

BİLECİK KARASU DERESİNİN MUTAJENİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Özgür ATEŞ

Yüksek Lisans Tezi

**Biyoloji Anabilim Dalı
Ocak 2011**

JURİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Özgür ATEŞ' in “**Bilecik Karasu Deresinin Mutajenitesinin Araştırılması**” başlıklı Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans tezi aşağıdaki juri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı- Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Mehtap KUTLU	,
Üye :Yard. Doç. Dr. Hüseyin BERBER	
Üye : Yard. Doç. Dr. Filiz SUSUZ	

Anadolu üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
.....tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİLECİK KARASU DERESİNİN MUTAJENİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Özgür ATEŞ

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Mehtap KUTLU

2011, 40 Sayfa

Bu çalışmada Bilecik Karasu deresinin 6 ayrı noktasından alınan su ve sediment örneklerinin mutajenitesi Ames testi ile belirlenmiştir. Deneyde *Salmonella typhimurium* 'un TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. TA 98 suşu çerçeve kayması TA 100 suşu nokta mutasyonu taşır. Deneyler her nokta için 5 doz, her doz için 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. TA 98 ve TA 100 su ve sediment örneklerinin gösterdiği mutajenik etkiler doza bağlı cevap eğrisi şeklinde grafik oluşturularak gösterilmiştir. Grafiklerden elde edilen bulgulara göre TA 98 ve TA 100 suşları için su ve sediment örneklerinin mutajenik etkinliği karşılaştırılmalı olarak sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Ames, *Salmonella typhimurium*, Karasu, Mutajenite

ABSTRACT

Master of Science Thesis

AN INVESTIGATION OF MUTAGENICITY OF KARASU RIVER

Özgür ATEŞ

**Anadolu University
Graduate School of Science
Biology Program**

Supervisor: Prof. Dr. Mehtap KUTLU

2011, 40 Pages

In this study, mutagenity of six different water and sediment samples of Karasu River determined by Ames test. In this test TA 98 and TA 100 strain of *Salmonella typhimurium* were used. TA 98 strain has frameship muatation, TA 100 has base-pair substitution. The experiment was established 5 doses with 3 replicates for each point. The mutagenic effects of water and sediment samples, which were exposed to TA 98 and TA 100 strain, were shown as dose depent respond curve by drawing graphics. According to finding from graphics, matching the mutagenic effects of water and sediment samples on TA 98 and TA 100 strain were submited.

Key Words: Ames, *Salmonella typhimurium*, Karasu, Mutagenecity

TEŞEKKÜR

Çalışmamda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve tezimin değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehtap KUTLU'ya kendisinden Ames testini öğrendiğim ve bu testin yapılıp değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Araştırma Görevlisi Sayın Gözde AYDOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Benden desteklerini esirgemeyip çalışmalarına yardımcı olan Eskişehir Toprak ve Su Kaynakları Araştırma Enstitüsü Müdürü Sayın Halil POLAT'a, Müdür Yardımcısı Sayın Ramazan YAVUZ'a, Toprak Bölüm Başkanı Sayın Gülser YALÇIN'a ve çalışmalarımda yardımcı olan Laborant Sayın Ferdi SAĞIR'a teşekkürlerimi sunarım.

Özgür ATEŞ

Ocak 2011

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
1.GİRİŞ	1
1.1 Mutasyon.....	2
1.2 Mutasyon Çalışmaları.....	3
1.3 Mutasyon Çeşitleri.....	3
1.3.1 Kromozom Sayı Değişmeleri.....	3
1.3.1.1 Euoploidi.....	3
1.3.1.2 Aneuploidi.....	4
1.3.2 Kromozom Yapı Değişmeleri.....	4
1.3.2.1 Delesyon.....	4
1.3.2.2 Duplikasyon.....	5
1.3.2.3 İnversiyon.....	5
1.3.2.4 Translokasyon.....	5
1.3.3 Gen Mutasyonları.....	5
1.3.3.1 Gen Mutasyonlarının Sınıflandırılması.....	6
1.4 Mutasyonların Sebepleri ve Etkileri.....	6
1.5 DNA Onarım Teknikleri.....	7
1.5.1 DNA Polimeraz Proofreading ile Onarım.....	7
1.5.2 Fotoreaktivasyon ile Onarım	7
1.5.3 Kesme-Çıkarma Onarımı.....	7
1.5.4 Yanlış eşleşme onarımı.....	8
1.5.6 SOS Onarımı.....	8
1.6 Mutajenite Testleri.....	8
1.6.1 Sitogenetik Testler.....	8

1.6.1.1 Yapısal kromozom bozulma testi.....	9
1.6.1.2 Mikronükleus testi.....	9
1.6.1.3 Comet testi.....	9
1.6.1.4 Kardeş kromotid değişim yöntemi.....	10
1.6.2 Bakteriyel Yöntemler.....	10
1.6.2.1. UMU (SOS) Testi.....	10
1.6.2.2. E. Coli lak I test sistemi.....	10
1.6.2.3. Salmonella / Mikrozom (Ames) sistemi.....	11
2. MATERYAL VE METOT	12
2.1 Materyal	12
2.1.1. Test Maddelerin Eldesi	13
2.1.1.1. Sedimet Örneklerinin Hazırlanışı.....	13
2.1.1.2. Su Örneklerinin Hazırlanışı.....	13
2.1.2. <i>Salmonella typhimurium</i> Test Suşları.....	14
2.1.3. Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları.....	14
2.2 Metot.....	18
2.2.1.Salmonella Suşlarının Kültürlerinin ve Master Plaklarının Hazırlanması.....	18
2.2.2. Salmonella Suşlarının Saklanması ve Stok Kültürlerin Açılması.....	18
2.2.3. Salmonella Suşlarının Genetik Kontrollerinin Yapılması.....	19
2.2.3.1. Histidin Gekersinimi Kontrolü.....	19
2.2.3.2. Rfa Mutasyonu Kontrolü.....	19
2.2.3.3.UVrB Mutasyonu Kontrolü.....	19
2.2.3.4. R faktör Varlığı Kontrolü.....	20
2.2.3.5. Spontan Geriye Dönüş Sıklığı Kontrolü.....	20
2.2.4. Ames Testinin Yapılışı.....	20
2.2.4.1. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	21
3. BULGULAR	22
3.1. Sediment Örnekleri TA 98 ve TA 100 Sonuçları.....	23
3.2. Su Örnekleri TA 98 ve TA 100 Sonuçları.....	25
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	37
KAYNAKLAR	38

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.1. A,B,C Noktaları Sediment Örneklerinin TA 98 ve TA 100 Sonuçlar.....	23
Tablo 3.1.2. D,E,F Noktaları Sediment Örneklerinin TA 98 ve TA 100 Sonuçları.....	24
Tablo 3.2.1 A, B, C, Noktaları Su örneklerinin TA 98 Sonuçları.....	25
Tablo 3.2.2 D, E, F, Noktaları Su örneklerinin TA 98 Sonuçları	26
Tablo 3.2.3 A, B, C, Noktaları Su örneklerinin TA 100 Sonuçları.....	27
Tablo 3.2.4 D, E, F, Noktaları Su örneklerinin TA 100 Sonuçları	28

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Örnek alınan noktalar.....	12
Şekil 2. A noktası sediment örneğinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	29
Şekil 3. A noktası sediment örneğinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	29
Şekil 4. B noktası sediment örneğinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	29
Şekil 5. B noktası sediment örneğinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	30
Şekil 6. C noktası sediment örneğinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	30
Şekil 7. C noktası sediment örneğinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	30
Şekil 8. D noktası sediment örneğinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	31
Şekil 9. D noktası sediment örneğinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	31
Şekil 10. E noktası sediment örneğinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	31
Şekil 11. E noktası sediment örneğinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	32
Şekil 12. F noktası sediment örneğinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	32
Şekil 13. F noktası sediment örneğinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	32
Şekil 14. A noktası su örneklerinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	33
Şekil 15. A noktası su örneklerinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	33
Şekil 16. B noktası su örneklerinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	33

Şekil 17. B noktası su örneklerinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	34
Şekil 18. C noktası su örneklerinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	34
Şekil 19. C noktası su örneklerinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	34
Şekil 20. D noktası su örneklerinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	35
Şekil 21. D noktası su örneklerinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	35
Şekil 22. E noktası su örneklerinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	35
Şekil 23. E noktası su örneklerinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	36
Şekil 24. F noktası su örneklerinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	36
Şekil 25. F noktası su örneklerinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	36

1.GİRİŞ

Günümüzde gelişen teknoloji insanların yaşamlarında büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Gelişen teknoloji, hızlı nüfus artışı artan sanayileşme sonucu insanlar her geçen gün daha fazla kimyasal maddelerle karşılaşmaktadır. Bu kimyasal maddelere ve bunların bozunması sonucu oluşan atık maddeler çeşitli yollarla doğaya karışmakta ve kullanıldıkları yerlerden binlerce kilometre uzaklıktaki canlıları bile etkilemektedir.

Teknolojik gelişmelerin insan yaşamına sunduğu fiziksel ve kimyasal ajanların dahil olduğu çok sayıda çevresel faktör, sağlık açısından tehlike oluşturma oluşturmaktadır ve ayrıca insan DNA'sı üzerinde olumsuz etkilerde bulunmaktadır.

İnsan popülasyonu çevredeki kanserojen ve mutajen maddelerin etkisinden korumak için çevremizde bu özelliklere sahip bileşiklerin tespit edilmesi ve etkilerinin değerlendirilmesi öncelikle önemli ve gereklidir [1].

Günlük yaşama önemli ölçüde giren X ışınları, gamma ışınları ve radyasyon kaynaklarının (televizyon, telsiz telefon, radyoaktif atıklar, nükleer silahlar, nükleer santraller vb.) hatalı ya da kötü amaçlarla kullanımının biyolojik sistemlere zarar verdiği kanıtlanmıştır. Buna karşın birçok araştırmacı mutajen kimyasalların radyasyondan çok daha zararlı olduğunu savunmaktadır. Çünkü radyasyon kaynağını tespit etmek, koruma önlemi almak ve miktarını ölçmek mümkün iken, bir çok kompleks kimyasal madde karışımına maruz kalan kişide ve de yavrusunda görülmeyebilir. Ancak resesif bir allelin nesiller sonra ortaya çıkma olasılığı vardır. Bu kimyasalların çok küçük dozları mutasyona neden olabileceği gibi kanserojen de olabilir[2,3].

Kimyasal maddeler maddelerin mutajenik aktivitelerini araştıran ilk çalışmalar İkinci Dünya Savaşı'ndan hemen sonra bir grup kimyasal üzerinde yapılmış ve ilk olarak hardal gazının etkili bir mutajen olduğu saptanmıştır. Dünyanın hemen her yerinde yapılan deneylerle diğer bazı kimyasallara dikkat çekilmiştir. 1972 yılında yapılan bir araştırmada yiyecekleri renklendirme, koruma ve diğer amaçlarla kullanılan 2500 kadar katkı maddesi olduğu tespit edilmiştir. Yiyeceklere bulaşarak vücuda giren pestisidler ve çeşitli amaçlarla kullanılan ilaçlar üzerinde durulmuştur[4].

Mutajenlerin etki mekanizması kesin olarak aydınlatıldıktan sonra belirli çevresel mutajenlerin insanda kansere sebep olabileceği şüphesi doğmuştur. Mutajenite ve karsinojenite arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma ile bilinen 175 karsinojenik maddenin 157'sinin aynı zamanda mutajen olduğu ve karsinojenite ve mutajenite arasında % 90 oranında bir bağlantı olduğu ileri sürülmüştür. Bu sebeple kimyasal maddeleri “mutajen” ve “kanserojen” olarak iki grupta incelemek yerine mutajen/kanserojen olarak incelemenin daha doğru olduğu kabul edilmektedir [5].

Kimyasal maddelerin mutajenik/karsinojenik etkilerinin saptamasında kısa zamanlı test sistemleri kullanılmaktadır. Bu test sistemlerinin özellikleri, kolaylıkla tekrar edilebilir olmaları, ucuz olmaları, ve güvenilir sonuçlar vermeleridir. Kimyasalların mutajenik/karsinojenik etkilerini ölçmede sitogenetik ve bakteriyel test sistemleri kullanılır. Bu testler; kardeş kromatid değişimi (SCE) [6], mikronükleus testi (MN), kromozom bozulma testi (CA) , COMET testi [7], programlanmamış DNA sentezi [8], SOS kromo test, umu testi [9] ve Ames/Salmonella/Mikrozom testi şeklinde sıralanabilir [7]. Tüm bu mutajenite test sistemleri *Salmonella* test suşları, çeşitli *E.coli* suşları, rat, primat ve tavşan türleri, kullanılarak hazırlanmış memeli hücre kültürleri ve memelilerin kan, kemik iliği hücreleri, *Saccharomyces cerevisia* suşları ve farklı organizmalar kullanılarak uygulanmaktadır [7,10].

Ames test sistemi bakteriyel test sistemleri içinde mutajenik/karsinojenik etkisi en iyi bilinen ve karakterize edilen geçerliliği, uygulama kolaylığı ve hassasiyeti nedeniyle en fazla tercih edilen test sistemidir. [11].

Bu çalışmanın amacını; Bilecik'in Bozalan köyü yakınlarından doğan Bozüyük ilçesinin içme ve tarımda sulama suyu ihtiyacını karşılayan Karasu deresinin Sakarya nehrine dökülünceye kadar maruz kaldığı endüstriyel ve tarımsal kirlenme sonucu oluşan mutajenik kirliliğinin araştırılmasıdır.

1.1. Mutasyon

Mutasyonlar canlıların genetik bilgisinde (DNA'da) meydana gelen ve kuşaklar boyunca aktarılan kalıtsal değişimlerdir.

Bireyin kalıtsal özelliklerinin ortaya çıkmasını sağlayan kalıtsal şifre, X ışını, radyasyon, bazı ilaç ve toksik kimyasallar vb. nedenlerle bozulabilir.

Bu durumda DNA'nın sentezlediği enzimler ve proteinler bozulur. Böylece canlının yapısı bozulur. Bir gen mutasyona uğradıktan sonra kararlı hale gelir ve tekrar eski haline dönmek için herhangi bir eğilim göstermez. Mutasyonlar kalıtsal materyalin normal kombinasyonunu değiştirmeyen, kalıtsal yapıda meydana gelen bütün değişiklikleri kapsar.[12]

1.2. Mutasyon Çalışmaları

Mutasyonlar genetik çalışmanın temelini oluştururlar. Mutasyonların en önemli sonucu bir sonraki kuşağa farklı genetik özellikler aktarılmasını sağlamasıdır. Bu ise farklı fiziksel özelliklere sahip bireyler meydana getirir. Bu değişimler sonucu ortaya çıkan fenotipik çeşitlilik, genetikçilerin değişikliğe uğramış olan genleri çalışmalarına yardımcı olmaktadır. [12]

Bazı canlıların kısa hayatlarından yararlanarak kolayca tanınabilecek ve çalışabilecek mutasyonlar elde edilir. Mutasyon ve mutagenез çalışmalarında özellikle virüsler, bakteriler, mantarlar, meyve sinekleri, bazı bitkiler ve fareler kullanılmaktadır. Bu canlılar genetik hakkında bilgilerin elde edilmesinde çok faydalı olmuşlardır. [12]

1.3. Mutasyon Çeşitleri

1.3.1. Kromozom Sayı Değişimleri

Organizmaların populasyonun da meydana gelen kromozom sayı değişimleridir. Her canlı türünün kendine has bir kromozom sayısı vardır ve bu sayı sabittir. Ancak bazı durumlarda türün bazı bireylerinde kromozom sayılarında sapmalar olabilmektedir. Kromozomlar bazen mitoz ve mayoz bölünme sırasında eşit olarak dağılmaz ve sonuçta kromozom sayısı bakımından farklı hücreler meydana gelir. Kromozom sayısı değişiklikleri başlıca iki grup altında toplanır. Bunlar; euploidi ve aneuploididir.[1,13]

1.3.1.1. Euploidi

Kromozom takımı sayısındaki değişimlerdir. Bir takımdaki kromozomların sayısının hepsinin birden sayının tam katlar halinde artması ya da organizmada tek takım kromozom bulunması şeklinde olabilir. Bunlar; monoploidi ve poliploididir.

a-Monoploidi: Nadiren bazı hayvan ve bitki hücreleri tek bir takım yani n kromozom içerirler. Bu olaya monoploidi bu fertlere de monoploid adı verilir.

b-Poliploidi: Bir genomdaki kromozomların sayısının hepsinin birden artması olayıdır. Bu olay sonunda $3n$, $4n$, $5n$ ve daha yüksek katlarda n kromozomlu fertler meydana gelir. Poliploidiler iki yolla meydana gelirler.

1. Mayozda kromozom sayısının yarıya inmesinin önlenmesi ile somatik hücrelerdeki kadar gametlerin oluşması

2. Zigotun ilk bölünmesi sırasında enine çeperin oluşmasına engel olunması suretiyle meydana gelecek bireyin kromozom sayısı yükselebilir.[1]

1.3.1.2 Aneuploidi

Bir takımdaki kromozomların birinin veya birden fazlasının sayısının değişmesi olayıdır. Diploid bir fertte tek bir kromozomun eksik olması olayına monosomi, bir canlıda bir kromozomun homologu ile birlikte eksik olması olayına nullisomi, bir takımda bulunan kromozomlardan birinin veya birkaçının fazla olmasına polisomi denir. Diploid bir canlıda diploid sayısının birkaç kromozom altında olanlara hipodiploidi, birkaç kromozom üstünde olanlara ise hiperdiploidi denir.[1,13]

1.3.2. Kromozom Yapı Değişmeleri

Bazen kromozomları oluşturan kromatidler krossing-over olmadan da parça değişimine uğrarlar.[14,13] Kromozom kırılmaları ve tekrar birleşmeleri sonucu kromozomlar tekrar organize olurlar. Bunun gibi değişimler kromozomların düzeninin değişmesine sebep olurlar. Bir mutasyon sonucu kromozomlardan biri yada birkaçı karakteristik yapılarını yitirebilirler. Böylece yapısal kromozom anomalileri ortaya çıkar. Kromozomlardaki bu değişiklikler çeşitli şekillerde meydana gelebilir.[14,15,13] Bunlar; delesyon, duplikasyon, inversiyon, translokasyondur.

1.3.2.1 Delesyon

Delesyon ısı, radyasyon, virüsler, kimyasallar gibi ajanların neden olduğu kromozomdan parça kopması olayıdır. Delesyonda hücre genlerini kaybeder. Sentromeri olmayan kırık kromozom parçası bir sonraki bölünmede iğ ipliklerine tutunamayacağından çekirdek dışına kalıp yok olur. Eğer hücre diploid ise kaybolan genlerin allelleri kardeş kromozom üzerinde bulunacağından öldürücü olmaz. Eğer kaybedilen parça çok büyük olursa gen dengesi bozulacağından öldürücü olabilir. Erkeklerin Y kromozomda meydana gelen böyle bir parça yitimi Y kromozomu üzerinde allelli olmadığından ölümle sonuçlanabilir[13,16].

1.3.2.2. Duplikasyon

Bir kromozomun herhangi bir parçasını fazla sayıda taşıması olayına duplikasyon denir. Delesyonun tersine bir parça çoğalması vardır ve sonuçta duplikasyonlu kromozom taşıyan hücrede bazı genler fazla sayıda bulunur.[16]

1.3.2.3 İnversiyon

Kromozomda bir parçanın 180^0 ters dönerek tekrar aynı kromozoma bağlanması şeklinde görülen kromozom anomalisidir. Kromozom gen sayısı ve özelliği aynı olmasına rağmen diziliş değişmiştir. Bu tür bir inversiyonda kromozomun sentromeri ters dönen parçaya ait ise buna perisentrik inversiyon denir. Fakat sentromeri ters dönen parça içinde değilse buna parasentrik inversiyon denir [17].

1.3.2.4 Translokasyon

Homolog olmayan kromozomlar arasında kromozom parçalarının yer değiştirmesine translokasyon adı verilir. Translokasyonlar her zaman homolog olmayan parça değişimleridir. Gen sayısının ve niteliğinin aynı kaldığı translokasyonlara dengeli translokasyon, gen sayısının ve niteliğinin değiştiği translokasyonlara dengesiz translokasyon adı verilir. Basit translokasyonda, bir kromozomda tek bir noktada kırılma olur ve parçalardan biri bir başka kromozomun ucuna yapışır. Kromozom uçlarının yapışkan olmama özelliği nedeniyle basit translokasyon oldukça enderdir. İnterkalar translokasyonda kromozomların birinde iki yerde bir başkasında ise tek noktada kırılma olur ve aradan çıkan parça tek noktada kırığın olduğu kromozomun o bölgesine yapışır. Karşılıklı translokasyon ise en fazla olan ve en iyi çalışılmış olan translokasyon türüdür. Bu tür translokasyonda iki ayrı kromozomda kırılma olur ve kopan parçalar karşılıklı olarak yer değiştirirler. Translokasyonlar yeni gen kombinasyonları ve hücrede DNA miktarının değişmesini sağladığı için evrimsel olarak önemlidir. [12,18]

1.3.3 Gen Mutasyonları

Kromozomların yapısında yada sayısında herhangi bir değişiklik olmadan doğal ya da deneysel yolla meydana gelen ve mikroskopla görülmeyen mutasyonlardır. Mutasyonu meydana getiren araçlara mutajenik faktör denir. Mutasyona uğramış bir gen nadiren eski haline dönebilir.[12]

Gen depolanmış kimyasal bilgiyi temsil eden nükleotit çiftlerinin lineer dizisi olarak değerlendirilir. Genetik şifrede üç'lü nükleotit dizilerinin her biri ilgili proteindeki tek bir aminoasidi belirler. Bu dizileri veya şifreyi bozan herhangi bir değişiklik mutasyon olarak değerlendirilir. [12]

Gen mutasyonları, hücredeki kalıtsal bilgiyi taşıyan, çift nükleotit zincirinden oluşan DNA molekülündeki gen denilen ve belli bir özelliği kodlayan bölümündeki değişiklikten kaynaklanır. En basit değişiklik bir nükleotidin yer değiştirmesidir. Buna nokta mutasyonu adı verilir. [19]

Mutasyonlar bir DNA zincirindeki bazın başka bir bazla yer değiştirmesi sonucu ortaya çıkabileceği gibi zincire bir yada daha çok bazın eklenmesi veya zincirdeki bazların eksilmesi sonucunda da ortaya çıkabilir. [12]

1.3.1 Gen Mutasyonlarının Sınıflandırılması

Gen mutasyonları üç şekilde sınıflandırılır. Bunlar; transisyon transversiyon ve çerçeve kaymasıdır.

a-Transisyon: DNA üzerindeki bir pürin yada pirimidinin, başka bir pürin yada pirimidine dönüşmesi olayıdır.

b-Transversiyon: Bir pürin bazının bir primidin bazı ile ya da bir primidin bazının bir pürin bazı ile yer değiştirmesi olayıdır.

c-Çerçeve Kayması Mutasyonu: DNA zincirinde çoğunlukla sık tekrar edilen baz çiftlerinin bulunduğu palindromik bölgelerde bir yada birkaç baz çiftinin eklenmesi veya çıkması ile meydana gelen mutasyon şeklidir.

1.4. Mutasyonların Sebepleri ve Etkileri

Mutasyonun gözlenebilen bir etki olmadan ortaya çıkması çok az görülen bir olgudur. Daha çok çevreden gelen kimyasallar yada fiziksel etkiler nedeniyle olur. Bir dış etkinin mutasyona neden olabilmesi (mutajen olması) için hücre içine girip etkinlik göstermesi gerekir. Örneğin Güneş'in morötesi ışınları düşük enerjili olmasından dolayı yalnızca deri hücrelerindeki somatik mutasyona neden olurken, yüksek enerjili X ışınları germ hattında mutasyonlara neden olarak nesilden nesile aktarılan mutasyonları oluştururlar. Mutasyonlar ayrıca hücre bölünmesi üzerindeki kontrol mekanizmasını çıkararak kontrolsüz hücre bölünmesine ve dolayısıyla da kansere neden olabilirler.[12]

1.5 DNA Onarım Mekanizmaları

Bir canlıya ait tüm genetik bilgiyi taşıyan DNA molekülü doğal olarak veya çevresel faktörlerin etkisiyle sürekli hasara maruz kalmaktadır. Bu etkenler DNA'nın yapısını ve dahası diğer nesillere aktarılan genetik bilgiyi değiştirebilmektedir. Bu değişimler yararlı olabileceği gibi ölümcül sonuçlara neden olabilecek kadar zararlıda olabilirler. Bu yüzden bütün canlı hücreler evrim süreçleri boyunca diğer nesillere değişmeden aktarılması gereken DNA molekülünü koruma mekanizmaları geliştirmişlerdir. DNA onarım mekanizmaları aşağıda açıklanmıştır[20]

1.5.1 DNA Polimeraz Proofreading ile Onarım

DNA polimeraz III bir hata okuma sistemine sahiptir. Polimerizasyon sırasında hatalı bir nükleotid yerleştirildiğinde enzim kompleksinin hatayı tanıma ve hatalı nükleotiti keserek değiştirme ve onu geri döndürme potansiyeli vardır. Çoğu DNA polimerazın 5¹-3¹ yönünde, polimerizasyon, 3¹-5¹ yönünde ise ekzonükeaz aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Bu sayede hatalı nükleotitler kesilip düzeltilir. Bakteriyel sistemlerin hata okumanın sentez esnasındaki doğruluğu 100 misli artırdığı düşünülmektedir. Eğer ilk yanlış eşleşmeler 1/10⁵ nükleotit çiftinde ise hata okuma sistemi yanlış eşleşmeleri 1/10⁷ ye düşürmektedir.[19]

1.5.2 Fotoreaktivasyon ile Onarım

UV ışığı nedeniyle oluşan timin ve diğer pirimidin dimerleri 320-370 dalga boylu görünür ışığın varlığında oluşan dimerler onarılır. Fotoreaktivasyon yada ışık ile onarım adı verilen bu sistemde fotoliyaz enzimi tarafından kataliz edilir. Fotoliyaz ışık ile aktive olarak dimerleri DNA dan uzaklaştırır. Fotoliyaz enzimi prokaryotlarda bulunmaktadır [19]

1.5.3 Kesme-Çıkarma Onarı

Tüm canlılarda bulunan bir onarım mekanizmasıdır. Bu sistem üç temel aşama içerir.

1- Bozuk bölge veya hata tanınır ve enzimatik olarak bir nükleaz tarafından kesilip çıkarılır. Bu kesip çıkarma işlemi tek bir baz veya hatanın olduğu bölgeye komsu birkaç nükleotiti kapsayabilir ve sonuçta sarmalda bir boşluk oluşur.

2-DNA polimeraz I sağlam zincirdeki nükleotitlere komplementer olan nükleotitleri yerleştirerek boşlukları doldurur. Enzim bu bazları kesilmiş DNA'nın 3'-OH ucuna ekler.

3-Birleştirici enzim olan DNA ligaz en son nükleotitin ucunda kalan çentiği yapıştırır ve boşluk tamamen kapanır.[19]

1.5.4 Yanlış eşleşme onarımı

DNA replikasyonundan sonra dizide yer alan yanlış baz eşleşmelerinin pek çoğu yanlış eşleşme onarımı denilen diğer bir sistem tarafından düzeltilebilmektedir. Bu mekanizma *E. coli*'de mut S, mut Z, mut H genlerinin ürünleri tarafından başlatılır. Yanlış bazlar ekzonükleazla çıkarılır. DNA polimeraz III ve ligazla düzeltilerek tamamlanır. Yanlış eşleşme onarımı ökaryotlarda *E. coli*'dekine benzer şekilde ancak başka genler tarafından yürütülür. Bu genlerdeki fonksiyon kaybı genomdaki mutasyonları biriktirdiği için mutator genler olarak bilinirler.

1.5.6 SOS Onarımı

E. coli'de hasarlı DNA'ya farklı bir şekilde yanıt veren bir onarım sistemidir. Bu sistemde replikasyonun doğruluğundan fedakarlık edilir.

Bu sistemde *lexA*, *RecA* ve *Uvr* dahil olmak üzere 20 kadar farklı genin ürünlerinin SOS yanıtında görev yapmak üzere DNA hasarı tarafından uyarıldığı saptanmıştır.

1.6 Mutajenite Testleri

Mutajenleri tanımlamakta kullanılan test sistemlerinin her biri farklı bir mutasyonu gösterdiği için değişik test sistemleri geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları DNA hasarına neden olan faktörleri belirleyen sitogenetik yöntemlerdir. Bu yöntemler; kardeş kromatid değişimi, mikronükleus testi, kromozom bozulma testi, Comet testi, programlanmamış DNA sentezi testi, SOS kromotest ve Ames/Salmonella testleridir.

1.6.1 Sitogenetik Yöntemler

Sitogenetik çalışmalar, çevresel olarak veya çalışma ortamında radyasyona maruz kalan belirli populasyonlar için bireysel olarak etkilenme dozunu saptamak amacıyla kullanılan testlerdir[21]

1.6.1.1 Yapısal Kromozom Bozulma Testi

Bu test tekniğinde mutasyon sonucu kromozomda oluşan kırıklar, yer değiştirmeler, ve fragmentler sayılır. Anöploid ve poliploid gibi sayısal kromozom bozuklukları ile kromozom tipi, kromatid tipi kopmalar ve anormal birleşme gibi yapısal bozukluklar çok yaygın olarak, bölünen hücrelerin metafazda olanların kolsemid yada kolşisin gibi tübülün polimerizasyon inhibitörleri kullanılarak tutuklama ile sağlanmaktadır . Herbisit olarak kullanılan triflualin'in insan lenfosit hücrelerinde kromozom aberasyonlarını artırdığı da bildirilmiştir[22].

1.6.1.2 Mikronükleus Testi

Mikronükleus hücre bölünmesi sırasında; kromozom, kromozom parçası, kromozom ve kromatid tipi kırıklardan oluşabileceği gibi asentrik fragmentlerden de meydana gelebilir. Mikronükleus mitotik hücre bölünmesi sırasında serbest kalan kromozom fragmenti veya serbest kalan kromozomların ortamda varlığını sürdürmesidir. Bunlar bir nükleoplazma ile sarılarak sitoplazma içinde ana nükleusun yanında yer alan bir nüklear materyaldir. Mikronükleus oluşumunun temeli DNA hasarıdır. DNA hasarı; oksidasyon sonucu serbest oksijen radikallerinin oluşumu, DNA metilasyonunun normalden az ya da çok olması, organizmanın çeşitli mutajenik, klastojenik ve karsinojenik ajanlara maruz kalması vb. nedenleri sayılabilir [23].

DNA defektlerine neden olan etkenler incelenirken bunların DNA da ne gibi değişimlere yol açtığını belirtmek ve analiz edebilmek için laboratuvar tekniklerine gerek duyulmuştur. DNA düzeyindeki incelemeyi sağlayan bu teknik mikronükleus testidir. Tekniğin basit oluşu kısa sürede sonuca ulaşması ve DNA hasarı konusunda güvenli bilgi vermesi önem taşımaktadır. Mikronükleus testi insan periferik kan lökositlerinde daha sonra kemik iliğinde ve yanak mukoza hücrelerinde kimyasal ajanların genotoksik etkilerinin incelenmesinde kullanılmıştır[24].

1.6.1.3 Comet Testi

Bu yöntem iplik kıvrılmaları çapraz bağlanma kesme çıkarma onarım bölgelerindeki hataları bir jel sistemi kullanarak belirleyebilmektedir[25]. Uygulamada kan lökositleri, mesane, yanak, mide, sperm hücrelerindeki DNA hasarını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır[26]. Comet testi hücre metafaz

aşamasında incelenerek kromozom hatalarının ortaya çıkarıldığı sitogenetik bir yöntemdir[27].

1.6.1.4. Kardeş Kromatid Değişim Testi

Kardeş kromatid değişim yönteminin prensibi kardeş kromatidlerin birbirine kontrast sağlayacak şekilde boyanmasına dayanır. Kardeş kromatidlerde meydana gelen parça değişimi boyanma farklılığından hemen anlaşılır. Bu yöntemle sadece kromozomlarda oluşan yapısal değişimler gözlemlendiğinden dolayı bu yöntem sınırlı amaçlarla kullanılır.[28,29]. Bu yöntem belli bir alanda belli bir mutajene maruz kalan popülasyondaki bireylerin bireysel maruz kalma düzeyini göstermektedir.[30]

1.6.2 Bakteriyel Yöntemler

Fiziksel yada kimyasal ajanların DNA’da meydana getirdiği hasar bakteriyel mutasyonları ölçebilen kısa zamanlı testlerle saptanabilmektedir [4]. Bakteriler gecelik kültürde çok sayıda ürer ve nadir mutasyonların saptanmasına olanak tanırırlar[4]

1.6.2.1 UMU(S.O.S) Testi

UMU test sistemi kimyasal ajanların genotoksik etkilerini saptamak amacıyla kullanılan kolorimetrik bakteriyel bir test sistemidir [31]. SOS cevabı esas alınarak geliştirilmiş ve regülator bir sistem olan SOS sistemi, DNA hasarı ile indüklenebilen sistemler içerisinde ilk olarak karakterize edilmiş olan en kapsamlı, en kompleks ve en iyi anlaşılmış sistemdir [32]. UMU test sistemi diğer SOS cevap genlerinden çok daha dolaysız bir şekilde mutajenesisle ilgili olduğu düşünülen UMU operonunun ifade edilme düzeyini saptamaya dayanır.

Bu test için tek bir bakteri suşu gereklidir. Yüksek bakteriyotoksik etkilere sahip olan kimyasalların teşhisinde kullanılabilir. UMU test suşu TA1535/Psk1002’ye eklenen çok kopyalı plazmidler, NR geni, NAT geni yada her ikisini bakteriye aktarmaktadır. Sonuç olarak bu bakteri suşu DNA hasarına sebep olan nitroantren ve aromatik aminlere karşı hassasiyet kazanır[9]

1.6.2.2 *E. Coli* lak I Test Sistemi

Bakterilerde meydana gelen mutasyonların genetik ve moleküler analizinde kullanılan bir ileri mutasyon yöntemi olup ilk kez 1983’de Miller ve arkadaşları tarafından *E. Coli*’de geliştirilmiştir [4].

Bu sistemde laktoz operonundaki reseptörü kodlayan lac I geninde oluşan mutasyonun fenotip üzerindeki yansıması belirlenerek değerlendirilmektedir. Lac I mutasyonlarını içeren gen bölgesi bakteriden alınarak bir plazmite yada M 13 fajı klonlama vektörüne aktarılmakda, vektörler çoğaltılarak çok sayıda mutant DNA kopyası elde edilerek dizi analizi yapılmaktadır[4,33]

1.6.2.3 Salmonella / Mikrozom (Ames) sistemi

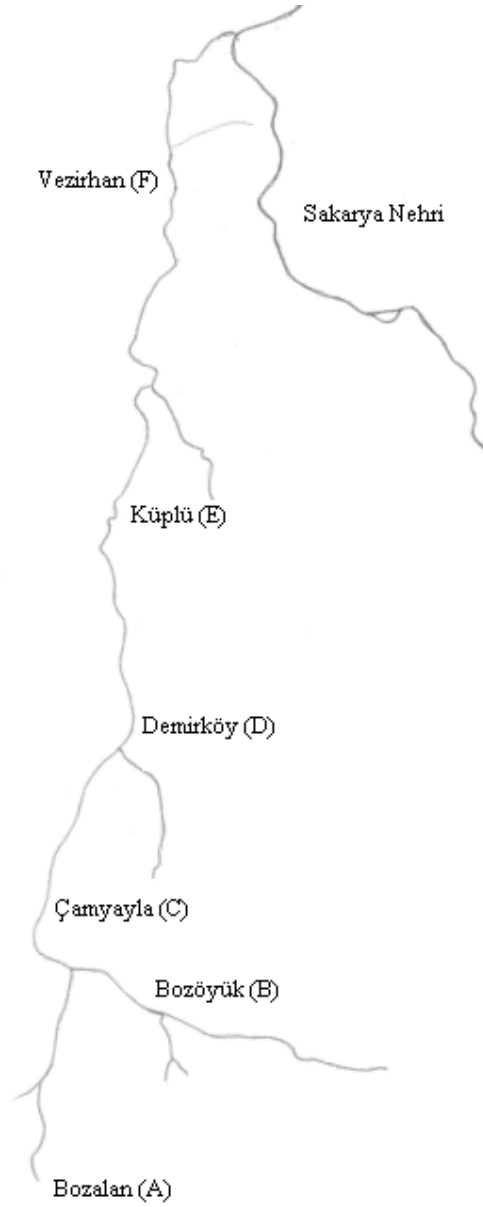
Ames Testi 1970'lerin başında Prof. Dr. Ames ve Dr. Maron tarafından geliştirilen ve daha sonra yaygın olarak kullanılmaya başlanan bir mutajenite test sistemidir [6]. Ames testi bakteriyel mutasyon test sistemleri içinde detayları en iyi bilinen ve karakterize edilen, geçerliliği ve uygulama kolaylığı nedeniyle en fazla tercih edilip günümüzde en fazla kullanılan test sistemidir [34]

Test organizması olarak kullanılan *Salmonella typhimurium*'un histidin geninde oluşan farklı mutasyonlarla gelişmek için histidin gereksinimi duyan farklı tiplerde oksotrofik mutantlara dönüştürülmüştür. Bu testin temeli oksotrofik suşların test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip his⁺ hale dönüşmesine dayanır. Geri dönüşen bakteri kolonileri sayılarak değerlendirilir. Fakat normalde de mutajene maruz kalmayan spontan olarak geri dönüşebilen bakteriler olmaktadır. Mutajenik etkiden bahsetmek için spontan olarak geri dönüşen kolonilerinde sayılması gerekir [34,35]

2.MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

Bu çalışmadan Karasu deresinin kaynağından Sakarya nehrine dökülünceye kadar olan mesafe içinde seçilen altı noktadan alınan su ve sediment örneklerinin analizi yapılmıştır. Bu noktalar; A) Bozalan köyü, B) Bozüyük çıkışı, C) Çamyayla yol ayrımı, D) Demirköy çıkışı E) Küplü çıkışı F) Vezirhan çıkışıdır.



Şekil 2.1 Örnek Alınan Noktalar

2.1.1. Test Maddelerin Eldesi

2.1.1.1 Sediment Örneklerinden Test Maddesinin Eldesi

Belirlenen noktalardan toplanan sediment örnekleri laboratuvara getirilmiş karanlık bir ortamda serilerek kurumaları beklenmiştir. Daha sonra 3 mm'lik elekten elenmiş ve toprak parçacıkları ezilmiştir. Ezilen topraklardan 0,1 gr tartılarak 1 ml hexan($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), 1 ml kloroform (CHCl_3) ve 1 ml aseton(CH_3COCH_3) dan oluşan karışımına eklenmiş $+4^\circ\text{C}$ 'de 10 dakika boyunca santifrüj edilmiştir. Oluşan süpernatant alınarak bir gece beklenmiş ve böylece çözücülerin uçması sağlanmıştır. Tüplerde oluşan kalıntı 5 ml DMSO ile çözünerek örnekler analize hazır hale getirilmiştir.

2.1.1.2 Su Örneklerinden Test Maddesinin Eldesi

Belirlenen noktalardan alınan 2'şer lt. su örnekleri laboratuvara getirilmiş su örneklerindeki yabancı maddeler süzildükten sonra 1'er lt olacak şekilde 2 ye ayrılmıştır. Daha sonra XAD 4 ve XAD16 kolonları hazırlanmıştır. XAD 4 ve XAD 16 rezinlerinden 15 'er gr tartılarak ayrı ayrı mezürlere konulmuş, üzerlerine hacimlerinin 2 katı olacak şekilde aseton eklenerek kısa aralıklarla karıştırmak suretiyle 1-1,5 saat bekletilmiştir. Bu işlemin ardından aseton süzölmüş ve aynı işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Daha sonra metanol ile yıkama işlemine geçilmiştir. Asetonda olduğu gibi dolgu maddeleri metanolde 1-1,5 saat bekletilmiş ve bu işlem metanolde bulanıklık kalmayınca kadar sürdürülmüştür. Dolgu maddesi daha sonra deiyonize su ile 5-6 kez yıkanmış ve kolona yüklenmiştir. Cam kolona yüklenen dolgu maddelerinden 250 ml %1 lik NaOH geçirilmiş, kolonu nötrale etmek için %5 lik HCl kullanılmıştır. Son aşamada ise kolondan 1 lt distile su geçirilerek kolonlar kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Su örneklerini kolondan geçirirmeden önce örneklerinin yarısının pH'sı 10'a ayarlanmış daha sonra su örneklerinden pH'sı 10'a ayarlananlar XAD 16 pH değiştirilmeyenler ise XAD 4 kolonlarından geçirilmiştir. Su örneklerinin kolondan geçiş hızı 10 ml/dk dır. Su örnekleri kolonlardan geçirildikten sonra kolonda kalan suyun kolona tutunan çözünmüş maddelerin toplama işlemini etkilememesi için kolondaki suyu uzaklaştırmak amacıyla kolonlara azot gazı verilmiş ve kolonlar kurutulmuştur. Su örneklerinden kolona tutunan organik maddelerin toplanması elüsyon işlemine geçilmiştir. Bu işlem için sırası ile diklormetan (CH_2Cl_2), aseton (CH_3COCH_3), dietileter ($(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$) ve metanol

(CH₃OH) kullanılmıştır. Her bir çözücü 10ml/dk hızında 100 ml miktarında kolondan geçirilmiş ve ayrı ayrı beherlerde toplanmıştır. Daha sonra çözücüler içinde toplanan fraksiyonlar 45 °C ayarlanmış su banyosu ve evaporatör yardımıyla ayrılmış kalan kuru kısımlar 3 ml DMSO ile çözünerek deney için hazır hale getirilmiştir.

2.1.2 *Salmonella typhimurium* Test Suşları

Deneyde Prof. Dr. Ames ve Dr. Maron tarafından geliştirilen *Salmonella typhimurium* bakterisinin TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. TA 98 suşu Hacettepe Üniversitesinden TA 100 suşu Ege Üniversitesinden temin edilmiştir.

2.1.3. Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları

Vogel Bonner Medium E(50X) Tuz Çözeltisi

Kullanımı: Minimal Glikoz Ağar plaklarının hazırlanmasında kullanılır.

Distile su	167.5 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.5 g
Sitrik Asit Monohidrat	25 g
K ₂ HPO ₄	125 g
NaH ₂ NH ₄ .(PO ₄ .4H ₂ O)	43.75 g

Yukarıdaki maddeler yazıldıkları sıra ile distile su içinde çözünmüşlerdir. Daha sonra çözelti 250 ml'ye tamamlanır ve iki adet 250 ml lik cam balona bölünerek 121 ° C'de 15 dakika otoklavlanarak oda sıcaklığında saklanır.

Histidin/Biotin Çözeltisi (0.5 Mm)

Kullanımı: Mutasyon deneyinde kullanılır.

D-Biotin (M.A.247.3)	30.9 mg
L-Histidin (M.A.191.7)	24.0 mg
Distile su	250 ml

Biotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözünür. Daha sonra histidin ilave edilip 121 °C 15 dakika süreyle otoklava konulmuş ve +4 °C' de saklanır.

Ampisilin Çözeltisi

Kullanımı: Ampisiline direnç kontrolü ve HBA (master) plakların hazırlanmasında kullanılır.

Ampisilin Trihidrat	0.8 g
0.02 M NaOH	100 ml

Ampisilin trihidrat 0.02 M NaOH içinde çözünerek sterilizasyon için 0.22 mmikro çaplı filtreden geçirilerek +4 °C’de saklanır.

0.02 M NaOH 100 ml distile suda 0.08 g NaOH çözünerek hazırlanır.

Kristal Viyole Çözeltisi (% 0.1) (C₂₅H₃₀CIN₃)

Kullanımı: Suşların Rfa mutasyonu taşıyıp taşımadıklarının kontrolünde kullanılır.

Kristal Viyole 0.1 g

Distile Su 100 ml

Boya ile su karıştırılıp, solusyon ışık geçirmeyen bir kaba konur +4 °C de saklanır.

Biotin Çözeltisi (% 0.13)

Kullanımı: Genotip Kontrolü ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanılır.

D-Biotin 0.65 mg

Distile Su 50 ml

D-Biotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür 121 °C 15 dakika otoklavlanarak steril edilir + 4 °C’de saklanır.

Histidin Çözeltisi (% 0.5)

Kullanımı: Genotip Kontrolü ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanılır.

L-Histidin.HCI 2 g

Distile Su 400 ml

Histidin ile distile su 121 °C 15 dakika otoklavlanarak steril edilir + 4 °C’de saklanır.

Glikoz Çözeltisi (% 20)

Kullanımı: MGA ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanılır.

Glikoz 20 g

Distile Su 100 ml

Glikoz distile su içinde çözülerek 121 °C 15 dakika otoklavlanarak steril edilir + 4 °C’ de saklanır.

Top Agar

Kullanımı: Mutasyon deneyinde kullanılır.

Ağar 1.5 g

NaCl	1.25 g
Distile Su	250 ml

Maddeler distile su içinde çözülerek 121 °C 15 dakika otoklavlanarak steril edilir.

Histidin/Biotin Plakları (HB agar)

Kullanımı: Histidin gereksinimi deneyinde kullanılır.

Ağar	3 g
Distile Su	180 ml
50X VB Tuzları	4 ml
Glikoz (% 20)	20 ml
Histidin Çözeltisi	2 ml
Biotin Çözeltisi	1.2 ml

Ağar ve su karıştırılarak 121 °C 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. 45 °C'ye soğutularak sırasıyla % 20 glikoz, 50X VB tuzları ve histidin çözeltisi eklenir. Karışım biraz daha soğuduktan sonra biotin çözeltisi eklenerek 30'ar ml olarak steril petrilere dökülür.

Histidin/Biotin/Ampisilin Plakları (HBA agar)

Kullanımı: Ampisiline direnç testi ve Master Plate hazırlanmasında kullanılır.

Agar	3 g
Distile Su	182 ml
50X VB Tuzları	4 ml
Glikoz (% 20)	20 ml
Histidin çözeltisi	2 ml
Biotin Çözeltisi	1.2 ml
(% 0.8/0.02 M) Ampisilin	0.6 ml

Ağar ve su karıştırılarak 121 °C 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. 45 °C'ye soğutularak sırasıyla % 20 glikoz, 50X VB tuzları ve histidin çözeltisi eklenir. Karışım biraz daha soğuduktan sonra biotin çözeltisi ve ampisilin çözeltisi eklenerek 30'ar ml olarak steril petrilere dökülür.

Minimal Glikoz Agar (MGA)

Kullanımı: Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü ve mutasyon deneyinde kullanılır.

Agar	7.5 g
Distile Su	450 ml
50X VB Tuz	10 ml
Glikoz (% 20)	40 ml

Ağar ve su karıştırılarak 121 °C 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. 45 °C'ye soğutularak sırasıyla % 20 glikoz, 50X VB tuzları eklenir.

Nutrient Agar Plakları (NA)

Kullanımı: Gecelik kültürlerin ml'sinde bakteri sayısının bulunması ve genotip kontrolünde kullanılır.

Oxoid Nutrient Broth	2.6 g
Agar	1.6 g
Distile Su	100 ml

Agar, broth ve su karıştırılıp 15 dakika otoklavlanarak steril edilir.

Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı (NB)

Kullanımı: Gecelik kültürlerin hazırlanmasında kullanılır.

Oxoid Nutrient Broth	5 g
Distile Su	250 ml

Agar ve su karıştırılıp 121 °C 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. +4 °C'de saklanır.

Sodyum Azid (SAZ)

Kullanımı: Pozitif kontrol olarak TA 100 için kullanılır.

5 mikro/g petri olarak DMSO içinde çözünerek kullanılır. +4 °C'de saklanır.

4-Nitro-o-Fenilendiamin (NPD)

Kullanımı: Pozitif kontrol olarak TA 98 için kullanılır.

2.5 mg/g petri olarak DMSO içinde çözünerek kullanılır. +4 °C'de saklanır

2.2 METOT

Bu çalışmada Dr. Bruce Ames'den elde edilen *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 test bakterilerinin stok kültürlerinin hazırlanması, bakterilerin genetik özelliklerinin kontrol edilmesi Ames/Salmonella ile Maron ve Ames (1983)'in yöntemine uygun olarak plak inkorporasyon metodu ile yapılmıştır. Deneyde her doz her suş için üç plak halinde düzenlenmiştir. Ayrıca pozitif, solvent kontrol ve spontan kontroller de deneye paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.1. Salmonella Suşlarının Kültürlerinin ve Master Plaklarının Hazırlanması

Bakterilerin Histidin Biotin Ampisilin (HBA) plaklarına paralel ekim yapıp 37 °C' de 48 saat inkübe edilir. Sürenin sonunda iyi izole olmuş bir koloni seçilip 2 ml Nutrient Broth içinde süspanse edilerek bir gece (12-16 saat) 37 °C' de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda platin öze ile bir öze dolusu sıvı kültür alınıp HBA agar üzerine çizgi ekim yapılmıştır. Bu plaklar 37 °C' de 48 saat tekrar inkübe edilerek +4 °C' de iki ay süre ile saklanmış ve pasajlar alınmıştır.

2.2.2. Salmonella Suşlarının Saklanması ve Stok Kültürlerinin Açılması

Test Suşlarının uzun süre canlılığını ve mutant özelliklerini koruyabilmeleri için stoklanmaları gerekir. Bunun için HBA agarda üremiş olan Salmonella suşlarından iyi izole olmuş normal büyüklükteki bir koloni öze ile alınıp 2 ml NB içeren tüplerde süspanse edilerek 37 °C' de bir gece inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda steril ependorf tüp içine 1 ml sıvı bakteri kültürü ve 0.9 ml DMSO ilave edilip -20 °C' de donması ve -80 °C'de saklanması sağlanmıştır.

Kültürün açılması gerektiğinde stok bakteri kültürü oda sıcaklığında eritilip bir öze dolusu alınarak Histidin Biotin (HB) agar plaklarına paralel ekim yapılmıştır. Bu plaklar 37 °C' de 48 saat inkübe edildikten sonra HB plaklarında iyi üreyen bakterilerden iyi izole olmuş bir koloni steril tranfer iğnesi ile Histidin/Biotin/Ampisilin (HBA) agar plaklarına paralel ekim yapılmıştır. HBA plaklarında 37 °C' de 48 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda master plaklar +4 °C' de iki ay süre ile saklanmış ve yenilenerek deney sırasında gecelik kültürler hazırlanmıştır.

2.2.3. Salmonella Suşlarının Genetik Özelliklerinin Kontrol Edilmesi

Ames testinde mutant bakteriler kullanılır. Bu çalışmada, Kullanılan mutant bakterilerin, genetik kontrolü, saklanması ve deneyin yapılışı Maron ve Ames (1983)'in yöntemine uygun olarak yapılmıştır. Testin güvenilirliği açısından test suşlarının genetik yapılarındaki mutasyon durumları aşağıdaki sıraya göre gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.1. Histidin Gereksinimi Kontrolü

Bakterilerin minimal glikoz agar (MGA) üzerine ekilmeleri his- karakterdeki bakterilerin His+ karakterdeki bakterilerden ayrılması için yapılmaktadır. Bu nedenle, NB içinde büyütülen kültürlerden, steril kürdan ile his- bakterilerden MGA ve HB agar plaklarına paralel ekim yapılmıştır. Plaklar 37 °C' de 48-72 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda HB agar plaklarında üreme gözlenirken, MGA plaklarında üreme gözlenmemiştir. Bu sonuç, bakterilerin “His- mutasyonu” nu taşıdığını göstermektedir.

2.2.3.2 Rfa Mutasyonun Kontrolü

Bu mutasyon, bakteri hücre zarının lipopolisakkarit yapısında hücre zarının geçirgenliğini artırmak için oluşturulmuştur. Varlığı kristal viyole duyarlılık testi ile tespit edilir.

Bu test için; bakteriler NB'da bir gece üretilir. 0.1 ml sıvı kültür 45 °C'lik su banyosunda ısıtılmış 2 ml top agar üzerine ilave edilir. Nutrient agar (NA) plaklarına dökülür. Plaklara 8 işareti yaptırılır. 10 dakika donması beklenir. Plağın ortasına 0.5 cm çaplı steril filtre kağıdı disk yerleştirilir. Diskin ortasına % 0.1'lik kristal viyole damlatılır. Kağıdın boyayı emmesi beklenir. Plaklar 37 °C' de 24 saat inkübe edilir.

İnkübasyon sonuna disk çevresinde 9 cm lik üreme olmayan kısım gözlenir. Bu zonda boya maddesi bakterilerin içine kolayca girdiği için bakterilerin üremesi engellenmiştir. Bu bakterilerin Rfa mutasyonu taşıdığını gösterir.

2.2.3.3. UVrB Mutasyonun Kontrolü

Bu mutasyon ile bakterilerde, UV ışığının neden olduğu replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan DNA onarım mekanizması engellenmiştir ve mutasyon varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tespit edilir.

Bu test için; bakteriler NB'da bir gece üretilir. NA plaklarının tamamına paralel ekim yapılır. Plağın yarısı çizgileri kesecek şekilde plastik bir tabaka ile kapatılır. 15 Watt gücünde bir UV lambası 33 cm yüksekten 8 sn süre ile ışınlanır. Işınlanmadan sonra petri kapakları kapaklanır. Plaklar 37 °C' de 24 saat inkübe edilir.

Kullanılan UV ışığı dozu, UVrB mutasyonu taşıyan bakterileri öldürecek dozdadır. Çünkü DNA kesme tamir etme mekanizması engellenmiştir. Bundan dolayı UV'ye maruz bırakılmış kısmında üreme olmazken, plastik kapakla kapatılan kısmında normal bir üreme gözlenir. Bu da bakterilerin UVrB mutasyonu taşıdığını gösterir.

2.2.3.4. R Faktör Varlığı Kontrolü

Test Bakterilerinin içerdiği R faktör taşıyan pKM101 plazmidlerinin kaybolup kaybolmadıkları, ampisilin dirençliliğinin ölçülmesi ile tespit edilir.

Bu amaçla bakteriler NB'da bir gece üretilir. Ampisilin içeren HBA plaklarına ekim yapılır. Plaklar 37 °C' de 24 saat inkübe edilir.

Plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda üredikleri gözlenir. Bu sonuç bakterilerin ampisiline direnç taşıyan R faktör taşıyan pKM101 plazmidlerini taşıdığını gösterir.

2.2.3.5 Spontan Olarak Geriye Dönüş Sıklığının Kontrolü

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden His- durumdan His + 'e dönüşmesi belirli sınırlar içinde mümkündür. TA 98 ve TA 100 suşlarının genetik yapılarının kontrolüne ek olarak bu suşların MGA'da belirli sınırlar içinde uyarılmadan dönüşmesi kontrol edilir.

Bu test için; NB'da bir gece üretilir. 0.1 ml sıvı kültür 45 °C'lik su banyosunda ısıtılmış 2 ml top agar üzerine ilave edilir. 0.2 ml 0.5 M Histidin-Biotin solusyonu eklenir. Test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılır. Plaklar 37 °C' de 48 saat inkübe edilir. Revertant koloniler sayılır.

2.2.4. Ames Testinin Yapılışı

Deneyin amacı daha önceden gelişmesi için histidin aminoasidine ihtiyaç duyan suşların kullanılan test maddesi ile tekrar histidin sentezleyebilir hale dönüşmesi temeline dayanır. Deneyler 3 tekrarlanabilirli olarak düzenlenir. Her deney suşu karakteristik olarak spontan olarak geriye dönüş mutasyonu taşır. TA 98 için spontan geriye dönüş sıklığı 20-50 koloni, TA 100 için 120-200 kolonidir.

Ames testinde mutajenitenin belirlenmesi için 0.1 ml örnek 0.2 ml histidin-biotin solüsyonu 0.1 ml gecelik bakteri suşu 2 ml top agar içine eklenerek MGA plaklarına dökülür. Daha sonra MGA plakları 48-72 saat inkübe edilerek oluşan koloni sayıları değerlendirilir. Deneyle paralel olarak pozitif, solvent kontrol ve spontan kontroller de kurulur.

2.2.4.1. Sonuçların Değerlendirilmesi

Bu çalışmada Karasu Deresinin 6 ayrı noktasından alınan su ve sediment örneklerinin mutajenitesi TA 98 ve TA 100 mutant suşları ile araştırılmıştır. Her noktanın örnekleri 5 ayrı doz ve her doz 3 tekrarlanabilirli olarak test edilmiştir. Her deneye paralel olarak spontan, solvent ve pozitif kontroller yapılmıştır.

İstatistiksel analiz aşamasında tek yönlü varyans analizi kullanılarak çoklu karşılaştırma testlerinden student-t testi ile sonuçlar değerlendirilmiştir. Uygulamalar SPSS paket programında gerçekleştirilmiştir.

3.BULGULAR

Bu çalışmada Karasu deresinin 6 ayrı noktasından alınan su ve sediment örneklerinin mutajenitesi Ames testi ile araştırılmıştır. Çalışmada; deneyler su ve sediment örnekleri 5 doz halinde 3 tekrarlanabilirli olarak düzenlenmiştir. Su örnekleri XAD 4 ve XAD 16 kolonlarından geçirilerek ayrı ayarı değerlendirilmiştir. Deneylerle paralel olarak spontan kontrol, negatif kontrol (DMSO) ve pozitif kontroller (TA 98 için 4-Nitro-o-Fenilendiamin, TA 100 için Sodyum Azid) 3 tekrarlanabilirli olarak düzenlenmiştir.

Sonuçlar istatistiksel açıdan “student-t testi” kullanılarak negatif kontrol olan DMSO sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Karasu deresinin A, B, C noktalarının sediment sonuçları Tablo 3.1.1’de, D, E, F noktalarının sediment sonuçları Tablo 3.1.2’ de verilmiştir. Karasu deresinden alınan su örneklerinin A, B, C noktalarının TA 98 sonuçları Tablo 3.2.1’de, D, E, F noktalarının TA 98 sonuçları Tablo 3.2.2’de, A, B, C noktaları TA 100 sonuçları Tablo 3.2.3’de, D, E, F noktaları TA 100 sonuçları Tablo 3.2.4’ de verilmiştir. Tablolarda sonuçlar “ortalama $\pm$ standart” hata şeklinde verilmiştir. Her noktadan alınan su ve sediment örneklerinin TA 98 ve TA 100 sonuçları grafikler şekilde sunulmuştur.

3.1. Sediment Örnekleri TA 98 ve TA 100 Sonuçları

Tablo 3.1.1. A,B,C Noktaları Sediment Örneklerinin TA 98 ve TA 100 Sonuçları

Test Noktası	Doz	REVERTANT KOLONİ SAYISI	
		TA 98	TA 100
A	1	23.0 ± 0.6	166.7 ± 2.7
	0.1	23.7 ± 2.0	165.7 ± 2.8
	0.01	24.7 ± 0.9	161.3 ± 2.9
	0.001	22.0 ± 1.2	164.7 ± 3.9
	0.0001	23.7 ± 1.2	156.7 ± 2.3
	Negatif Kontrol	22.3 ± 1.8	159.0 ± 2.3
	Pozitif Kontrol	1098.7 ± 80.6	1358.3 ± 61.7
B	1	30.0 ± 2.5	199.0 ± 9.5
	0.1	28.7 ± 0.8	196.0 ± 9.1
	0.01	28.7 ± 2.3	191.7 ± 8.6
	0.001	29.0 ± 1.0	194.3 ± 11.4
	0.0001	33.0 ± 3.2	197.3 ± 7.8
	Negatif Kontrol	21.7 ± 2.0	166.7 ± 4.1
	Pozitif Kontrol	1010.0 ± 65.6	1271.3 ± 85.5
C	1	22.6 ± 1.5	149.0 ± 5.2
	0.1	21.0 ± 1.0	149.3 ± 1.8
	0.01	23.0 ± 0.6	148.3 ± 3.3
	0.001	21.7 ± 0.9	154.3 ± 3.1
	0.0001	23.7 ± 1.2	145.7 ± 3.5
	Negatif Kontrol	22.0 ± 1.2	147.6 ± 1.5
	Pozitif Kontrol	1067.0 ± 77.9	1233.7 ± 68.1

Tablo 3.1.2. D,E,F Noktaları Sediment Örneklerinin TA 98 ve TA 100 Sonuçları

Test Noktası	Doz	REVERTANT KOLONİ SAYISI	
		TA 98	TA 100
D	1	22.3 ± 1.2	142.7 ± 2.0
	0.1	21.3 ± 1.4	135.3 ± 1.8
	0.01	20.3 ± 0.3	139.0 ± 1.5
	0.001	23.0 ± 0.6	131.7 ± 1.2
	0.0001	21.7 ± 0.9	138.0 ± 1.2
	Negatif Kontrol	22.3± 0.6	137.3 ± 1.8
	Pozitif Kontrol	1085.3 ± 65.4	1080.3 ± 50.2
E	1	22.7 ± 1.2	135.7 ± 1.8
	0.1	22.0 ± 1.2	137.0 ± 1.7
	0.01	21.0 ± 0.6	136.0 ± 1.5
	0.001	23.0 ± 1.2	134.0 ± 2.3
	0.0001	22.7 ± 1.2	138.7 ± 3.4
	Negatif Kontrol	20.0 ± 0.6	132.3 ± 1.9
	Pozitif Kontrol	1085.3 ± 65.4	1060.0 ± 33.0
F	1	21.3± 0.6	148.0 ± 1.7
	0.1	22.7 ± 1.7	159.9 ± 2.9
	0.01	24.0 ± 0.6	152.0 ± 4.5
	0.001	22.3 ± 0.9	160.7 ± 1.5
	0.0001	23.6 ± 1.2	152.7 ± 1.9
	Negatif Kontrol	21.3 ± 1.2	153.7 ± 0.9
	Pozitif Kontrol	1170.3 ± 32.3	1159.7 ± 57.9

3.2. Su Örnekleri TA 98 ve TA 100 Sonuçları

Tablo 3.2.1 A, B, C, Noktaları Su örneklerinin TA 98 Sonuçları

Test Noktası	Doz	REVERTANT KOLONİ SAYISI	
		XAD 4	XAD 16
A	1	23.7 ± 0.9	22.7 ± 0.9
	0.1	22.7 ± 1.2	23.7 ± 1.3
	0.01	21.7 ± 0.9	22.0 ± 1.5
	0.001	23.3 ± 1.8	24.0 ± 1.2
	0.0001	22.7 ± 1.5	20.7 ± 1.2
	Negatif Kontrol	22.3 ± 1.8	22.3 ± 1.8
	Pozitif Kontrol	1098.7 ± 80.6	1098.7 ± 80.6
B	1	28.3 ± 1.2	28.3 ± 2.0
	0.1	28.7 ± 1.9	31.3 ± 2.7
	0.01	28.0 ± 1.0	29.3 ± 2.0
	0.001	27.7. ± 0.3	30.3 ± 2.4
	0.0001	29.3 ± 1.3	33.0 ± 3.2
	Negatif Kontrol	21.7 ± 2.0	21.7 ± 2.0
	Pozitif Kontrol	1010.0 ± 65.6	1010.0 ± 65.6
C	1	22.3 ± 0.9	24.3 ± 1.2
	0.1	21.3 ± 1.3	22.3 ± 0.3
	0.01	23.3 ± 1.2	22.3 ± 1.8
	0.001	21.7 ± 0.9	23.3 ± 1.9
	0.0001	20.3 ± 0.9	22.0 ± 1.7
	Negatif Kontrol	22.0 ± 1.2	22.0 ± 1.2
	Pozitif Kontrol	1067.0 ± 77.9	1067.0 ± 77.9

Tablo 3.2.2. D, E, F Noktaları Su Örnekleri TA 98 Sonuçları

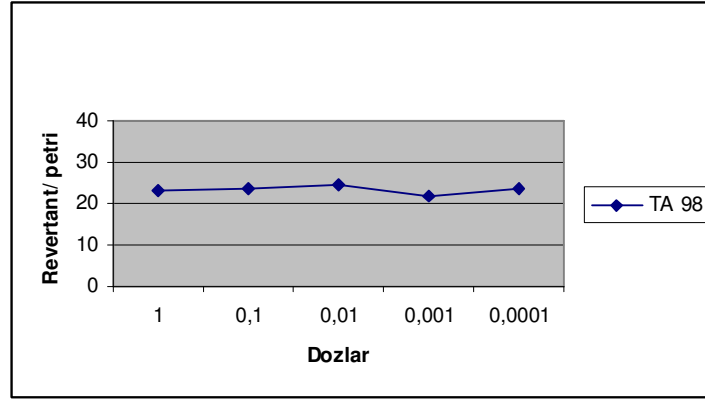
Test Noktası	Doz	REVERTANT KOLONİ SAYISI	
		TA 98	TA 100
D	1	26.6 ± 1.5	27.0 ± 1.5
	0.1	23.6 ± 0.6	26.0 ± 1.2
	0.01	25.3 ± 1.2	26.0 ± 2.5
	0.001	24.7 ± 1.2	24.7 ± 0.9
	0.0001	27.0 ± 2.3	24.3 ± 0.9
	Negatif Kontrol	22.3± 0.6	22.3± 0.6
	Pozitif Kontrol	1085.3 ± 65.4	1085.3 ± 65.4
E	1	24.0 ± 1.5	24.0 ± 1.5
	0.1	22.7 ± 0.8	22.3 ± 0.9
	0.01	22.3 ± 2.0	23.0 ± 1.2
	0.001	22.0 ± 0.6	22.1 ± 1.7
	0.0001	21.7 ± 1.3	20.7 ± 0.8
	Negatif Kontrol	20.0 ± 0.6	20.0 ± 0.6
	Pozitif Kontrol	1085.3 ± 65.4	1085.3 ± 65.4
F	1	22.0 ± 1.5	21.3 ± 0.9
	0.1	21.6 ± 0.9	20.7 ± 0.9
	0.01	22.3 ± 2.0	22.3 ± 0.9
	0.001	23.0 ± 0.1.2	22.3 ± 1.8
	0.0001	21.3 ± 1.2	23.8 ± 2.3
	Negatif Kontrol	21.3 ± 1.2	21.3 ± 1.2
	Pozitif Kontrol	1170.3 ± 32.3	1170.3 ± 32.3

Tablo 3.2.3. A, B, C, Noktaları Su örneklerinin TA 100 Sonuçları

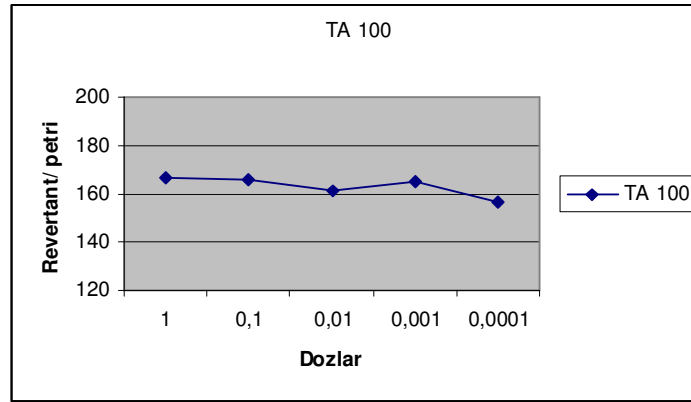
Test Noktası	Doz	REVERTANT KOLONİ SAYISI	
		XAD 4	XAD 16
A	1	140.0 ± 2.9	138.7 ± 1.2
	0.1	135.3 ± 1.5	146.2 ± 1.5
	0.01	137.6 ± 1.8	141.3 ± 2.3
	0.001	141.3 ± 1.8	141.3 ± 4.2
	0.0001	137.2 ± 2.3	139.3 ± 1.8
	Negatif Kontrol	136.3 ± 1.2	136.3 ± 1.2
	Pozitif Kontrol	1056.3 ± 1.2	1056.3 ± 1.2
B	1	175.3 ± 6.2	173.7 ± 5.5
	0.1	186.7 ± 5.9	172.3 ± 2.6
	0.01	177.7 ± 4.1	180.0 ± 5.3
	0.001	174.0 ± 5.5	171.3 ± 3.3
	0.0001	173.3 ± 6.1	181.3 ± 7.8
	Negatif Kontrol	150.7 ± 4.1	150.7 ± 4.1
	Pozitif Kontrol	1271.3 ± 85.5	1271.3 ± 85.5
C	1	149.7 ± 3.3	145.0 ± 7.0
	0.1	143.7 ± 3.0	150.0 ± 3.2
	0.01	147.3 ± 1.8	149.3 ± 7.4
	0.001	147.3 ± 1.5	139.3 ± 1.8
	0.0001	140.7 ± 1.5	144.0 ± 2.3
	Negatif Kontrol	137.3 ± 3.4	137.3 ± 3.4
	Pozitif Kontrol	1140.3 ± 99.4	1140.3 ± 99.4

Tablo 3.2.4. D, E, F, Noktaları Su örneklerinin TA 100 Sonuçları

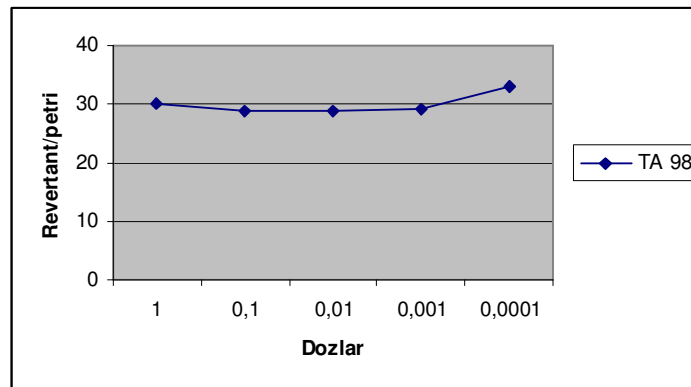
Test Noktası	Doz	REVERTANT KOLONİ SAYISI	
		XAD 4	XAD 16
D	1	144.0 ± 2.1	151.3 ± 5.5
	0.1	146.3 ± 3.5	141.7 ± 6.8
	0.01	143.5 ± 4.5	142.3 ± 1.8
	0.001	149.0 ± 3.6	141.7 ± 4.6
	0.0001	153.7 ± 4.4	137.3 ± 2.3
	Negatif Kontrol	137.3 ± 1.8	137.3 ± 1.8
	Pozitif Kontrol	1083.3 ± 50.2	1083.3 ± 50.2
E	1	156.7 ± 3.8	160.3 ± 2.0
	0.1	151.0 ± 0.6	163.0 ± 4.0
	0.01	157.3 ± 1.3	163.3 ± 1.3
	0.001	152.0 ± 1.5	162.7 ± 2.3
	0.0001	156.0 ± 2.9	159.0 ± 5.0
	Negatif Kontrol	146.7 ± 4.4	146.7 ± 4.4
	Pozitif Kontrol	1060.0 ± 33.0	1060.0 ± 33.0
F	1	144.0 ± 2.3	147.7 ± 3.8
	0.1	143.3 ± 3.2	159.3 ± 9.4
	0.01	142.0 ± 1.5	160.3 ± 8.4
	0.001	143.0 ± 2.1	157.7 ± 6.2
	0.0001	142.0 ± 2.0	142.3 ± 5.8
	Negatif Kontrol	133.7 ± 2.9	133.7 ± 2.9
	Pozitif Kontrol	969.3 ± 22.2	969.3 ± 22.2



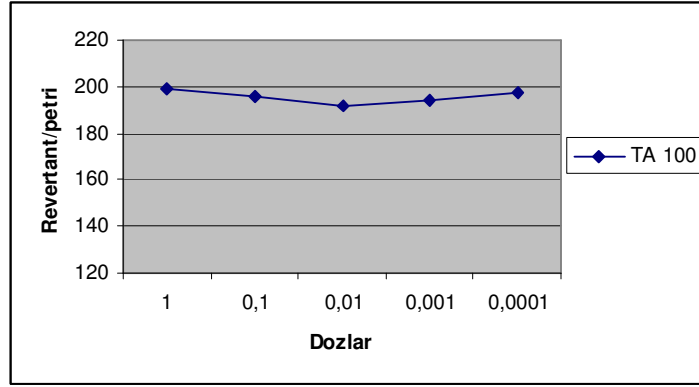
Şekil 2. A noktası sediment örneğinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



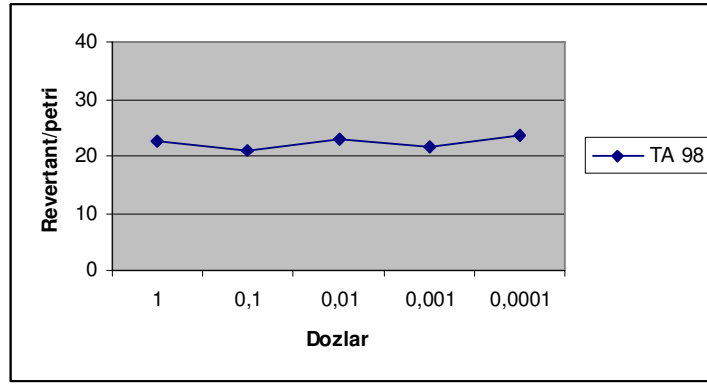
Şekil 3. A noktası sediment örneğinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



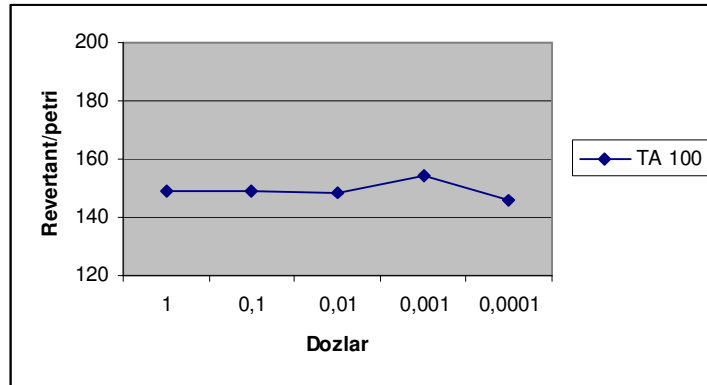
Şekil 4. B noktası sediment örneğinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



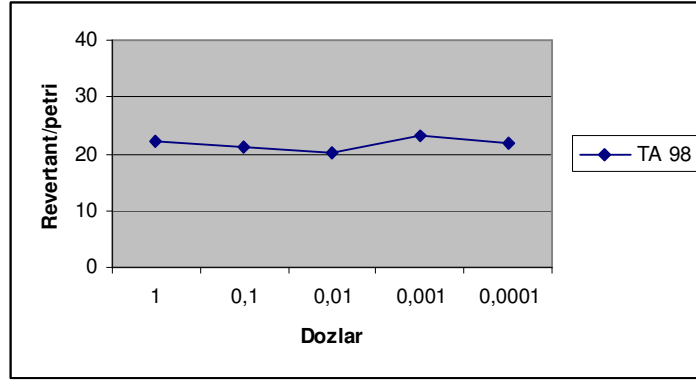
Şekil 5. B noktası sediment örneğinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



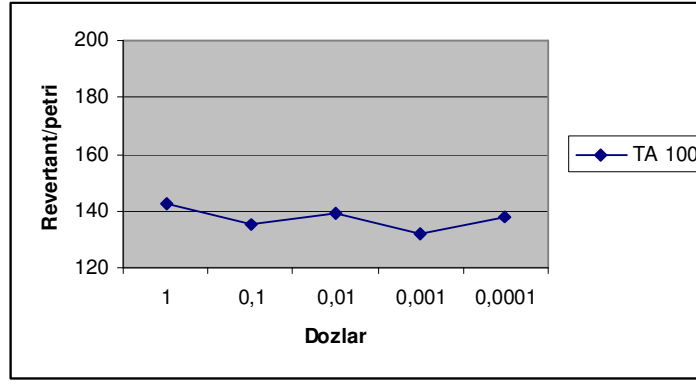
Şekil 6. C noktası sediment örneğinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



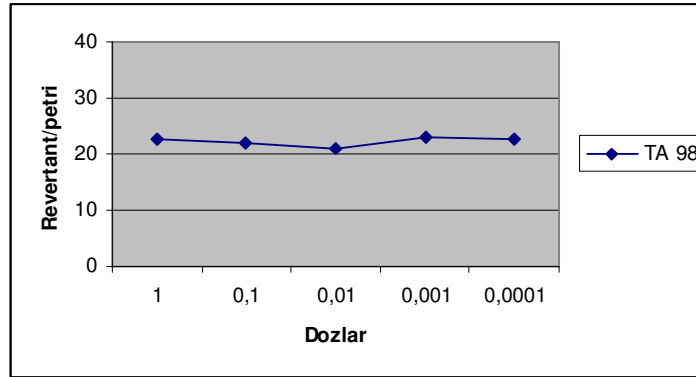
Şekil 7. C noktası sediment örneğinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



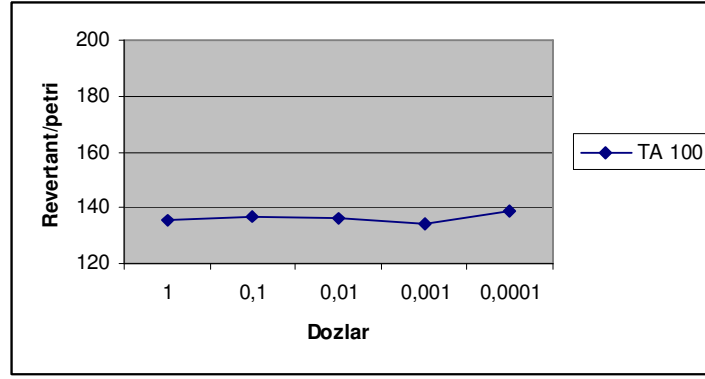
Şekil 8. D noktası sediment örneğinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



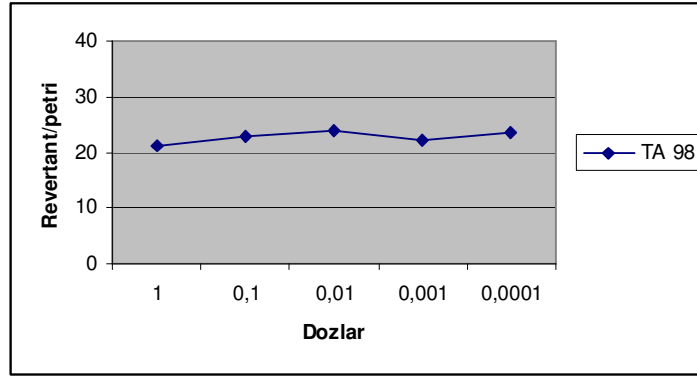
Şekil 9. D noktası sediment örneğinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



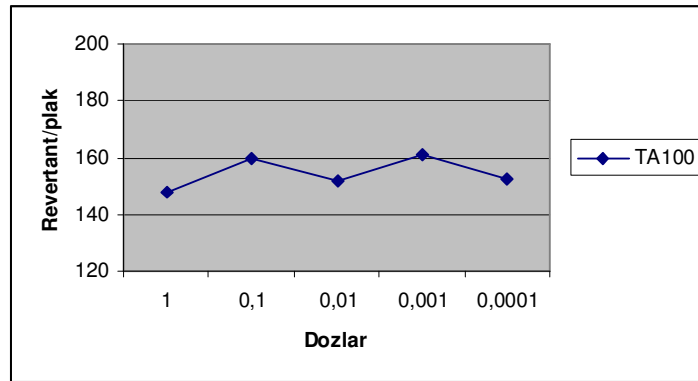
Şekil 10. E noktası sediment örneğinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



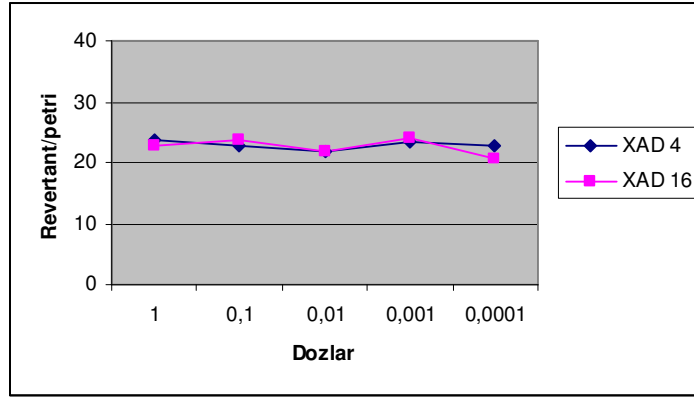
Şekil 11. E noktası sediment örneğinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



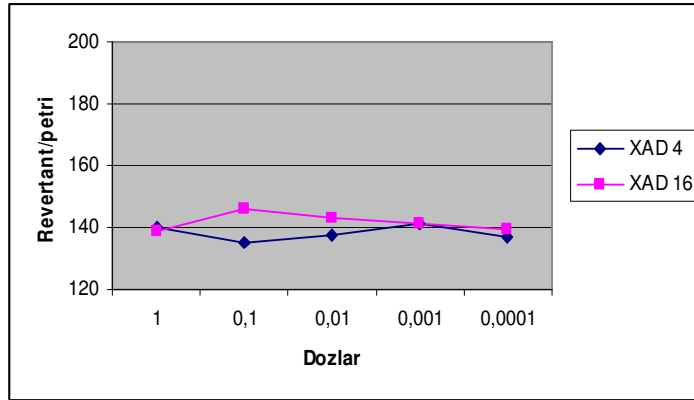
Şekil 12. F noktası sediment örneğinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



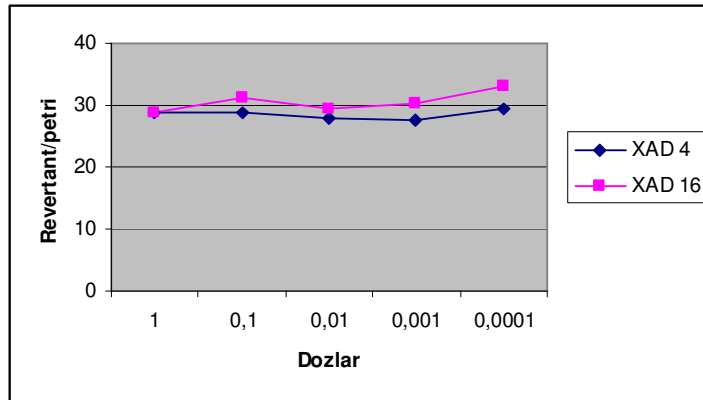
Şekil 13. F noktası sediment örneğinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi



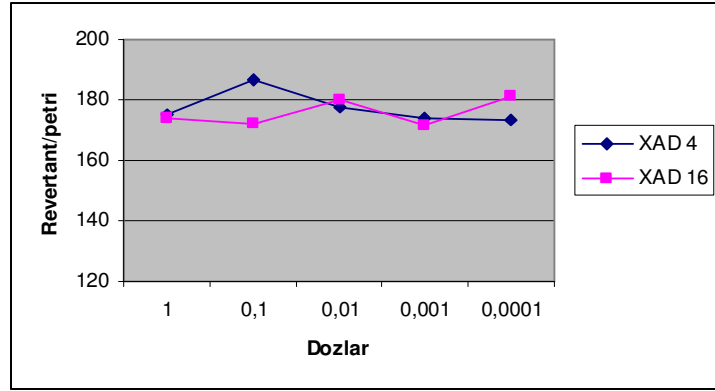
Şekil 14. A noktası su örneklerinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi



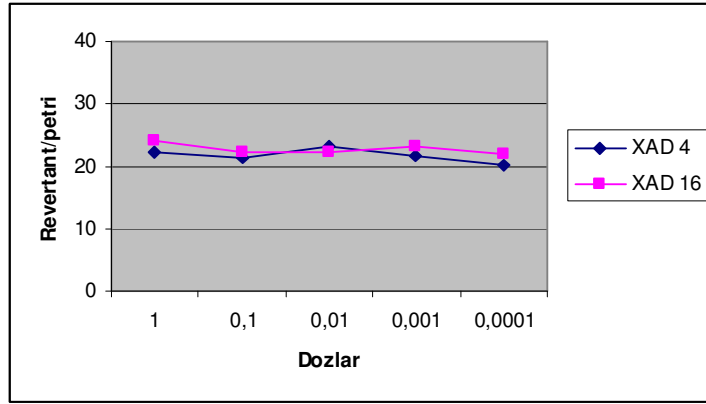
Şekil 15. A noktası su örneklerinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi



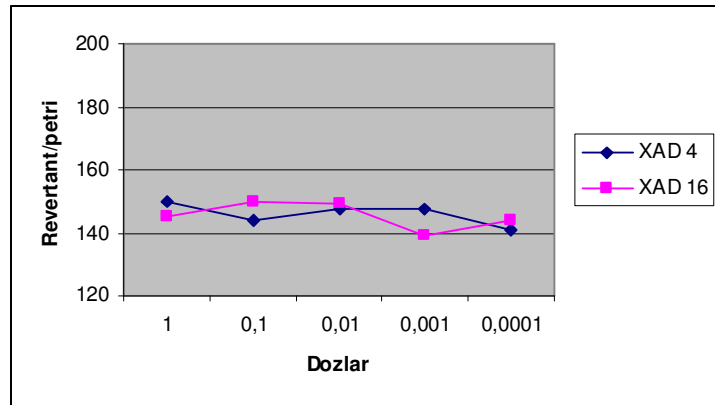
Şekil 16. B noktası su örneklerinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



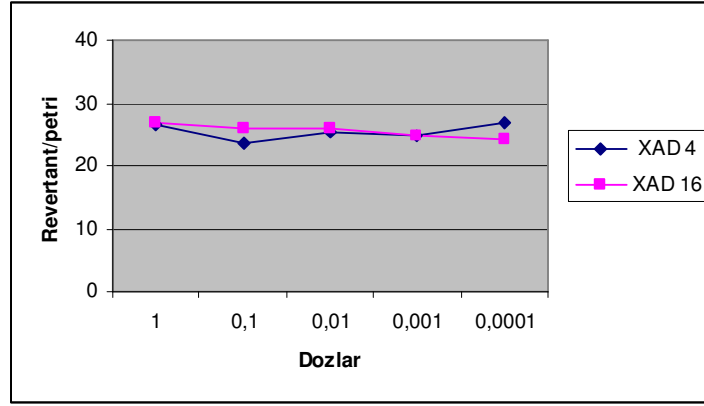
Şekil 17. B noktası su örneklerinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



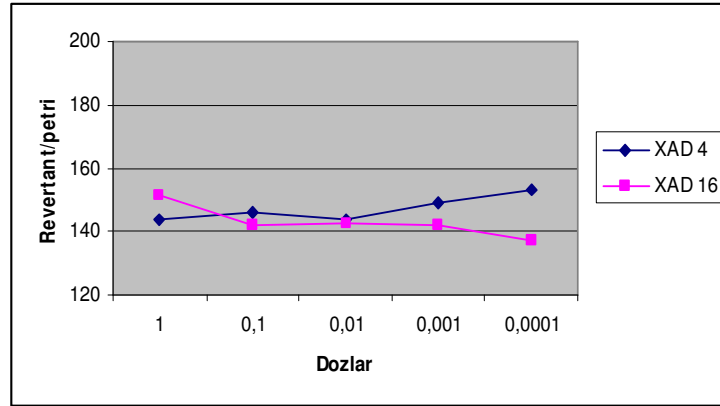
Şekil 18. C noktası su örneklerinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



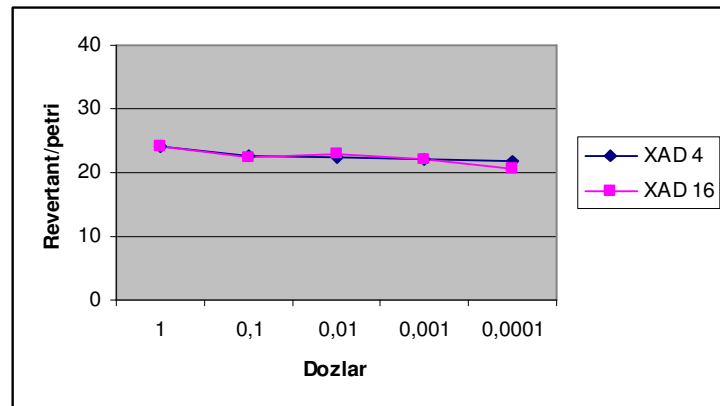
Şekil 19. C noktası su örneklerinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



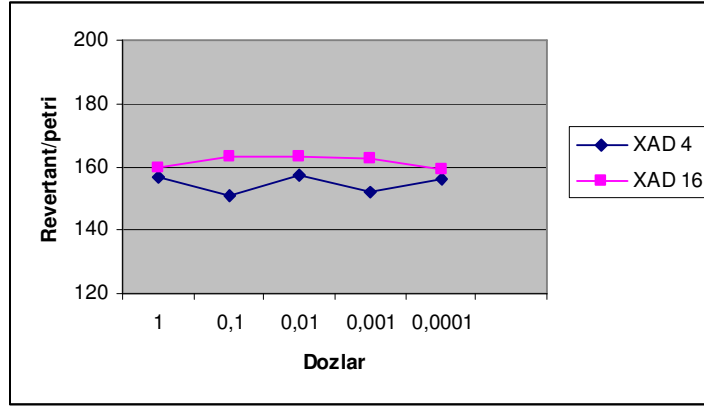
Şekil 20. D noktası su örneklerinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



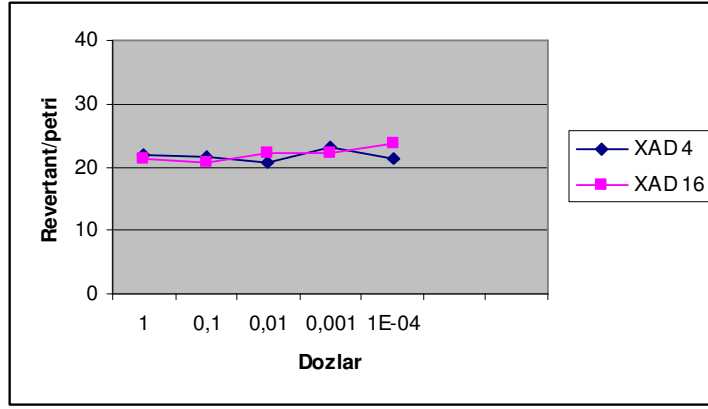
Şekil 21. D noktası su örneklerinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



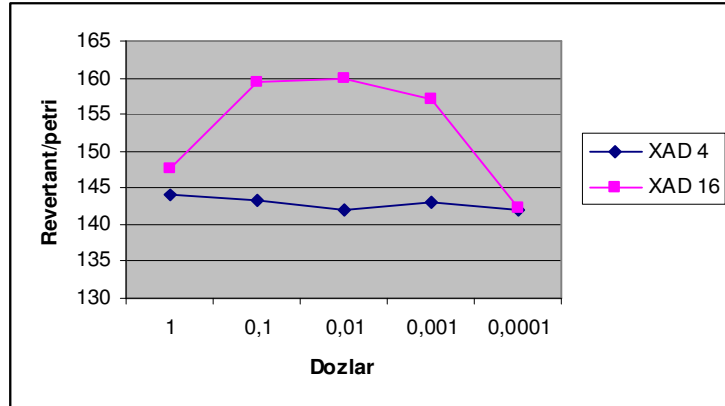
Şekil 22. E noktası su örneklerinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



Şekil 23. E noktası su örneklerinin TA 100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



Şekil 24. F noktası su örneklerinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



Şekil 25. F noktası su örneklerinin TA 98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde hemen hemen her alanda pek çok kimyasal madde kullanılmakta ve her gün çeşitli amaçlarla yeni kimyasallara üretilmektedir. Bunun sonucu olarak insanoğlu direkt veya dolaylı yollardan bu kimyasal maddeler ile karşılaşmakta ve etkilenmektedir. Tarımda kullanılan yapancı ot ilaçları, böcek öldürücü gibi pestisitler ve bunların kalıntıları bitkiler yoluyla insanlara ulaşmaktadır. Kentleşmeyle birlikte evsel atıklar ve endüstri atıkları başta sulara olmak üzere çevreye salınmakta ve insan sağlığını tehdit etmektedirler. Kimyasal maddelerce kontamine olan yüzey sularının gerek yer altı sularına karışması gerekse tarımda sulama amacıyla kullanılması sonucu pek çok kimyasal madde insan besin zincirine girebilmektedir.[36]

Yaşadığımız yüzyılda canlılar için toksik olabilecek kimyasal maddelerle çok fazla içli dışlı olmamız nedeniyle bu kimyasalların genotoksik etkilerini ölçen testler pek çok alanda kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tıp, eczacılık kozmetik gibi alanlarda geliştirilen herhangi bir kimyasal maddenin ticari ürün haline getirilip kullanılmadan önce mutajenik özelliklerinin belirlenmesini şart koşturmuştur. Kimyasal maddelerin mutajenitesinin araştırılmasında kullanılan mutajenite test sistemlerinin bir kaçının bir arada kullanılması gerekmektedir. Geliştirilen test sistemlerinde farklı canlılar kullanıldığından birbirinden farklı sonuçlara verebilmektedir. Mutajenite test sistemleri arasında en çok kullanılan Ames test sistemi diğer bazı test sistemlerine göre daha hassas olduğundan tercih edilmektedir.[37].

Bu çalışmada Karasu deresinin kaynağından Sakarya Nehrine dökülünceye kadar ki mesafe içinde seçilen 6 ayrı noktadan alınan su ve sediment örneklerinin mutajenitesi Ames test sistemi ile belirlenmeye çalışılmıştır. Sediment örneklerinden ekstraksiyon yapılmış su örnekleri hazırlanan XAD 4 ve XAD 16 kolonlarından geçirilerek test maddeleri elde edilmiştir. Tüm test maddeleri 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} dilüsyon düzeyleri hazırlanarak Ames test sisteminde kullanılmıştır. Analiz sonuçları incelendiğinde Karasu deresinin herhangi bir noktasında su ve sediment örneklerinde mutajenik etki saptanamamıştır.

KAYNAKLAR

- [1]Yüksel, S., “Bazı Süstitüe Benzilidenilin Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Salmonella Mutajenite Testi ile Araştırılması” Yüksek Lisans tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2005.
- [2] Vijayalaxmi, Raymond, R.T., Garry, H.S.S “Assesment of Radiation-İnduced DNA Damage in Human Blood Lymphocytes Using The Single-Cell Elektrophoresis Technique” Muataion Research, **271**, 243-252, 1992
- [3] Dökmeci, i., “Akut Zehirlenmelerinde Tanı ve Tedavi”, Toksikoloji, Nobel Tıp Kitapevi, 547-588, İstanbul, 1994
- [4] Korkmaz, B., “Bazı 2-Substitutie Perimidin Bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Mutajenite Testi ile Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir 2005
- [5] Saleh, K., “Mikronükleus Testi ile Bazı Kimyasal maddelerin ve Çevre Kirleticilerin Neden Olduğu Klastrojenik Etkilerin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 1997.
- [6] Lee, H., Bain, S.S., Chen, Y.L., “Genotocity of 1,3-ditiane and 1,4-ditiane in The CHO/SCE Assay and The Salmonella Mikrosomal Test” , Mutation Research, **312** , 213-218, 1994
- [7] Hayası, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Volders, M.K., Oleson, F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutuo S., Vannier, B., “In Vivo Rodent Erythrocyte Mikronukleus Assay”, Mutation Research, **312**, 293-304, 1994
- [8] Foster, R., Blowers, S.D., Cinelli S., Marquardt, H., Westenford, J., “Mutagenecity of Imidazole and Related Compounds”, Mutation Research, **292**, 71-79, 1992
- [9] Josepy, P.D., Gruz, P., Nohmi, T., “Recent Advences in Construction of Bacterial Genotoxicity Assays”, Mutation, Research, **386**, 1-23, 1997
- [10] Meng, Z., Zhang, L., “Cytogenetic Damage Induced in Lymphocytes Sodium Bisulfite” Mutation Research, **298**, 63-69, 1992
- [11] Barış, A., ‘Farklı Tipteki Pestisitlerin Muhtemel Mutajenitelerinin Ames/Salmonella/Mikrozom Test Yöntemiyle Araştırılması”, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Entitüsü, Afyon, 2007
- [12] Anonim, 2010.

- <http://tr.wikipedia.org/wiki/Mutasyon>
- [13] Anonim, 2010.
<http://www.turkmmo.com/biyoloji/16102-mutasyon.html>
- [14] Şahin, Y., Genel Biyoloji 2, Bilim Teknik Yayınevi, 334-349, 1995
- [15] Tatlı, A., Evrim ve Yaratılış, Damla Matbaacılık, 95-107, Konya, 1992
- [16] Demirsoy, A., Yaşamın Temel Kuralları, Genel Biyoloji, 1, Ankara ,1992
- [17] Anonim, 2010,
<http://tr.wikipedia.org/wiki/%C4%B0nversiyon>
- [18] Anonim, 2010,
<http://tr.wikipedia.org/wiki/Translokasyon>
- [19] Cummings, M.R., Klug, W.S., “Genetik”,(Ed: Öner, C.) Palme Yayıncılık, 467-471, 2003.
- [20] Anonim, 2010,
http://tr.wikipedia.org/wiki/DNA_onar%C4%B1m%C4%B1
- [21] Fender, H., Wolf, G., “Cytogenetic investigations in Employees From Waste Disposal Sites”, Toxicology Letters, **96-97**, 149-154, 1998.
- [22] Ribas, G., Surralles, J., Carbonell, E., Xemená, A., Marcos, R., “Genotoxic Evaluation of The Herbicide Trifluralin on Human Lymphocytes Exposed in Vitro”, Mutation Research, **371**, 15-21, 1996
- [23] Abou-Eisha, A., Creus, A., Marcos, R., “Genotoxic Evaluation of The Antimicrobial Drug, Trimethoprim, in Cultured Human Lymphocytes” Mutation Research, **440**, 157-162, 1999.
- [24] Fenech, M., “The in Vitro Micronucleus Technique”, Mutation Research, **1-2**, 81-95, 2000.
- [25] Singh, N.P.,Maccoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., “A Simple Technique Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells”, Experimental Cell Research, **175**, 184-919, 1988
- [26] Albertini, J.R., Anderson, D., Douglas, G.R., Hugmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan,A.F., Norppa, H., Suhaker, D.E.G., Tice,R., Waters, M.D., Aitio,A., “IPCS Guidelines For Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogenes in Humans”, Mutation Research, **463**, 111-172, 2000,

- [27] Kasamatsu, T., Kohda, K., Kawazoa, Y., “Comparison of Chemically Induced DNA Breakage in Celular and Subcelular Systems Using The Comet Assay”, Mutation Research, **369**, 1-6, 1996.
- [28] Galli, A., Schieslt, R.G., “Effects of Salmonella Assay Negative and Positive Carcinogens on Intrachromosomal rekombination in G1-Arrested Yeast Cell”, Mutation Research, **370**, 209-221, 1996.
- [29] Bakele, G., McCreary, “ Respond of K_e Test to NCI/NTP Screened chemicals. I. Non-genotoxic carcinogens and Genotoxic Non-carcinogens”,**11**, 1811-1818, 1990.
- [30] Albenesi, T., Polani, S., Cozzi, R., Perticone, P., “DNA Strand Methylation and Sister Cromatid Exchanges in Mamalian Cells in Vitro”, Mutation Research, **429** , 239-248, 1999,
- [31] Quillardet , P., Hofnung M., “The SOS Cromotest, A Colorimetric Bacteral Assay for genotoxins: Procedures”,Mutation Research, **147** , 67-78, 2005.
- [32] Oda, Y., Makamura, S., Oki, I., Kato, T., Shinagausa, H., “Evalatuon of The New System (UMU Test) for Detection of Enviromental Mutagens and Carcinogens”, Mutation Research, **147**, 219-229, 1985.
- [33] Güven, K., Biyokimyasal ve Moleküler Toksikoloji, Dicle Üniversitesi Basımevi, Diyarbakır.
- [34] Maron, M.D., Ames, B.N., “Revised Methods for Salmonella Mutagenicity Test”, **113**, 173-215, 1982.
- [35] Almaca, I.E., Fundamentals of Microbiology , Third Edition, 175-182, 1991.
- [36] Shen, J.H., Vahl, H.H., Shen, L., Wasterford, J., “Toxicoligal Profile of Pollutanst in Surfacewater From Area in Thai Lake”, Toxicology, **166** , 71-78, 2001.
- [37] Ames, B.N., Gold, S., “ The Causes and Prevention of Cancer The Role of Enviroment”,Biotherapy, **11**, 1998