F., Kawamoto, M., Yoshitake, A., Miyamoto, J., 1989, “Mutagenicity studies on fenitrothion in bacteria and mammalian cells”, Mutation Research, Jan; 222(1):53-61.
- Healy, C.E., Kier L.D., Broeckert F., Martens M.A., 2003, “A review of the genotoxicity of triallate” International Journal of Toxicology., May-Jun; 22(3):233-251.
- 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.

- Isono, K., Younna, 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.
- Kada, T., Hirano, K., 1980, "Screening of environmental chemical mutagens by the rec-assay system with *Bacillus subtilis*, chemical mutagens, principles and methods for their detection", New York, Plenum. Hollaendes, A., Serres, F., vol.6.
- 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.
- Karaer, F., Gürlük, S., 2003, "Gelişmekte olan ülkelerde tarım-çevre-ekonomi etkileşimi", Doğu Üniversitesi Dergisi, 197-206.
- Kutlu, M., Aydoğan, G., Işıkdag, İ., 2005, "İki yeni benzimidazol türevinin sentezi, yapısal analizi ve mutajenik aktivitelerinin belirlenmesi", Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi, 5:25-36.
- 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.
- Lah, B., Zinko, B., Tisler, T., Marinsek-Logar, R., 2005, "Genotoxicity detection in drinking water by Ames Test, Zimmermann Test and Comet Assay", Acta Chimica Slovenica, 52:341-348.
- Leifer, Z., Kada, T., Mandel, M., Zeiger, E., Stafford, R., Rosenkranz, H.S., 1981, "An evaluation of test using DNA repair deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity", Mutation Research, Vol. 87, pp.211-297.
- 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.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983, "Revised methods for the mutagenicity test", Mutation Research, Vol.113, pp.173-215.

- Mathur, N., Bhatnagar, P., Nagar, P., Bijarnia, M.K., 2005, "Mutagenicity assessment of effluents from textile/dye industries of Sanganer, Jaipur (India): A Case Study", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61:105-113.
- 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.
- Mc Cann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N., 1975a, "Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome tests: Assay of 300 chemicals", *The Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.*, Vol.72, pp.5135-5139.
- Mc Daniels, C.C., Stelma G.N., Jr., 1990, "Comparison of the *Salmonella* (Ames) test, Umu tests and the Chromotests for detecting genotoxins", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol.16, pp.204-205.
- 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.
- Moriya, M., Ohta, T., Watanabe, K., Miyazawa, T., Kato, K., Shirasu, Y., 1983, "Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems", *Mutation Research*, Mar; 116(3-4):185-216.
- Oraler, G., 1990, "Genetik", İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstanbul, 177-178p.
- 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 monooksijenaz enzim sistemleri", *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 3(3), 257-275.
- Öztürk S., Özge N., 1978, "Bitki Koruma İlaçları", Hasad Yayıncılık, İstanbul, 70-107p.
- 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.
- Quillardet, P., Hofnung, M., 1985, "The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins:procedures", *Mutation Research*, 147, 65-78.
- Quillardet, P., de Bellecombe, C., Hofnung, M., 1985, "The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds", *Mutation Research*, 147, 89-85.
- Ramel, C., Rannung, U., 1980, "Short- term mutagenicity test", *Environmental Healt.*, 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.
- Reifferscheid, G., Heil, J., 1996, "Validation of the SOS/*umu* test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data", *Mutation Research*, 369:129-145.
- Rosenkranz, H.S., Mermelstein, 1980, "The *Salmonella* mutagenicity and the *E. coli* Pol A/Pol A₁ repair assays evaluation of relevance to carcinogenesis. The predictive value of short-term screening test in the evaluation of carcinogenicity", Elsevier/North-Holland , Amsterdam, 5-26.
- Ruiz, M.J., Marzin, D., "Genotoxicity of six pesticides by *Salmonella* mutagenicity test and SOS chromotest", *Mutation Research*, May, 23; 390(3):245-255.
- 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.
- Sato, S., Tomita, I., 2001, "Short-term screening method for the prediction of carcinogenicity of chemical substances: current status and problems of an *in vivo* rodent micronucleus assay", *Journal of Health Science*, 47(1):1-8.
- Shukla, Y., Taneja, P., Arora, A., Sinha, N., 2004, "Mutagenic potential of mancozeb in *Salmonella typhimurium*" *Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 23(4):297-302.

- Slater, E.E., Anderson, M.D., Rosenkranz, H.S., 1971, "Rapid detection of mutagens and carcinogens", *Cancer Research*, 31, 970-973.
- 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.
- Tzoneva, M., Kappas, A., Georgieva, V., Vachkova, R., Tziolas, V., 1985, "On the genotoxicity of the pesticides endodan and kilacar in 6 different test systems", *Mutation Research, Genetic Toxicology*, 157(1):13-22.
- Udeogalanya, A.C., 1982, "Effect of the systemic fungicide benodanil on the growth and development of six spring barley varieties in the presence or absence of Brown rust infection in the glasshouse", *Beitr Trop Landwirtsch Veterinarmed*, 20(4):467-74.
- 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.
- Vargas, V., Guidobono, R.R., Henriques, J.A., 1991, "Genotoxicity of plant extracts", *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 86(2): 67-70.
- 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, Hollaaender, 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.
- 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.

- Yeoman, D.P., Lapwood, D.H., McEwen, J., 1986, "Effects of a range of fungicides used to control rust (*Uromyces viciae-fabae*) on spring-sown field beans (*Vicia faba*) in the UK", *Crop Protection*, 6(2):90-94.
- Yoon, J.Y., Oh, S., Yoo, S., Lee, S., Lee, H., Choi, S., Moon, C., Lee, B., 2001, "N-Nitrosocarbofuran, but not Carbofuran, induces apoptosis and cell cycle arrest in CHL cells", *Toxicology*, Vol.169, pp.153-161.
- Yue, K., Wang, M., Zhou, Z., 1995, "Usage of the geno-toxicological studies in the biological evaluation of dental materials", *Chinese Journal of Stomatology*, 30(1):6-9.
- Yücer, M.M., 1996, "Zirai Mücadele İlaçları", Yenilik Basımevi, Ankara, 44p.
- Yüksel, N., 1999, "Sitokrom P-450 Enzim Sistemi ve İlaç Etkileşmeleri", 35. Ulusal Psikiyatri Kongresi, Trabzon.
- 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.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca benden yardım ve katkılarını esirgemeyen ve bu tezin hazırlanmasında tüm laboratuvar desteğini sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Muhsin KONUK'a, tezimin tamamlanmasında büyük emek sarf eden değerli arkadaşım Arş. Grv. Recep LİMAN'a, yine çalışmalarım boyunca laboratuvar aşamasında bana büyük yardımları olan arkadaşım Ahmet BARIŞ'a, katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Elif KORCAN'a, manevi desteğini bana her zaman hissettiren dostum Arş. Grv. Arzu ÖZKARA'ya, çalışmalarım sırasında ve tez yazımında büyük katkı sağlayan Arş. Grv. Yasin EREN'e ve yine manevi desteğini esirgemeyen Arş. Grv. S. Feyza KUŞ'a, takıldığım her noktada yardımcı olan Arş. Grv. Çiğdem KAPLAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca bu tezi hazırlarken her türlü maddi-manevi desteğini ve yardımlarını esirgemeyen değerli eşim Murat AKYIL'a ve tezimin hazırlanmasında bana büyük destek olan sevgili annem ile şu an yanımda olmasa da varlığını her zaman kalbimde hissettiğim ve bu noktaya gelmemde büyük çaba sarfetmiş olan değerli babama çok teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Afyonkarahisar'da doğdu. 1991 yılında ilköğrenimini, Afyonkarahisar Şeker İlköğretim Okulu'nda, 1994 yılında ortaöğrenimini Afyonkarahisar Merkez Atatürk Ortaokulu'nda ve lise öğrenimini Afyon Lisesi'nde tamamladı. 1998 yılında Afyon Lisesi'nden mezun oldu. 2002 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde Lisans Eğitimini bitirdi. Aynı yıl içerisinde Afyon Kocatepe Üniversitesi'nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Halen aynı yerde çalışmakta olup Yüksek Lisans öğrenimini devam ettirmektedir.