



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DEKİ BAZI YÖRESEL BAL ÇEŞİTLERİNİN ANTİMUTAJENİK ETKİLERİNİN SALMONELLA/MİKROZOM (AMES) TEST SİSTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Nuriye EKMEKCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos–2010
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all materials and results that are not original to this work.

İmza

Nuriye EKMEKCİ

Tarih:06/08/2010

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRKİYE'DEKİ BAZI YÖRESEL BAL ÇEŞİTLERİNİN ANTİMUTAJENİK ETKİLERİNİN SALMONELLA/MİKROZOM (AMES) TEST SİSTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Nuriye EKMEKCİ
Selçuk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

I. Danışman: Prof. Dr. Yusuf DURAK
II. Danışman: Prof. Dr. Kadriye SORKUN

2010, X + 58 sayfa
Jüri: Prof. Dr. Yusuf DURAK
: Prof. Dr. Ali ATEŞ
: Prof. Dr. Celaleddin ÖZTÜRK

Bu çalışmada, Türkiye'deki bazı yöresel bal çeşitleri toplandı. Bal örneklerinin polen analizleri yapılarak gerçek bal oldukları belirlendi.

Anzer balı, Trabzon Kestane balı, Kekik balı, Çam balı, Narenciye balı ve Buzluhan Yayla balı olarak belirlenen balların *Salmonella*/ mikrozom test sistemi ile antimutajenik akiviteleri araştırıldı. İncelenen bal örneklerinin farklı dozlarının sitotoksik etkisi gözlenmedi. Antimutajenite denemeleri S9 varlığında ve yokluğunda *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde yapıldı.

İncelenen bal örneklerinin tüm dozları (100 mg/ml, 50 mg/ml 25 mg/ml, 12.5 mg/ml ve 6.25 mg/ml) S9 varlığında *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerinde güçlü antimutajenik etki gösterdi (> 40 %). Trabzon Kestane ve Kekik ballarının tüm dozları S9 varlığında ve yokluğunda *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üzerinde güçlü antimutajenik etkili görüldü (> 40 %), diğer bal örnekleri ise doza bağlı gittikçe azalan oranlarda antimutajenik etkili olarak belirlendi (% 40-% 20).

Anahtar kelimeler: Antimutajenite, *Salmonella typhimurium*, Bal, Polen, Salmonella/ mikrozom testi

ABSTRACT

MS Thesis

INVESTIGATION OF ANTIMUTAGENIC EFFECTS OF SOME LOCAL HONEY KINDS IN TÜRKİYE BY SALMONELLA/ MICROSOME (AMES) TEST SYSTEM.

Nuriye EKMEKCİ

Selcuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. YUSUF DURAK

II. Supervisor: Prof. Dr. Kadriye SORKUN

2010, X + 58 pages

Jury: Prof. Dr. Yusuf DURAK

: Prof. Dr. Ali ATEŞ

: Prof. Dr. Celaleddin ÖZTÜRK

In this research, some regional honey kinds collected in Turkey. Honey samples were determined that they are genuine by pollen analyzing.

Antimutagenic activities researched of honeys which determined as Anzer honey, Trabzon chestnut honey, thyme honey, pinus honey, citrus honey and Buzluhan Plateau honey by Salmonella/microsome test system. Cytotoxic affects of researched honey samples' different doses, were not seen. Antimutagen experiments were done in existing S9 and not existing *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 strains.

All doses of researched honey samples (100mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12.5 mg/ml and 6,25 mg/ml) in existing *Salmonella typhimurium* pointed out powerful antimutagen affect on TA 98 strain (> 40 %). All doses of Trabzon chestnut and thyme honeys were pointed out powerful antimutagen affect on TA 100 strain, in existing S9 and not existing Salmonella typhimurium (> 40 %). And other honey samples were determined antimutagen affect in decreasing rates depend to dose (40 % - 20 %).

Key Words: Antimutagenicity, *Salmonella typhimurium*, Honey, Pollen, Salmonella/ mikrosome test

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2009-2010 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlandı. Çalışmada Türkiye'deki bazı yöresel bal çeşitlerinin, Salmonella / mikrozom test sisteminde antimutajenik etkileri araştırıldı. Bal örneklerinin polen analizleri Hacettepe Üniversitesi Palinoloji Laboratuvarında, antimutajenite deneyleri S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bana rehber olan danışmanım Sn. Prof. Dr. Yusuf DURAK'a, fikir ve deneyimleri ile çalışmalarımda bana yol gösteren ve destek olan ikinci danışmanım Sn. Prof. Dr. Kadriye Sorkun'a,

Tezimin oluşturulması ve yazılması sırasındaki her aşamada, gecesini gündüzüne katarak, çok büyük yardımlarını gördüğüm ve bana her konuda büyük destek olan sevgili arkadaşım Döndü AKIN'a,

Maddi ve manevi büyük emeği geçen, çalışmamın her aşamasında ilgisini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Arş. Gör. Gönül DEMİREL'e,

Değerli bilgilerini, yardım ve önerilerini benden esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Cahit Doğan'a,

Çalışmalarım sırasında her konuda yardımcı olan değerli hocalarım Arş. Gör. Ahmet UYSAL'a, Yrd. Doç. Dr. M. Onur ALADAĞ'a, Yrd. Doç. Dr. Haluk ÖZPARLAK'a, Arş. Gör. Ömür GENÇAY'a, Arş. Gör. Evren YILDIZTUGAY'a, Yrd. Doç. Dr. Hasibe CİNGİLLİ VURAL'a, Yrd. Doç. Dr. Birol ÖZKALP'e, Doç. Dr. M. Aydın ŞANDA'ya, Öğr. Gör. Fatih SEVGİ'ye ve Arş. Gör. İlginç KIZILPINAR'a, çalışmanın laboratuvar aşamasında bana yardımcı olan ve beni destekleyen sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Erdoğan GÜNEŞ'e, Yavuz Selim ÇAKMAK'a Arş.Gör. Gökhan ZENGİN'e Zehra BAĞRIYANIK'a, Birsel MOUSTAFA'ya, Safiye ACAR'a ve Sevinç ALBAYRAK'a, Biyoloji Bölümü teknisyenleri Süleyman ALAN ve Yücel ÜSTÜN'e, Biyoloji Bölümünün her türlü araştırma imkânlarından faydalanmamı sağlayan, Bölüm Başkanı, Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK'e teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve varlıklarıyla destek ve mutluluk bulduğum sevgili aileme sonsuz teşekkürler ederim.

Ayrıca bu çalışmayı **09201056** nolu proje ile destekleyen S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Nuriye EKMEKCİ

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ 1

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 4

3. MATERYAL ve METOT 12

3.1. Materyal 12

3.1.1. Kullanılan Bal Örnekleri 12

3.1.2. Kullanılan Test Suşları 12

3.1.3. Kimyasal maddeler 13

3.1.4. Besiyerleri, tamponlar ve çözeltiler 13

3.2. Metot 21

3.2.1. Bal örneklerinin polen analizi 21

3.2.2. Bazik-fuksinli gliserin-jelatin (montaj materyali) 21

3.2.3. Balda polen analizi için preparat hazırlama 21

3.2.4. Polen preparatlarının incelenmesi 22

3.2.5. Balda toplam polen sayısı (TPS)'nın tespiti için preparat hazırlama 23

3.2.6. Toplam polen sayısı (TPS/10 g) preparatlarının incelenmesi 24

3.2.7. Çam balı örneklerinden polen preparatının hazırlanması 25

3.2.8. Çam balında TPS preparatının incelenmesi 25

3.2.9. Çam balındaki balçiği elementi (BÇE) preparatlarının incelenmesi 25

3.2.10. Test suşlarının üretilmesi 26

3.2.11. Test suşlarının genetik özelliklerinin kontrolü 26

3.2.12. Kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı kontrolü 31

3.2.13. Master plakların hazırlanması 32

3.2.14. Bal konsantrasyonlarının ayarlanması 32

3.2.15. Sitotoksik dozun hesaplanması 33

3.2.16. S9 karışımının hazırlanması 33

3.2.17. Pozitif kontrol 33

3.2.18. Negatif kontrol 34

3.2.19. Antimutajenite testi (AMES/ Salmonella mikrozom testi) 35

3.2.20. Sonuçların değerlendirilmesi 37

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI 38

4.1. Bal örneklerinin polen analizi 38

4.2. Test Suşlarının Üreme Durumları 38

4.3. Sitotoksik dozun belirlenmesi 39

4.4. Çalışılan balların antimutajenik özelliklerinin belirlenmesi 39

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 47

6. KAYNAKLAR 51

ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 3.1.2 Salmonella/ mikrozom test sisteminde yaygın olarak kullanılan bazı *Salmonella* suşları ve genetik özellikleri 12

Şekil 3.2.6 Preparatta polen sayımlarının yapılmasında izlenen tarama yöntemi..... 24

Çizelge 3.2.9. Balların BÇE/TPS oranına göre sınıflanması 26

Şekil 3.2.11.1. *S. typhimurium* TA 98'in histidin gereksinim kontrolü A) Histidin/ biyotin agarda üreme var, B) Biyotin agarda üreme yok 27

Şekil 3.2.11.2 *S. typhimurium* TA 100'ün histidin gereksinim kontrolü sonucu A) Histidin/ biyotin agarda üreme var, B) Biyotin agarda üreme yok 28

Şekil 3.2.11.3. *S. typhimurium* TA 98 suşunda rfa mutasyonu kontrolü. A) Zon çapı 14 mm, B) Zon çaplarının yakın görünümü 28

Şekil 3.2.11.4. *S. typhimurium* TA 100'de rfa mutasyonu kontrolü. A. Zon çapı 14 mm, B. Zon çaplarının yakın görünümü 29

Şekil 3.2.11.5. *S. typhimurium* TA 98 ve *E.coli* ATTC 25922 suşlarında R faktörü varlığının kontrolü.Ampisiline dirençli TA 98 suşu, B) Ampisiline duyarlı *E. coli* ATTC 25922 suşu 30

Şekil 3.2.11.6. . *S. typhimurium* TA 98 ve *E.coli* ATTC25922 suşlarında R faktörü varlığının kontrolü. A) Ampisiline dirençli TA 98 suşu, B) Ampisiline duyarlı *E. coli* ATTC 25922 suşu..... 30

Şekil 3.2.11.7 *S. typhimurium* TA 98, TA 100 ve *E.coli* ATTC 25922 suşlarında R faktörü varlığının kontrolü.A) Ampisiline dirençli TA 98 suşu, B) Ampisiline dirençli TA 100 suşu, C) Ampisiline duyarlı *E. coli* ATTC 25922 suşu..... 30

Çizelge 3.2.12.1 Mutant suşların kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı 31

Şekil 3.2.12.1 *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları. A) *S. typhimurium* TA 98 suşunun kendiliğinden geri dönen koloni sayısı, B) *S. typhimurium* TA 98 suşunun kendiliğinden geri dönen koloni sayısı..... 32

Şekil 3.2.17.1 *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerine; A) S9 yokluğunda 4 nitro-o-fenilendiamine mutajeninin etkisi, B) S9 varlığında 2Aminoflouren mutajeninin etkisi .. 34

Şekil 3.2.17.2. *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üzerine S9 varlığında ve yokluğunda Sodyum azid mutajeninin etkisi 34

Şekil 3.2.18.1 Su kullanılarak hazırlanan negatif kontrol plaklarındaki üreme durumu. A) TA 100, B) TA 98 35

Şekil 3.2.18.2 DMSO kullanılarak hazırlanan negatif kontrol plaklarıındaki üreme durumu. A) TA 100, B) TA 98 35

Çizelge 4.2.1 *Salmonella typhimurium* TA 98 standart suşunun zamana göre absorbans değerleri ve üreme durumu 38

Çizelge 4.2.2 *Salmonella typhimurium TA 100* standart suşunun zamana göre absorbans değerleri ve üreme durumu 39

Çizelge 4.3 İncelenen bal örneklerinin sitotoksik doz sonuçları 39

Çizelge 4.4.1 İncelenen bal çeşitlerinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerine antimutajenik etkileri 41

Çizelge 4.4.2 İncelenen bal çeşitlerinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerine antimutajenik etkileri 42

Şekil 4.4.1 Bal çeşitleri A) Kekik, B) Anzer, C) Buzluhan Yayla, D) Narenciye, E) Trabzon Kestane ve F) Çam balı'nın 100 mg/ml dozundaki revertant sayıları..... 43

Şekil 4.4.1 Anzer Balının S9 varlığında ve yokluğunda *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerine % inhibisyon oranları 44

Şekil 4.4.2 Trabzon Kestane Balının S9 varlığında ve yokluğunda *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerine % inhibisyon oranları 44

Şekil 4.4.3 Çam Balının S9 varlığında ve yokluğunda *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerine % inhibisyon oranları 45

Şekil 4.4.4 Kekik Balının S9 varlığında ve yokluğunda *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerine % inhibisyon oranları 45

Şekil 4.4.5 Narenciye Balının S9 varlığında ve yokluğunda *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerine % inhibisyon oranları 46

Şekil 4.4.3 Buzluhan Yayla Balının S9 varlığında ve yokluğunda *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerine % inhibisyon oranları 46

SİMGELER VE KISALTMALAR

g …… gram

mg ……. miligram

ml…… mililitre

l……... litre

µg…… mikrogram

µl……. mikrolitre

°C…… santigrad derece

rpm…….. dakikadaki devir sayısı

LD_{50}…… yarıyarıya öldürücü doz

1. GİRİŞ

Bal, insanlar için önemli bir besin kaynağıdır. Çok eski zamanlardan beri insanlar, arıların yaptıkları baldan çeşitli şekillerde yararlanmaktadırlar (Aydoğan 1990).

Günümüzde yaklaşık doğal olarak yetişen 375 000 bitki türünün 500 kadarı nektarlı bitkilerdir (Crane 1978, 1984; Cherghton 1974; Atkins 1946). Türkiye'de doğal olarak ortalama 9224 bitki türü yetişmekte ve bunların 3000 türünün endemik olduğu belirtilmektedir (Davis 1988). Bu bitkilerden 450 tanesi arıcılık için önem taşımaktadır. Türkiye, nektarlı bitkilerce zengin bir floraya sahip olması nedeniyle arıcılığa en uygun ülkelerden biridir (Sorkun 2002).

Bal; bitkilerin çiçeklerinde bulunan nektarların (bal özünün) veya bazı eş kanatlı böcekler tarafından bitkilerin canlı kısımlarından yararlanılarak salgılanan tatlı maddelerin bal arıları tarafından toplandıktan sonra, vücutlarında bileşimlerinin değiştirilmesi ve petek gözlerinde olgunlaşması sonucunda meydana gelen tatlı bir üründür (Ötleş 1995).

Balın hammaddesi olarak bilinen nektar, çözünmüş şeker içeren bir sıvı olup, nektarın çeşitli oranlarda protein, aminoasit, enzim, yağ, organik asit, vitamin, alkoloid ve antioksidanlar bulundurduğu saptanmıştır. Balda, nektarda bulunan bileşiklerden farklı maddelerin de bulunması, bal arısının midesinde olgunlaştırma sırasında, bala farklı bileşikleri eklediğini göstermektedir (Krell 1996).

Arılar nektarı çiçekli bitkilerden toplarken, beslenmesinde kullanmak için değişik bitkilerden topladığı polenleri de kovana taşır ve petek gözlerine depo ederler (Ünlü 1994). Polenler yüksek oranda vitamin, mineral ve protein içeriklerinden dolayı birçok hastalığa karşı iyileştirici ve koruyucu bir etkiye sahiptir (Sorkun 1987; Çakmak 2001).

Melissopalinoloji, balın floristik orijinini bulmaya yardım etmektedir. Bunun için balda polen analizleri yapılmaktadır. Bal içinde bulunan polenler teşhis edilerek, bu polenlerin hangi bitkilere ait oldukları tespit edilmektedir. Bu da balın kaynağı ve kalitesi hakkında fikir vermektedir.

Melissopalinolojik çalışmalarla insan sağlığı açısından zararlı olan kötü kaliteli ya da zehirli balların önceden teşhis edilmesi de mümkün olabilmektedir (Dalgıç 1994).

Ayrıca, arılara bol miktarda şeker şurubu yedirilmesi ile üretilen düşük kaliteli şeker balları da yine polen analizleri ile tespit edilebilmektedir (Pınar 2003).

Balda çeşitli karbonhidratlar, aminoasitler, su, vitaminler, mineraller, flavonoidler, organik asitler, asetil kolin, polenler, pigmentler, balmumu ve enzimlerden oluşan 180'den fazla bileşik tanımlanmıştır. Bunların bazıları arı kökenli, diğerleri ise bitkisel kökenli bileşiklerdir (Sato ve Miyata 2000).

Baldaki fenolik bileşikler, özellikle flavonoidler, antioksidan, antibakteriyel, antikanserojenik ve antialerjik gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteler göstermektedirler (Russel 1983, Bogdanov 1984, Cook ve Samman 1996). Bal, gıdalarda doğal tatlandırıcı olarak kullanılmakla birlikte, bazen ilaç olarak da kullanılabilmektedir (Molan ve ark. 2001).

Son yıllarda birçok doğal bileşiğin tümör inhibe edici etkiye ve immün sistemi kuvvetlendirici niteliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Lien ve Li 1985). Çeşitli biyoaktif bileşikler ve bunların türevlerinin; başlangıç, gelişme ve yayılım safhalarını içine alan birçok deneysel sistemlerde karsinogenesisi inhibe ettiği gözlenmiştir (Huang ve ark. 1994). Bu yüzden çabalar, kanserin engellenmesi ve sonraki gelişim safhalarını yavaşlatan veya gerilemesini sağlayan doğal antikarsinojenleri tanımlamaktır (Chuang ve ark. 2000).

Günlük alınan vitamin ve mineral içerikli besin maddeleri (askorbik asit, tokoferoller, isoflavonlar, flavonoidler ve polifenolik bileşikler); DNA sentezi, DNA onarımı, metilasyon ve apoptozis gibi birçok DNA faaliyetlerini kapsadığından son derece önemlidir (Fenech 2001).

Bitkisel metabolitlerin antimutajenik aktivitelerinin belirlenmesinde, deney hayvanları kullanılarak yapılan *in vivo* çalışmalar uzun süre ve yüksek maliyet nedeniyle başlangıç aşamasında tercih edilen test sistemleri değildir (Iarc 1980). Bu nedenle araştırıcılar, antikarsinojenite taramalarına esas olabilecek kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı mutajenite test sistemleri geliştirmişlerdir (Mortelmans ve Zeiger 2000). AMES-*Salmonella*/mikrozom test sistemi kısa zamanlı mutajenite test sistemlerinden biri olup antimutajen/ antikarsinojenlerin veya tersine mutajen/karsinojenlerin tespit edilmesinde sıklıkla kullanılan önemli bir tekniktir (Abdullaev ve ark. 2003).

Bu çalışmada; Türkiye'nin farklı yörelerinden toplanan Anzer balı, Trabzon Kestane balı, Çam balı, Kekik balı, Narenciye balı ve Buzluhan Yayla balı farklı dozlarının

antimutajenik etkilerinin araştırılması amaçlandı. İncelediğimiz bal örneklerinin antimutajenik aktiviteleri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmadığından, antimutajenik etkilerinin *Salmonella/* mikrozom test sistemi ile araştırılması kararlaştırıldı.

1. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Dünyanın birçok yerinde yapılan arkeolojik kazılar ile Avrupa ve Asya'daki Mezolitik kayalarda bulunan resimler insanoğlunun, günümüzden 8000 yıl öncesinden bugüne kadar arıcılıkla uğraştığını göstermektedir (Crane 1996). Hititlerin milattan önce 1300 yıllarında Anadolu'da arıcılık yaptığını kanıtlayan birçok tarihi eser bulunmuş, yazıtlarda arıcılıkla ilgili bilgilere rastlanmıştır. Milattan sonra 1850'li yıllara kadar arıcılık çerçevesiz kovanlarda ve geleneksel yöntemlerle yapılırken, bu tarihten itibaren Amerikalı arıcı Langstroth'un geliştirdiği ilk çerçeveli kovanla modern arıcılığa geçilmiştir (İnci 1985).

Bal yönetmeliğine göre salgı balı, bal arılarının (*Apis mellifera*) çiçek dışındaki nektarları ya da bitkilerin veya bitkiler üzerinde yaşayan bazı canlıların salgılarını topladıktan sonra, kendilerine özgü maddelerle karıştırarak değişikliğe uğratıp petek gözlerine depoladıkları maddedir. Çiçek balı ise arıların çiçeklerdeki nektardan ürettikleri baldır (Anonim 2004).

Baharla birlikte çiçekler açmaya başlayınca, çiçekler arasında tozlaşmalar da başlamaktadır. Tozlaşma; polenlerin çiçeğin dişi organına taşınması olarak bilinmektedir. Çiçekli bitkilerin % 20'sinin polenleri rüzgar ile tozlaşırken (Anemogam), diğerlerinin polenleri böcekler (Entomogam), kuşlar (Ornithogam) veya su ile tozlaşır. Bal arıları, arı ekmeği diye de bilinen poleni, kendilerinin ve larvalarının besin ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla toplarken, tozlaşmaya da etkin bir şekilde katkıda bulunmuş olurlar. Böcekle tozlaşan bitkiler, tozlaşma şansını arttırabilmek amacıyla, böcekler için besin oluşturan nektarı üretirler. Genel olarak sabahın erken saatlerinde çiçekler bol nektar salgılar. Güneş yükselip sıcaklık artınca nektar salgılanması da azalır ve sonra akşam serinliğinde nektar üretimi tekrar artmaya başlar (Sönmez ve Altan 1992).

Bal arılarının sıkça uğradığı çiçekli bitkiler; kekik (*Thymus* sp.), adaçayı (*Salvia* sp.), taş yoncası (*Melilotus* sp.), hindiba (*Cichorium intybus*), ballıbaba (*Lamium* sp.), korunga (*Onobrychis* sp.), lavanta (*Lavandula angustifolia*), muhabbet çiçeği (*Reseda* sp.), nane (*Mentha* sp.), fiğ (*Vicia sativa*), yonca (*Medicago* sp.), kolza (*Brassica napus*), pamuk (Gossypium sp.), tütün (*Nicotiana tabacum*), ayçiçeği (*Helianthus annuus*), akasya (*Acacia* sp.), portakal (*Citrus sinensis*), ıhlamur (*Tilia* sp.), funda (*Erica* sp.), çeşitli meyve

ağaçları (*Rosaceae*), söğüt (*Salix* sp.), yalancı akasya (*Robinia pseudoacacia*), akçaağaç (*Acer* sp.), böğürtlen (*Rubus* sp.), muz (*Musa* sp.), at kestanesi (*Aesculus hippocastanum*), kocayemiş (*Arbutus unedo*) olarak bilinmektedirler (Sönmez ve Altan 1992).

Balın bileşimi arının nektarını aldığı çiçeklerin türüne, iklim koşullarına, arının cinsi ve yaşına bağlı olarak değişmektedir (Hışıl ve Börekçioglu 1986, Güneş 2001). Balın % 17.10'unu su, kalanını katı madde oluşturmaktadır. Katı madde içinde fruktoz, glukoz, maltoz ve sakkaroz olmak üzere şekerler önemli bir orana sahiptir. Ayrıca az miktarda protein, bazı B grubu vitaminleri, C vitamini ve çesitli mineraller de bulunmaktadır. Bal, başta glukonik asit olmak üzere bütirik, asetik, formik, laktik, süksinik, malik, sitrik ve okzalik asitler gibi organik asitler nedeniyle asidik bir gıdadır. Ortalama olarak asitliği % 0.57 (% 0.017–1.17) olup, pH'sı 3.9 (3.4–6.1)'dur (Anonim 2003).

Bal içerisinde, aynı taksona ait polenlerin oranının % 45'ten fazla olması o balın unifloral (tek çiçek kaynaklı) olduğunu göstermektedir. Bu balların lezzeti, rengi ve tadı karakteristiktir. Arı her seferinde bir türün çiçeklerinden nektar ya da polen toplama eğilimindedir. Ancak bölgede yoğunluk bakımından tek tür hakim değilse, arılar çeşitli taksonların çiçeklerinden nektar ve polen toplamaktadırlar. Bu da balların polen içeriğine yansımaktadır. Bu şekilde oluşan ballar ise multifloral (çok çiçek kaynaklı) olarak isimlendirilmektedirler (Deodikar 1965). Son yıllarda gezginci arıcılar özellikle unifloral bal üretimi için büyük çabalar harcamaktadırlar (okaliptus, akasya ve limon balı v.b). Bu ballar piyasada hem daha kolay pazarlanmakta hem de tüketiciler istedikleri bal çeşidine daha kolay ulaşabilmektedirler (Oddo ve ark. 1988).

Balın toplam polen sayısı (TPS/10 g) değerinin, sahte ve saf balların ayırt edilmesinde bir ölçüt olabileceği belirtilmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda Lieux (1972), Moar (1985) ve Jose ve ark. (1989) *Lycopodium* sporlarını kullanarak 10 gram baldaki TPS değerini tespit etmişlerdir.

Balda polen analizi ilk kez 1845 yılında Pfister tarafından yapılmıştır (Sorkun ve ark. 1989). Türkiye ballarında polen analizi ilk kez 1976 yılında Quistani tarafından çalışılmıştır. Türk araştırmacılardan ilk defa Sorkun ve İnceoğlu (1984), 1979-1981 yılları arasında balda polen analizi yapmışlardır.

Lieux (1972), A.B.D'nın Lousiana bölgesinden topladığı 54 bal örneğinde polen analizleri yaparak, bala kaynak oluşturan nektarlı bitkileri saptamıştır.

Sorkun ve ark. (1989), 1984-1986 yılları arasında Rize'nin çeşitli ilçe ve köylerinden toplanan 26 bal örneğinde polen analizi yapmışlardır. Sonuçta Fagaceae familyasından *Castanea sativa*'nın bu yöre ballarının çoğunda nektar kaynağı olduğu saptanmıştır.

Gemici (1991), İzmir yöresine ait 17 bal örneği üzerinde gerçekleştirdiği polen analizi sonucu, yörenin ballarında Chenopodiaceae, Ericaceae, Brassicaceae, Poaceae familyaları ile Fagaceae familyasından *Castanea sativa*, Papaveraceae familyasından *Papaver* L., Verbenaceae familyasından *Vitex agnus-castus* L, Cistaceae familyasından *Cistus* L. polenlerini dominant olarak tespit etmiştir.

Türker (1993), Gümüşhane yöresinden 1991 yılında topladığı 12 bal örneğinde polen analizi yapmıştır. Bal örneklerinde Fabaceae familyasından *Astragalus, Trifolium* ve Asteraceae familyasından *Achillea* polenlerine dominant miktarda rastlandığını belirtmiştir.

Başoğlu ve ark. (1996), Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden 1993 yılında toplanan 25 bal örneğinde yaptıkları çalışmada, sahte bal ile saf balın ayırt edilmesini sağlayacak kriterlerin potasyum/sodyum oranı, prolin ve toplam polen sayısı (TPS/10 g) değerleri olabileceğini bildirmişlerdir.

Sorkun ve ark. (1999), 1994-1996 yılları arasında Türkiye'nin çeşitli illerinden topladıkları 127 doğal çiçek, 33 doğal salgı, 44 katkılı çiçek ve 23 katkılı salgı balı örneğinde olmak üzere, kontrollü şekilde üretilen toplam 227 bal örneğinde yaptıkları çalışmada, doğal ve yapay kaynaklı balların ayırt edilmesine esas olacak fiziksel, kimyasal ve palinolojik kriterleri belirlemişlerdir.

Doğan ve Sorkun (2001), Ege Bölgesi'nden 31, Marmara Bölgesi'nden 17, Akdeniz Bölgesi'nden 24, Karadeniz Bölgesi'nden 2 örnek olmak üzere toplam 74 çiçek balında polen analizi yapmış, elde edilen sonuçlara göre; 18'i tür, 67'si cins düzeyinde olmak üzere toplam 85 farklı taksona ait polen teşhis etmişlerdir.

Silici (2004), Bursa marketlerinde satılan ve Türkiye'nin farklı bölgelerine ait 49 bal örneğinin kimyasal ve palinolojik analizlerinin sonuçlarını açıklamıştır. Bu çalışmada, *Castanea sativa, Helianthus annuus, Onobyrchis sp., Rubus sp., Brassica sp., Salix sp., Achillea sp., Lotus sp.,* Brassicaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae, Umbelliferae, Chenopodiaceae, *Centaurea sp*. polenleri dominant bulunmuştur.

Yutsever (2004) tarafından, Kemaliye-Erzincan yöresinden 2002-2003 yılları arasında sağlanan 29 bal örneğinde mikroskobik, organoleptik ve kimyasal analizler yapılmıştır. Yörenin ballarında, polenine dominant miktarda rastlanan taksonların Fabaceae familyasından *Trifolium, Astragalus*, Rosaceae familyasından *Sanguisorba* L., Rhamnaceae familyasından *Paliurus* ve Salicaceae familyasından *Salix* olduğu tespit edilmiştir.

Tunç (2004), Konya-Karaman yöresinden 2002 yılında toplanan 21 bal örneğinde yaptığı polen analizi sonucunda, bölgenin önemli ballı bitkilerinin Apiaceae, Rosaceae familyaları ile Fabaceae familyasından *Astragalus, Trifolium, Lotus, Onobrychis,* Asteraceae familyasından *Carduus* L., *Centaurea, Achillea, Tragopogon* L., Brassicaceae familyasından *Brassica*, Lamiaceae familyasından *Mentha* L., *Salvia,* Plantaginaceae familyasından *Plantago* L. ve Scrophulariaceae familyasından *Linaria* olduğunu belirtmiştir.

Son yıllarda, serbest radikallerin oksidatif reaksiyonlarının sonucunda, lipid, protein ve nükleik asitler gibi vücutta bulunan bileşiklerin zarar gördüğüne inanılmaktadır. O^{-}, OH^{-} ve lipit peroksit (LOO^{-}) gibi aktif oksijen moleküllerinin, kansere ve mutasyona yol açma başta olmak üzere birçok biyolojik sorunlara neden olduğu açıklanmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 1989).

Balın; kronik yaraların, diyabetik ülserin, mide ülseri ve mide-bağırsak ülseri gibi birçok hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Balın tedavi edici rolü kısmen antimikrobiyal etkisinden ve kısmen de antioksidan madde içermesinden kaynaklanmaktadır. Bu hastalıkların bazılarının, serbest radikallerinin verdiği zararlardan ortaya çıktığı bilinmektedir (Aljadi ve Kumaruddin 2004).

Balın flavonoidleri, nektar, polen ve propolisten kaynaklanmaktadır. Propolis, bal kovanlarının doğal bir bileşeni olup, bileşikleri oldukça lipofilik olan balmumu ve çok hidrofilik olan bal arasında dağılmaktadır. Flavonoid içeriği, yaklaşık olarak, polende % 0.5, propoliste % 10 ve balda yaklaşık % 0.005-0.01 arasındadır (Ferreres ve ark. 1992).

Balın yapısında bulunan 5-florasil ve siklofosfamid'in, laboratuvar farelerinin beyin tümör hücrelerine antimetastazik etkisinin olduğu araştırmalar sonunda saptanmıştır (Gribel ve Pashinskii 1990); Başka bir çalışmada, kekik balının maymun hücrelerinden izole edilen Rubella virüsü üzerine etkili olduğu ve büyüyen tümörler üzerine topikal

olarak uygulandığında tümörün gelişmesini yavaşlattığı tespit edilmiştir (Zeina ve ark. 1996).

Orofaringeal bölge kanserine karşı radyoterapi ile ve topikal olarak bal kullanımının karşılaştırıldığı çalışmada, bal ile birlikte yapılan radyasyon uygulamalarının sağaltımda daha başarılı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (Biswall ve ark. 2003).

Hamzaoğlu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, deney farelerinde oluşturulan yaralara tümör implantasyonları yapıldıktan sonra, tümördeki gelişme incelenip, gelişme gösteren tümörlerin üzerine sürülen balın tümör gelişimine karşı yavaşlatıcı etki gösterdiği görülmüştür (Hamzaoğlu ve ark. 2000). Yapılan bir diğer çalışmada ise, balın % 6-12 arasındaki dilusyonlarının, hastalıklı doku üzerinde veya oral olarak uygulanmasının idrar kesesi kanserine karşı olumlu etkileri olduğu, özellikle T-24, MBT-2, RT- 4, 253-J tümör hücrelerinin büyümesini yavaşlattığı bildirilmiştir (Swellam ve ark. 2003).

Mutasyonlar; DNA' da meydana gelen kalıtsal nitelikte yapısal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Mutasyon terimi geniş anlamda kromozom sayısı, kromozom yapısı değişimleri ve genlerin yapısındaki fiziksel ve kimyasal değişiklikleri ifade etmek için kullanılmaktadır.

Baz değişimine neden olan mutasyonlar; gende bir baz dizisinde meydana gelen bir başkalaşım, mRNA kodonunda da değişiklik oluşturur ve sonuç olarak farklı bir aminoasit taşınmasına neden olur.

Çerçeve kayması (frameshift) mutasyonu; Bir gende üç bazdan daha fazla ya da daha az küçük delesyonlar ya da insersiyonlar tarzında gerçekleşen mutasyon türüdür. Bu mutasyon sonucu hem transkripsiyon hem de mRNA'daki okuma çerçevesinde oluşan değişme sonucunda önemli kusurlar ortaya çıkabilir (Bahçeci 2002). (normal DNA baz dizisi: CTA TTC CGA ACA normal mRNA dizisi: GAU AAG GCU UGU, çerçeve kayması mutasyonundan sonra; DNA baz dizisi: CTA TT**T** **CCG** **AAC** **A**, mRNA dizisi: GAU AA**A** **GGC** **UUG** **U**).

Kimyasal maddelerin karsinojenik risklerini ortaya çıkarmak için en akıllıca yaklaşım deney hayvanlarında tümör indüksiyonudur. Bu testlerde, kimyasal maddelerin uygulanmasıyla, deney sonuçlarının alınması arasında geçen sürenin oldukça uzun olmasından dolayı bunlara "uzun zamanlı testler" adı verilmiştir. Uzun zamanlı test sistemlerinin kullanılması istenen bir durum olmakla birlikte, deney hayvanlarına kimyasal

maddeler verildikten sonra, bu hayvanlarda tümör oluşması oldukça zaman almakta ve bu testlerin maliyeti yüksek olmaktadır (Petek 1999).

Bu nedenle araştırıcılar, karsinojenite taramalarına esas olabilecek kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı mutajenite test sistemleri geliştirmişlerdir (Mortelmans ve Zeiger 2000). Bu testler kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini belirlemeye yöneliktir. Denemeler veya seri halindeki genotoksik testler; mutasyonlar (genlerin bloke edilmesine veya tek gen değişikliklerine neden olan mutasyonları), klastojenisity (yapısal kromozom aberasyonları), anöploidi (sayısal kromozom aberasyonları) olmak üzere insandaki hastalıklarla bağlantılı genetik zararın üç büyük son noktası üzerine etkilerini değerlendirmek için geliştirilmişlerdir (Rovado ve ark. 2004).

Karsinojenlerin taranmasında mutajenitenin esas alınması, iki önemli nedene dayanır:

• Genetik kodun ve genetik sistemin evrensel oluşu,

• Karsinojenite ile mutajenite arasındaki korelâsyonun yüksek oluşu (Akın 1990).

Kısa zamanlı test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanları, bakteriyel testlerdir. Bakteriler, basit üreme ortamlarında hızla ürediklerinden, basit, çabuk ve ucuz uygulanabilir olmalarından dolayı bakteriyel testler tercih edilmektedir (Mortelmans ve Zeiger 2000).

Antimutajenite; mutajenik maddelerin mutajen veya kanserojen etkilerinin ortadan kaldırılması veya bunların DNA ile etkileşimlerinin önlenmesidir. Genellikle antimutajenik maddeler etki etme şekillerine göre desmutajenler ve biyoantimutajenler olmak üzere ikiye ayrılır. Mutajenin DNA'nın yapısına katılmasından sonra DNA replikasyonu ve DNA tamir mekanizmalarının işleyişini düzenleyerek mutagenezisi azaltan maddeler biyoantimutajenik maddelerdir. DNA polimeraz I ve DNA polimeraz III sentezini artırmak, error- prone DNA tamir mekanizmasını engellemek, error- free DNA tamir mekanizmasını geliştirmek biyoantimutajenlerin etkiledikleri önemli mekanizmalardır. Mutajen ajanların hücreye girişini bloke eden yani DNA'nın yapısına dahil olmadan onları inaktif hale getiren antimutajenik maddeler ise desmutajenler olarak tanımlanmaktadırlar. Ajanları bloke etme, nitrosation reaksiyonlarını engelleme, serbest radikalleri (reaktif oksijen türleri= ROS) giderme, devre I ve devre II detoksifikasyon enzimlerinin modülasyonu başlıca etki mekanizmalarıdır (Nakasugi ve ark. 2000).

Bitkiler; fenolik bileşikler (fenolik asit, flavonoid, quinonlar, koumarinler, taninler), nitrojen bileşikler (alkaloidler, beta alaninler, aminler), vitaminler, terpenoidler (karotenoidler) ve antioksidant aktivite bakımından zengin olan bazı endojen metabolitler içerebilirler. Epidemiyolojik araştırmalar böyle antioksidant bileşiklerin anti-inflamatuar, anti-arteriosklerotik, antitümör, antimutajenik, antikarsinojenik, antiviral, antibakteriyal aktivitelere az veya çok ölçüde sahip olduğunu göstermiştir (Chai ve ark. 2004).

Birt ve ark. (1986), sebzelerde bulunan ve kanserleşme oranını azalttığı tespit edilen apigenin ve robinetin'in, *Salmonella typhimurium* üzerinde antimutajenik aktivitesini tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda mutajenitenin apigenin ile % 62 oranında, robinetin ile % 87 oranında mutasyonu inhibe edildiği tespit edilmiştir.

Kaur ve ark. (2002), *Terminalia arjuna* (Arjun ağacı)' nın benzen, kloroform, aseton ve metanol ekstraktlarının siyah asit boyası, 2-aminofluorene (2AF) ve 4-nitro-o-phenylenediamine (NPD)'e karşı *Salmonella typhimurium* TA98 suşu üzerinde antimutajenik etkilerini incelemiş, aseton ve metanol ekstraktlarının antimutajenik etkilerinin diğer ekstraktlardan daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Carneiro ve ark. (2005), *Matricaria chamomilla* (papatya) ve diğer bitkilerin yağlarında bulunan bir sesquiterpene alkol olan α -Bisabolol (BISA)'nın mutajenik ve antimutajenik etkilerini Salmonella / mikrozom test sistemi ile incelemiş, antimutajenite deneylerinde BISA, direk mutajenlere karşı toksik olmayan en yüksek dozda test edilmiş ve antimutajenik aktivite göstermediği görülmüştür.

Evandri ve ark. (2005), *Melaleuca alternifolia* (çay ağacı yağı) ve *Lavandula angustifolia* (lavanta yağı)'ın gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi ile kimyasal bileşiklerini tanımladıktan sonra, mutajenik ve antimutajenik etkilerini *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ve *Escherichia coli* WP2-uvrA suşları üzerinde incelemiş, iki bakteriyel test sisteminde de mutajenik aktivite görmezken, konsantrasyona bağlı antimutajenik aktivite belirlemişlerdir.

İpek ve ark. (2005), *Origanum onites* (İzmir kekiği)'in yağı ve ana bileşenlerinden olan carvacrol ile yapmış oldukları çalışmada genotoksik ve antigenotoksik etkilerini Ames Salmonella/mikrozom testi ile tespit etmişlerdir. *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarını S9 varlığında ve yokluğunda denemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre carvacrol'ün önemli bir şekilde antimutajenik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Nogueira ve ark. (2005), *Melampodium divaricatum* (’un çiçek ekstraktlarının mutajenik ve antimutajenik etkilerini Salmonella/mikrozom test sistemi ile incelemişlerdir. Test edilen ekstraktların *Salmonella typhimurium* TA 97, TA 98, TA 100 ve TA 102 suşlarının hiçbirinde mutajenik etki göstermediğini ve aflatoksin B1 (AFB1), benzo(a) pyrene ve daunomycin’in mutajenitesini azalttığını bulmuşlardır.

Hayder ve ark. (2007), *Myrtus communis* (mersin) bitkisinin yaprak kısmının hekzan, etil asetat, metanol ve kloroform ile elde edilen ekstraktlarının mutajenik ve antimutajenik aktivitelerini Salmonella/mikrozom testi ile incelemişler ve sonuçta ekstraktların antimutajenik aktiviteye sahip olduklarını belirtmişlerdir.

Özbek ve ark. (2008), Türkiye’nin Doğu Anadolu Bölgesinden toplanan *Origanum vulgare* L. *subsp. vulgare* (mercanköşk)’nin metanol ekstraktının *Salmonella typhimurium* TA1535 ve TA1538 suşları üzerine antimutajenik potansiyelini araştırmış ve sonuç olarak *Origanum vulgare* L. *subsp. vulgare* ekstraktının antimutajenik etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Ham ve ark. (2009), *Inonotus obliquus* (Chaga) ekstraktlarının antimutajenik ve antioksidan aktivitelerini değerlendirmiş, ekstraktların *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerine önemli ölçüde antimutajenik etki gösterdiğini bulmuşlardır.

Loh ve ark. (2009), *Euphorbia hirta* (sütleğen)’nın bir bileşeni olan quercetin (25µg/ml)’in *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerine S9 varlığında ve yokluğunda güçlü mutajenik etki gösterdiğini, aynı bitkinin su ve metanol ekstraktlarının (>100 µg/ml) TA 98 ve TA 100 suşları üzerine S9 varlığında ve yokluğunda mutajenik etkisinin olmadığını belirlemişlerdir.

Sotto ve ark. (2010), *Sisymbrium officinale* Scop. (dereotu) ekstraktlarının antimutajenik aktivitesini *Salmonella typhimurium* TA98, *Salmonella typhimurium* TA100 ve *Escherichia coli* WP2-uvrA suşları üzerinde güçlü bir antimutajenik aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

2. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan bal örnekleri

Anzer Balı

Trabzon Kestane Balı

Kekik Balı

Çam Balı

Narenciye Balı

Buzluhan Yayla Balı

Bal örnekleri Prof. Dr. Kadriye SORKUN tarafından (H.Ü. Fen Fak. Ankara) sağlandı.

3.1.2. Kullanılan test suşları

Çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları (Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü)' den sağlandı. Bu suşların genotip özellikleri: TA 98: his D 3052, rfa, uvr B, +R

TA 100: his G 46, rfa, uvr B, +R

Çizelge 3.1.2 Salmonella/ mikrozom test sisteminde yaygın olarak kullanılan bazı *Salmonella* suşları ve genetik özellikleri.

Suş	Histidin Mutasyonu	Lipopolisakkarit (LPS)	Onarım	pKM 101	Mutasyonun Niteliği	Belirlenecek Bileşik Sınıfları
TA1535	his G46	Rfa	uvrB	-	AT→GC transisyon	Baz Çifti Değisimine Neden Olan Mutajenler
TA1537	his C3076	Rfa	uvrB	-	C……C yanında +1	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA1538	his D3052	Rfa	uvrB	-	CG……CG yanından-1	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA98	**his D3052**	**Rfa**	**uvrB**	**+**	**CG yanından -1**	**Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler**
TA100	**his G46**	**Rfa**	**uvrB**	**+**	**AT→GC transisyon**	**Baz Çifti Degisimine Neden Olan Mutajenler**
TA97	his D6610	Rfa	uvrB	+	CCC yanına +4	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA102	PA Q1 his G428/Δhis	Rfa	uvrB	+	G ochre AT	Oksidanlar, X-Isınları, U.V., Mitomisin C, Bleomisin ve Kinonlar

(Mortelmans ve Zeiger 2000).

3.1.3. Kimyasal maddeler

Antimutajenite çalışmasında kullanılan pozitif mutajenler; Sodyum azid, 2-aminoflouren ve 4-nitro-o-fenilendiamine Merck, KGaA Darmstad (Germany)'den sağlandı.

D-glukoz 6-fosfat, β-NADP, D-biyotin, Ampisilin trihidrat Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmBH (Germany)'dan; Dimetil sülfoksit, L-histidin-HCl monohidrat Merck'den; Ampisilin ticari diskleri Oxoid, Unipath Ltd, Basngstoke Hampshire (England)'den sağlandı. S9 fare karaciğer fraksiyonu Sigma'dan sağlandı.

3.1.4. Besiyerleri, tamponlar ve çözeltiler

Vogel-Bonner Minimal Medium (50xVB tuzları)

Minimal Glukoz agar (MGA), Histidin/Biyotin (HB) agar ve Histidin/Biyotin/Ampisilin (HBA (master)) agar plakları'nın hazırlanmasında kullanıldı.

	1000 ml için
Distile su (45 ºC)	670 ml
Magnezyum sülfat ($MgSO_4$. $7H_2O$)	10 g
Sitrik asit monohidrat	100 g
Potasyum fosfat (K_2HPO_4)	500 g
Sodyum amonyum fosfat ($NaHNH_2PO_4$. $4H_2O$)	175 g

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile distile suya ilave edildi. Son hacimlerine tamamlanıp otoklavda 121 ºC'de 20 d steril edildi. Oda sıcaklığında karanlıkta saklandı.

(0.5 mM) Histidin/Biyotin Solüsyonu

Antimutajenite deneyinde (90 ml top agara 10 ml olarak) kullanıldı.

	250 ml için
D- biyotin (M. A: 247,3 g /mol)	30.9 mg
L-Histidin-HCl (MA: 191.7 g /mol)	24 mg
Distile su	250 ml

Biyotin kaynama noktasına yakın derecedeki distile su içerisinde çözüldü. Ardından histidin ilave edildi. Karışım otoklavda 121 ºC' de 20 d steril edildi ve +4 ºC'de saklandı.

Top (Üst) Agar

Bakterilerin plaklara ekilmesi sırasında kullanıldı.

	100 ml için
Bacto agar	600 mg
NaCl	500 mg
Distile su	100 ml

Sitotoksik dozun belirlenmesinde; maddeler mekanik karıştırıcıda ısı ile iyice çözülerek karıştırıldı. Daha sonra karışımın tamamen homojen hale gelebilmesi için su banyosunda 100 ºC'de bekletildi. Homojen hale gelen karışım tüplere 2 ml olarak dağıtıldı ve otoklavda 121 ºC'de 20 d steril edildi.

Antimutajenite deneyinde ise; aynı şekilde karışım homojen hale getirildi. Otoklavda 121 ºC'de 20 d steril edildi. İçerisine (90 ml top agara 10 ml) steril HB solüsyonu ilave edilerek steril tüplere 2 ml olacak şekilde steril bir dağıtıcı ile dağıtıldı.

Serum Fizyolojik

Bakteri sulandırmada kullanıldı.

	500 ml için
NaCl	4500 mg
Distile su	500 ml

(% 0.1) Kristal Viyole Solüsyonu

Suşların kristal viyole'ye duyarlılıkları, dolayısıyla rfa mutasyonunu taşıyıp taşımadıklarının kontrolünde kullanıldı.

	100 ml için
Kristal viyole	100 mg
Distile su	100 ml

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

(% 0.13) Biyotin Çözeltisi

Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanmasında kullanıldı.

	100 ml için
D-biyotin	0,13 g
Distile su	100 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözüldü. Otoklavda 121 ºC'de 20 d steril edildi. +4 ºC'de saklandı.

(% 0.5) Histidin Çözeltisi

Genotip kontrolü ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

	100 ml için
L-Histidin-HCl (Ma: 191,7)	0.5 g
Distile su	100 ml

Otoklavda 121 ºC'de 20 d steril edildi. +4 ºC'de saklandı.

(% 20) Glukoz Çözeltisi

MGA ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

	100 ml için
Glukoz	20 g
Distile su	100 ml

Glukoz distile su içinde tamamen çözülerek otoklavda 121 ºC'de 20 d steril edildi. +4 ºC'de saklandı.

(0.2 µg/µl) 2- Aminofluorene (2AF)

Pozitif kontrol'de kullanıldı.

	10 ml için
2AF	0,02 g
DMSO	10 ml

Petri başına 200 µg olmak üzere dimetilsülfoksit'te (DMSO) çözülerek kullanıldı. TA 98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında kullanılan kimyasaldır. +4 ºC'de saklandı.

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

Pozitif kontrol olarak kullanıldı.

	10 ml için
NPD	0,02 g
DMSO	10 ml

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

(0.1 µg/µl) Sodyum Azid Çözeltisi

Pozitif kontrol'de kullanıldı.

	100 ml için
Sodyum Azid	0,01 g
Distile su	100 ml

Petri başına 200 µg olmak üzere distile suda çözülerek kullanıldı. TA 100 suşu için S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda kullanılan kimyasaldır. +4 ºC'de saklandı.

Tuz Çözeltisi (1.65 M KCl + 0.4 M $MgCl_2$)

Antimutajenite deneyinde S9 karışımında kullanıldı.

	500 ml için
Potasyum klorür (KCl)	61,5 g
Magnezyum klorür ($MgCl_2.6H_2O$)	40,7 g
Distile su	500 ml

Distile suda çözülen tuzlar, otoklavda 121 ºC'de 20 d steril edildikten sonra cam şişelerde buzdolabında veya oda ısısında saklandı.

0.2 M Sodyum-fosfat tamponu (pH:7.4)

S9 Fraksiyonu ilavesinin yapılmadığı antimutajenite çalışmalarında kullanıldı.

	500 ml için
0.2 M Sodyum dihidrojen fosfat ($NaH_2PO_4. H_2O$) (13.82 g/500 ml)	60 ml
0.2 M Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (14.2g/500 ml)	440 ml

pH ölçüldü, çok düşük olduğu takdirde biraz daha 0,2 M disodyum hidrojen fosfat eklendi. Otoklavda 121 ºC'de 20 d steril edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

0.1 M β-NADP çözeltisi

S9 karışımında kullanıldı.

	10 ml için
β- NADP (MA: 765.4)	0,76 g
Steril distile su	10 ml

Sterilizasyon 0.45 µm delik çaplı filtrelerle yapıldı. -20 ºC'de saklandı.

1M Glukoz -6 -fosfat çözeltisi

S9 karışımında kullanıldı.

	2,5 ml için
Glukoz-6-fosfat	0,705 g
Steril distile su	2,5 ml

Sterilizasyon 0.45 µm delik çaplı filtrelerle yapıldı. -20 ºC'de saklandı.

S9 karışımı (rat karaciğeri mikrozomal enzimleri ve kofaktörleri)

Antimutajenite deneyinde kullanıldı.

	50 ml için
Rat karaciğeri S9 fraksiyonu	2 ml
$MgCl_2$ – KCl tuz çözeltisi	1 ml
1 M Glukoz -6 –fosfat	250 µl
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 aşağıdan yukarıya doğru taze olarak ve yeterince hazırlandı. İçerikler daima buz içinde tutuldu.

(% 0.8 / 0.02N NaOH) Ampisilin Solüsyonu

Suşların ampisiline dirençlilik özelliğinin kontrolünde ve master plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

	100 ml için
Ampisilin trihidrat	0.8 g
0.02 N Sodyum hidroksit (NaOH)	100 ml

Ampsilin trihidrat, 0.02 N NaOH içinde çözüldü ve 0.45 µm çaplı filtreden geçirilerek steril edildi. + 4 ºC' de saklandı.

0.02N NaOH Hazırlanışı

Ampisilin solüsyonunun hazırlanmasında kullanıldı.

	250 ml için
NaOH	0.2 g

Son hacim 250 ml'ye distile su ile tamamlandı.

Nutrient Broth (NB) Sıvı Kültür Ortamı

Bakterilerin gecelik kültürde üretilmeleri için kullanıldı.

	200 ml için
Nütrient broth no:2 (Oxoid)	5 g
Distile su	200 ml

Histidin/Biyotin Plakları (HB Agar)

Histidin gereksinim deneyinde kullanıldı.

	1000 ml için
Agar	15 g
% 20 glukoz	100 ml
50xVB	20 ml
Histidin HCl. H_2O	10 ml
0,5 mM Biyotin	6 ml
Distile su	864 ml

Agar ve su karıştırıldıktan sonra 121 ºC'de 20 d otoklavda steril edildi. 50 ºC'ye soğutulup (20-30 dk) % 20 glukoz, 50xVB tuzları, histidin çözeltisi ve biyotin çözeltisi eklendi, karıştırılıp petri kutularına 25 ml olarak dağıtıldı. +4 ºC'de saklandı.

Histidin / Biyotin / Ampisilin Plakları (HBA agar)

Ampisiline dirençlilik testi ve master plak olarak kullanıldı.

	1000 ml için
Agar	15 g
Distile su	860 ml
50xVB tuzları	20 ml
% 20 glukoz	100 ml
Histidin $HCl.H_2O$	10 ml
0,5 mM Biyotin	6 ml
Ampisilin çözeltisi	3.15 ml

Agar ve su otoklavlandı, 50 ºC'ye soğutulup % 20 glukoz, 50xVB tuzları, histidin çözeltisi, biyotin çözeltisi ve ampisilin çözeltisi eklendi. Karışım petrilere 25 ml olarak aktarıldı (Bu plaklarda bakteriler +4 ºC'de 2 ay saklanabilir).

Minimal Glukoz Agar (MGA) Plakları

Antimutajenite deneylerinde ve revertant koloni hesaplamalarında kullanıldı.

	1000 ml için
Agar	15 g
Distile su	880 ml
50xVB tuzları	20 ml
% 20 glukoz solüsyonu	100 ml

Agar ve distile su karıştırıldıktan sonra otoklavlanarak steril edildi. 50 ºC'ye soğutulup (20-30 d) % 20 glukoz solüsyonu ve 50xVB tuzları karıştırılıp petri kutularına 25 ml olarak dağıtıldı. +4 ºC'de saklandı.

Nutrient Agar (NA) Plakları

Gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısını belirleme ve genotip kontrollerinde (Kristal viyole, UV duyarlılığı) kullanıldı.

	1000 ml için
Nütrient broth no:2 (Oxoid)	25 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Agar, broth ve su bir kapta karıştırılıp 121 ºC'de 20 d steril edildi ve petri kutularına 30 ml olacak şekilde aktarıldı. +4 ºC'de saklandı.

3.2. Metot

3.2.1. Bal örneklerinin polen analizi

Bal örneklerinin polen analizleri Hacettepe Üniversitesi Palinoloji Laboratuvarında yapıldı. Referans preparatlar için Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü polen preparatları koleksiyonundan yararlanıldı.

3.2.2. Bazik-fuksinli gliserin-jelatin (montaj materyali)

Preparatların yapımında kullanılan montaj materyali Wodehouse yöntemine göre hazırlandı (Aytuğ 1967, Kapp 1969). Bu yönteme göre yedi g jelatin plak tartıldı ve 42 ml ılık distile suda iki saat bekletildi. Yumuşayan jelatinin üzerine 50 ml gliserin ilave edilerek iyice karıştırıldı. Karışımın küflenmesini önlemek amacıyla üzerine 0.5 g karbolik asit eklendi ve polenlerin boyanmasını sağlamak amacıyla bir kaç damla bazik fuksin ilave edildi. Elde edilen karışım 15 dakika ılık su banyosunda bekletildikten sonra steril petri kaplarına ince bir tabaka halinde döküldü ve soğumaya bırakıldı (Brawn, 1960).

3.2.3. Balda polen analizi için preparat hazırlama

Balda polen analizi için preparat hazırlama yöntemi, sekiz Avrupa ülkesinin arıcılık enstitülerinde çalışan uzmanlarca incelenmiş ve sonuçta uluslararası ortak bir yöntem kabul edilmiştir (Maurizio 1951, Louveaux ve ark. 1970, Lieux 1972).

Polen preparatları bu ortak yönteme göre aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı:

Kavanozlara konulan 250 g süzülmüş stok bal örneğinden kristalleşmiş veya soğuktan katılaşmış olanlar varsa 40-45 °C'lik su banyosunda bir süre bekletilerek, balın yumuşaması sağlandı. Daha sonra kavanozdaki bal örneği steril cam baget yardımıyla iyice karıştırılarak polenlerin bal içinde homojen bir şekilde dağılması sağlandı.

Stok baldan 10 g alınarak deney tüpüne aktarıldı ve üzerine 20 ml distile su ilave edildi. Laboratuvar ortamından bala polen kontaminasyonunu önlemek amacıyla tüplerin ağzı parafilm ile kapatıldı. Balın su içinde çözünmesi için tüpler yaklaşık 45 ºC'lik su banyosunda 10-15 dakika bekletildi. Su banyosundan çıkarılan tüpler çalkalanarak, bal ile suyun iyice karışması sağlandı.

Çözelti 3500-4000 rpm'de 45 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden alınan tüpler ters çevrilerek suları döküldü ve ters olarak kurutma kâğıdı üzerine konuldu. Tüpteki su süzülünceye kadar beklendi.

Steril iğne ucuna alınan bir miktar (1-2 mm^3) bazik-fuksinli gliserin-jelâtin'in tüp dibindeki polenlere bulaştırılmasıyla alınan materyal, lam üzerine aktarıldı.

Lam, 30-40 ºC'ye ayarlı ısıtıcının tablasına konularak, üzerindeki bazik fuksinli gliserin jelâtin'in erimesi sağlandı. Isıtma sırasında hava kabarcıklarının oluşmaması ve polenlerin deforme olmaması için montaj materyalinin (bazik fuksinli gliserin-jelâtin) kaynamamasına özen gösterildi. Platin iğne ile lam üzerindeki erimiş bazik-fuksinli gliserin-jelâtin karıştırılarak polenlerin montaj materyali içinde homojen dağılması sağlandıktan sonra lam üzerine 18x18 mm'lik lamel kapatıldı. Hazırlanan preparat ters çevrilerek iki cam çubuk üzerine yerleştirildi. Böylece polenlerin lamel yüzeyine yaklaşmalarına ve mikroskopta daha net görülebilmelerine imkân sağlandı. Lamın bir kenarına etiket yapıştırılarak, üzerine balın alındığı yöre ve örnek numarası yazıldı. Hazırlanan preparatlar yaklaşık 12 saat boyunca bu şekilde bekletilerek mikroskopta incelemeye hazır hale getirildi.

3.2.4. Polen preparatlarının incelenmesi

Polen teşhisi için her örnekten dört preparat hazırlandı. Bu preparatlardan ikişer tanesi incelendi. Polen teşhisi Nikon Model SE marka mikroskopla 10X oküler, 40X ve 100X'lik objektiflerle yapıldı. Preparatlar sayıma başlanmadan önce genel olarak taranarak, polenlerin ait olduğu taksonlar tespit edildi. Daha sonra sol üst köşeden başlayarak sağa sola hareket ettirmek suretiyle preparatlardaki bu taksonlara ait polenlerin sayıları tespit edildi. Her preparatta 200 adet polen teşhis edilinceye kadar sayıma devam edildi. Daha sonra iki preparatın ortalaması alındı. Polen teşhisi sırasında tanımlanamayan polenler dikkate alınmadı. İncelemelerde 18x18 mm^2'lik tüm lamel alanı tarandı ve bu

alandaki polenler teşhis edildi. Yapılan analizlerde Palinoloji ile ilgili çeşitli yayın, atlas ve bölgeden toplanan bitkilerden hazırlanan referans preparatlardan faydalanıldı (Moore ve Webb 1991, Pehlivan 1995).

İncelenen ballarda bulunan polenler, polen spektrumlarına göre dört ana gruba ayrılmaktadır:

a) Miktarı > = % 45 olan polenler dominant

b) Miktarı % 16- % 44 arası olan polenler sekonder

c) Miktarı % 3- % 15 arası olan polenler minör

d) Miktarı < % 3 olan polenler ise eser miktarda bulunan polenler olarak belirlenmektedir (Barbattini ve ark. 1991, Warakomska and Jaroszynska 1992).

3.2.5. Balda toplam polen sayısı (TPS)' nın tespiti için preparat hazırlama

10 g bal içindeki TPS'nin saptanması için polen preparatları aşağıdaki şekilde hazırlandı (Moar 1985):

Steril bir cam çubuk yardımıyla iyice karıştırılarak homojen hale getirilen stok baldan, deney tüpüne 10 g alındı. Üzerine 20 ml distile su ilave edilerek karıştırıldı ve sonra tüp içerisine, her birinde 12542 adet *Lycopodium* sporu bulunan tabletlerden bir tanesi atıldı. Tüpler tabletin erimesini sağlamak amacıyla yaklaşık 45 ºC'lik su banyosunda 10-15 dakika bekletildi ve erimeyi hızlandırmak için bir cam bagetle karıştırıldı.

Tablet iyice eridikten sonra polen ve sporların boyanması için tüpe birkaç damla bazik-fuksin ilave edilerek karıştırıldı ve tüpler 3500-4000 rpm'de yaklaşık 45 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen tüpler ters çevrilerek suyu döküldü ve kurutma kâğıdı üzerine ters vaziyette konuldu. Tüpteki su iyice süzülünceye kadar beklendi.

Tüpün içerisine 0.1 ml % 50'lik gliserin ilave edilerek çökeltinin gliserin ile homojen bir biçimde karışması sağlandı. Bu karışımdan 0.01ml alınarak, içerisinde 0.09 ml gliserin bulunan ikinci bir tüpe aktarıldı ve yeni karışım homojenize edildi.

İkinci tüpteki karışımdan 0,01 ml alınarak lam üzerine kondu ve üzerine 18x18 mm^2'lik lamel kapatılarak, mikroskopta incelemeye hazır hale getirildi.

3.2.6. Toplam polen sayısı (TPS/10 g) preparatlarının incelenmesi

Araştırmamızda polen sayımı lamelin sol kenarından başlayarak 2 mm aralıklarla tüm lamel alanının taranması ile yapıldı (Şekil 3.2.6). Bu alanda bulunan polenlerin ve *Lycopodium* sporlarının sayısı ayrı ayrı tespit edildi.

Sayımlarda x10'luk objektif kullanıldı. Her bal örneği için iki ayrı tüp hazırlanmış ve her tüpten bir preparat yapıldı. Sayımlar, iki preparattaki sayımın ortalaması alınarak aşağıdaki formüle uygulandı.

$$\text{Toplam Polen Sayısı (TPS-10 g)} = \frac{\text{Sayılan Polen}}{\text{Sayılan } \textit{Lycopodium} \text{ sporu}} \times 12\,542^{*}$$

* Bir *Lycopodium* tabletinde bulunan spor sayısı

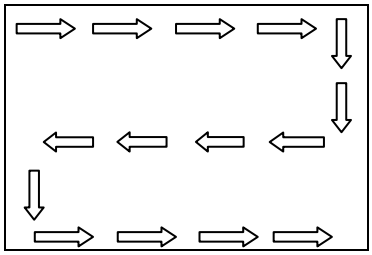
İncelenen ballar TPS yönünden dört ana gruba ayrılmaktadır (Jose et al., 1989).

a) Toplam polen sayısı (TPS) 20 000'den az olanlar, poleni çok az ballar

b) TPS 20 000-100 000 arası olanlar poleni normal ballar

c) TPS 100 000-500 000 arası olanlar poleni zengin ballar

d) TPS 500 000-1 000 000 arası olanlar poleni çok zengin ballar olarak belirlenmektedir (Jose et al., 1989).



Şekil 3.2.6 Preparatta polen sayımlarının yapılmasında izlenen tarama yöntemi

3.2.7. Çam balı örneklerinden polen preparatının hazırlanması

Çam balının mikroskobik incelenmesi için sabit preparat hazırlamaya gerek yoktur. Toplam Polen Sayısı (TPS) preparat hazırlama yöntemi ise çiçek balında uygulanan yöntemle aynıdır. Ancak preparatın incelenmesi, değerlendirilmesi ve sayımı farklıdır.

3.2.8. Çam Balında TPS Preparatının İncelenmesi

Her preparat sol üst köşeden incelenmeye alındı ve 18x18 mm^2'lik alan tamamen taranarak bu alanda bulunan tüm polenlerin sayısı tür ayrımı yapmadan tespit edildi. Daha sonra başa dönülerek *Lycopodium* sporlarının sayısı saptandı. Sayım sırasında 10X oküler ve 40'lık objektif kullanıldı ve alınan sonuçlar aşağıdaki formüle uygulanarak çam balında bulunan TPS saptandı.

$$\text{Toplam Polen Sayısı (TPS/10 g)} = \frac{\text{Sayılan Polen}}{\text{Sayılan } \textit{Lycopodium} \text{ sporu}} \times 12.542^*$$

3.2.9. Çam Balındaki Balçiği Elementi (BÇE) Preparatlarının İncelenmesi

Toplam Polen Sayısının saptandığı aynı preparatta Balçiği Elementi (BÇE) Sayısı da saptanmalıdır. Aynı preparat (18x18 mm^2'lik alan) tamamen taranarak bu alanda bulunan tüm spor, hif ve varsa alg sayısı tespit edildi. Alınan sonuçlar aşağıdaki formüle uygulanarak çam balında bulunan Balçiği Elementlerinin sayısı saptandı.

$$\text{Balçiği Elementi Sayısı (BÇE/10 g)} = \frac{\text{Sayılan (spor+hif+alg)}}{\text{Sayılan } \textit{Lycopodium} \text{ sporu}} \times 12.542^*$$

BÇE ve TPS oranlanarak (BÇE/TPS) elde edilen sonuca göre balın sınıfı aşağıda verilen tabloya göre belirlenir.

Çizelge 3.2.9. Balların BÇE/TPS oranına göre sınıflanması (Sorkun, 1987)

BÇE/TPS	Tanımlama	Bal Tipi
0 – 1,5	Az yoğun	Çiçek balı
1,5 – 3,0	Orta yoğun	Çam+Çiçek balı
3,0 – 4,5	Yoğun	Çam balı
□ 4,5	Çok yoğun	Birinci sınıf çam balı

3.2.10. Test suşlarının üretilmesi

Salmonella typhimurium suşları ile yapılan mutajenite/antimutajenite testlerinde kullanılan bakteri kültürünün 1 ml'sinde 1-2 x 10^9 Koloni Oluşturan Birim (kob) olması öngörülmektedir. Bu amaçla *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 test suşlarının zamana karşı absorbans değerleri ve mililitredeki canlı bakteri sayıları belirlendi. *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100'ün üreme eğrilerinin çıkarılması için içerisinde 20 ml nutrient broth (63 µl ampisilin solüsyonu eklenmiş) bulunan 50 ml'lik erlenlere master plaklardan tek koloni alınarak ekim yapıldı. Çalkamalı etüvde 37 ºC'de 140 rpm çalkalama ile 16 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda elde edilen kültürden 0.5 ml örnekler alınarak 20 ml nutrient broth içeren erlenlere ekim yapıldı. 37 ºC'de 110 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. Bakteri kültüründen belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin, spektrofotometrede 650 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Buna paralel olarak alınan örnekler belirli oranlarda (10^{-6} ve 10^{-7}) serum fizyolojik ile sulandırılarak, nutrient agarlı plaklara 0.1 ml olacak şekilde ekim yapıldı. Bu çalısma sırasında bakterilerin homojen dağılımını sağlamak amacı ile kültür 50 ^{0}C'deki 2 ml üst agara karıştırıldı ve çalkalandıktan sonra hızlı bir şekilde plaklara döküldü. Plaklar 37 ºC'lik etüvde bir gece inkübe edildikten sonra koloni sayımı yapıldı (Maron ve Ames 1983).

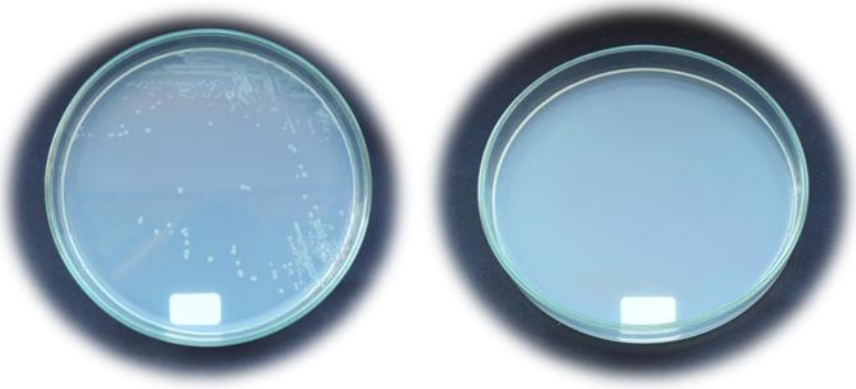
Bir mililitredeki canlı hücre sayısı (ml/kob) = sulandırma faktörü x plaktaki koloni sayısı x10 olarak hesaplandı.

3.2.11. Test suşlarının genetik özelliklerinin kontrolü

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

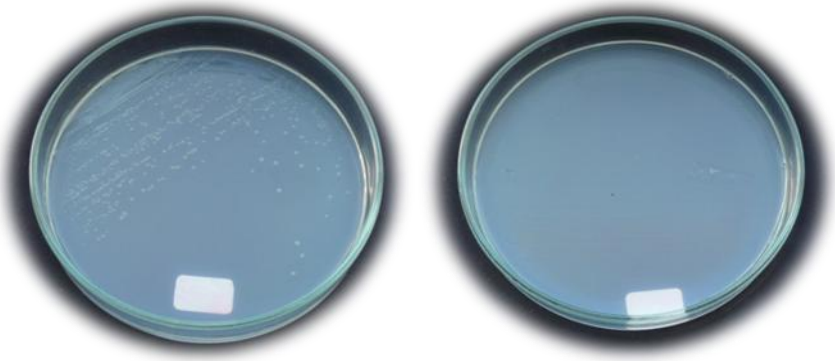
Histidin gereksinimi: Test suşlarının his (-) özelliği, minimal glukoz agar plaklarına ekilmeleri yoluyla kontrol edildi. Suşlar; uvrB delesyonu nedeniyle histidine ek olarak biyotine de gereksinim duydukları için histidin/ biyotin içeren ve sadece biyotin içeren histidinsiz minimal glukoz agar plaklarına ekildi. Suşların histidin varlığında üreyip, histidin yokluğunda üretememeleri his (-) karakterini doğrulamaktadır (Maron ve Ames 1983, Mortelmans ve Zeiger 2000).

Salmonella typhimurium TA 98 ve TA 100 suşları histidin\biyotin içeren minimal glukoz agarlı plaklarda üredi. Test bakterileri, biyotin içeren histidinsiz minimal glukoz agarlı plaklarda üremedi. Suşların his (-) karakteri doğrulandı (Şekil 3.2.11).



A B

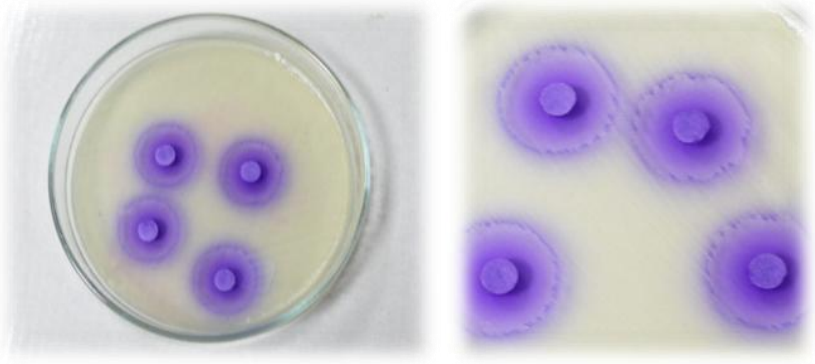
Şekil 3.2.11.1. *S. typhimurium* TA 98'in histidin gereksinim kontrolü A) Histidin/ biyotin agarda üreme var, B) Biyotin agarda üreme yok.



A B

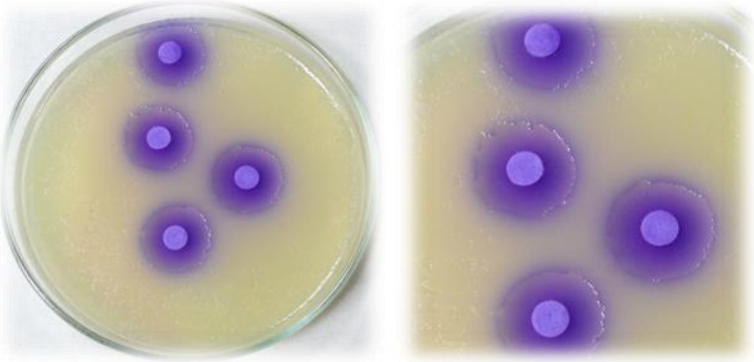
Şekil 3.2.11.2 *S. typhimurium* TA 100'ün histidin gereksinim kontrolü sonucu A) Histidin/ biyotin agarda üreme var, B) Biyotin agarda üreme yok.

rfa mutasyonun kontrolü: Test suşlarının gecelik kültüründen alınan 0.1 ml'lik örnekler, Nutrient agarlı petrilere yayma yöntemiyle dağıtılarak ekildi. 10 µl kristal viyole çözeltisi (1mg/ml) emdirilmiş hazır (Wathman no:1) boş diskler, petrilerin ortasına yerleştirildi. Petriler bir gece 37 ºC'de inkübe edildikten sonra diskin etrafında inhibisyon zonunun oluşup oluşmadığı gözlendi. Diskin çevresindeki şeffaf bölge, büyük moleküllü kristal viyole çözeltisinin bakteri içerisine girip, onu öldürmesine izin veren rfa mutasyonunun varlığının göstergesidir (Ames ve ark. 1973).



A B

Şekil 3.2.11.3. *S. typhimurium* TA 98 suşunda rfa mutasyonu kontrolü. A) Zon çapı 14 mm, B) Zon çaplarının yakın görünümü.

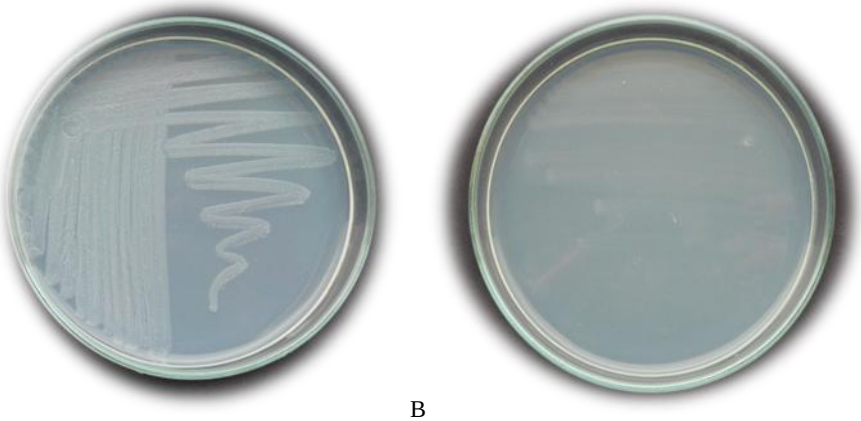


A B

Şekil 3.2.11.4. *S. typhimurium* TA 100'de rfa mutasyonu kontrolü. A) Zon çapı 14 mm, B) Zon çaplarının yakın görünümü.

uvrB mutasyonunun kontrolü: Bu mutasyonun varlığı ultraviyole ışınlarına duyarlılık testi ile ölçüldü. Test suşlarının gecelik kültüründen öze ile alınan örnekler, nütrient agarlı petrilere ekilip yayıldı. 37 ºC'de bir gecelik inkübasyondan sonra üreyen tek koloniler, steril eküvyon çubuklarıyla alınarak nütrient agarlı iki plağa çizgi ekim yöntemi ile ekildi. Bu plaklardan bir tanesi kontrol plağı olarak kullanıldı, diğeri ise kapağı açılıp 30 watt'lık germisidal UV lambası altında 33 cm uzaklıktan 8 saniye süre ile ışınlandı. Kontrol plağı ve UV' ye maruz bırakılan plak 37 ºC'de bir gece inkübe edildi. uvrB delesyonu taşıyan suşların kontrol plağında ürediği fakat UV ile ışınlanmış plaklarda ise üremediği gözlendi (Ames ve ark. 1973).

R faktörünün kontrolü: Öncelikle his (-) karakterleri doğrulanan kolonilerin ampisiline dirençlilikleri test edildi. Bunun için histidin/biyotin/ampisilin (HBA) agar hazırlanarak R faktörü test edilecek suşların ekimi yapıldı (Mc Cann ve ark. 1976). 37 ºC'de 12-24 saatlik bir inkübasyon süresi sonunda, R faktörü içeren suşların ampisilinli plaklarda ürediği gözlendi. Bu çalışmaya alternatif olarak 10 µg'lık ticari ampisilin diskleri, bakteri ekimi yapılmış olan nütrient agarlı plaklara belirli aralıklarla yerleştirildi. İnkübasyon süresi (37 ºC'de 12-24 saat) sonunda R faktörü taşıyan suşlarda inhibisyon zonu gözlenmedi. Kontrol amaçlı *E.coli* ATTC 25922 suşu için de bu işlemler yapıldı. Sonuç olarak HBA agar plaklarında üreme gözlenmedi ve nütrient agarlı plaklardaki ampisilin disklerinin etrafında inhibisyon zonu gözlendi. Bu da *E.coli* ATTC 25922 suşunun ampisiline duyarlı olduğunu kanıtladı.



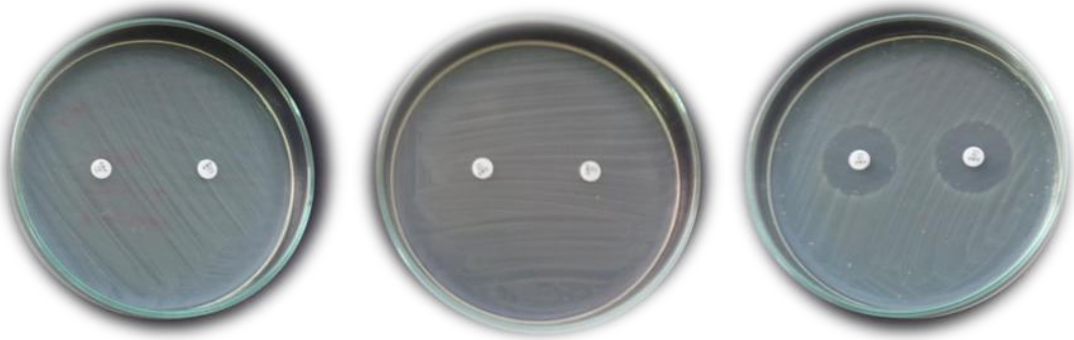
A B

Şekil 3.2.11.5. *S. typhimurium* TA 98 ve *E.coli* ATTC 25922 suşlarında R faktörü varlığının kontrolü.
A) Ampisiline dirençli TA 98 suşu, B) Ampisiline duyarlı *E. coli* ATTC 25922 suşu.



A B

Şekil 3.2.11.6. . *S. typhimurium* TA 98 ve *E.coli* ATTC 25922 suşlarında R faktörü varlığının kontrolü.
A) Ampisiline dirençli TA 98 suşu, B) Ampisiline duyarlı *E. coli* ATTC 25922 suşu.



A B C

Şekil 3.2.11.7 *S. typhimurium* TA 98, TA 100 ve *E.coli* ATTC 25922 suşlarında R faktörü varlığının kontrolü.
A) Ampisiline dirençli TA 98 suşu, B) Ampisiline dirençli TA 100 suşu,
C) Ampisiline duyarlı *E. coli* ATTC 25922 suşu.

3.2.12. Kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı kontrolü

Test suşlarının, histidinsiz ortamda üreyebilmelerine yol açan kendiliğinden geriye dönüş, mutajenite/antimutajenite deneylerinde rutin olarak ölçülür ve her plakta kendiliginden geriye dönen bakteri sayısı olarak ifade edilir. Bu kendiliginden geriye dönüş her suş için belirli limitler içinde olmaktadır.

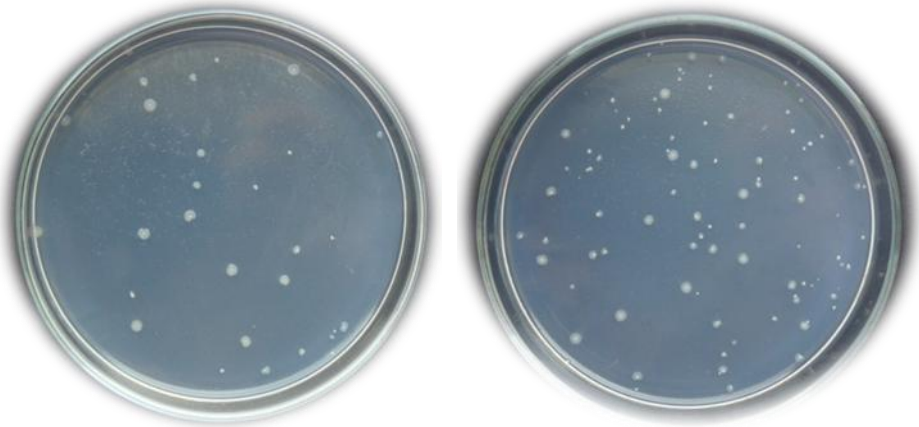
TA 98 için 20-50 revertant / plak

TA 100 için 80-200 revertant / plak

Bu bakterilerin kolonileri, oksotrofik mutant bakterilerin geliştiği bir besiyerinde kolayca gözlenebilir. Kendiliğinden geriye dönüş frekansını saptayabilmek için minimal glukoz agar plakları hazırlandı. Bacto agar (% 0.6) ve NaCl (% 0.5) içeren 90 ml'lik üst agar 121 ºC'de 20 d otoklavda steril edildikten sonra, 50 ºC'lik su banyosunda bekletildi. Bu sırada içerisine 0.5 mM histidin/biyotin çözeltisinden 10 ml eklendi. Bu karışım 2 ml'lik porsiyonlar şeklinde steril tüplere dağıtıldı. Tüplere her suşun gecelik kültüründen 0.1 ml eklendi. Düşük devirde tüp çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra, karışım soğutulmadan plağa döküldü ve sekiz şeklinde hareket ettirilerek yayılması sağlandı. 37 ºC'de 48-72 saat arası inkübasyondan sonra geriye dönen kolonilerin sayımı yapıldı. Bu deney her iki suş için bir çok kez tekrarlandı ve ortalama değerleri belirlendi. Deney suşlarının kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları literatürlerdeki sayılarla benzerlik gösterdi (Maron ve Ames 1983).

Çizelge 3.2.12.1. Mutant suşların kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı

Salmonella typhimurium mutant suşlar	Kendiliğinden geriye dönen koloni Sayısı
TA 98	30 – 50
TA 100	120 – 200



A B

Şekil 3.2.12.1. *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları.

A) *S. typhimurium* TA 98 suşunun kendiliğinden geri dönen koloni sayısı,

B) *S. typhimurium* TA 98 suşunun kendiliğinden geri dönen koloni sayısı.

3.2.13. Master plakların hazırlanışı

Bakteri suşlarının iki ay süre ile saklanabilmesi için (+ 4 ºC'de) master plaklar hazırlandı. Genetik işaretleri doğrulanan suşlar, histidin/biyotin/ampisilin içeren bu plaklara ekildi. Daha sonraki kültür hazırlama çalışmaları, iki ay süre ile bu plaklardan yapıldı (Maron ve Ames 1983).

3.2.14. Bal konsantrasyonlarının hazırlanması

Bal örnekleri steril cam baget yardımıyla iyice karıştırılarak tartıldı ve 100 mg/ml olacak şekilde suda çözüldü.

Sitotoksik doz belirlenmesinde, bal konsantrasyonları 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml 12.5 mg/ml olacak şekilde dilüe edilerek kullanıldı.

Antimutajenite deneyinde ise sitotoksik doz belirlemede kullanılan konsantrasyonlara beşinci konsantrasyon olarak 6.25 mg/ml eklendi.

3.2.15. Sitotoksik dozun belirlenmesi

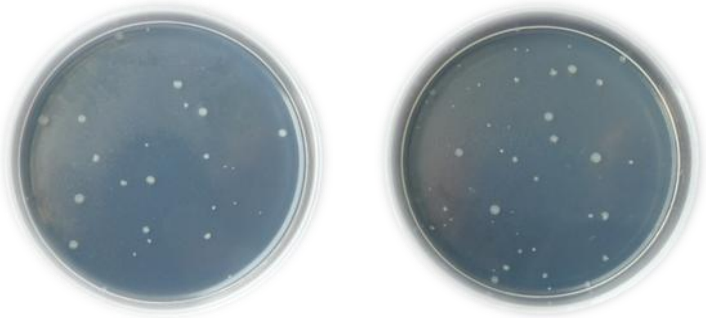
Antimutajenite deneyine geçmeden önce deneyin sağlıklı olarak değerlendirilmesi için, test bileşiklerinin sitotoksik etkilerinin saptanması gerekir. Uygun sayıda bakteri içeren (1-2x10^9) kültürden serum fizyolojik kullanılarak 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} 10^{-6} ve 10^{-7} oranlarında seyreltme yapıldı. Sitotoksik etkiyi belirlemek için daima 10^{-7} seyreltmedeki kültür kullanıldı. Daha sonra test maddesinin uygun konsantrasyonları hazırlandı. Bu işlemler tamamlandıktan sonra içerisinde 2 ml top agar ihtiva eden tüplere, bakteri kültüründen 0.1 ml ve test bileşiğinin değişik konsantrasyonlarından 0.1 ml eklendi Karışım iyice çalkalandıktan sonra nutrient agarlı plaklara hızlı bir şekilde döküldü ve yayıldı. Plaklar 37 ºC'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan sonra plaklardaki koloni sayıları kontrol plaklarındaki bakteri sayıları ile karşılaştırılarak toksik olmayan dozlar saptandı (Dean ve ark. 1985). Bir dozun sitotoksik olduğunun anlaşılması LD_{50} dozunun altında olmasıyla anlaşılır. Deneme plaklarındaki koloni sayısı, kontrol plağındaki koloni sayısının yarısının altında olmamalıdır.

3.2.16. S9 karışımının hazırlanması

Salmonella / mikrozom test sistemi için standart S9 karışımının bileşenleri; 1ml $MgCl_2$ (8 mM), 1 ml KCl (33 mM), 0.25 ml Glukoz-6-fosfat (5 mM), 2 ml β-NADP (4 mM), 25 ml sodyum-fosfat (100 mM), pH: 7.4 ve bu karışımın her mililitresi için 0.04 ml derişimindeki S9 fraksiyonudur. Karışım, her antimutajenite deneyi için taze hazırlandı ve deney süresince buz içerisinde saklandı (Maron ve Ames 1983).

3.2.17. Pozitif kontrol

Bakterilerin bilinen standart mutajenlere karşı tepkilerini saptamak için belirlenmiş bir mutajen, pozitif kontrol amacıyla esas denemeye paralel olarak yapıldı. *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu için indirekt mutajen olan, 2-aminoflouren S9 karışımı varlığında ve direkt mutajen olan 4-nitro-o-fenilendiamine S9 karışımı yokluğunda kullanıldı. *Salmonella typhimurium* TA 100 için direkt mutajen olarak S9 karışımı varlığında ve yokluğunda sodyum azid kullanıldı (Özbek 2008).



A B

Şekil 3.2.17.1 *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerine; A) S9 yokluğunda 4 nitro-o-fenilendiaminin mutajenik etkisi, B) S9 varlığında 2-Aminoflourenin mutajenik etkisi.

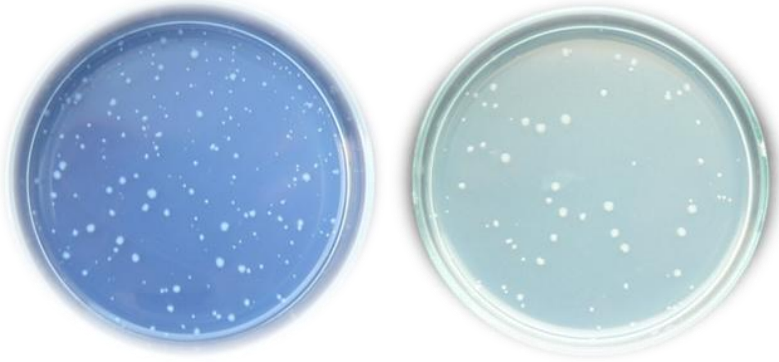


A **B**

Şekil 3.2.17.2. *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üzerine; A) S9 varlığında Sodyum azidin mutajenik etkisi, B) S9 yokluğunda Sodyum azidin mutajenik etkisi

3.2.18. Negatif kontrol

Bal dilüsyonlarını ve kontrol mutajenlerinden Sodyum azid'i çözmek için kullanılan suyun, 4-nitro-o-fenilendiamine ve 2-aminofloureni çözmek için kullanılan Dimetil sülfoksitin, her iki bakteri suşu üzerine etkisinin olup olmadığını kontrol etmek amacı ile bu deney yapıldı. Bu denemede uygun konsantrasyondaki bakteri kültüründen (1-2x10^9) 0.1 ml ve spektrofotometrik saflıktaki Dimetil sülfoksitten veya sudan 0.1 ml alınarak, içerisinde 2 ml top agar bulunan tüpe aktarıldı ve karışım minimal glukoz agarlı plaklara döküldü. Plaklar 37 ºC'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda negatif kontrol plaklarındaki bakteri sayıları ile revertant plaklarındaki bakteri sayıları karşılaştırıldı. Bu sayıların benzer veya yakın olması negatif kontrolü doğrulamaktadır.



A **B**

Şekil 3.2.18.1 Su kullanılarak hazırlanan negatif kontrol plaklarındaki üreme durumu. A) TA 100, B) TA 98.



A **B**

Şekil 3.2.18.2 DMSO kullanılarak hazırlanan negatif kontrol plaklarıındaki üreme durumu. A) TA 100, B) TA 98.

3.2.19. Antimutajenite testi (AMES/ Salmonella mikrozom testi)

AMES/ *Salmonella* mikrozom test sistemini çalışırken 'standart plak inkorporasyon' yöntemi kullanıldı. Bu teknikte; S9 varlığında ve yokluğunda olmak üzere iki farklı deney yapıldı.

S9 yokluğunda yapılan deney

Bu deney için öncelikle gecelik kültür hazırlandı. 140 rpm'de 16 saat çalkalanan gecelik kültürden 500 µl alınarak taze kültür hazırlandı ve 6 saat boyunca 110 rpm'de

çalkalamalı inkübatörde üremeye bırakıldı. Bakteri kültürünün 6 saat sonundaki üremesi bu deney için uygun olarak görüldü.

6. saat sonunda, 50 °C' lik su banyosunda tutulan ve tüplere 2 ml olarak dağıtılmış olan top agara sırasıyla önce 500 µl sodyum-fosfat tamponu, daha sonra 100 µl balın değişik konsantrasyonları, 100 µl 6 saatlik taze bakteri kültürü ve 100 µl pozitif mutajen madde eklendi. Tüpler düşük hızda vortekslenerek MGA plakların yüzeyine döküldü ve sekiz işareti yapılarak karışımın homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Agarın donması beklendi ve plaklar ters çevrilerek 37 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda plaklardaki koloniler sayıldı.

Deneyde her bir doz için üç ayrı plak kullanıldı. Ayrıca deneye paralel olarak negatif ve pozitif kontroller de yapıldı.

Negatif kontrol (su veya DMSO) için (üç plak): 500 µl sodyum-fosfat tamponu+100 µl su veya DMSO+100 µl bakteri kültürü top agara eklendi.

Pozitif kontrol için (üç plak): 500 µl sodyum-fosfat tamponu+100 µl pozitif mutajen madde+100 µl bakteri kültürü top agara eklendi.

S9 varlığında yapılan deney

Bu deney için öncelikle gecelik kültür hazırlandı. 140'rpm de 16 saat çalkalanan gecelik kültürden 500 µl alınarak taze kültür hazırlandı ve 6 saat boyunca 110 rpm'de çalkalamalı inkübatörde üremeye bırakıldı. Bakteri kültürünün 6 saat sonundaki üremesi bu deney için uygun olarak görüldü.

6. saat sonunda, 50 °C' lik su banyosunda tutulan ve tüplere iki ml olarak dağıtılmış olan top agara sırasıyla önce 500 µl S9 karışımı, daha sonra 100 µl balın değişik konsantrasyonları, 100 µl pozitif mutajen madde ve 100 µl 6 saatlik taze bakteri kültüründen eklendi. Tüpler düşük hızda vortekslenerek MGA plakları yüzeyine döküldü ve sekiz işareti yapılarak karışımın homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Agarın donması beklendi ve plaklar ters çevrilerek 37 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda plaklardaki koloniler sayıldı.

Deneyde her bir doz için üç ayrı plak kullanıldı. Ayrıca deneye paralel olarak negatif ve pozitif kontroller de yapıldı.

Negatif kontrol (su veya DMSO) için (üç plak): 500 µl S9 karışımı+100 µl su veya DMSO+100 µl bakteri kültürü top agara eklendi.

Pozitif kontrol için (üç plak): 500 µl S9 karışımı+100 µl pozitif mutajen madde+100 µl bakteri kültürü top agara eklendi.

3.2.20. Sonuçların değerlendirilmesi

Çalışmamızda denemeler üç tekrarlı olarak yapıldı ve elde edilen sonuçlar % inhibisyon değeri ile analiz edilerek tablo halinde verildi.

Salmonella mikrozom test sisteminde elde edilen sonuçlar değerlendirilirken, % inhibisyon oranı aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

% inhibisyon oranı

T→ Mutajen madde ve bal konsantrasyonu varlığında geri dönen koloni sayısı

M→ Sadece mutajen madde varlığında geri dönen koloni sayısı

S → Spontan revertant koloni sayıları

Bal konsantrasyonunun mutajen madde üzerindeki inhibisyon oranı % 20-40 arasında olduğu durumlarda antimutajenik etki orta dereceli olarak tanımlanırken; % 40'dan fazla olduğu durumlarda güçlü antimutajenik etkili olarak kabul edildi. İnhibisyon oranı % 20'den daha az olduğunda ise antimutajenik etki negatif olarak kabul edildi (Negi ve ark. 2003).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. Bal Örneklerinin Polen Analizi

Referans preparatlarla karşılaştırılan bal örneklerinin polen analizleri ve toplam polen sayıları (TPS/10g)'nın sonuçlarına göre Anzer balı, Trabzon Kestane balı, Çam balı, Kekik balı, Narenciye balı ve Buzluhan Yayla balı'nın gerçek bal oldukları belirlendi.

Çam balında BÇE/TPS oranına göre analiz sonuçları 3 – 4.5 arasında bulundu. Bu da bu bal çeşidinin yoğun Çam balı olduğunu gösterdi.

4.2. Test Suşlarının Üreme Durumları

Salmonella typhimurium TA98 ve TA100 suşlarının zamana bağlı absorbans değerleri ve kültürün mililitresindeki canlı bakteri sayıları belirlendi (Çizelge 4.2.1, 4.2.2).

Salmonella/mikrozom test sisteminde kullanılan suş kültürlerinin mililitresinde 1-2x10^9 canlı bakteri olması öngörülmektedir (Maron ve Ames 1983). *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarının mililitresinde bulunması gereken bakteri sayısına (1-2x 10^9); *Salmonella typhimurium* TA 98 suşunda, inkübasyonunun yaklaşık 5. ve 6. saatleri arasında, *Salmonella typhimurium* TA 100 suşunda ise 6. saatte ulaşıldı. Bu nedenle denemelerde, çalkalamalı inkübatörde 110 rpm ve 37 ^{0}C 'de 6 saat süre ile inkübe edilen *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA 100 suşları kullanıldı.

Çizelge 4.2.1 *Salmonella typhimurium* TA 98 mutant suşunun zamana göre absorbans değerleri ve üreme durumu

Zaman(saat)	**Ortalama Absorbans (λ=650 nm)**	**Ortalama Canlı Bakteri Sayısı**	**Mac farland değeri**
3	0.540	1.3 x 10^8	0.6
4	0.537	1.2 x 10^8	0.7
5	0.720	1.74 x 10^8	0.8
6	**0.954**	**2 x 10^9**	**0.9**
7	0.718	0.73 x 10^9	0.7
8	0.818	0.74 x 10^9	0.7

Çizelge 4.2.2 *Salmonella typhimurium* TA 100 mutant suşunun zamana göre absorbans değerleri ve üreme durumu

Zaman (saat)	OrtalamaAbsorbans (λ=650nm)	Ortalama Canlı Bakteri Sayısı	Mac farland değeri
3	0.353	2.79×10^7	0.4
4	0.346	5.7×10^7	0.4
5	0.465	1.53×10^8	0.5
6	**0.640**	**1.35×10^9**	**0.6**
7	0.548	3.06×10^9	0.7
8	0.631	1.65×10^9	0.6

4.3. Sitotoksik dozun belirlenmesi

Antimutajenite denemelerinde kullanılan bal örneklerinin sitotoksik dozları araştırıldı (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 İncelenen bal örneklerinin sitotoksik doz sonuçları

DOZLAR (mg/ml)	BAL ÇEŞİTLERİ						
	ANZER	TRABZON KESTANE	ÇAM	KEKİK	NARENCİYE	BUZLUHAN YAYLA	KONTROL
100	736 kob/ml	824 kob/ml	826 kob/ml	704 kob/ml	577 kob/ml	698 kob/ml	510 kob/ml
50	678 kob/ml	840 kob/ml	777 kob/ml	519 kob/ml	582 kob/ml	840 kob/ml	
25	840 kob/ml	990 kob/ml	652 kob/ml	826 kob/ml	616 kob/ml	896 kob/ml	
12,5	742 kob/ml	653 kob/ml	972 kob/ml	614 kob/ml	718 kob/ml	618 kob/ml	

Elde edilen verilere göre belirlenen koloni sayıları, kontrol plağındaki koloni sayılarından fazla olduğundan, incelenen bal örnekleri dozlarının hiçbirinin sitotoksik olmadıklarının sonucuna varıldı. Antimutajenite deneylerinde bal örneklerinin 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12.5 mg/ml ve 6.25 mg/ml'deki farklı konsantrasyonları kullanıldı (Çizelge 4.3).

4.4. Çalışılan Balların Antimutajenik Özelliklerinin Belirlenmesi

Anzer balı, Trabzon Kestane balı, Kekik balı, Çam balı, Buzluhan Yayla balı ve Narenciye balının antimutajenik aktivitelerinin araştırılması için yapılan antimutajenite deneylerinde; bal çeşitlerinin farklı beş dozu kullanıldı (100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 6.25 mg/ml). Deneyler üç tekrarlı olarak yapıldı. Deney sonuçları tüm

dozların önemli antimutajenik aktivite gösterdiğini ve % inhibisyon oranının da doza bağlı olarak arttığını gösterdi(Çizelge 4.4.1).

Çizelge 4.4.1 İncelenen bal çeşitlerinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA98 suşu üzerine antimutajenik etkileri.

Test edilen ballar	Konsantrasyon (mg/plak)	Geriye dönen (revertant) koloni Sayısı			
		Salmonella typhimurium TA 98 S9 yokluğunda		*Salmonella typhimurium* TA 98 S9 varlığında	
		Ortalama	**% inhibisyon**	**Ortalama**	**% inhibisyon**
Negatif Kontrol (su)	100 µl/plak	35		38	
Pozitif Kontrol*	200 µg/plak	765.3		601.3	
Anzer Balı	10 mg/plak	316	61.6	114	86
	5 mg/plak	337.3	58.7	141.3	81.7
	2.5 mg/plak	368	54.5	154.6	79.4
	1.25 mg/plak	382.6	52.5	169.3	76.7
	0.625 mg/plak	400	50.1	206.6	70.2
Pozitif Kontrol*	200 µg/plak	693.3		346.6	
Trabzon Kestane Balı	10 mg/plak	194.6	75.8	109.3	76.9
	5 mg/plak	229.3	70.5	117.3	74.4
	2.5 mg/plak	230.6	70.3	117.3	74.4
	1.25 mg/plak	254	66.8	120	73.5
	0.625 mg/plak	312	58	125.3	71.8
Pozitif Kontrol*	200 µg/plak	726.6		316	
Çam Balı	10 mg/plak	316	59.4	82.6	84
	5 mg/plak	360	53.1	89.3	81.6
	2.5 mg/plak	378.6	50.4	110.6	73.9
	1.25 mg/plak	461.3	38.4	124	69.1
	0.625 mg/plak	465.3	37.8	146.6	61
Pozitif Kontrol*	200 µg/plak	506.6		320	
Kekik Balı	10 mg/plak	236	57.4	39.6	99.5
	5 mg/plak	237.3	57.2	96	79.5
	2.5 mg/plak	305. 3	42.7	114	73.1
	1.25 mg/plak	335.3	36.4	116	72.4
	0.625 mg/plak	364	30.3	120	71
Pozitif Kontrol*	200 µg/plak	698.6		276	
Narenciye Balı	10 mg/plak	270.6	64.5	87.6	79.2
	5 mg/plak	297.3	60.5	98.6	74.6
	2.5 mg/plak	320	57.1	122.3	64.6
	1.25 mg/plak	328	55.9	130	61.4
	0.625 mg/plak	585.3	17.1	139.3	57.5
Pozitif Kontrol*	200 µg/plak	888		282	
Buzluhan Yayla Balı	10 mg/plak	378.6	59.8	32	97.6
	5 mg/plak	385.6	59	72	86.1
	2.5 mg/plak	414.6	55.5	72	86.1
	1.25 mg/plak	518.6	43.4	88	79.6
	0.625 mg/plak	570.6	37.3	108	71.4

**S.typhimurium* TA 98 suşu için S9 varlığında kullanılan indirekt mutajen 2-Aminofluoren, S9 yokluğunda kullanılan direkt mutajen 4-nitro-o-fenilendiamine

Çizelge 4.4.2 İncelenen bal çeşitlerinin farklı konsantrasyonlarının *S. typhimurium* TA100 suşu üzerine antimutajenik etkileri.

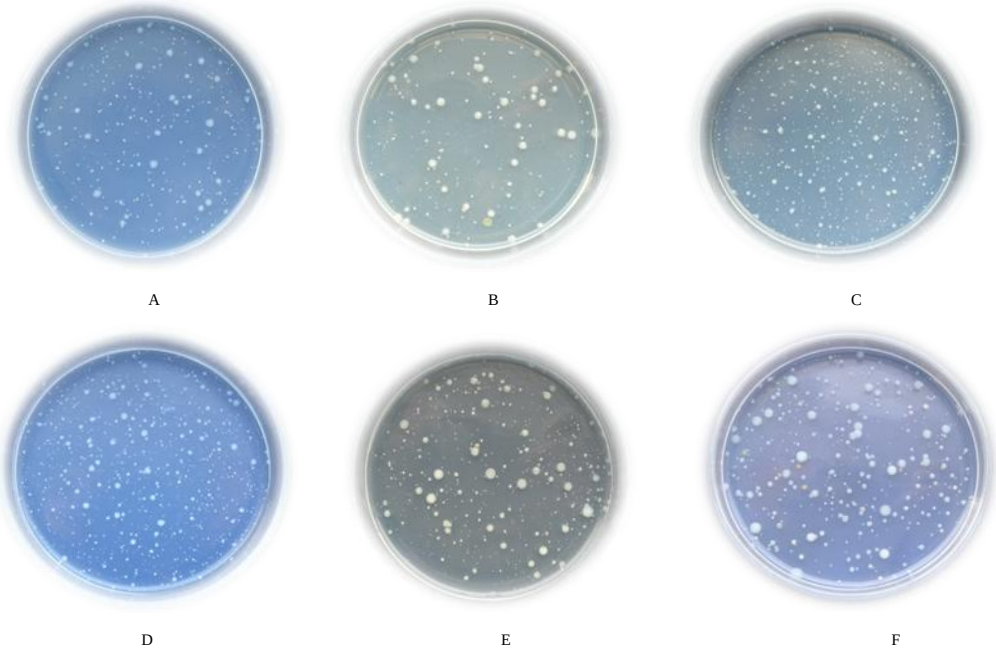
Test Edilen Ballar	**Konsantrasyon (mg/ml)**	**Geriye dönen (revertant) koloni Sayısı**			
		Salmonella typhimurium TA 100 S9 yokluğunda		*Salmonella typhimurium* TA 100 S9 varlığında	
		Ortalama	**%i nhibisyon**	**Ortalama**	**% inhibisyon**
Negatif Kontrol	100µl/plak	122.3		111	
Pozitif Kontrol*	1mg/plak	448.3		477.3	
Anzer Balı	10 mg/plak	118	97.7	160	86.7
	5 mg/plak	132.3	97	222.6	69.6
	2.5 mg/plak	172.5	84.7	237.3	65.6
	1.25 mg/plak	173.3	84.4	314	44.6
	0.625 mg/plak	303.3	44.5	367.3	31
Pozitif Kontrol*	1mg/plak	448.3		505.3	
Trabzon Kestane Balı	10 mg/plak	176	83.6	164	86.6
	5 mg/plak	333.3	36	168	85.6
	2.5 mg/plak	377.3	21.8	248	65.3
	1.25 mg/plak	396.6	15.9	276	58.2
	0.625 mg/plak	440	3	282.6	56.5
Pozitif Kontrol*	1mg/plak	448.3		477.3	
Çam Balı	10 mg/plak	209.3	73.4	205.3	74.3
	5 mg/plak	212	72.5	205.3	74.3
	2.5 mg/plak	218.6	70.5	214.6	71.8
	1.25 mg/plak	242.6	63.1	340	37.5
	0.625 mg/plak	258.6	58.2	445.3	9
Pozitif Kontrol*	1mg/plak	448.3		614.6	
Kekik Balı	10 mg/plak	223.6	69	148	92.7
	5 mg/plak	238.6	64.4	166.6	89
	2.5 mg/plak	242.6	63.1	200	82.4
	1.25 mg/plak	254	59.7	245.3	73.4
	0.625 mg/plak	367.6	24.8	288	65
Pozitif Kontrol*	1mg/plak	448.3		550.6	
Narenciye Balı	10 mg/plak	158.6	88.9	244	69.8
	5 mg/plak	224	68.9	277.3	62.2
	2.5 mg/plak	340	33.3	288	59.8
	1.25 mg/plak	373.3	23.1	296	58
	0.625 mg/plak	414.6	11	409.3	32.2
Pozitif kontrol*	1mg/plak	448.3		449.3	
Buzluhan Yayla Balı	10 mg/plak	141.3	94.2	193.3	75.7
	5 mg/plak	206.6	74.2	213.3	69.8
	2.5 mg/plak	210	73.1	270.6	52.9
	1.25 mg/plak	322.6	38.6	310.6	41
	0.625 mg/plak	354.6	28.8	320	38.3

**S.typhimurium* TA 100 suşu için S9 varlığında ve yokluğunda kullanılan direkt mutajen Sodyum azid.

100 mg/ml dozunda Kekik balı, Buzluhan Yayla balı, Anzer balı, Çam balı, Narenciye balı ve Trabzon Kestane balı çeşitleri, *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerinde ve S9 varlığında sırasıyla % 99.5, % 97.6, % 86, % 84, % 79.2 ve % 76.9 oranında güçlü antimutajenik inhibisyon etkisi gösterdikleri tespit edildi (Çizelge 4.4.1). Anzer balı ve Trabzon Kestane balının; *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerinde ve S9 yokluğunda tüm dozlarda güçlü antimutajenik etki gösterdikleri belirlendi. Çam balı ve Kekik balında 100, 50 ve 25 mg/ml doz aralığında yüksek antimutajenik etki, 12.5 ve 6.25 mg/ml dozlarında ise orta dereceli antimutajenik etki görüldü. Narenciye balı ise 6.25 mg/ml dozda etkisiz olarak değerlendirildi (Çizelge 4.4.1).

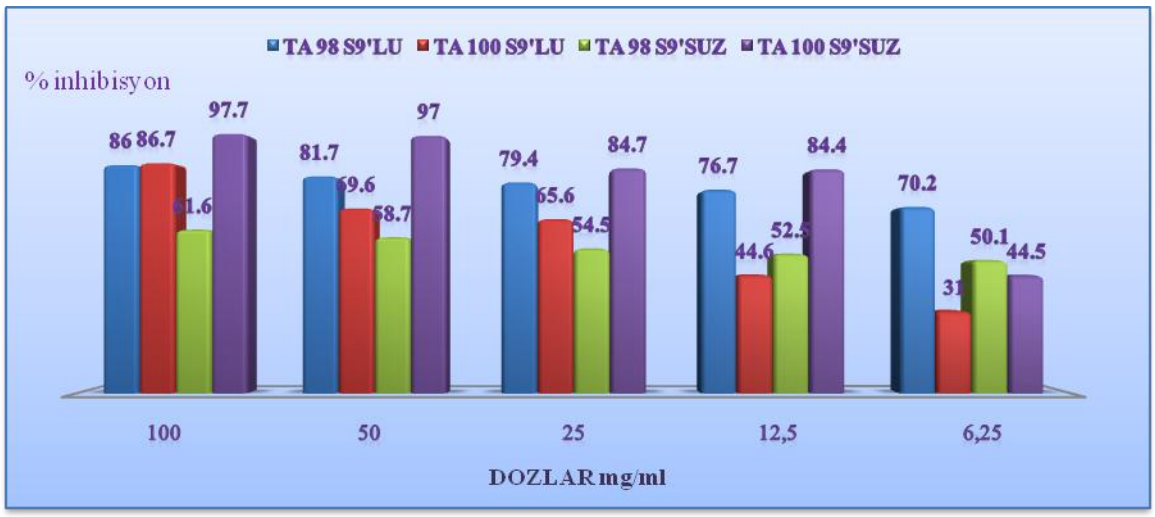
Kekik balı, 100 mg/ml dozunda *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üzerinde ve S9 varlığında % 92.7 inhibisyon oranı ile en güçlü, Çam balı ise 6.25 mg/ml dozda % 9 inhibisyon oranı ile en düşük antimutajenik aktiviteyi gösterdi (Çizelge 4.4.2).

Anzer balı, 100 mg/ml ve 50 mg/ml dozlarında *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üzerinde ve S9 yokluğunda sırasıyla % 97.7 ve % 97 inhibisyon oranları ile en güçlü antimutajenik etkiyi gösterdi. Çam balının tüm dozları ile Anzer balının diğer dozlarının güçlü antimutajenik aktivite gösterdikleri belirlendi. Trabzon Kestane balı ise S9 yokluğunda denenen diğer bal çeşitlerine göre en düşük antimutajenik aktiviteyi gösterdi (Çizelge 4.4.2).



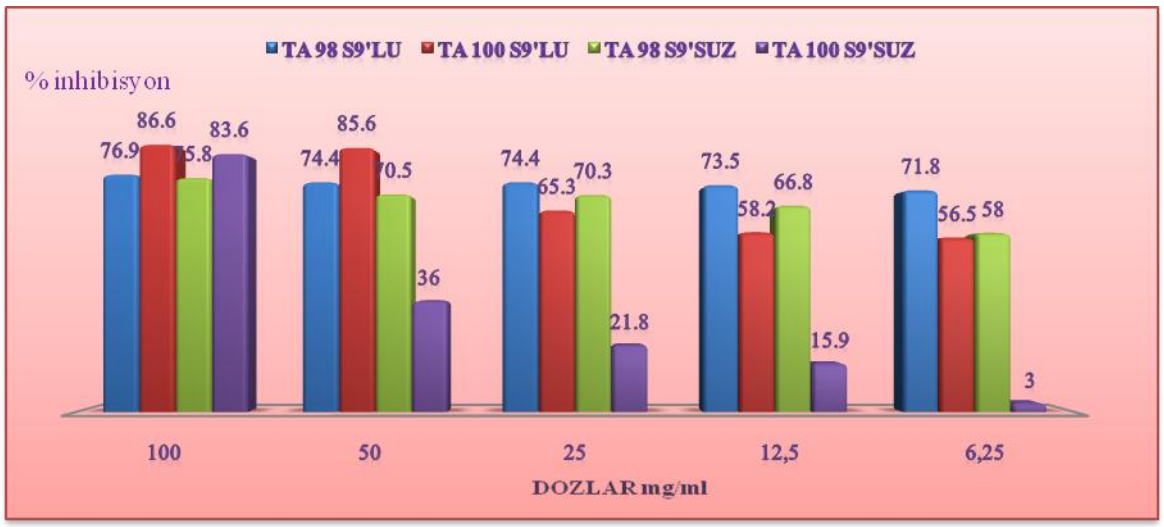
Şekil 4.4.1 Bal çeşitleri A) Kekik, B) Anzer, C) Buzluhan Yayla, D) Narenciye, E) Trabzon Kestane ve F) Çam balı'nın 100 mg/ml dozundaki revertant sayıları.

Anzer balı 100 mg/ml dozda *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde ve S9 varlığında sırası ile % 86 ve % 86.7 inhibisyon oranı ile güçlü ve yakın antimutajenik aktivite gösterdi. Aynı bal çeşidi 6.25 mg/ml dozda *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde ve S9 yokluğunda sırası ile % 50.1 ve % 44.5 inhibisyon oranı ile güçlü ve yakın antimutajenik aktivite gösterdi (Şekil 4.4.1).



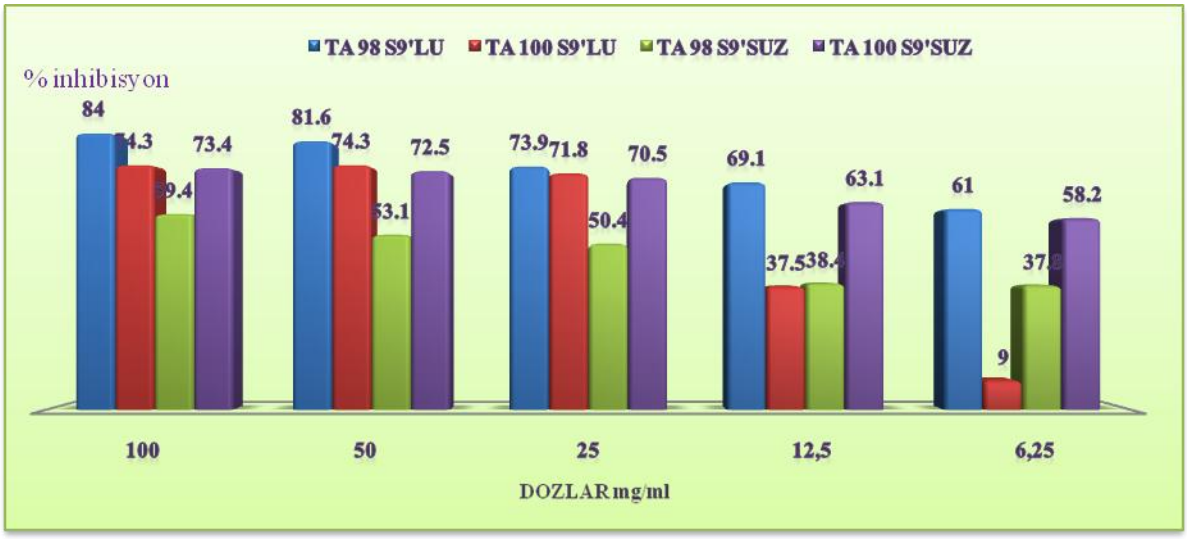
Şekil 4.4.1 Anzer Balının S9 varlığında ve yokluğunda *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerine % inhibisyon oranları

Trabzon Kestane balı 100 mg/ml dozda *S.typhimurium* TA 98 suşu üzerinde S9 varlığında ve yokluğunda sırası ile % 76.9 ve % 75.8 inhibisyon oranı ile güçlü ve yakın antimutajenik aktivite gösterdi. Aynı bal çeşidi aynı dozda *S.typhimurium* TA 100 suşu üzerinde S9 varlığında ve S9 yokluğunda sırası ile % 86.6 ve % 83.6 inhibisyon oranı ile güçlü ve yakın antimutajenik aktivite gösterdi (Şekil 4.4.2).



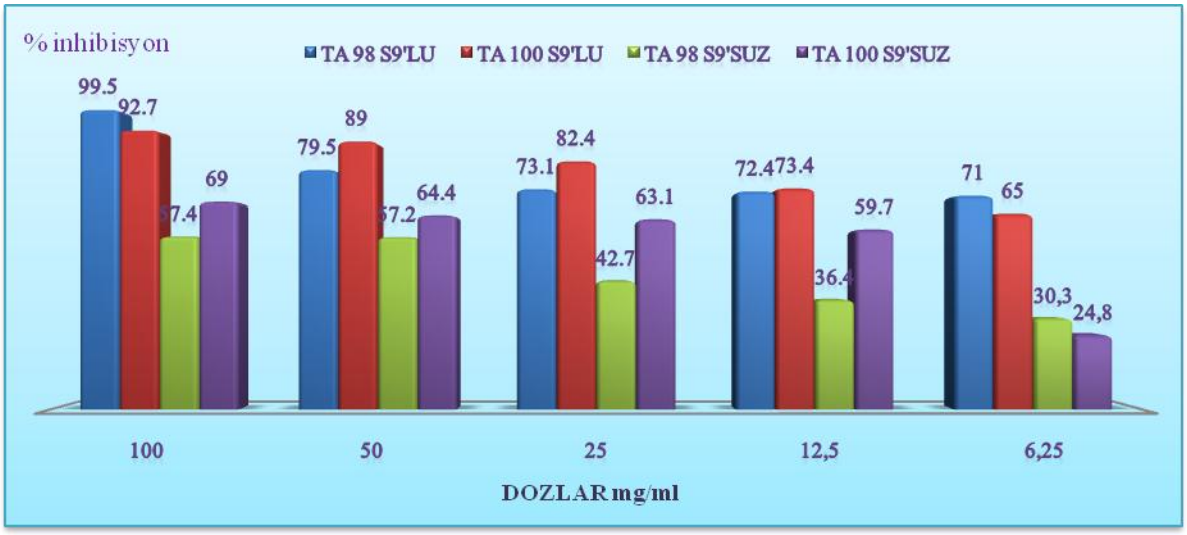
Şekil 4.4.2 Trabzon Kestane Balının S9 varlığında ve yokluğunda *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerine % inhibisyon oranları.

Çam balı 100 ve 50 mg/ml dozlarında *S.typhimurium* TA 98 suşu üzerinde S9 varlığında sırası ile % 84 ve % 81.6 inhibisyon oranı ile güçlü ve yakın antimutajenik aktivite gösterirken, Aynı bal çeşidi 100, 50 ve 25 mg/ml dozlarında *S.typhimurium* TA 100 suşu üzerinde ve S9 varlığında sırası ile % 74.3, % 74.3 ve % 71.8 inhibisyon oranı ile güçlü ve yakın antimutajenik aktivite gösterdi (Şekil 4.4.3).



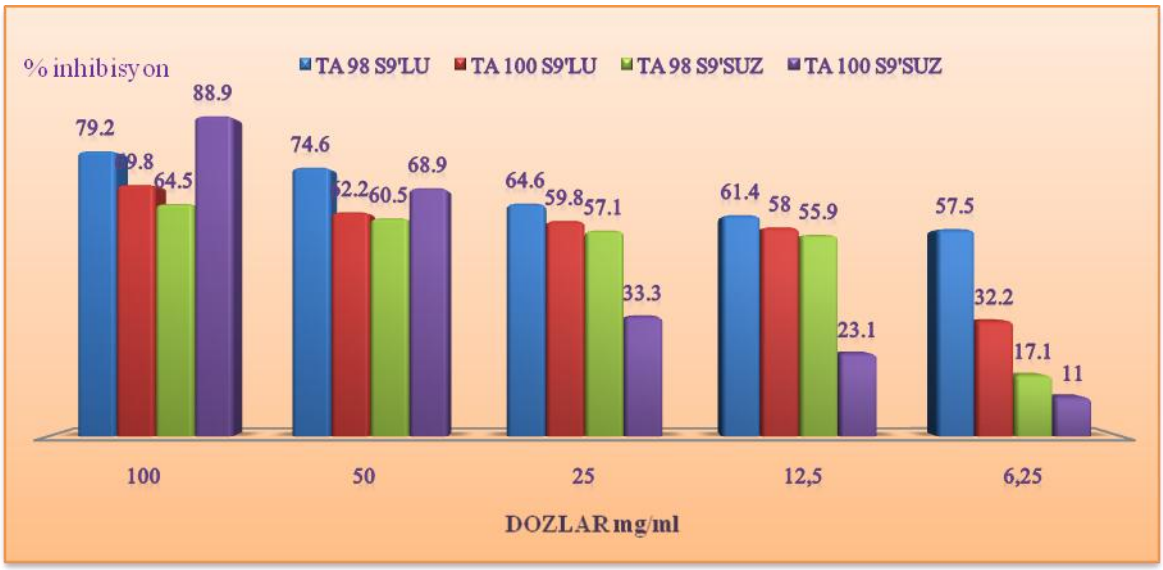
Şekil 4.4.3 Çam Balının S9 varlığında ve yokluğunda *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerine % inhibisyon oranları

Kekik balının denenen tüm dozlarında *S. typhimurium* TA 100 suşu üzerinde ve S9 varlığında doza bağlı güçlü ve yakın antimutajenik aktivite gözlendi. Aynı balın 100 mg/ml dozu hariç diğerleri *S. typhimurium* TA 98 suşu üzerinde ve S9 varlığında doza bağlı güçlü ve yakın antimutajenik aktivite gösterdi (Şekil 4.4.4).



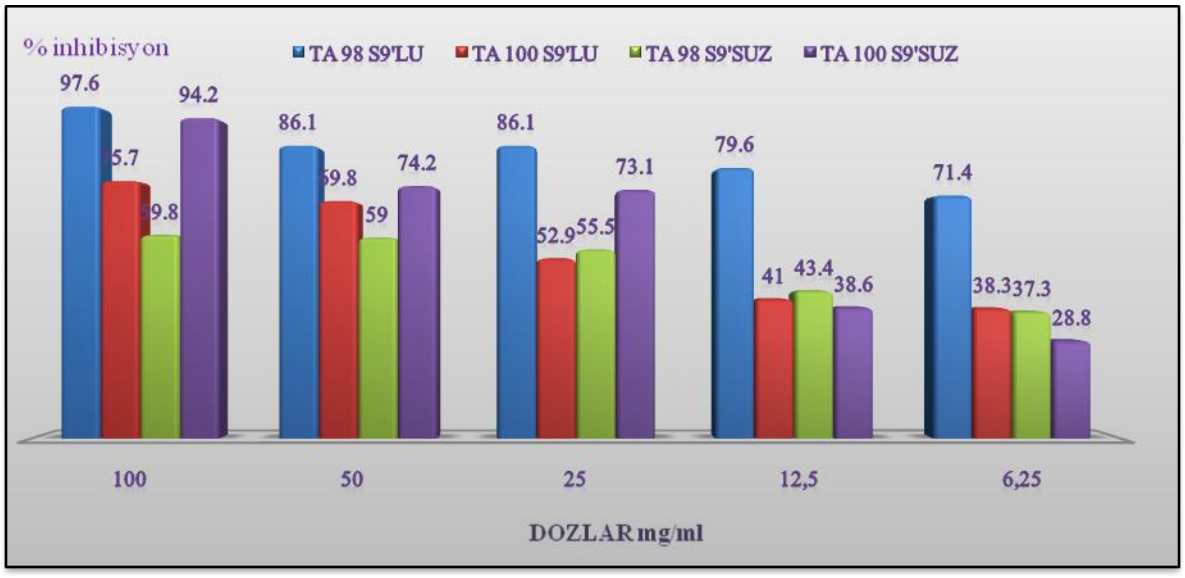
Şekil 4.4.4 Kekik Balının S9 varlığında ve yokluğunda *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerine % inhibisyon oranları

Narenciye balı 100 mg/ml dozda *S.typhimurium* TA 98 suşu üzerinde ve S9 varlığında % 79.2 ve TA 100 suşu üzerinde S9 yokluğunda % 88.9 inhibisyon oranı ile en güçlü antimutajenik aktiviteyi sağladı (Şekil 4.4.5).



Şekil 4.4.5 Narenciye Balının S9 varlığında ve yokluğunda *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerine % inhibisyon oranları

Buzluhan Yayla balı 100 mg/ml dozda *S.typhimurium* TA 98 suşu üzerinde ve S9 varlığında % 97.6, TA 100 suşu üzerinde S9 yokluğunda % 94.2 inhibisyon oranı ile en güçlü ve yakın antimutajenik aktiviteye sahip bulundu (Şekil 4.4.6).



Şekil 4.4.3 Buzluhan Yayla Balının S9 varlığında ve yokluğunda *S.typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerine % inhibisyon oranları.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda Türkiye'nin farklı yörelerinden toplanan (Anzer Balı, Trabzon Kestane Balı, Çam Balı, Kekik Balı, Narenciye Balı ve Buzluhan Yayla Balı) bal örneklerinin *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile antimutajenik etkileri araştırıldı.

Denemelerde, test suşları olarak *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan, in vitro mutasyonlarla elde edilen *Salmonella typhimurium* TA 98 ve *Salmonella typhimurium* TA 100 suşları kullanıldı. Bu mutantlar his (-) olup, histidin üreten gen grubunun değişik bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar içermektedirler. TA 98, çerçeve kayması mutasyonunu, TA 100 ise baz çifti değişim mutasyonunu belirlemede kullanılmaktadır. *Salmonella*/mikrozom test sisteminin, memelilerde gerçekleşen biyotransformasyon olayına model olması için, sisteme S9 fraksiyonu eklendi. Böylece bu testte kullanılan bakteri suşlarının metabolizması, memelilerdeki detoksifikasyon mekanizmasına benzetildi (Ames ve ark. 1973). *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu için S9 yokluğunda direkt mutajen olan 4-nitro-o-fenilendiamine, S9 varlığında indirekt mutajen olan 2-Aminofluoren, *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu için ise S9 varlığında ve yokluğunda direkt mutajen olan Sodyum azid kullanıldı.

Her bal çeşidi için beş farklı doz (100, 50, 25, 12.5 ve 6.25 mg/ml) kullanıldı. İncelenen bal çeşitlerinin gerçek olup olmadıklarını belirlemek ve çalışmanın doğru değerlendirilmesini sağlamak amacıyla bal örneklerinin polen analizleri yapıldı. Ayrıca incelenen bal örneklerinin ortalama toplam polen sayısı (TPS/10 g) belirlendi.

Türkiye'de bal üretimi, zaman zaman piyasanın ihtiyaç duyduğu seviyenin altında kalmakta, bu nedenle oldukça ucuz olan yüksek früktozlu mısır şurubu, dekstroz ve galaktoz gibi şekerler kovanlarda arıların beslenmesi ve bal üretiminde kullanılmaktadır (Croft 1987, Swallow ve Low 1990). Balın kaynağının belirlenmesi ve orijinalliğinin kanıtlaması büyük önem taşımaktadır. Balın kalitesi; kimyasal bileşimi, fiziksel özellikleri ve polen içeriği gibi özelliklerinin belirlenmesiyle ölçülmektedir (Ünlü, 1994).

Haroun (2006), Türkiye'de üretilen bazı çiçek ve salgı ballarının fenolik asit ve flavonoid profilinin belirlenmesi üzerine yaptığı çalışmada, fiziksel ve kimyasal parametreler ve fenolik bileşiklerin profili ve miktarını belirleyerek, farklı bal çeşitlerinin ayırt edilmesinin mümkün olduğunu belirtmiş fakat aynı verilere dayanarak balları üretim

yörelerine göre ayırt edebilmenin mümkün olmadığını tespit etmiştir. Fiziksel ve kimyasal parametreler ve fenolik bileşiklerin profili ve/veya miktarı bal analizleri için ne kadar önemli olsa da balların gerçek olup olmadığını belirlemede, polen analizi yöntemi kadar sağlıklı sonuçlar vermemektedir.

Arılar balı üretmek için gerekli olan maddeleri ve polenleri çiçeklerden topladığı için, bitkilerin antioksidan kapasiteleri ile gerçek balın antioksidan kapasitesi arasında doğrudan bir ilişki kurulmaktadır. Yapılan istatistiki çalışmalar, bitkisel kaynaklı gıdalarla beslenme alışkanlığı fazla olan toplumlarda, kansere yakalanma oranının daha az olduğunu göstermektedir (Balachandran ve Govindarajan, 2005; Riboli ve Norat, 2003).

Salmonella/mikrozom test sistemi; çeşitli mutajen ve kanserojenlerin aktiviteleri üzerinde, başta antioksidanlar olmak üzere çeşitli maddelerin inhibitör etkilerinin izlenebildiği kısa zamanlı bir test sistemidir (Rosin ve Stich 1979, Alekperov ve ark. 1986). Bu sistem aynı zamanda, kimyasal maddelerin mutajen veya kanserojen etkilerini ortadan kaldıran, bunların DNA ile etkileşimlerini önleyen antimutajenlerin ve antikanserojenlerin belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Petek 1999).

Bal vitamin deposu olup tiamin, riboflavin, folik asit, pridoksin, pantotenik asit, nikotinamid, biotin gibi B vitaminlerinin yanısıra, askorbik asit, karotenoidler ve α-tokoferolleri de içermektedir (Rashed ve Soltan 2004, Yao ve ark. 2004)

Raucher ve ark. (1998), balın bir bileşeni olan karotenoidlerin *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerinde antimutajenik aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Cameron ve ark. (2003), da balın bir bileşeni olan E vitamininin bazı formlarının insan kanser hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğunu ve bazılarının da kanser hücrelerinde apoptozisi indüklediğini rapor etmişlerdir. Gentile ve ark. (1998), balda bulunan Askorbik asit (vitamin C)'in, etkili serbest radikalleri toplayıcı özelliğe sahip bir antioksidan olduğunu ve bilinen birçok mutajene karşı antimutajenik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Block ve Shwarz (1994), yaptıkları hayvan denemelerinde; askorbat anyonunun hamile sıçan ya da hamster'ların fetuslarında kimyasal bileşiklerle oluşturulan tümörleri tamamen inhibe ettiğini, sıçanlarda akciğer kanserinin görülme sıklığını azalttığını, UV radyasyonla oluşturulan cilt lezyonlarında kontrole göre altı kat azalmaya neden olduğunu, erkek hamster'larda östrojen ya da dietilstilbestrol ile oluşturulan renal tümörlerin görülme sıklığını azalttığını saptamışlardır. Ayrıca, askorbik

asit spontan meme tümörü görülme sıklığının yüksek olduğu (%56) R III farelerinde, tümör oluşumunu tamamen önlemediğini, ancak önemli ölçüde azalttığını belirlemişlerdir.

Çalışmamızda denenen tüm bal çeşitlerinin *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları üzerinde farklı seviyelerde antimutajenik etkili görülmesinin, balın bileşiminde bulunan zengin vitamin içeriklerinden kaynaklanabileceği sonucuna varıldı.

Wang ve ark. (2002), yaptıkları çalışmada balın *Salmonella*/mikrozom test sistemiyle antimutajenik aktivite gösterdiğini ve bu özelliğin de balın bileşimindeki antioksidanlardan ve şekerlerden kaynaklanabileceğini belirtmiş, ayrıca bu çalışmalarında fruktoz, glukoz ve maltoz karışımının da daha düşük antimutajenik aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Gheldof ve ark. (2002)'e göre, balların antioksidan aktivitesi; fenolikler, peptitler, organik asitler, enzimler gibi birçok bileşiğin aktiviteleri sonucunda meydana gelmektedir. Bu çalışmanın sonuçları dikkate alındığında, çalışmamızda incelenen balların güçlü antimutajenik aktiviteye sahip olmalarının, bileşimlerine giren maddeler (fenolik bileşikler, flavonoidler vb.) ile yakından ilişkili olabileceği söylenebilir.

Çalışmamızda Anzer, Trabzon Kestane, Çam, Kekik, Narenciye ve Buzluhan Yayla ballarının *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde direkt mutajenler 4-nitro-o-fenilendiamine, Sodyum azid, indirekt mutajen 2-Aminofluoren'e karşı antimutajenik aktiviteleri değerlendirildiğinde; Kekik balı % 99.5 inhibisyon oranı ile en güçlü antimutajenik etkiyi gösterdi. Kekik balını sırası ile Anzer balı (%97.7), Buzluhan Yayla balı (% 97.6), Narenciye balı (% 88.9), Trabzon Kestane balı (% 86.6) ve Çam balı (% 84) takip etti.

Sonuç olarak; bal çeşitlerinin farklı dozları *S. typhimurium* TA 98 suşu üzerinde ve S9 varlığında daha güçlü antimutajenik aktivite gösterirken, *S. typhimurium* TA 100 suşu üzerinde S9 varlığında ve yokluğunda görülen antimutajenik aktivite değişkenlik gösterdi. Bu değişikliğin nedenleri hakkında literatürlerde açıklayıcı bir bilgiye rastlanmadı.

Beslenme alışkanlıkları sağlığı etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Diyet ile çeşitli hastalıkların oluşum riskinin azaltılması ve bazı hastalıkların ise oluşumunun önlenmesi mümkündür. Modern teknolojilerle uygulanan cerrahi müdaheleler ve kemoterapi, radyoterapi gibi yardımcı tedaviler kanserden kaynaklanan ölümleri azaltmasına rağmen, kanserin oluşumunun engellenmesi en etkin ve ekonomik yol olarak görünmektedir (Lau ve ark. 1990). Gıdalardaki antimutajenik ve antikarsinojenik bileşiklerin, karsinojeniteyi inhibe etme mekanizmaları kesin olarak bilinmemekle birlikte

kanser ile lif içeren gıdalar, taze sebze ve meyveler, vitaminler ve mineraller arasında negatif bir ilişki olduğu ortaya konmuştur (Stavric 1994). Sağlıklı yaşamak için balın doğal bir ürün olarak daha fazla tüketilmesi önerilmektedir. Tabiî ki halkın ve arıcıların sahte bal üretimi ve tüketimine karşı uyarılması ve bilinçlendirilmesi çok büyük bir öneme sahiptir.

6. KAYNAKLAR

Abdulaev, F.I., Riveron-Negrete, L., Caballero-Orgeta, H., Hernandez, J.M., Perez- Lopez, I., Pereda-Miranda, R., Espinosa-Aguirre, J.J. (2003), "Use of in vitro assay to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.)", Toxicology in Vitro, 17, 731-736.

Aljadi, A.M. and Kamaruddin, M.V. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. Food Cemistry, 85, 513-518.

Ames, B. N., Lee, F. D., Durston, W. E. (1973), "An improved bacterial test systems for the detection and classification of mutagens and carcinogens", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 782-786.

Anonim (2003), "Honey-Health and Therapeutic Qualities", National Honey Board.

Anonim (2004), "Bal Mucizesi", http://www.saglikvakfi.org.tr/Default.asp?id=42

Anonim (2005), "Türk Gıda Kodeksi Yönetmeligi", Bal Tebliği. Bal Tebliği No 2005/49. Resmi Gazete 17.12.2005/26026.

Atkins, E. L. (1946), "The Hive and Honey Bee", *Journal Printing Company*, Illinois, 740.

Aydoğan, A. (1990), "Yerli Ballarımızın Kimyasal Yapıları Üzerinde Araştırmalar", Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 4-5.

Aytuğ, B. (1967), "Polen Morfolojisi ve Türkiye'nin Önemli Gymnospermleri Üzerinde Palinolojik Araştırmalar", *İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları*, İstanbul, 114.

Bahçeci, Z. (2002), "Moleküler Biyoloji", Öğrenci Kitabevi Yayınları, 323 s, Kırşehir.

Barbattini, R., Gretti, M., Lob, M., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. I. And Colombo, R. (1991), "Osservazioni SuMetcalfa Pruinosa (Say) E Indagine Sulle Caratteristiche Del Miele Delvato Dalla Sua Melata", *Apicoltura,* 7: 113-135.

Başoğlu, N. F., Sorkun, K., Löker, M., Doğan, C. Ve Wetherilt, H. (1996), "Saf ve Sahte Balların Ayırt Edilmesinde Fiziksel, Kimyasal ve Palinolojik Kriterlerin Saptanması", *Gıda,* 21 (2):67-73.

Balachandran, P. ve Govindarajan, R. (2005), "Cancer: an ayurvedik perspective, Pharmacol", Res., 51, 1 19-30.

Birt, DF., Walker, B., Tıbbels, MG., and Bresnıck, E. (1986), "Antimutagenesis and anti-promotion by apigenin, robinetin and indole-3-carbinol", Carcinogenesis, 7(6):959-63.

Biswal, BM., Zakaria, A., Ahmad, A. NM. (2003), "Topical maplication of honey in the manangement of radiation mucositis", Support Care Cancer.11(4), 242-248.

Bogdanov, S. (1984), "Characterization of antibacterial substances in honey", Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 17(2): 74–76.

Brawn, C. (1960), "Palynological Techniques. Baton Rouqe", *London,* 188.

Cameron, I.L., Munoz, J., Barnes, J.C., Hardman, E.W. (2003), "High dietary level of synthetic vitamin E on lipid peroxidation, membrane fatty acid composition and cytotoxicity in breast cancer xenograft and in mouse host tissue", Cancer Cell Int., 3, 3.

Carneiro, M.R. , Dias, M.M., De-Oliveira, A.C.A.X. (2005), "Paumgartten J.R., Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of α-bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay", Laboratory of Environmental Toxicology, Department of Biological Sciences, National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Brasil 4036, Rio de Janeiro, RJ 21040-361, Brazil.

Chai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004), "Antioksidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer", Life Science, 74, 2157-2184.

Cherghton, H. C. (1974), "Bees and People", *MIR Publishers,* Moscow.

Chuang, S.E., Cheng, A.L, Lin, J.K., Kuo, M.L. (2000), "Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, inflammation, cellular gene products and cell-cycle-related proteins in rats", Food Chem. Toxicol., 38(11), 991-995.

Cook, N.C. and Samman, S. (1996), "Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources", Journal of Nutritional Biochemistry, 7(21), 66–76.

Crane, E. (1978), "Honey", International Bee Research Association, *Morrison and Gibb Ltd.,* Edinburgh, 277.

Crane, E. (1984), "Bees: Honey and Pollen as Indicators of Metals in the Environment", *Bee World*, 65 (1):47-49.

Crane, E. (1996), "The Past and Present Importance of Bee Products to Man", *Bee Products Properties Applications and Apiterapy*, 1-1

Croft, L.R.(1987), “Stable isotope mass spectrometry in honey analysis. Trends in Antibacterial Chemistry”, 6, 206–209.

Çakmak, İ. (2001), “Apiterapi (Polen)”, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, Bursa, 1(3):38-39.

Dalgıç, R., “Türkiye Ege Bölgesi Ballarının Biyokimyasal ve Palinolojik Yönden İncelenmesi”, Doktora Tezi, ***Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** İzmir, 3-4 (1994).

Davis, P. H. (1965-1988), ”Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 1-9”, *Edinburgh University Press,* Edinburgh.

Dean, B. J., Brooks, T. M., Hodson –Walker., G., Hutson, D. H. (1985), “Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals”, Mutation Research, 153, 57-77.

Deodikar, G. B. (1965), “Melittopalynology”, *Indian Bee Journal,* 27: 59-72.

Doğan, C. Ve Sorkun, K. (2001), “Türkiye’nin Ege, Marmara, Akdeniz ve Karadeniz Bölgelerinden Toplanmış Ballarda Polen Analizi”, *Mellifera,* 1(1): 2-12.

Dustmann, J H. (1979), “Antibacterial effect of honey”. *Apiacta,* 14(1): 7-11.

Evandri, M.G., Battinelli, L., Daniele, C., Mastrangelo, S., Bolle, P., Mazzanti, G. (2005), “The antimutagenic activity of Lavandula angustifolia (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay”, Department of Human Physiology and Pharmacology, University La Sapienza, P.le Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy, Department of Human Physiology and Pharmacology, Medical School, University of Bari, Policlinico, Bari, Italy.

Fenech, M. (2001), “Recommended dietary allowances (RDAs) for genomic stability”, Mutation Research, 480-481, 51-54.

Ferreres, F. Ortiz, A., Silva, A. Garcia-Viguera, C., Tomas-Barberan, F.A. and Tomas-Lorente, F. (1992), “Flavonoids of La Alcarria honey. A study of their botanical origin”, Zeitschrift für Lebensmıtttel-Unterssuchung und-Forschung, 194, 139–143.

Gemici, Y. (1991). “İzmir Yöresi Ballarında Polen Analizi”, *Doğa Türk-Journal of Botany,* 15: 291-296.

Gentile, M.J., Rahimi, S., Zwiesler, J., Gentile, J.G., Ferguson, L.R. (1998), “Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents”, Mutation Research, 402,289-298.

Gheldof, N., Wang, X-H., and Engeseth, N.J. (2002), “Identification and quantification of an antioxidant components of honeys from various floral sources”, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50, 5870–5877.

Gribel, N., Pashinskii VG. (1990), "The antitumor properties of honey", Vapor Onkol. 36 (36): 704-709.

Halliwell, B and Gutteridge, J.M.C. (1989), "Free radicals in biology and medicine", Oxford, UK: Calendon Pess, 51–57.

Ham, S., Kim, S.H., Moon, S.Y., Chung, M.J., Cui, C.B., Han, E.K., Chung, C.K., Choe, M. (2009), "Antimutagenic effects of subfractions of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) Extract", Department of Food Science and Biotechnology, School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea.

Hamzaoğlu, I., Sarıbeyoğlu, K., Durak, H., Karahasanoğlu, T., Bayrak, I., Altuğ, T., Şirin, F., Sarıyar, M. (2000), "Protective covering od surgical wounds with honey impedes tumor implantation", Arch. Surg. 135 (12): 1414-7.

Haroun, M.I., (2006), "Türkiye'de Üretilen Bazı Çiçek Ve Salgı Ballarının Fenolik asit ve flavonoid profilinin belirlenmesi", Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim dalı Doktora Tezi.

Hayder, N., Skandrani, I., Kilani, S., Bouhlel, I., Abdelwahed, A., Ben Ammar, R., Mahmoud, A., Ghedira, K., Ghedira L. (2007), "Unité de Pharmacognosie/Biologie Moléculaire 99/UR/07-03", Faculté de Pharmacie de Monastir, Rue Avicenne, 5000 Monastir, Tunisia Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté de Médecine Dentaire de Monastir, Rue Avicenne, 5000 Monastir, Tunisia.

Huang, L. E., Zhang, H., Bae, S. W. and Liu, A. Y. C. (1994), "Thiol reducing reagents inhibit the heat shock response: Involvement of a redox mechanism in the heat shock signal transduction pathway", J Biol Chem, 269, 30718-30725.

Iarc,L. (1980), "Monographs on the carcinogenic risks of chemicals to humans. supp. z. Long Term Screening Assays For Carcinogens", A Critical Appraisal, IARC Monographs Supplement 2. IARC Lyon, International Agency For Research on Cancer.

İnci, A. (1985), "Dünyada arıcılık", *Teknik Arıcılık*, 2: 2-6.

İpek, E., Zeytinoğlu, H., Okay, S., Tüylü, BA., Kürkcüoğlu, M., and Başer, KHC. (2005), "Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test", Food Chemistry, 93:551-556.

Jose, M., Demalsy, F., Parent, J. And Alexander, A. S. (1989), "Microscopic Analysis of Honey from Manitoba, Canada", *Journal of Apicultural Research*, 28(1): 41-49.

Kaur, S., Arora, S., Kaur, K., Kumar, S. (2002), "The in vitro antimutagenic activity of Triphala- an Indian herbal drug", Food and Chemical Toxicology, 40, 527-534.

Kapp, R. O. (1969), "How to Know Pollen and Spores", *W. C. Brown Company Publishers*, Iowa, 249.

Krell, R. (1996), "Value-Added Products from Beekeeping", *FAO Agricultural Services Bulletin*, Honey, 16-93.

Lau, B.H.S., Tadi, P.P. ve Tosk, J.M. (1990), "*Allium sativum* (sarımsak) ve cancer prevention, Nutrition Research", 10: 937-948.

Lien, E.J., and Li, W.Y. (1985), "Structure Activity Relationship Analysis of Anti-Cancer Chinese Drugs and Related Plants", Long Beach, CA: Oriental Healing Arts Institu

Lieux, M. H. (1972), "A Melissopalynological Study of 54 Lousiana (USA) Honeys", *Review of Palaeobotany and Palynology*, 13: 95-124.

Loh, D.S.Y., Er, H.M., Chen, Y.S. (2009), "Mutagenic and antimutagenic activities of aqueous and methanol extracts of Euphorbia hirta", School of Pharmacy and Health Sciences, International Medical University, No. 126, Jalan 19/155B, 57000 Bukit Jalil, Kuala Lumpur, Malaysia.

Louveaux, J., Maurizio, A. And Vorhwohl, G. (1970), "Method of Melissopalgnology", *Bee World*, 51: 125-138.

Maron, D. M., Ames, B. N. (1983), "Revised methods for the mutagenicity test", Mutat. Res., 113, 173-215.

Maurizio, A. (1951), "Pollen Analysis of Honey", *The Bee World*, 32 (1): 1-6.

Mc Cann, J., Ames, B. N. (1976), "Detection of Carcinogens as Mutagens in The Salmonella/microsome Test: Assay of 300 chemicals: Discussion", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 950-954.

Moar, N. T. (1985), "Pollen Analysis of New Zealand Honey", *Journal of Agricultural Research*, 28: 38-70.

Moore, D., Webb, J. A. And Collinson, M. E. (1991), "Pollen Analysis", *Blackwell Scientific Publications*, London, U.K., 216.

Mortelmans, K. and Zeiger, E. (2000), "The Ames *Salmonella/* mikrosome mutagenicity assay" Mutation Research, 455, 29-60.

Nakasugi,T., Nakashima, M., Komait, K. (2000), "Antimutagens in Gaiyou (*Artemisia argyi* Levl. et Vant.)", J. Agric. Food Chem., 48, 3256 -3266.

Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., Jena, B.S. (2003), "Antioxidant ve antimutagenic activities of pomogrenate peel extracts", Food Chemistry, 80, 393-397.

Nogueira, M.E.I., Passoni, M.H., Biso, F.I., Longo, M.C., Cardoso, C.R.P., Santos, L.C., Varanda, E.A. (2005), "Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of Melampodium divaricatum in Salmonella typhimurium", Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, Estadual Paulist University, UNESP—Rodovia Araraquara-Jau´ km 1, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil.

Oddo, L. P., Stefanini, R., Piazza, M. G. And Accorti, M. (1988), "Diagnosis of unifloral honeys, III. Application of a Statistical Approach to Honey Classification", *Journal of Apicultural Research*, 4: 27-38.

Ötleş, S. (1995), "Bal ve Bal Teknolojisi", *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları*, İzmir, 89.

Özbek, T. , Güllüce, M., Şahin, M. , Sevsay, S. , Barış, Ö. (2008), "Investigation of the Antimutagenic Potentials of the Methanol Extract of *Origanum vulgare L. Subsp. vulgare* in the Eastern Anotolia Region of Turkey" Turk Journal of Biological.

Pehlivan, S. (1995), "Türkiye'nin Alerjen Polenler Atlası", *Ünal Offset Matbaacılık Sanayi ve Ticaret Ltd. Şirketi,* Ankara, 191.

Petek, M. (1999), "İstanbul Boğazındaki toplam kirliliğin canlılardaki mutajenik etkilerinin, Salmonella/ mikrozom test sistemi ile araştırılması", Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü, İstanbul.

Pınar, N.M., Akgül, G. Ve Tuğ, G.N. (2003), "Palinoloji Laboratuvar Kılavuzu", *Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Döner Sermaye İşletmesi Yayınları*, Ankara, 6-32.

Rashed, M.N. ve Soltan, M.E. (2004), "Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral and non-floral bee", J. Food Comp. Anal., 17,6 725-735.

Raucher, R., Edenharder, R., Platt, K.L., 1998. In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. Mutation Research, 413, 129- 142.

Riboli, E. ve Norat, T. (2003), "Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk", Am,J.Clin.Nutr., 78, 3 559-569.

Roncada,T., Vicentini, V.E.P.,Mantovani,M.S. (2004), "Possible modulating actions of plant extracts on the chromosome breaking activity of MMC and in human lymphocytes in vitro", Toxicology in Vitro ,18, 617–622.

Rosin, M.P. and Stıch, H.F. (1979), "Assesment of the use of the *Salmonella* mutagenesis assay to determine the influence of antioksidants on carcinogen-induced mutagenesis", Int. J. Cancer, 23, 722-727.

Rovado, T., Vicentini, V.E.P., Mantovani, M.S. (2004), "Possible modulating actions of plant extracts on the chromosome breaking activity of MMC and Ara-C in human lymphocytes in vitro", Toxicology in Vitro, 18(5),617-22.

Russel, K.M. (1983), "The antibacterial properties of honey", M.Sc. Thesis, University of Waikato, New Zealand.

Sato, T. And Miyata, G. (2000), "The Nutraceutical Benefit part:3 Honey", *Nutrition,* 16: 468-469.

Silici, S. (2004), "Türkiye'nin Farklı Bölgelerine Ait Örneklerinin Kimyasal ve Palinolojik Özellikleri". *Mellifera* 4(7):12-18.

Sorkun, K. (1987), "Arı Ürünleri", *Bilim Teknik Dergisi*, 20: 20-21.

Sorkun, K. (2002), "Honey Origin and Types from Turkey", *The First German Congress for Bee Products and Apitherapy*, Passau, Deutschland, 62.

Sorkun, K., Doğan, C., Gümüş, Y., Başoğlu, N., Bulakeri, N. Ve Ergün, K. (1999), "Türkiye'de Üretilen Doğal ve Yapay Kaynaklı Balların Ayırt Edilmesine Esas Olacak Fiziksel, Kimyasal ve Palinolojik Kriterlerin Belirlenmesine Yönelik Araştırmalar'', *Tübitak Tarım, Orman ve Gıda Teknolojileri Araştırma Grubu, Proje no:TOGTAG-1270*, Bursa, 110.

Sorkun, K., Güner, A. ve Vural, M. (1989), "Rize Ballarında Polen Analizi", *Doğa Türk Botanik Dergisi*, 13 (3): 547-554.

Sotto, A.D., Vitalonea, A., Nicoletti, M., Piccinb, A., Mazzanti, G. (2010), "Pharmacological and phytochemical study on a *Sisymbrium officinale Scop*. Extract", Journal of Ethnopharmacology 127: 731–736.

Sönmez, R. Ve Altan, Ö. (1992), "Teknik Arıcılık", *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, Bornova, İzmir, 246.

Stavric, B. (1994), "Antimutagens and anticarsinogens in foods", Food and Chemical Toxicology, 32 (1): 79-90.

Swellam, T., Miyanaga, N., Onozawa, M., Hattori, K., Kawai, K., Shimazui, T., Akaza, H. (2003), "Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: in vivo and in vitro studies", International Journal Urology. 131-139.

Tunç, B. (2004), "Hadim, Taşkent (Konya), Sarıveliler (Karaman) Yöresi Ballarında Polen Analizi", Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, 90.

Türker, M. (1993), "Gümüşhane Ballarında Polen Analizi", Yüksek Lisans Tezi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Van, 35.

Ünlü, E. (1994), "Bursa'da Pazarlanan Ballar Üzerine Kimyasal ve Palinolojik Araştırmalar", Doktora Tezi, *Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Bursa, 2-6.

Wang, X.H., Andrae, L., and Engeseth, N.J. (2002), "Antimutagenic Effect of Various Honeys and Sugars against Trp-p-1", Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois, Urbana, Illinois 61801.

Warakomska, Z. And Jaroszynska, T. (1992), "Analysis of the Honeydew Honey's Roztocze", *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe,* 36: 149-156.

Yao, L., Jiang, Singanusong, R., Data, N., Raymont, K. (2004), "Phenolic acids and abscisic acid in Australian Eucalyptus honeys and their potential for floral authentication", Food Chem., 86, 2, 169 – 177.

Yurtsever, N. (2004), "Kemaliye-Erzincan Yöresinde Üretilen Balların Mikroskobik, Kimyasal ve Organoleptik Analizleri ile Balın Fizikokimyasal Özelliklerinin Saptanması", Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Ankara, 113.

Zeina, B., Othman, O., Assad, S. (1996), "Effect of honey versus thyme on Rubella virus survival in vitro", J. Altern Complement Med. 2 (3): 345-348.