T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI BİTKİ GELİŞİM DÜZENLEYİCİLERİN SALMONELLA / MİKROZOM TEST SİSTEMİNDE MUTAJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ahmet UYSAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

KONYA - 2006

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI BİTKİ GELİŞİM DÜZENLEYİCİLERİN SALMONELLA / MİKROZOM TEST SİSTEMİNDE MUTAJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ahmet UYSAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Bu tez 13/12/2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf DURAK
(Danışman)

Yrd. Doç. Dr Rüstem DUMAN
(Üye)

Yrd. Doç. Dr. Birol ÖZKALP
(Üye)

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

BAZI BİTKİ GELİŞİM DÜZENLEYİCİLERİN SALMONELLA / MİKROZOM TEST SİSTEMİNDE MUTAJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ahmet UYSAL

Selçuk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yusuf DURAK

2006, XII + 58 sayfa

Jüri: Prof. Dr. Yusuf DURAK

: Yrd. Doç Dr. Rüstem DUMAN

: Yrd. Doç. Dr. Birol ÖZKALP

Bu çalışmada, bitki gelişim düzenleyicileri olarak kullanılan; 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), 4-Klorofenoksiasetik asit (4-CPA) ve Betanaftoksiasetik asit (BNOA), mutajenik aktiviteleri yönünden Salmonella / mikrozom test sisteminde incelenmiştir. Çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının standart mutasyonları kontrol edilmiştir. Suşların zamana bağlı absorbans ve üreme durumları belirlenmiştir. Kullanılan 2,4-D, 4-CPA ve BNOA'nın toksik olmayan dozları hesaplanmıştır. Denemeler *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında, hem metabolik aktivasyonlu (S9) hem de metabolik aktivasyonsuz şartlarda yapılmıştır. Toksik olmayan dozlarla yapılan denemelerde belirlenen revertant sayıları; kontrol plaklarındaki revertantlarla karşılaştırılmıştır. Metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda revertant sayılarında önemli bir artış gözlenmemiştir. Elde edilen bulgulara dayanılarak 2,4-D, 4-CPA ve BNOA'nın Salmonella / mikrozom test sisteminde mutajen veya promutajen olmadıkları sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Mutajenite, *Salmonella typhimurium*, Bitki gelişim düzenleyiciler, Salmonella / mikrozom testi.

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF MUTAGENIC EFFECTS OF SOME PLANT GROWTH REGULATORS ON SALMONELLA / MICROSOME TEST SYSTEM

Ahmet UYSAL

Selcuk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Yusuf DURAK

2006, XII + 58 pages

Jury: Prof. Dr. Yusuf DURAK

: Assist. Prof. Dr. Rüstem DUMAN

: Assist. Prof. Dr. Birol ÖZKALP

In this study, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 4-Chlorophenoxyacetic acid (4-CPA) and Beta naphthoxyacetic acid (BNOA) used as plant growth regulators were investigated for their mutagenic activity in Salmonella / microsome test system. Standard mutations of *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 strains used in this study were controlled. The reproduction state and absorption of strains depend on time were determined. Nontoxic doses of 2,4-D, 4-CPA and BNOA used in the assays were estimated. Assays were carried out on the *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 strains in the conditions both with and without metabolic activation (S9). Numbers of revertant determined in the assays performed with nontoxic doses compared to those of control plates. A significant increasing in numbers of revertant were not observed in the presence or absence of metabolic activation (S9). Based on the results, it was concluded that 2,4-D, 4-CPA

and BNOA were not mutagen or promutagen in the Salmonella / microsome test system.

Key Words: Mutagenicity, *Salmonella typhimurium*, Plant growth regulators, Salmonella / microsome test.

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2003-2006 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Çalışmada bazı bitki gelişim düzenleyicilerin, Salmonella / mikrozom test sisteminde mutajenik etkileri araştırılmıştır. Laboratuvar çalışmaları S.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışma konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren danışmanım sayın Prof. Dr. Yusuf DURAK'a (S.Ü. Fen-Edb. Fak.), Biyoloji Bölümünün her türlü araştırma imkânlarından faydalanmamı sağlayan, Prof. Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK'e (S.Ü. Fen-Edb. Fak. Biyoloji Bölüm Başkanı), bakteri suşlarını sağlayan Prof. Dr Sanver EKMEKÇİ (Ege Üniv. Fen Fak.) ve Prof. Dr Muhsin KONUK'a (Afyon Kocatepe Üniv. Fen-Edb. Fak.), test sisteminde karşılaştığım sorunların giderilmesinde yardımcı olan Prof. Dr Nuran DİRİL'e (Hacettepe Üniv. Fen Fak.) ve Arş. Gör. Recep LİMAN'a (Afyon Kocatepe Üniv. Fen-Edb. Fak.), çalışmalarım sırasında her türlü yardımlarını benden esirgemeyen bölümümüz araştırma görevlileri Dr. Haluk ÖZPARLAK, Dr. Hakkı DEMİRELMA, Dr. Sinan AKTAŞ ve Dr. Tuna UYSAL'a, tez çalışmamın her aşamasında daima benimle birlikte çalışan arkadaşım Mehmet DEMİRALAY'a, laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan lisans öğrencileri Mustafa ÖZKAN ve Süleyman ŞAFAK'a, maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

.

Bu çalışmayı **06101016** nolu proje ile destekleyen S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Ahmet UYSAL

2006

İÇİNDEKİLER

ÖZET ---------- iii
ABSTRACT ---------- v
ÖNSÖZ ---------- vii
İÇİNDEKİLER ---------- viii
ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER LİSTESİ ---------- x
SİMGELER VE KISALTMALAR ---------- xii

1. GİRİŞ ---------- 1

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI ---------- 5

3. MATERYAL ve METOT ---------- 20

3.1. Materyal ---------- 20
3.1.1. Kullanılan test suşları ---------- 20
3.1.2. Kimyasal maddeler ---------- 21
3.1.3. Besiyerleri, tamponlar ve çözeltiler ---------- 21

3.2. Metot ---------- 26
3.2.1 Test suşlarının üretilmesi ---------- 26
3.2.2. Test suşlarının genetik işaretlerinin kontrolü ---------- 27
3.2.3. Kendiliğinden geri dönen koloni sayısının kontrolü ---------- 31
3.2.4. Master plakların hazırlanışı ---------- 33
3.2.5. S9 karışımının hazırlanması ---------- 33
3.2.6. Sitotoksik dozun hesaplanması ---------- 33
3.2.7. Pozitif kontrol ---------- 34
3.2.8. Negatif kontrol ---------- 35
3.2.9. Salmonella/Mikrozom mutajenite testi ---------- 35
3.2.9 Sonuçların değerlendirilmesi ---------- 36

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ---------- 37

4.1. Test Suşlarının Üreme Durumları ---------- 37

4.2. Sitotoksik Dozun Belirlenmesi ---------- 39

4.3 Salmonella / Mikrozom Mutajenite Testi Sonuçları ----------40

5. TARTIŞMA ve SONUÇ----------43

6. KAYNAKLAR----------51

ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 3.1.1 Ames test sisteminde kullanılan diğer Salmonella suşları ve genetik özellikleri.....20
Şekil 3.2.2.1. *S. typhimurium* TA 98'in histidin gereksinim kontrolü sonucu a) Histidin/ biyotin agarda üreme (+), b) Biyotin agarda üreme (-). 27
Şekil 3.2.2.2. *S. typhimurium* TA 100'ün histidin gereksinim kontrolü sonucu a) Histidin/ biyotin agarda üreme (+), b) Biyotin agarda üreme (-). 27
Şekil 3.2.2.3. *S. typhimurium* TA 98'in R faktör varlığının kontrolü Ampisilin (10µg'lık) diskleri varlığında inhibisyon zonu gözlenmemiştir.....28
Şekil 3.2.2.4. *S. typhimurium* TA 100'ün R faktör varlığının kontrolü Ampisilin (10µg'lık) diskleri varlığında inhibisyon zonu gözlenmemiştir.....28
Şekil 3.2.2.5. *S. typhimurium* TA 98'de rfa mutasyonu kontrolü (14 mm çapında inhibisyon zonları görülmüştür). 29
Şekil 3.2.2.6. *S. typhimurium* TA 100 de rfa mutasyonu kontrolü (14 mm çapında inhibisyon zonları görülmüştür). 29
Şekil 3.2.2.7. *S. typhimurium* TA 98'de uvrB mutasyonu kontrolü a) Kontrol plağı üreme (+), b) Test plağı üreme (-) 30
Şekil 3.2.2.8. *S. typhimurium* TA 100'de uvrB mutasyonu kontrolü, a) Kontrol plağı üreme (+), b) Test plağı üreme (-) 30
Şekil 3.2.3.1. *S. typhimurium* TA 98'in minimal glukoz agar plaklarında oluşturduğu revertant koloniler.....32
Şekil 3.2.3.2. *S. typhimurium* TA 100'ün minimal glukoz agar plaklarında oluşturduğu revertant koloniler 32
Şekil 3.2.7. 1 *Salmonella typhimurium* TA 98'de 2-Aminoflouren'in mutajenik etkisi a) S9 yokluğunda mutajenik etki (-), b) S9 varlığında mutajenik etki (+).....34
Şekil 3.2.7.2. *Salmonella typhimurium* TA 100'de S9 yokluğunda Sodyum Azid'in mutajenik etkisi (+).....34
Çizelge 4.1. *Salmonella typhimurium* TA 98'in zamana göre absorbans değerleri ve üreme durumu.....38

Şekil 4.1. *Salmonella typhimurium* TA 98'in zamana göre absorbans değerleri ve üreme durumlarının karşılaştırılması 38
Çizelge 4.2 Azalan seviyelerdeki dozlara göre plak başına oluşan koloni sayısı. 39
Çizelge 4.3.1. *Salmonella typhimurium* TA 98 ile denenen bazı bitki gelişim düzenleyicilerin (S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda) plak inkorporasyon testi sonuçları. 41
Çizelge 4.3.2. *Salmonella typhimurium* TA 100 ile denenen bazı bazı bitki gelişim düzenleyicilerin (S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda) plak inkorporasyon testi sonuçları. 42

SİMGELER VE KISALTMALAR

g ……	gram
mg …….	miligram
ml……	mililitre
l……...	litre
µg……	mikrogram
µl…….	mikrolitre
µM……...	mikromolar
mM……..	milimolar
M…….	molar
^{0}C……	santigrad derece
ppm…….	milyonda bir kısım
rpm……..	dakikadaki devir sayısı
LD_{50}……	yarıyarıya öldürücü doz

1. GİRİŞ

Çağdaş teknoloji insanlara sunduğu kolaylıkların yanı sıra, büyük bir sorun olan çevre kirliliğini de beraberinde getirmekte ve bu durum canlı organizmaların tümünü olumsuz yönde etkilemektedir. Doğadaki canlılar; günlük yaşamlarında doğal ya da sentetik kimyasal maddelerle etkileşim içerisindedirler.

Canlı yapısına herhangi bir yolla giren yabancı ajanlara"ksenobiyotik'' (Yunanca: xenos = yabancı) denir. Sağlık açısından önemli ksenobiyotik sınıflarına; ilaçlar, kimyasal karsinojenler, poliklorlu bifeniller ve insektisitler örnek verilebilirler. Çevreye kontrolsüz olarak dağılan ksenobiyotiklerin canlı yapısına girmesi sonucunda; kalıtımsal doğum bozuklukları, kalp hastalıkları, yaşlanma, katarakt ve gelişimsel doğum bozuklukları gibi sorunlara neden olmakta, ayrıca bu ajanların çeşitli kanser türlerinin temel nedeni olduklarına ilişkin hipotezler, gün geçtikçe daha fazla kabul görmektedirler (Murray ve ark. 1996).

Kimyasal mutajenler, DNA molekülünde neden oldukları değişimlere göre üç tipe ayrılırlar. Birinci grupta yer alanlar, tahrip edici mutajenlerdir ve bunlara örnek olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) ile nitröz asidi verilebilir. Nitröz asit; bakteri ve mantarlarda mutajeniktir. İnsanlarda ise mutajenik potansiyeli yoktur. İnsan için tehlikesi nitrat tuzları ile mide asiditesinde oluşan nitröz asidin, sekonder ve tersiyer aminlerle kuvvetli nitröz aminleri oluşturması ile ilgilidir. İkinci grupta yer alan mutajenler, bağlanma şeklinde etki gösterenlerdir ve bunlara alkillendirici etkenler örnek verilebilir. Alkil gruplarını DNA molekülüne eklerler yani alkillendirirler. Histolojide nükleik asitlerin boyanmasında kullanılan akridin boyaları DNA moleküllerine eklenerek mutasyona neden olurlar. Akridinler, DNA üzerinde bağlanarak kompleks oluştururlar. Bu durumda iki baz arasındaki mesafe açılmaktadır. DNA replikasyonunda bu açılmış yerin karşısına, yeni sentez edilen DNA ipliğinden yeni bir baz yerleşir. Böylece mutasyon oluşur. Üçüncü grupta ise yerini alma şeklinde etki gösteren mutajenler bulunur. DNA yapısında değişmeye neden olan bu kimyasal mutajenlere nükleik asit baz analogları örnek verilebilir (Vural 1984).

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

Kimyasal maddelerin karsinojenik risklerini ortaya çıkarmak için en akılcı 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 madde verildikten sonra, bu hayvanlarda tümör oluşması oldukça uzun zaman almakta ve bu testlerin maliyetleri yüksek olmaktadır (IARC Lyan 1980). Bu nedenle, kimyasalların mutajenik etkilerini belirlemeye yönelik, kısa sürede sonuç verebilen ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı mutajenite test sistemleri geliştirilmiştir. Zaman açısından en pratik ve hızlı cevap veren test sistemleri genellikle bakteriyel testlerdir. Bu testlerin tercih edilme nedeni ; bakterilerin kolayca sağlanabilen vasatlarda hızlı üremeleri, üretim maliyetlerinin düşük olması ve uygulama kolaylıkları sunmasıdır (Hofnung ve Quillardet 1986).

Karsinojenlerin araştırılmasında mutajenitenin temel teşkil etmesinin iki önemli nedeni vardır:

1- Genetik kodun ve genetik sistemin evrensel oluşu,

2- Karsinojenite ile mutajenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşu (de Serres 1976, Ramel ve Rannug 1980).

Kimyasal maddelerin biyolojik aktivitelerine bağlı olarak meydana gelen mutasyon, kanser ile doğrudan ilgilidir. Genellikle doğrudan veya metabolize edildikten sonra karsinojenik etki gösteren tüm maddelerin, aynı zamanda mutajenik etki gösterecekleri kabul edilmektedir. Tüm mutajenik maddelerin karsinojenik etki göstermeleri beklentisi ise bazen gerçekleşmemektedir. Bakteriyel test sistemlerinde mutajen olduğu saptanan birçok bileşiğin aynı zamanda karsinojen olup olmadığı

300 kimyasal madde kullanılarak, Salmonella / mikrozom test sistemi ile araştırılmış; 175 karsinojen maddenin 157 tanesinin mutajenik etkili, karsinojenik etki göstermeyen 108 maddenin 94 tanesinin mutajenik etkili olmadığı saptanmıştır. Görüldüğü gibi karsinojen etki gösteren bileşiklerin % 90'ı mutajenik, karsinojen olmayan bileşiklerin % 87'sinin de mutajenik etki göstermediği bulunmuştur (Mc Cann ve Ames 1976).

Bakteriyel test sistemlerinin kullanım amaçlarından bazılarını şöyle sıralayabiliriz;

- Çeşitli kimyasalların potansiyel karsinojenitelerinin incelenmesinde,
- Kompleks karışımlardan, biyolojik olarak etkin bileşiklerin belirlenmesinde,
- Prokarsinojenlerin öncül ya da son metabolitlerinin saptanmasında,
- Vücut sıvılarının ve atıklarının test edilmesiyle, insanların mutajen ve karsinojenlere maruz kalma düzeylerinin izlenmesinde,
- Kimyasalların mutajenik etki mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalarda,
- Konakçılar üzerinde yapılan deneylerde,
- Karsinojen ve mutajenlerin neden olduğu özgül DNA hasarlarının tiplerini saptamada bakteriyel test sistemleri kullanılmaktadır (Öksüzoğlu 2000).

Kısa zamanlı bakteriyel test sistemleri, karmaşık kimyasal örneklerdeki mutajenik bileşiklerin ve metabolik aktivasyon sonucu ortaya çıkan reaktif bileşenlerin saptanmasında analitik araçlar haline gelmişlerdir (Hedenstedt ve ark. 1977). Bununla birlikte, kısa zamanlı test sistemlerinin hiçbiri tek başına karsinojenleri mutajen olarak tanımlamada yeterli değildir. Çünkü bu testlerin her biri yalnızca birkaç mutajeni tanımlayabilir. Bu nedenle özellikle birkaç test sisteminin bir arada kullanıldığı "**bateri**" test sistemleri, karsinojenlerin saptanmasında oldukça yüksek oranda seçici olmaktadır (Pandita 1988, Mc Daniels ve ark. 1990).

Salmonella mikrozom test sistemi, gen mutasyonlarının oluşumunda öncülük edebilecek genetik hasarların, meydana gelişine sebep olabilecek maddelerin tespit edilmesinde geniş ölçüde kabul gören kısa zamanlı bakteriyel test sistemidir. Dr. B. Ames tarafından geliştirilmiş bir sistem olup kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini araştırmak amacıyla standardize edilmiş ve günümüzde en fazla kabul gören bir yöntemdir (Maron ve Ames 1983, Mortelmans ve Zeiger 2000). Bu testte,

önceden meydana gelmiş ve bakteri gelişimi için gerekli olan histidin amino asidinin sentezine engel teşkil eden mutasyonlar içeren *Salmonella* suşları kullanılır. Böylece histidin yokluğunda mutant suşlar büyüyemez ve koloni oluşturamazlar. Önceden mutasyon geçirmiş gen bölgelerinde meydana gelebilecek yeni mutasyonlar, gene histidin sentezleme fonksiyonunu yeniden kazandırabilir ve hücre gelişimine izin verir. Test edilen kimyasal maddenin *Salmonella typhimurium* His (-) (histidin okzotrofu) mutantlarını His (+) (prototrof; yabani tip) haline çevirme gücü ölçülmektedir. Bu nedenle, Salmonella/mikrozom testi geri dönüşüm çalışmalarında iyi bir başvuru yöntemidir.

Sera koşullarında domates, patlıcan, biber ve kabak gibi birçok bitkisel üretimde hormon kullanılmaktadır. Hormonların bilinçsiz ve gelişi güzel kullanımı ile ilgili kuşkular gün geçtikçe artmaktadır. Bu çalışmadaki amaç; zirai çalışmalarda (özellikle seracılık) geniş bir kullanım alanına sahip olan bazı bitki büyüme ve gelişim düzenleyicilerin saf formlarının kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden olan Salmonella / mikrozom test sistemlerinde, mutajenik etkilerini araştırmaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Ames testi, 1970'lerin başlarında Bruce Ames tarafından geliştirilen ve daha sonra yaygın olarak kullanım alanı bulmuş olan kısa zamanlı, bir geri mutasyon testidir (Maron ve Ames 1983). Salmonella / mikrozom testi bakteriyel test sistemleri içinde detayları en iyi bilinen ve karakterize edilen, geçerliliği uygulama kolaylığı ve duyarlılığı nedeniyle en fazla kabul görerek tercih edilen ve günümüzde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Gatehouse ve ark. 1998). Bu testte, histidin operonunda bulunan çeşitli genlerdeki farklı mutasyonlar içeren *Salmonella* suşları kullanılır. Bu suşlarda meydana getirilen ilave mutasyonlar, çok çeşitli maddelere karşı bakteriyi daha duyarlı hale getirir. Bu suşlar *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan invitro mutasyonlarla elde edilmişlerdir. (Mortelmans ve Zeiger 2000).

Histidin mutasyonu

Her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar ya DNA'daki tek bir bazın değişmesi ile ortaya çıkan baz değişimleri ya da bir bazın eklenmesi ya da çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonlarıdır. Test edilen bileşiğin neden olduğu mutasyonun esas mekanizması, moleküler düzeyde bu suşlarla gösterilebilir (Ames ve ark. 1973b).

S. typhimurium his (-) (histidin gereksinimi olan) mutantlarının DNA baz dizilimi analizleri yapılarak mutasyonların yerleri ve karakterleri saptanmıştır (Maron ve Ames 1983).

S. typhimurium TA 100 ve *S. typhimurium* TA 1535 suşlarında bulunan His G46 mutasyonu, histidin biyosentezindeki ilk enzimi kodlayan his G geni üzerindedir. Bu mutasyon, his G geninde, lösin amino asidinin kodonu olan $\begin{matrix}-\text{GAG}-\\-\text{CTC}-\end{matrix}$ yerine prolin amino asidinin kodonu olan $\begin{matrix}-\text{GGG}-\\-\text{CCC}-\end{matrix}$'nin gelmesine neden olur. *S. typhimurium* TA 1535 ve *S. typhimurium* TA 100 suşu, baz çifti değişmesine neden olan mutajenler tarafından geri döndürülür (Ames 1972, Maron ve Ames 1983).

His D 3052 mutasyonu, *S. typhimurium* TA 1538 ve *S. typhimurium* TA 98 test suşlarında bulunur ve histidinolü histidine çeviren histidin biyosentezindeki son

enzim olan histidinol dehidrogenazı kodlayan his D geni üzerindedir. His D 3052 mutasyonu çerçeve kayması tipinde bir mutasyon olup, tek bir nükleotidin eksikliği (çerçeve kayması) sonucu oluşmuştur. His D 3052 mutasyonu, His D geni içinde, $\begin{matrix} -GCGCGCGC- \\ -CGCGCGCG- \end{matrix}$ dizilimi olan, 8 kere tekrarlanan GC dizisine sahiptir ve bu dizi -1 çerçeve kayması mutasyon bölgesinin yanındadır (Isono ve Yourna 1974). Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler, DNA'nın tekrarlanan diziler ya da sıcak noktalar denilen bölgelerinde görülen kodon kaymalarını geri döndürerek bu kodonların yeniden doğru okunmalarını sağlarlar (Ames ve ark. 1972). *S. typhimurium* TA 1538 ve TA 98 suşları, çerçeve kayması tipi mutasyonlara neden olan mutajen maddeler ile tekrar his (+) hale geri döndürülmektedir (Maron ve Ames, 1983). Genel mutajenite testleri için, birincil test suşları da denilen *S. typhimurium* TA 97, TA 98, TA 100 ve TA 102 suşları kullanılmaktadır. *S. typhimurium* TA 1535 ve TA 1538 suşları araştırıcının isteğine bağlı olarak *S. typhimurium* TA 100 ve TA 98 suşlarına yardımcı olmak için kullanılabilmektedir. *S. typhimurium* TA 1535, *S. typhimurium* TA 100 suşundan oldukça az kendiliğinden mutasyon sıklığına sahiptir. *S. typhimurium* TA 1538, 4-nitro-o-fenilendiamin gibi çerçeve kaymasına neden olan bazı aromatik mutajenlerin ortaya çıkarılmasında uygun olmakla birlikte bu suş, *S. typhimurium* TA 98'e çok benzediğinden genel taramalarda bunun yerine *S. typhimurium* TA 98 suşu kullanılmaktadır (Maron ve Ames 1983).

Başlangıçta geliştirilen his (-) mutantlarının çeşitli kimyasallara karşı duyarlılığını artırmak üzere, bu suşlara aşağıda belirtilen bazı mutasyonlar eklenmiştir.

rfa mutasyonu

Bu mutasyon, bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelir. Hücre duvarının lipopolisakkarit bariyerinin kısmen yok olmasını sağlayan rfa mutasyonu sonucu, normalde hücre duvarından geçemeyen büyük moleküllerin hücre içine girişi kolaylaşmıştır.

uvrB mutasyonu

DNA onarım sisteminde kesip çıkarma (=excision repair) görevini üstlenen enzimi kodlayan uvrB genindeki delesyon sonucu oluşmuştur. uvrB mutasyonu,

birçok mutajenin ortaya çıkarılmasında duyarlılığın artmasına neden olur. Ancak, teknik nedenlerden dolayı uvrB geninin kesilerek uzaklaştırılması sırasında bu delesyon biyotin (bio) genine kadar uzanmaktadır. Biyotin geni ise vitamin H denilen biyotinin sentezinden sorumludur (Maron ve Ames 1983). Bu nedenle, bakteriler üreyebilmeleri için histidinin yanında biyotine de gereksinim duyarlar.

R faktörü

Mutajenlerin daha iyi tayin edilebilmeleri amacıyla *S. typhimurium* TA 1538 ve TA 1535 suşlarına, ampisiline dirençlilik geni taşıyan pkM 101 R faktörü plazmidinin eklenmesiyle *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları elde edilmiştir (Ames ve ark. 1973a). Plazmid içeren suşların, mutajenik olduğu gösterilmiş ajanlara karşı cevapları, plazmid içermeyen suşlara göre oldukça yükselmiştir. Plazmid içeren yeni suşlar,orijinal suşlarla zayıf ya da mutajen olmayan ajanlara karşı net bir pozitif cevap vermişlerdir. pkm 101 plazmidi, bu suşların daha duyarlı olmasından sorumlu olan hata oranı yüksek (error-prone repair) onarım sistemi ile bağlantılı gen ürünlerini içermektedir. Daha sonraki yıllarda, mutajenik özgüllüğü *S.typhimurium* TA 1537 ile aynı olan, ancak pkM 101 plazmidi taşıdığı için çerçeve kayması mutajenlerine karşı ondan daha duyarlı olan *S. typhimurium* TA 97 suşu geliştirilmiştir. Oksidatif mutajenleri saptamak amacıyla da, yeni bir suş olan *S. typhimurium* TA 102 suşu geliştirilerek kullanıma girmiştir (Levin ve ark. 1982). Bu suşta bir his G428 mutasyonu ve bir tetrasiklin dirençlilik geni taşıyan pAQ1 plazmidi bulunmaktadır.

Salmonella / mikrozom test sistemine daha sonra rat karaciğeri 9000xg supernatanını ve kofaktörleri içeren metabolik aktivasyon sistemi eklenerek memelilerdeki biyotransformasyon olaylarının benzeri sağlanmaya çalışılmıştır (Ames ve ark. 1973b, Mortelmans ve Zeiger 2000). Daha önceki çalışmalarda mutajenik aktivite göstermeyen birçok prokarsinojenin, test sisteminin metabolik aktivasyonu içeren yeni uygulaması ile pozitif sonuç verdiği rapor edilmiştir.

Rat karaciğeri endoplazmik retikulumu (mikrozomal fraksiyonu) 9000xg supernatanında mevcut olan enzimler aşağıda verilmiştir.

- Sitokrom P-450- bağımlı monooksigenazlar
- Sitokrom P-450- bağımsız oksidazlar

- Epoksit hidraz
- Glukuronil transferazlar
- Azo ve nitro-redüktazlar
- Amidazlar
- Esterazlar

Canlı yapısında kimyasal maddelerle yüzyüze gelme ile mutasyon indüksiyonuna kadar geçen olaylar çeşitli basamaklar içermektedir.

Bu basamaklar şu şekilde sıralanabilir:

Kimyasal madde ile karşılaşma: Bütün organizmalarda, hücreleri ve genetik materyali, maruz kalınan yabancı maddelere karşı koruyan mekanizmalar vardır. Kimyasal maddelerin organizma tarafından alınan miktarı % 0-100 arasında değişir. İn vivo deneylerde, verilen miktarın ne kadarının hedef organa ulaştığı genelde çok az bilinmektedir.

Kimyasal maddenin organizmada biyotransformasyonu: Mutasyon indüksiyonu olaylarında ikinci evre, kimyasal maddelerin biyotransformasyonu ve memelilerde görülen metabolik değişimlerdir. Vücuda alınan kimyasal maddeler, esas olarak karaciğerde yerleşmiş olan bazı enzim sistemleriyle metabolize edilirler. Bu metabolizma ile ilgili enzim sistemleri, Faz I ve Faz II olmak üzere iki gruba ayrılır. Faz I enzim sistemlerinin en önemlilerinden biri, sitokrom(Cyt) P-450'yi içeren monooksigenazlar (MO) ya da karışık fonksiyonlu oksidazlar (MFO) olarak bilinen bir grup enzimdir. Bu enzim grubu, hücrenin düz endoplazmik retikulumu ve mitokondri membranlarına yerleşmiştir. Faz I'in diğer reaksiyonları ise redüksiyon ve hidroliz olaylarını içermektedir. Faz I'de yer alan reaksiyonlar sonunda, hidrofobik molekülden bir ya da daha fazla polar grup ortaya çıkarılır. Bu reaksiyonlar ana bileşik, Faz II'de yer alan konjugasyon enzimleri için uygun bir substrat haline gelir. Faz I reaksiyonlarının metabolitleri, Faz II'de yer alan glutatyon-S-transferaz, sulfo transferaz ve UDP-glukuronil transferaz gibi enzimler aracılığıyla glukuronik asit, aminoasit veya sülfat gibi gruplarla konjuge edilirler. Konjuge edilmiş ürünler yeterli derecede polar olup, hücre ve vücuttan kolaylıkla dışarı atılırlar. Bu metabolik yol, detoksifikasyon mekanizmasına benzemesine karşın, bazı durumlarda karsinojenik ara ürünlerin oluşmasına yol açar.

Karaciğerdeki metabolizma sırasında reaktif ara ürünleri daha da kuvvetlendiren ya da detoksifiye eden enzimler arasındaki denge, kimyasalların karsinojenik potansiyeli konusundaki kritik faktörlerden biridir. Metabolizma sonucu oluşan çeşitli ara ürünler, eğer kuvvetli elektrofilik özellik kazanırlarsa DNA, RNA ve proteinler gibi hücresel moleküllere atak yapabilecek hale gelirler. Bazı kimyasal maddeler hedef makromoleküller ile doğrudan etkileşime girerler. Bunlar direkt karsinojenler olarak adlandırılırlar. Prokarsinojenler olarak adlandırılan diğer bazı kimyasallar ise yukarıda anlatılan biyotransformasyon olayları ile metabolize olurlar. Bunun sonucunda çeşitli ara ürünler meydana gelir. Bu ara ürünlerin bir kısmı vücuttan uzaklaştırılabildiği gibi, diğer bir kısmı ise hedef makromoleküller ile etkileşime girebilirler, bu kimyasallar son (=ultimate) karsinojenler olarak bilinirler (Murray ve ark. 1996).

Kimyasal Madde İle Mutasyon İndüksiyonu: Direkt karsinojenler veya memelilerdeki biyotransformasyon basamakları sonucunda oluşabilen kuvvetli elektrofilik özellikteki metabolitler, canlıdaki genetik materyalin elektronca zengin atomlarıyla kimyasal olarak etkileşerek, DNA'da kalıtsal değişikliklere yol açabilirler. Bu oluşan hasar, hücredeki DNA onarım sistemleri ile giderilebilir. Onarma sistemlerinin varlığına rağmen kimyasal maddeler tarafından DNA'nın uğradığı bazı hasarlar onarılamazlar ya da yanlış onarılırlar. Bu onarılamamış lezyonlar (=lezyon), karsinojenesisde kritik olan mutasyonları oluştururlar.

Salmonella/mikrozom test sistemi, kimyasalların mutajenitesinin saptanmasında oldukça geniş bir uygulama alanı bulmuştur (Maron ve Ames 1983, Quillardet ve Hofnung 1993).

Coombs ve Ark. (1976), Benzoanthracene, chrysene ve cyclopentaaphenanthrene serisine ait karsinojenitesi bilinen bileşiklerin mutajenitelerini, *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu kullanarak Ames metodu ile tespit etmişlerdir. İstisnasız 37 karsinojen ve bilinen öncülleri mutajen olarak tespit edilmiştir.

McMahon ve Ark. (1979), Bakteriyel mutajenler için yeni modifiye edilmiş Ames testi kullanarak 855 test kimyasalının analizini yapmışlar ve bu çalışmada 10

adet test suşu kullanmışlardır. Test edilen 855 kimyasaldan 182 tanesi bir veya daha fazla suş için mutajenik olarak belirlenmiştir.

Menevşe ve Ark. (1984), Mutajen kimyasal karsinojenleri belirlemek amacı ile *Salmonella typhimurium* TA 104 suşunda histidin geriye dönüşümünün indüklenmesiyle çeşitli bileşiklerin mutajenitesini araştırmışlardır.

Gingold (1986), Bir mutajen veya kimyasal maddenin genetik materyalde değişiklik yapabileceğini ve bu nedenle mutasyon oranlarında artışa neden olduğunu belirtmiştir.

La Velle (1986), Kromat karışımlarının muhtemel mutajenik etkilerini bakteriyel sistemlerde araştırmıştır. Sonuçları sinerjik, total ve antagonistik yönden değerlendirmiştir.

Ogawa ve Ark. (1986), 4-aminopyridine (4AP), 4-aminoquinoline (4AQ), 9-aminoacridine (9AA), harman (HM), kobalt(II)klorit ($CoCl_2$) varlığında Salmonella test sistemi ile araştırılmıştır. 9AA ve $CoCl_2$ karışımının mutajenik aktivitesi, yalnız kullanılan 9AA'ya göre daha yüksek bulunmuştur.

Rapp. ve Ark. (1988), Koreli diyetinde önemli yer tutan Meju adlı gıdanın mutajenik aktivitesini araştırmışlardır. İki kimyasal yöntem ve Ames testi kullanılan bu araştırmada, 6'sı aflatoksin bulunduran 43 Meju test edilmiştir. Mejunun, aflatoksin ve benzoapyrene tarafından meydana getirilen mutasyona karşı koruyucu etkisinin bulunduğu tespit edilmiştir.

Houk ve Ark. (1988), Dr. Bruce Ames ve arkadaşları tarafından geliştirildiğinden bu yana, Salmonella / memeli mikrozom mutajenite testinin, kimyasal maddelerin mutajenik ve karsinojenik potansiyellerini belirlemede kullanılan en yaygın araç olduğunu belirtmişlerdir.

Akın ve Sümer (1989), Gıda katkı maddelerinden geniş bir kullanım alanına sahip sodyum benzoat ve sodyum nitratı, mutajenik özellikleri açısından Salmonella / mikrozom test sistemi ile incelemişlerdir. Sodyum benzoatın rat karaciğeri S-9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda test suşları üzerinde mutajenik etkili olmadığını; sodyum nitratın rat karaciğeri S-9 fraksiyonu varlığında *Salmonella typhimurium* TA 100 standart test suşu üzerinde zayıf mutajenik etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

İzbırak ve Ark. (1990), Gıdaları renklendirmede yaygın olarak kullanılan 4 azo boyasını (Ponceau 4R, Amaranth, Sunset Yellow FCF ve Tartrazine) mutajenik özellikleri açısından Ames testi ile incelemişlerdir. Denenen azo boyaların hiçbiri, standart test suşları olan *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 üzerine mutajenik etki göstermemiştir.

Sümer ve ark. (1990), *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları ile 4 adet insektisit (Bioallethrin, Tetramethrin, Lethane, Propoxur) ve 3 adet ticari formdaki insektisitin (Asbo, Formulation I, Formulation II) mutajenik etkilerini araştırmışlardır. Bioallethrin, *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşunda; Propoxur ve Formulation I'in sadece *S. typhimurium* TA 98 suşunda zayıf mutajenik etki gösterdiğini saptamışlardır.

Li ve ark. (1990), Ticari olarak elde edilebilen 5 dental malzeme kitinin bileşenlerini, mutajenik potansiyel yönünden Ames Salmonella / mikrozom testi kullanarak incelemişlerdir. Bu çalışmada ticari diş malzemelerinin mutajenitesinin yeteri kadar test edilemediğini, bunların ağız çalışmalarında güvenilir kullanımının, mutajenite belirleme yönünden daha detaylı testler kullanılmasına bağlı olduğunu belirtmişlerdir.

Rasool ve Musthaq (1991), Yaptıkları çalışmada, altı alkoloid madde (buxenone, ephedradine, protopine, saponin, pleiocarpamine ve vindoline) ve sivirisinek kovucu maddeyi mutajenik potansiyelleri yönünden Ames Salmonella mikrozom test sistemi ile araştırmışlardır. Sonuçlar test edilen bu alkoloid maddelerin hepsinin ve sivrisinek kovucunun mutajenik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Le Curieux ve ark. (1993), 3 kısa zamanlı test sistemi ile (SOS chromotest, Ames fluktuasyon test ve newt mikronukleus test) 7 kimyasalın (4-nitroquinoline 1-oxide, potassium dichromate, formaldehyde, sodium hypochlorite, benzo[a]pyrene, cyclophosphamide 2-naphthylamine) genotoksisitesini değerlendirmek için kullanmışlardır. Ames testinde sodyum hipoklorit hariç diğer bütün kimyasallar *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 102 ve TA 98 üzerinde mutajenik aktivite göstermiştir. Ames testi diğer testlerle karşılaştırıldığında direk genotoksik etkinin tespitinde, denenen bütün kimyasallar için en hassas deneme olmuştur.

Vargas ve ark. (1993), Brezilya'daki Cai nehri etrafında bulunan petrokimyasal endüstriyel kompleksin, nehir suyunda meydana getirdiği mutajenik etkileri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Ames testi kullanılan bu çalışmada yapılan testler sonucunda, incelenen su örneklerinin % 34 'ünde mutajenik aktivite saptanmıştır.

Mano ve ark. (1993), Kolelithiasis, koledokholithiasis, safra kesesi kanseri ve diğer hastalıklara sahip insanların safra keselerinden elde ettikleri safrayı ekstrakte etmişler ve *S. typhimurium* TA 98 suşuna uygulamışlardır. Test edilen 24 safra örneğinin 14 tanesinde pozitif mutajenik aktivite tespit etmişlerdir.

Ruiz ve Marzin (1997), biri bakteriyel mutajenite diğeri birincil DNA hasarlarını tespit eden (Ames testi ve SOS kromotest) iki invitro testi; 6 pestisidin genotoksik aktivitesini tespit etmek için denemişlerdir (atrazin, kaptafol, kaptan, kloroprifosmetil, malinat ve tetraklorvinfos). Kaptan ve kaptafol Ames testi ve SOS kromotestin her ikisinde de genotoksik bulunmuştur. Salmonella testinde mutajenik bulunan pestisitler, *Salmonella*'dan elde edilen mutajenite verileriyle karşılaştırıldığında SOS kromotest için genotoksiktir. Non genotoksik etkiler ne Salmonella ne de SOS kromotestlerinde; test suşları, S9 varlığında ve yokluğunda atrazin, molinat, kloroprifosmetil ve tetraklorvinfosa maruz bırakıldığında tespit edilememiştir.

Pillai ve Shankel (1997), poliaminlerin antimutajenik potansiyelini tespit etmek amacıyla modifiye edilmiş Ames testi kullanmışlardır. Poliaminlerden spermin, spermidin ve putreskinin tümü, EMS indüklenmiş dönüşümüne karşı anti mutajenik etki göstermiştir. Buna ek olarak spermidin ve putreskin modifiye edilen Ames testinde kendiliğinden geri dönenlerin sayısında azalma potansiyeli göstermiştir.

Kalaycıoğlu ve ark. (1997), *Spinacia oleracea* L. (Chenopodiaceae), *Lepidium sativum* L. (Brassicaceae), *Urtica dioica* L. (Urticaceae) özütlerinin pestisitlere karşı antimutajenik özelliğini *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında, metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz olarak incelemişlerdir.

Weng ve ark. (1997), Amonyak ile muamele edilen ve edilmeyen, aflatoksinli ve aflatoksinsiz mısır örneklerinden; ardışık fraksiyon ve partisyon prosedürüne

uygun olarak izole ettikleri ekstraktların mutajenik potansiyellerini Ames testi kullanarak araştırmışlardır.

Gomes-Carneiro ve ark. (1998), Kozmetik, gıda katkı maddesi ve eski ilaç hammaddesi olarak kullanılan 6 adet monoterpenoid bileşiğin[2 si aldehit (sitral ve sitronella); keton (kampor); oksit (1,8 sineol veya bilinen adıyla eukaliptol); ikisi alkol (terpineol ve mentol)] mutajenik potansiyelini, *Salmonella typhimurium* TA 97a, TA 98, TA 100 ve TA102 suşları üzerinde S9 varlığında ve yokluğunda araştırmışlardır. Sitral, sitronella, kampor, 1,8 sineol ve mentol mutajenik bulunmamasına rağmen terpineol TA 102 suşu üzerinde zayıf mutajenik özellikte bulunmuştur.

Musatov ve ark. (1998), beyin epifizi indol melatoninin, kuvvetli endojen antioksidan etkisi 12 adet iyi bilinen mutajen ve karsinojenin mutajenitesi üzerinde Ames testi ve Tek Hücre Jel Elektroforezi metodları kullanarak araştırmışlardır. S9 varlığında ve yokluğunda yapılan bu çalışmada melatonin ne toksik ne de mutajenik etki göstermiştir. 4 farklı Salmonella suşunda melatonin önemli derecede, S9 aktivasyonuna gerek duyan kimyasalların mutajenitesini indirgemiştir.

Beudot ve ark. (1998), 42 sentetik flavonun mutajenik ve anti mutajenik aktivitesini Ames testi ile araştırmışlardır. Mutajenite deneyleri *Salmonella typhimurium* TA 100 ve YG1042 ile S9 karışımı varlığı ve yokluğunda yapılmıştır. Mutajen olmayan flavon türevlerinin antimutajeniteleri, bilinen 11 mutajene karşı değerlendirilmiştir. Toplam 39 flavon mutajenik bulunurken, 3 flavon ise anti mutajenik aktivite göstermiştir.

Stammat ve ark. (1999), Antifungal aktivite gösteren bitkilerden elde edilmiş 4 farklı uçucu bileşiği (Cinnamaldehit, timol, karvakrol ve S(+)-karvon) genotoksik ve sitotoksik özellikleri bakımından Ames testi ile denemişlerdir. Toksik olmayan dozlarda metabolik aktivasyon olmaksızın yapılan standart plak inkorporasyon ve preinkübasyon metodları sonuçlarına göre; karvakrol ve timol revertant sayılarında artmaya neden olmuştur. Buna rağmen negatif sonuçlar gözlenmiştir.

Mercangöz ve Tüylü (2000), İlaç yapımında başlangıç maddesi olarak kullanılması amaçlanan 2,4,5 Tri fenil imidazol ve dokuz türevinin mutajenik etkilerini Ames / Salmonella / mikrozom test yöntemi ile araştırmışlardır. Test

bileşiklerinin özellikle *S. typhimurium* TA 98 suşunda etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Yeşilada (2000), Drosophila melanogaster'in somatik mutasyon ve rekombinasyon testi kullanılarak EMS ile indüklenmiş mutant kanat benekleri üzerine bitki büyüme hormonlarının (Kinetin, Gibberellik asit=GA_3 ve İndol asetik asit=IAA) etkisini araştırmıştır. Sonuç olarak özellikle GA_3'ün bio-antimutajen olabileceğini belirtmiştir.

Ramos ve ark. (2001), *Parthenium hysteropharus* bitkisinden elde edilen ham ekstraktı mutajenik potansiyeli yönünden Salmonella/mikrozom test sisteminde ve fare kemik iliği mikronükleus testinde incelemişlerdir. Bakteriyel mutajenite testi sonuçları 5 farklı suşta (*Salmonella typhimurium* TA 1535, TA1537, TA 98, TA 100 ve TA 102) negatif olarak bulunmuştur. Eksojen kaynaklı metabolik aktivasyon varlığında toksisitede azalma görülmüştür.

Cappuccino ve Sherman (2001), Kimyasal bileşiklerin kullanımının geçen on yıla göre arttığını ve çok geniş kullanım alanına sahip olan bu maddelerin; yapılan araştırmalar sonucu yaklaşık % 90'nının karsinojen ve mutajen olduğunu belirtmişlerdir.

De Paula ve ark. (2003), yaptıkları çalışmada *Ocimum selloi* yağının kimyasal kompozisyonu, akut toksisitesi, mutajenitesi, cilt tahriş etme potansiyeli ve sivrisinekleri kovma verilerinin elde edilmesini sağlamışlardır. Ocimum yağının genotoksisitesi Salmonella/mikrozom testiyle S9 karışımı varlığında ve yokluğunda değerlendirilmiştir. Yağ toksisite limitlerine kadar (500-700 mikrogram/petri) test edilmiş ve *Salmonella typhimurium* TA 97a, TA 98 ve TA 100 suşlarında mutajenik etki göstermemiştir.

Gümüş ve ark. (2003), 2-H metil, veya aminometilbenzimidazol ve 1,2 dimetilbenzimidazol zincirleri ayrılmayan grup gibi kompleksleri olan 4 adet platin(II) sentezlenmiş ve komplekslerin mutajenik potansiyellerini, *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde metabolik aktivasyon olmaksızın test etmişlerdir. 2- aminometilbenzimidazol ligandı *S. typhimurium* TA 98 de yüksek mutajen; *Salmonella typhimurium* TA 100'de zayıf mutajenik bulunmuştur. 1,2

dimetilbenzimidazol sadece *S. typhimurium* TA 98'de mutajenik bulunmuştur. Diğer iki komplekste mutajenik bulgulara rastlanmamıştır.

Kaplan ve ark. (2003), Zine fosfat, polikarboksilat ve cam ionomer harcı, gümüş destek varlığında ve yokluğunda mutajenik potansiyelleri yönünden Ames testi ile incelemişlerdir. Materyallerin mutajenik etkileri *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA102 ve TA 1535 suşları üzerinde standart plak inkorporasyon metodu kullanılarak, S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda test edilmiştir. Zine fosfat, polikarboksilat TA 98 ve TA 1535 suşları üzerinde; gümüş destek harcı sadece TA 98 üzerinde mutajenik etki göstermiştir. Cam ionomer harcına ilişkin bir mutajenik etki tespit edilememiştir.

Catteral ve Ark. (2003), Ames testi ile Aflatoksin B1 ve siyah çay theafulvini arasında genotoksik bir sinerji meydana gelmediğini göstermişlerdir.

İpek ve ark. (2004), Çalışmalarında; tıpta, gıdalarda aroma verici ve ürünlerin korunmasında kullanılan *Origanum onites* esansiyel yağı ve karvakrolün Ames Salmonella/mikrozom testi ile genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin araştırılmasını sağlamışlardır. Mutajenik aktivite ilk olarak *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında, S9 metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda gösterilmiştir. Yağda S9 varlığında ve yokluğunda her iki suşta mutajenik etki göstermezken, metabolik aktivite yokluğunda genellikle karvakrol tarafından kayda değer bir mutajenik aktivite gösterilmiştir. Yağ ve onun en büyük ögesi olan karvakrol son olarak 30 dakika preinkübasyon süresiyle antimutajenik etkisine bakılmıştır. Sonuçlara göre *Origanum* yağı ve karvakrol' ün kanserin engellenmesinde kayda değer bir antimutajenik etkisinin olduğu görülmüştür

Varella ve ark. (2004), alüminyum üreten fabrikadan kaynaklanan artık materyallerin mutajenik aktivitesini *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 98 ve YG1024 suşları kullanılarak Salmonella/mikrozom test sisteminde araştırmışlardır. Bütün ekstraktlar YG 1024 suşunda mutajenik aktivite göstermiştir. Aynı zamanda *Salmonella typhimurium* TA 98'de de mutajenik bulunmasına rağmen TA 100 de hiçbir mutajenite gözlenmemiştir.

Kutlu ve ark. (2004), çalışmalarında Porsuk nehrinden alınan su ve sedimenleri, potansiyel mutajeniteleri için *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde, metabolik aktivasyon olmadan Ames testi kullanarak

araştırmışlardır. İki istasyondaki su örneklerinin XAD4 ekstraktlarında, TA 98 suşunda pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Değişik bölgelerden alınan sedimen örneklerinin ekstraktlarında her iki test suşunda mutajenik aktivite gözlenmiştir.

Miyata ve ark. (2004), Ames testi ile yaptıkları çalışmalarının sonucunda; önce greyfurt suyu verilen daha sonra AFB1 uygulanan ratların karaciğerlerinde, greyfurt suyunun AFB1'in metabolik aktivasyon gücünün inaktivasyonu boyunca, neden olduğu karaciğer DNA zararını baskıladığını göstermişlerdir.

İpek ve Gülle (2004), yaptıkları çalışmada tekstil fabrikaları tarafından kullanılan boya maddelerinin mutajenik etkilerini Ames testi ile araştırmışlardır. Test edilen kimyasallardan bir tanesi kuvvetli mutajen bulunurken, diğer ikisinin zayıf mutajen ve geri kalan üç tanesinin mutajen olmadığını tespit etmişlerdir.

Taira ve ark. (2005), antigenotoksik aktivitelere sahip bileşiklerin temel gıdalarda bulunduğunu gösteren bir çalışmada, *Agrocybe cylindracea*, *Lentinula edodes* ve *Pleurotus ostreatus* gibi yenilebilen mantarlardan kurutulup öğütülmesiyle elde edilen tozların veya ekstraktlarının genotoksisite üzerinde yatıştırıcı bir etkiye sahip olup olmadığı araştırılmıştır. Somatik mutasyonları ölçebilen Drosophila DNA tamir testi, Drosophila kanat testinin yanı sıra Ames testi kullanılmıştır. *Agrocybe* cinsi mantarların antigenotoksik ve anti rekombinojenik etkiye sahip faktörler içerdiği saptanmıştır.

Umbuzeiro ve ark. (2005), Brezilyadaki Santos halici alanında 9 farklı siteden toplanan su örneklerinin genotoksik aktivitesi öncelikli olarak değerlendirmişlerdir. Sedimanların genotoksisitesi ve hem su hem de sediman örneklerinin PAH içeriklerine ilişkin önceki verilerle ilişkilendirilmiştir. Su örneklerinin değerlendirilmesi *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde S9 karışımı varlığında ve yokluğunda Ames testi ile yapılmıştır. 1, 3, 5 nolu sitelerden alınan su örnekleri düşük mutajenik bulunurken 3 nolu siteden alınan katı partiküller ise mutajenik olarak bulunmuştur.

McClain ve ark. (2005), doğal olarak soya fasulyelerinde meydana gelen bir fitoestrojen olan genisteinin mutajenik ve klastojenik aktiviteye sahip olup olmadığı *Salmonella typhimurium* denemesi ile (Ames testi), S9 karışımı varlığında ve yokluğunda araştırmışlardır. Yapılan bu çalışma sonucunda genisteinin mutajenik bir aktivite göstermediği belirtilmiştir.

Kutlu ve ark. (2006), çalışmalarında ilaç ham maddesi olarak kullanılması düşünülen iki tetrahidrobenzimidazol türevi bileşiğin mutajenik özelliklerini *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 suşları kullanarak, metabolik aktivasyon varlığı ve yokluğunda araştırmışlardır. Negatif kontrollerle karşılaştırıldığında bileşiklerin mutajenik özellik göstermediği belirtilmiştir.

Bitkilerin büyüme ve gelişmesinde birçok etkinlikleri kontrol altına alan en önemli içsel faktörlerden biri "bitki hormonları" (Fitohormonlar) dır. Bitki hormonları, bitkinin belirli bir yerinde sentez edilip başka bir yapıya ya da organa taşınarak orada etkinliğini gösteren organik maddeler olarak tanımlanabilirler. Hormonlar çok az konsantrasyonlarda dahi etkilerini gösterebilme özelliğinde olup bitkilerin fizyolojik aktivitelerini kontrol etmektedirler. Bitki hormonları büyüme ve gelişme olaylarında belli bir takım etkinliklerinden ve onları düzenleyici etkinliklerinden dolayı daha geniş kapsamlı olarak bitki büyüme maddeleri veya "Bitki Gelişim Düzenleyicileri" olarak adlandırılırlar (Önder ve Yentür, 1999).
Bitki gelişim düzenleyiciler 5 grupta incelenebilir. Bunlar;

1. Oksinler
2. Sitokininler
3. Gibberellinler
4. Dorminler (Absisik Asit)
5. Etilen gurubu

Bunlardan oksinler, sitokininler ve gibberellinler teşvik edicilerdir. Dorminler ve etilen ise engelleyiciler olarak gruplandırılırlar (Fırat 1998).

Asıl doğal oksinler, İndole 3-asetik asit (IAA) diğer iki doğal oksin ise 4-chloro- indole asetik asit ve fenilasetik asittir. Sentetik oksinler ise NAA, BNOA, IBA, 3-CPA, 2,4-D, 2,4,5-T ve 2,4,5-TP den ibarettir (Westwood 1993).

Oksinler, bitkilerin büyüme gösteren uç kısımlarında (kök, tomurcuk, yaprak vs.) en yüksek konsantrasyona ulaşmaktadır. Oksinlerin uzamayı hızlandırması, hücre büyüme ve bölünmesini artırmasının bir sonucudur. Hücre büyümesini artırması, oksinin hücrenin ozmotik sisteminde oluşturduğu bazı değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Bu konudaki görüşlere göre oksin;

1. Hücrede osmozu artırması,

2. Hücrenin suya karşı geçirgenliğini yükseltmesi,

3. Hücre çeperi basıncında düşmeye neden olması,

4. Hücre çeperi sentezinde artış oluşturması,

5. Hücre çeperi esnekliğini ve genişliğini artıran spesifik RNA ve protein yapısındaki enzimlerin sentezini artırması yollarıyla hücre büyümesinde etkili olmaktadır (Seçer 1989).

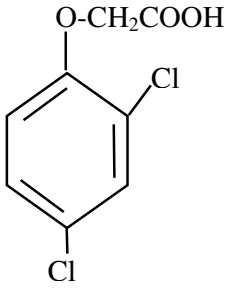
Çalışmamızda mutajenik etkilerini inceleyeceğimiz bitki gelişim düzenleyiciler olan 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), 4-Klorofenoksiasetik asit (4-CPA) ve Beta-Naftoksiasetik asit (BNOA) oksin grubuna dahildir.

Ülkemizde bitki gelişim düzenleyicilerin kullanımı yeterince yaygın değildir. Ancak belli alanlarda yine de başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu alanların başında örtü altı sebzeciliği gelmektedir. Özellikle domates ve patlıcanda partenokarpik meyve tutumunu sağlamak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla eskiden 2,4-D kullanılmakta iken bu hormonun insan sağlığına zararlı olduğu iddiaları nedeniyle Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı tarafından yasaklanmış ve yerine 4-CPA ve BNOA kullanılması tavsiye edilmiştir (Ertekin 1997).

Bu çalışmada kullanılacak hormonların işlev ve kimyasal yapıları aşağıdaki gibidir:

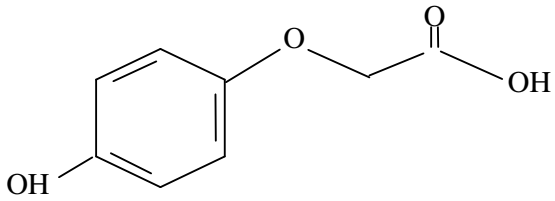
2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D):

Partenokarpik meyve gelişimini teşvik etmesinin yanı sıra geniş ölçüde herbisit olarak kullanılmaktadır.



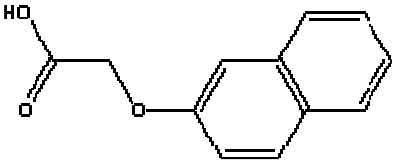
4-Klorofenoksiasetik asit (4-CPA):

Genellikle seralarda ve açık tarlalarda yetiştirilen domates ve patlıcanlarda döl tutma oranını artırmak amacıyla kullanılan bir bitki gelişim düzenleyicidir.



Beta-Naftoksiasetik asit (**BNOA**):

Kullanıldığı bitkilerde meyve tutumuna ve büyütmeye yardımcı olur, verim artışı sağlar. Domates, patlıcan, kabak, fasulye, biber, salatalık ve çilekte rahatlıkla kullanılabilen meyve tutturucu ve büyütücü özellikte bir bitki gelişim düzenleyicisidir.



3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan test suşları:

Çalışmada kullanılan test suşları, *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları (Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ABD ve Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü)'den sağlanmıştır. Bu suşların genotip özellikleri şöyledir:

TA 98: his D 3052, rfa, Δuvr B, +R

TA 100: his G 46, rfa, Δuvr B, +R

Ayrıca bu testte başka Salmonella suşları da kullanılmaktadır.

Çizelge 3.1.1. Ames test sisteminde kullanılan bazı Salmonella suşları ve genetik özellikleri

Suş	Histidin Mutasyonu	LPS	Onarım	pKM 101	Mutasyonun Niteliği	Belirlenecek Bileşik Sınıfları
TA 1535	his G46	rfa	ΔuvrB	-	AT→ GC Transisyon	Baz Çifti yerdeğişimine Neden Olan Mutajenler
TA 1537	his C376	rfa	ΔuvrB	-	C…….C yanına +1	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA 1538	his D3052	rfa	ΔuvrB	-	CG……CG yanından -1	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA 98	his D3052	rfa	ΔuvrB	+	CG yanından -1	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA 100	his G46	rfa	ΔuvrB	+	AT→ CG Transisyon	Baz Çifti Değişimine Neden Olan Mutajenler
TA 97	his D6610	rfa	ΔuvrB	+	CCC yanına +4	Çerçeve Kaymasına Neden Olan Mutajenler
TA 102	his G428 PAQ1 Δhis	rfa	ΔuvrB	+	G Ochre AT	Oksidanlar, X-Işınları, U.V., Mitomisin C, Bleomisin ve Kinonlar

(Öksüzoğlu 2000).

3.1.2. Kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan, 2,4-Diklorofenoksiasetik asit, 4-Klorofenoksiasetik asit ve Beta-Naftoksiasetik asit (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmBH, Germany)' dan sağlanmıştır. Sodyum azid ve 2-aminoflouren (Merck, KGaA Darmstad, Germany)'den sağlanmıştır. Diğer kimyasal maddeler ise 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; Nutrient broth No: 2 ve Ampisilin ticari diskleri (Oxoid, Unipath Ltd, Basngstoke Hampshire, England)'den sağlanmıştır. S9 fare karaciğer fraksiyonu Sigma'dan temin edilmiştir.

3.1.3. Besiyerleri, tamponlar ve çözeltiler:

Aşağıda Salmonella / mikrozom test sisteminde kullanılan besiyerleri ve çözeltiler verilmiştir.

Vogel-Bonner Minimal Medium (50xVB tuzları): Minimal agar için hazırlandı.

	1000 ml için
Distile su (45 ^{0}C)	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 ($NaHNH_4PO_4$. $4H_2O$)	175 g

Tuzlar sırasıyla distile suya ilave edildi. Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Son olarak da otoklavda 121^{0}C'de 20 dakika steril edildi.

0,5mM histidin / biyotin çözeltisi: Mutajenite deneylerinde 100 ml'lik üst agara 10 ml eklendi.

	250 ml için
D- biyotin (M. A: 247.3 g /mol)	30.9 mg
L-Histidin-HCl (M. A: 191.7 g /mol)	24.0 mg
Distile su	250 ml

Biyotin kaynama noktasına yakın derecedeki distile su içerisinde çözüldü. Ardından histidin ilave edildi. Sterilizasyon 0.22 µm lik filtre kağıtları kullanılarak filtrasyonla veya otoklavda 121^{0}C de 20 dakika steril edilebilir. Çalışmamızda karışım otoklavda 121^{0}C' de 20 dakika steril edildi.

Üst Agar (Top Agar): Bakterilerin plaklara ekilmesi sırasında kullanıldı.

	100 ml için
Bacto agar	0.6 g
NaCl	0.5 g
Distile su	100 ml

Karışım 121 ^{0}C'de 20 dakika otoklavda steril edildi.

Ampisilin çözeltisi (8 mg/ml): Suşların ampisiline dirençlilik özelliğinin kontrolünde ve R plazmiti taşıyan suşların master plakları için kullanıldı.

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

Eğer ampisilin NaOH yerine suda çözülecekse, bu suyun derecesi 65 ^{0}C' ye ayarlanır. Çözündükten sonra 0.45 µm filtrede süzüldü ve +4 ^{0}C 'de saklandı.

Kristal viyole çözeltisi (% 0.1 lik): Suşların kristal viyole'ye duyarlılıklarını, dolayısı ile de rfa mutasyonu taşıyıp taşımadıklarını kontrol amacı ile kullanıldı.

	100 ml için
Kristal viyole	0.1 g
Distile su	100 ml

Kristal viyole distile suda çözüldü ve hazırlanan solüsyon +4 ^{0}C'de renkli şişede saklandı.

Tuz çözeltisi (1.65 M KCl + 0.4 M $MgCl_2$): 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 ^{0}C de 20 dakika steril edildikten sonra cam şişelerde buzdolabında veya oda ısısında saklandı.

0.2 M Sodyum-fosfat tamponu (pH:7.4): S9 karışımında 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 ^{0}C'de 20 dakika steril edildi.

0.1 M β-NADP çözeltisi: S9 karışımında kullanıldı.

Steril distile su	5 ml
β-NADP (M. A: 765.4 g/mol)	383 mg

1M Glukoz -6 -fosfat çözeltisi: S9 karışımında kullanıldı.

	10 ml için
Glukoz-6-fosfat	282 mg
Steril distile su	10 ml

S9 karışımı (rat karaciğeri mikrozomal enzimleri ve kofaktörleri): Mutajenite deneylerinde kullanıldı.

	50 ml için
Rat karaciğeri S9 fraksiyonu	2 ml
$MgCl_2$ – KCl tuz çözeltisi	1 ml
1 M Glukoz -6 -fosfat	0.25 ml
0.1 M β-NADP	2.0 ml
0.2 M Fosfat tamponu (pH:7.4)	25 ml
Steril distile su	19.75 ml

Solüsyon, taze olarak soğuk ortamda hazırlandı ve buz içinde muhafaza edildi. Bütün içerikler soğutulmuş olmalıdır. S9 asla yeniden dondurulmamalıdır.

Minimal glukoz agar: Mutajenite deneylerinde ve revertant koloni hesaplamalarında kullanıldı.

	1000 ml için
Agar	15 g
Distile su	880 ml
50 x VB tuz çözeltisi	20 ml
Glukoz çözeltisi (% 20'lik)	100 ml

15 g agar tartılıp 2 litrelik erlene konulduktan sonra üzerine 880 ml distile su ilave edildi. Karışım otoklavda 121 ^{0}C'de 20 dakika steril edildikten sonra sıcaklık 50 ^{0}C civarına gelince daha önceden steril edilmiş olan 50 x VB çözeltisi ve glukoz çözeltisi sırası ile ilave edildi.

Histidin / Biyotin / Ampisilinli katı ortam: R faktörü taşıyan suşların ampisiline dirençliliklerini test etmek amacıyla kullanıldı.

	1000 ml için
Agar	15 g
Distile su	860 ml
50 x VB tuzları	20 ml

% 20'lik glukoz çözeltisi	100 ml
Steril histidin HCl H_2O (% 0.5)	10 ml
Steril 0.5 mM Biyotin	6 ml
Steril ampisilin çözeltisi	3.15 ml

15 g agar tartılıp 2 litrelik erlene konulduktan sonra üzerine 860 ml distile su ilave edildi. Karışım otoklavda 121 ^{0}C'de 20 dakika steril edildikten sonra sıcaklık 50 ^{0}C civarına gelince daha önceden steril edilmiş olan 50 x VB tuzları, % 20' lik glukoz ve steril histidin karıştırıldı. Daha sonra steril biyotin ve ampisilin solüsyonu ilave edildi.

Nütrient broth: Bakterilerin sıvı kültürlerinin hazırlanmasında kullanıldı.

	1000 ml için
(Oxoid) nütrient broth no:2	25 g
Distile su	1000 ml

Karışım otoklavda 121 ^{0}C'de 20 dakika steril edildi.

Nütrient agar: Test suşlarının kristal viyole ve UV'ye duyarlılık özelliklerinin test edilmesi ve sitotoksik etkinin belirlenmesi için kullanıldı.

	1000 ml için
(Oxoid) nütrient broth no:2	25 g
Bacto agar	15 g
Distile su	1000 ml

Karışım otoklavda 121 ^{0}C'de 20 dakika steril edildi ve plaklara 25-30 ml olacak şekilde döküldü.

Glukoz çözeltisi (%20'lik): Minimal glukoz agar ve histidin/biyotin/ampisilin'li katı ortam için kullanıldı.

	100 ml için
Glukoz	20 g
Distile su	100 ml

Karışım otoklavda 121 ^{0}C'de 20 dakika steril edildi.

3.2. Metot

Bu araştırmada bitki gelişim düzeneyicileri olarak kullanılan 2,4-Diklorofenoksiasetik asit, Beta naftoksiasetik asit ve 4- Klorofenoksiasetik asit'in mutajenik etkilerinin olup olmadığı, Salmonella / mikrozom test sistemiyle incelendi. Bu amaçla, öncelikle *Salmonella typhimurium* TA 98 suşunun üreme yoğunluğu spektrofotometrik ve kültür yöntemi ile belirlendi. Test suşlarının kullanılabilirliği; sahip oldukları mutasyonların varlıkları gösterilerek doğrulandı. Salmonella / mikrozom test sisteminde, öncelikle test edilen bitki gelişim düzenleyicilerin sitotoksik olmayan dozları Dean ve arkadaşları (1985)'nın yöntemine göre belirlenerek, bunların mutajenik etkileri araştırıldı.

3.2.1 Test suşlarının üretilmesi

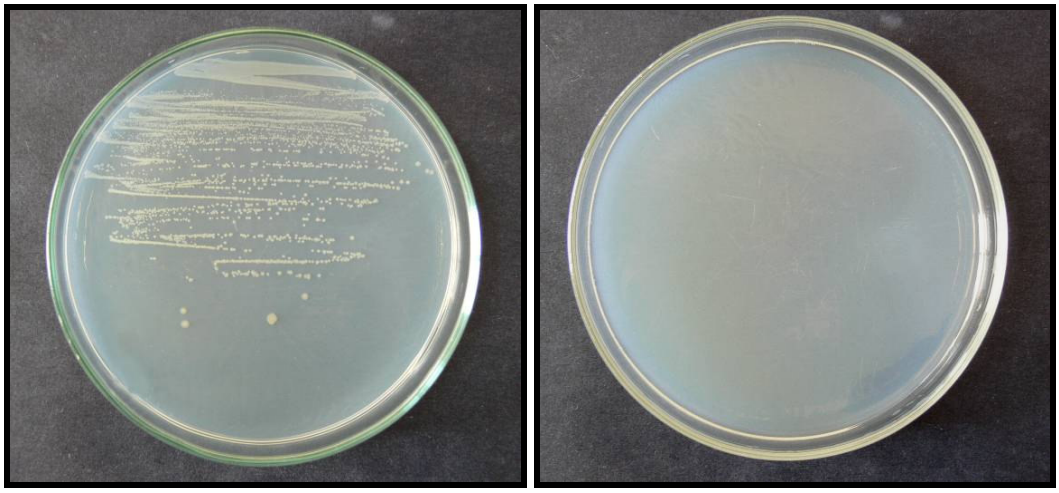
Salmonella typhimurium suşları ile yapılan mutajenite testlerinde kullanılan bakteri kültürünün 1 ml'sinde 1-2 x 10^9 ml/bakteri olması öngörülmektedir. Bu amaçla *Salmonella typhimurium* TA 98 test suşunun üreme eğrileri çizilerek zamana karşı bu eğri absorbans değerleri ve mililitredeki canlı bakteri sayıları belirlendi.

Salmonella typhimurium TA 98' in üreme eğrisinin çıkarılması için içerisinde 20 ml nutrient broth bulunan 50 ml'lik erlenlere master plaklardan veya histidin/biyotin agar plaklarından tek koloni alınarak ekim yapıldı. Çalkamalı etüvde 37 ^{0}C'de 110 rpm çalkalama ile 16 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda elde edilen kültürden 0.1 ml örnekler alınarak 20 ml nütrient broth içeren erlenlere ekim yapıldı. 37 ^{0}C'de 175 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}) serum fizyolojik ile sulandırılarak, nütrient agarlı plaklara 0.1 ml olacak şekilde ekim yapıldı. Bu çalışma sırasında bakterilerin homojen dağılımını sağlamak amacı ile kültür 45 ^{0}C'deki 2 ml üst agara karıştırıldı ve çalkalandıktan sonra hızlı bir şekilde plaklara döküldü. Plaklar 37^{0}C'lik etüvde bir gece inkübe edildikten sonra koloni sayımı yapıldı (Maron ve Ames 1983).

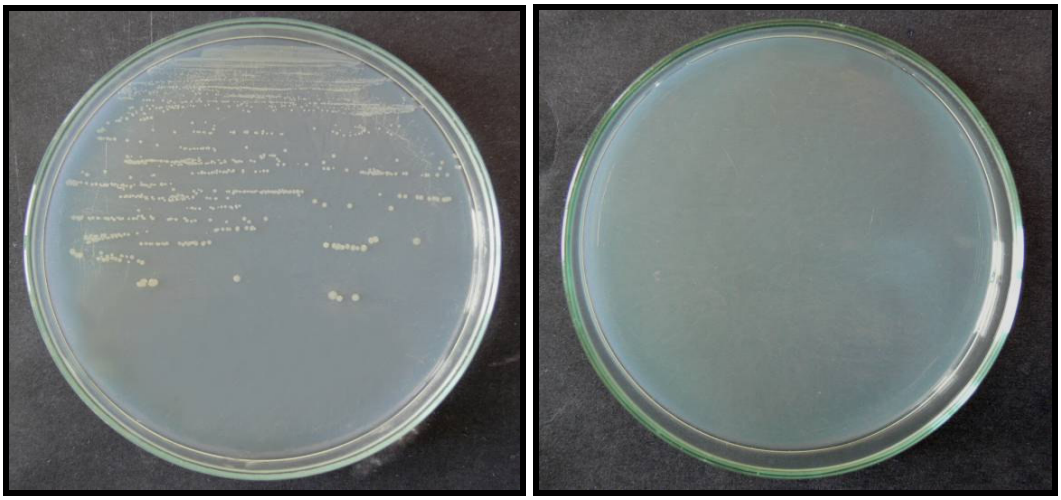
Bir mililitredeki canlı hücre sayısı= sulandırma faktörü X plaktaki koloni sayısı X 10 (/ml) ile hesaplandı.

3.2.2. Test suşlarının genetik işaretlerinin kontrolü

Histidin gereksinimi: Test suşlarının his (-) özelliği, suşların histidin/biyotin agar ve sadece biyotin agar plaklarına ekilmeleri yolu ile kontrol edildi. Her iki test suşu uvrB delesyonu nedeni ile histidine ek olarak biyotine de gereksinim duymaktadır. Bu plaklara çizgi ekim yapıldıktan sonra 37 ^{0}C'de bir gece etüvde inkübasyona bırakıldı. Suşların his/biyo agarda üreyip, biyotin agarda üremeleri his (-) karakterlerini doğrulamıştır (Maron ve Ames 1983, Mortelmans ve Zeiger 2000).



Şekil 3.2.2.1. *S. typhimurium* TA 98'in histidin gereksinim kontrolü sonucu a) Histidin/ biyotin agarda üreme (+) b) Biyotin agarda üreme (-).

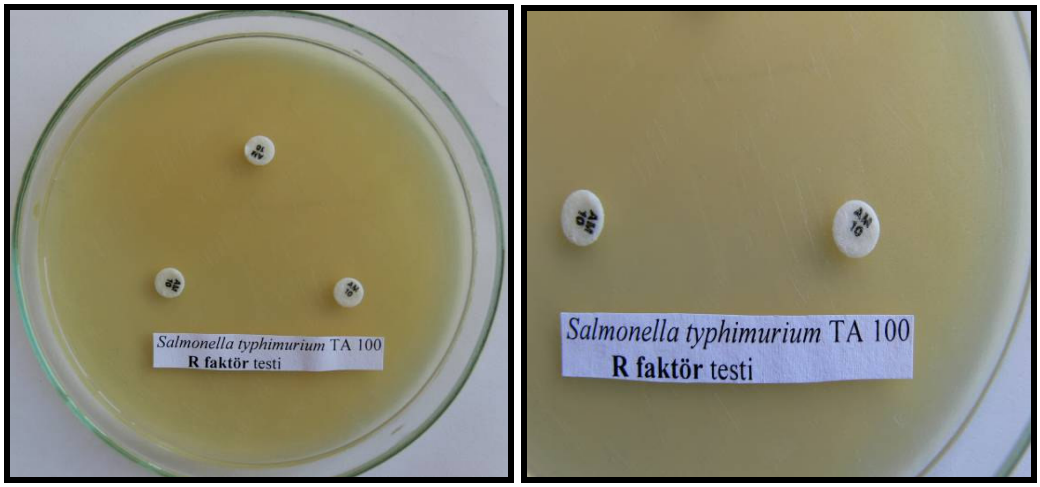


Şekil 3.2.2.2. *S. typhimurium* TA 100'ün histidin gereksinim kontrolü sonucu a) Histidin/ biyotin agarda üreme (+) b) Biyotin agarda üreme (-).

R Faktörünün kontrolü: Öncelikle his (-) karakterleri doğrulanan koloniler, ampisiline dirençlilikleri açısından test edildi. Bunun için histidin/biyotin/ampisilin içeren minimal glukoz agarlı plaklar hazırlanarak R faktörü test edilecek suşların ekimi yapıldı (Mc. Cann ve ark. 1975-b). 37^0C'de 12-24 saatlik bir inkübasyon süresi sonunda, R faktörü içeren suşların ampisilinli plaklarda ürediği gözlendi. Bu çalışmaya alternatif olarak 10µg'lık ticari ampisilin diskleri, bakteri ekimi yapılmış olan nütrient agarlı plakların muhtelif yerlerine yerleştirildi. İnkübasyon süresi (37^0C'de 12-24 saat) sonunda R faktörü taşıyan suşlarda inhibisyon zonu gözlenmedi.



Şekil 3.2.2.3. *S. typhimurium* TA 98'in R faktör varlığının kontrolü. Ampisilin (10µg'lık) diskleri varlığında inhibisyon zonu gözlenmemiştir).

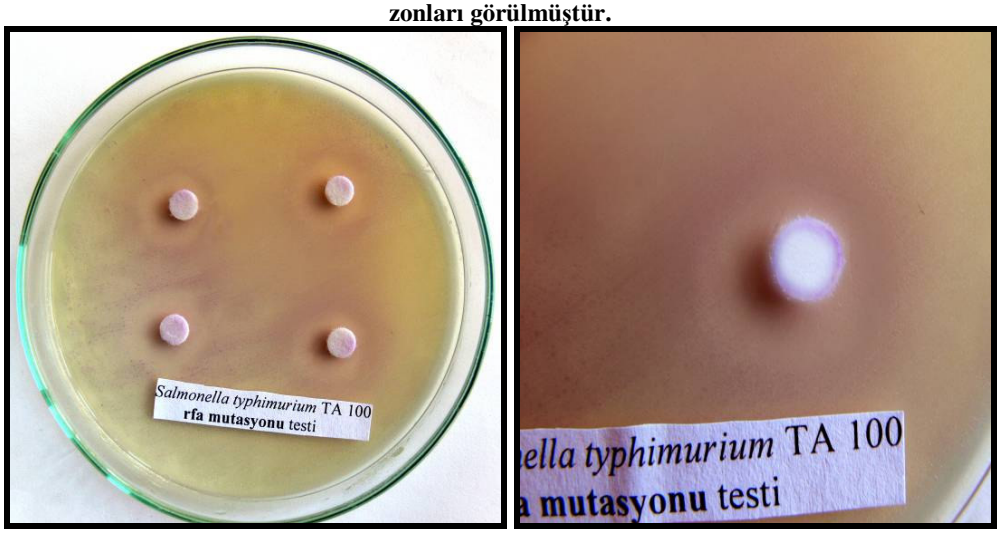


Şekil 3.2.2.4. *S. typhimurium* TA 100'ün R faktör varlığının kontrolü. Ampisilin (10µg'lık) diskleri varlığında inhibisyon zonu gözlenmemiştir.

rfa Mutasyonunun kontrolü: Test suşlarının gecelik kültürlerinden 0.1 ml örnekler alındı ve nütrient agarlı plaklara yayma ekimi yapıldı. Steril boş kağıt disklere önceden hazırlanan kristal viyole çözeltisinden 10µl emdirildi ve plağın çeşitli yerlerine yerleştirildi. Plaklar bir gece 37 ^{0}C'de inkübe edildikten sonra disklerin etrafında inhibisyon zonları gözlendi (Ames ve ark. 1973-b). Diskin çevresindeki şeffaf bölge büyük bir molekül olan kristal viyolenin bakteri içerisine girip, onun ölümüne neden olan rfa mutasyonu varlığının göstergesidir. Yapmış olduğumuz denemede kristal viyoleden kaynaklanan 14 mm'lik bir inhibisyon zonu gözlenmiştir.

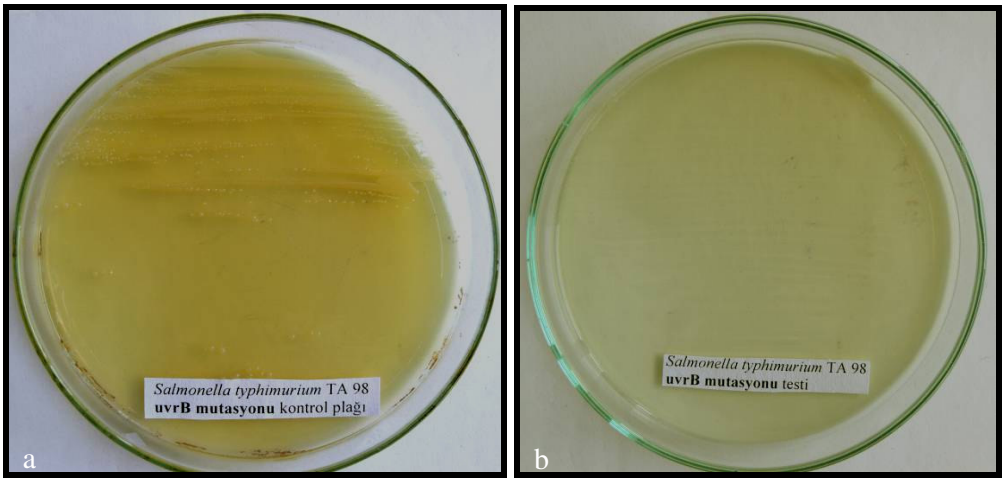


Şekil 3.2.2.5. *S. typhimurium* TA 98'de rfa mutasyonu kontrolü .14 mm çapında inhibisyon zonları görülmüştür.

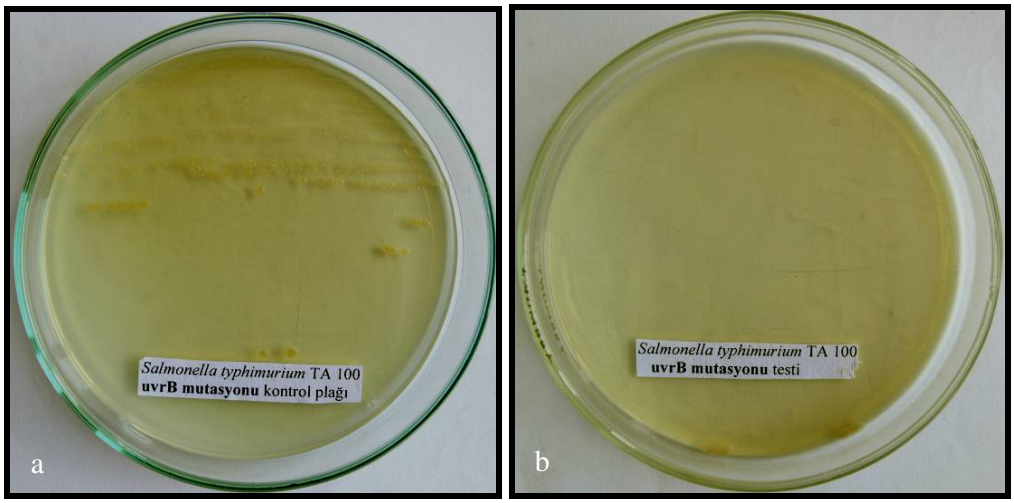


Şekil 3.2.2.6. *S. typhimurium* TA 100 de rfa mutasyonu kontrolü .14 mm çapında inhibisyon zonları görülmüştür.

uvrB Mutasyonunun kontrolü: Bu mutasyonun varlığı UV ışınlara duyarlılık testi ile kontrol edildi. Test suşlarının gecelik kültürlerinden öze ile alınan örnekler, nütrient agarlı plaklara çizgi ekim yapıldı. 37 ^{0}C'de bir gecelik inkübasyondan sonra üreyen tek koloniler, steril kürdanlarla alınarak nütrient agarlı iki plağa yine çizgi testi yöntemi ile ekildi. Bu plaklardan bir tanesi kontrol plağı olarak kullanıldı, diğeri ise kapağı açılıp 15 watt'lık germisidal UV lambası altında 33 cm uzaklıktan 8 saniye süre ile ışınlandı. Kontrol plağı ve UV'ye maruz bırakılan plak 37 ^{0}C'de bir gece inkübe edildi. uvrB delesyonu taşıyan suşların kontrol plağında ürediği fakat, UV ile ışınlanmış plaklarda ise üremediği gözlendi (Ames ve ark. 1973-b).



Şekil 3.2.2.7. *S. typhimurium* TA 98'de uvrB mutasyonu kontrolü. a) Kontrol plağı üreme (+). b) Test plağı üreme (-).



Şekil 3.2.2.8. *S. typhimurium* TA 100'de uvrB mutasyonu kontrolü. a) Kontrol plağı üreme (+). b) Test plağı üreme (-).

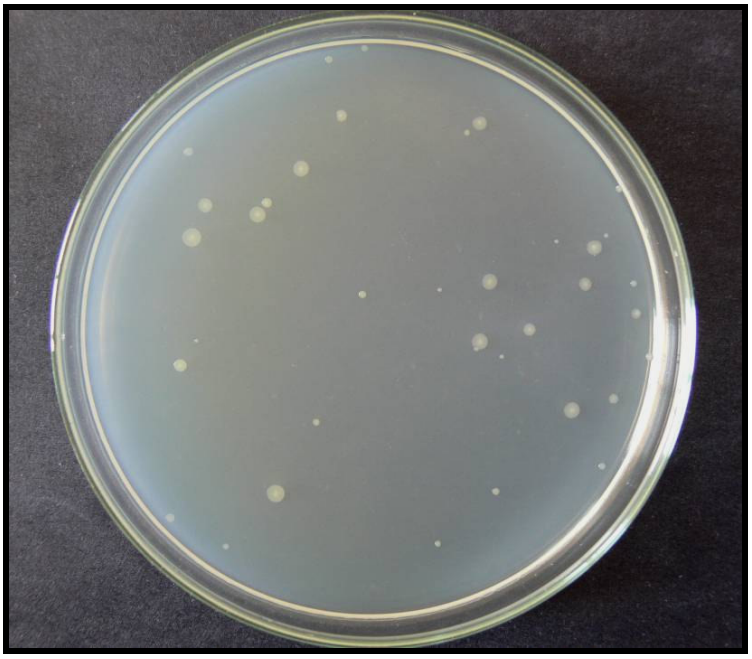
3.2.3. Kendiliğinden geri dönen koloni sayısının kontrolü

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

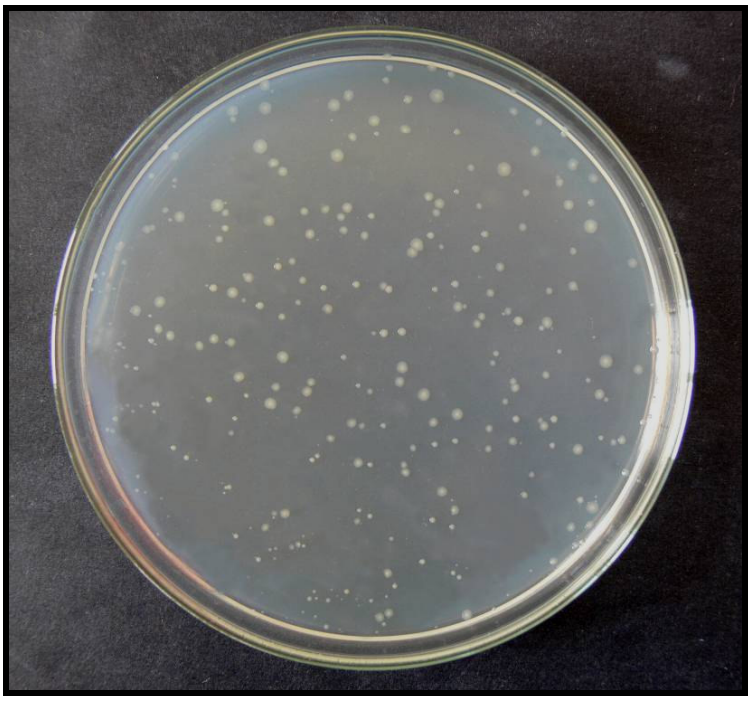
TA 98 için 30-50 revertant / plak

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 100 ml'lik üst agar 121 ^{0}C'de 20 dakika otoklavda steril edildikten sonra, 45 ^{0}C'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 ^{0}C'de 48-72 saat inkübasyondan sonra geriye dönen kolonilerin sayımı yapıldı. Bu deney her suş için bir çok kez tekrarlandı ve ortalama değerleri hesaplandı (Maron ve Ames 1983).



Şekil 3.2.3.1. *S. typhimurium* TA 98'in minimal glukoz agar plaklarında oluşturduğu revertant koloniler



Şekil 3.2.3.2. *S. typhimurium* TA 100'ün minimal glukoz agar plaklarında oluşturduğu revertant koloniler

3.2.4. Master plakların hazırlanışı

Bakteri suşlarının iki ay süre ile saklanabilmesi için (+ 4^0C'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).

3.2.5. S9 karışımının hazırlanması

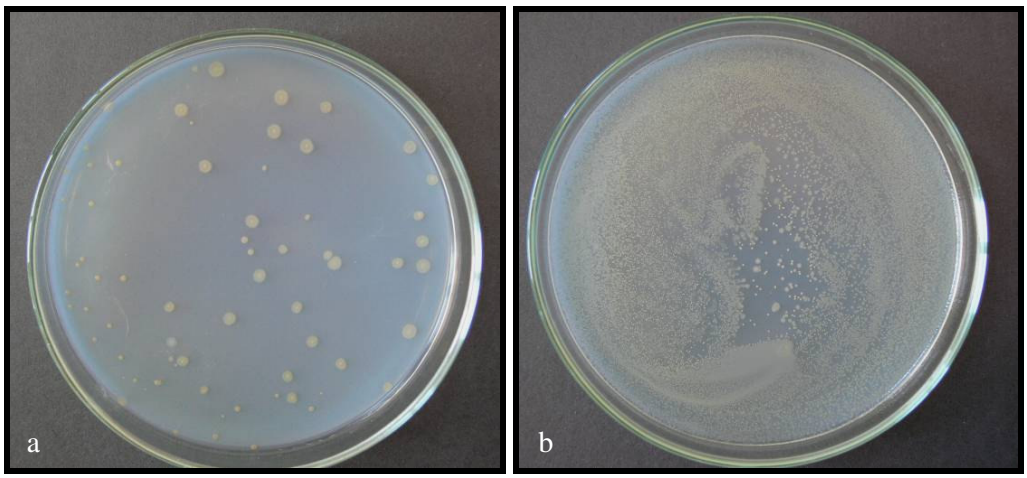
Salmonella / mikrozom test sistemi için standart S9 karışımının bileşenleri; 1 ml $MgCl_2$ (8 mM), 1 ml KCl (33 mM), 0.25 ml Glukoz-6-fosfat (5 mM), 2 ml β-NADP (4 mM), 25 ml sodyum-fosfat (100 mM), pH: 7.4 ve bu karışımın her mililitresi için 0.04 ml derişimindeki S9 fraksiyonudur. Karışım, her mutajenite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

3.2.6. Sitotoksik dozun hesaplanması

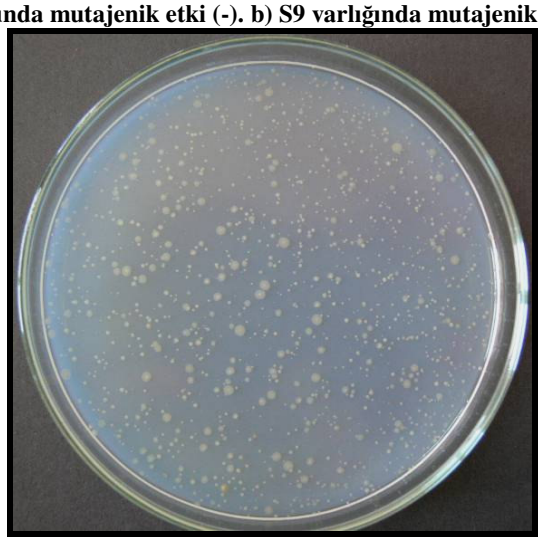
Mutajenite deneyine geçmeden önce deneyin sağlıklı olarak değerlendirilmesi için, test bileşiklerinin sitotoksik etkilerinin saptanması gerekir. Uygun sayıda bakteri içeren (1-2x10^9) kültürden serum fizyolojik kullanılarak 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} ve 10^{-6} oranlarında seyreltme yapıldı. Sitotoksik etkiyi belirlemek için daima 10^{-6} 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 ve karışım iyice çalkalandıktan sonra nütrient agarlı plaklara hızlı bir şekilde döküldü ve yayıldı. Plaklar 37 ^{0}C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan 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} dozun altında olmasıyla anlaşılır. Deneme plaklarındaki koloni sayısı, kontrol plağındaki koloni sayısının yarısının altında olmamalıdır.

3.2.7. Pozitif kontrol

Bakterilerin bilinen standart mutajenlere karşı tepkilerini saptamak için belirlenmiş bir muatjen, pozitif kontrol amacıyla esas denemeye paralel olarak yapıldı. *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu için kesin mutajen olan, 2-aminoflouren S9 karışımı varlığında ve yokluğunda kullanıldı. *Salmonella typhimurium* TA 100 için pozitif mutajen olarak sodyum azid kullanıldı. Bu pozitif mutajenlerden 2-aminoflouren; dimetil sülfoksit içerisinde, sodyum azid ise suda çözüldü. Sodyum azid plak başına 1.5 µg, 2-aminoflouren ise plak başına 10 µg konsantrasyonlarında kullanıldı.



Şekil 3.2.7. 1 *Salmonella typhimurium* TA 98'de 2-Aminoflouren'in mutajenik etkisi . a) S9 yokluğunda mutajenik etki (-). b) S9 varlığında mutajenik etki (+).



Şekil 3.2.7.2 *Salmonella typhimurium* TA 100'de S9 yokluğunda Sodyum Azid'in mutajenik etkisi (+).

3.2.8. Negatif kontrol

Test kimyasallarının ve kontrol mutajenlerinden 2-aminofloureni çözmek için kullanılan dimetil sülfoksitin, her iki bakteri suşu üzerine etkisi olup olmadığını kontrol etmek amacı ile bu deney yapıldı. Bu denemede uygun derişimdeki ($1\text{-}2x10^9$) bakteri kültüründen 0.1 ml, spektrofotometrik saflıktaki dimetil sülfoksitten 0.1 ml alınarak içerisinde 2 ml top agar bulunan tüpe aktarıldı ve karışım minimal glukoz agarlı plaklara döküldü. Plaklar 37 ^{0}C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda kontrol plakları ile deneme plaklarındaki bakteri sayıları karşılaştırıldı.

3.2.9. Salmonella/Mikrozom mutajenite testi

Bileşiklerin mutajenitesini test etmek amacı ile standart plak inkorporasyon testi kullanıldı. Plak inkorporasyon testinde test bileşiği, bakteriyel test suşu ve S9 karışımı üst agara karıştırılarak minimal glukoz agarlı plaklara döküldü. Plaklar 37 ^{0}C'de 48-72 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda plaklardaki his (+) revertant bakteri kolonileri sayıldı (Ames ve ark. 1973-a, 1973-b).

Bu yöntemde histidin ve biyotin eklenmiş 45 ^{0}C'deki 2 ml'lik üst agara, test suşu kültüründen 0.1 ml, test edilecek kimyasaldan 0.1 ml ve S9 karışımından 0.5 ml eklenip düşük hızda 3 saniye vortekslenerek oda sıcaklığındaki minimal glukoz agarlı plaklara yayıldı. Üst agarın plağın bütün yüzeyine donmadan yayılmasını sağlamak için karıştırma, dökme ve yayma işlemlerinin tümü, 20 saniyeden az bir sürede yapıldı. Her denemede her suşun ayrı ayrı geri dönme özgüllüklerini, S9 karışımının etkisini doğrulamak için pozitif mutajenler kullanılarak rutin olarak pozitif mutajenik etki kontrolleri yapıldı. Bakteriyi, S9 karışımını ve kullanılan çözücüyü içeren fakat test edilen kimyasalı içermeyen negatif kontrol plakları, her suş için kendiliğinden geriye dönen bakteri sayısının saptanmasında kullanıldı (Maron ve Ames 1983).

3.2.9 Sonuçların değerlendirilmesi

Salmonella/mikrozom test sisteminde bir maddeye mutajen denilebilmesi için, bu maddenin mutajenik etkisiyle histidin (+) hale gelen prototrofların sayılarının, kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının en az iki katı olması gerekmektedir. Bununla birlikte bu sayı kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının iki katından az olup, doza bağlı bir artış söz konusu ise bu durumda da bu maddeye mutajen denilebilmektedir (Maron ve Ames 1983).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. Test Suşlarının Üreme Durumları

Salmonella typhimurium TA 98 suşunun zamana bağlı absorbans değerleri ve kültürün mililitresindeki canlı bakteri sayıları Çizelge 4.1 de, bu değerlere göre çizilmiş olan üreme eğrileri de Şekil 4.1 de verilmiştir.

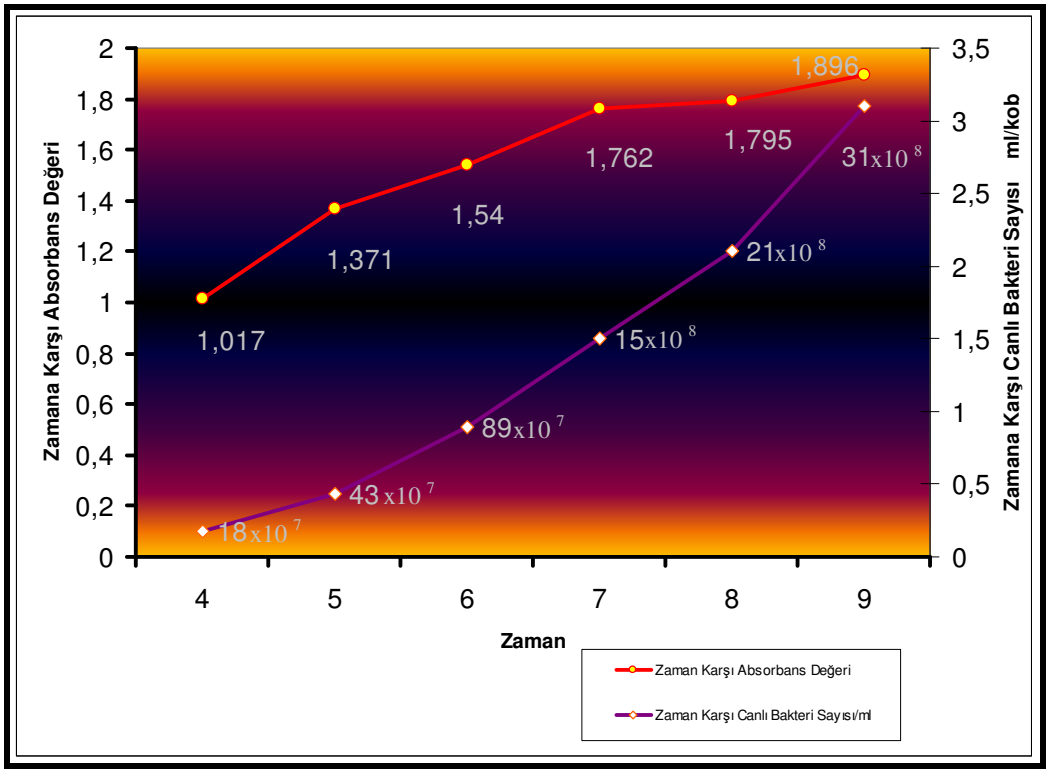
Salmonella / mikrozom test sisteminde kullanılan suşlara ait kültürlerin mililitresinde 1-2x10^9 canlı bakteri olması öngörülmektedir (Maron ve Ames 1983).

Salmonella typhimurium TA 98 suşunun mililitresinde bulunması gereken bakteri sayısına (1-2x10^9), inkübasyonun yaklaşık 7. saatinde ulaşıldı (Şekil 4.1). Bu nedenle denemelerde, çalkalamalı inkübatörde 175 rpm ve 37 ^oC'de 7 saat inkübe edilen *Salmonella typhimurium* TA 98 ve *Salmonella typhimurium* TA 100 suşları kullanıldı.

Çizelge 4.1. ***Salmonella typhimurium*** **TA 98'in zamana göre absorbans değerleri ve üreme durumu(*).**

Zaman (Saat)	Ortalama Absorbans λ=650 nm	Ortalama Canlı Bakteri Sayısı / ml
4	1.017	$0.18x10^9$
5	1.371	$0.43x10^9$
6	1.540	$0.89x10^9$
7	1.762	$1.5x10^9$
8	1.795	$2.1x10^9$
9	1.896	$3.1x10^9$

(*) Sonuçlar üç ayrı ölçüm ve sayımın ortalamasıdır.



kob: Koloni oluşturan birim

Şekil 4.1 ***Salmonella typhimurium*** **TA 98'in zamana göre absorbans değerleri ve üreme durumlarının karşılaştırılması**

4.2. Sitotoksik Dozun Belirlenmesi

Mutajenite denemelerinde kullanılan kimyasal maddelerin, toksik doz belirleme sonuçları Çizelge 4.2 de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Azalan seviyelerdeki dozlara göre plak başına oluşan koloni sayısı.

Kimyasal Maddeler	Dozlar (µg/0.1ml)						Kontrol
	5000	2500	1000	500	100	10	
2,4-D	Ø	Ø	Ø	25 kob	71 kob	87 kob	86 kob*
BNOA	Ø	Ø	Ø	59 kob	80 kob	96 kob	
4-CPA	Ø	Ø	Ø	22 kob	64 kob	84 kob	

* kob: Koloni oluşturan birim.
Ø: Koloni gözlenmemiştir.

Elde edilen verilere göre;

2,4-D için 100 µg/0.1ml ve altındaki dozların kullanılabilir olduğu tespit edildi. Mutajenite denemelerinde ise plak başına 100, 50, 10, 1 ve 0.1 µg 2,4-D solusyonları kullanıldı. 5000, 2500, 1000 µg/0.1ml dozları tamamen toksik bulundu. 500 µg/0.1ml dozunda ise koloni gelişmesine rağmen belirlenen sayılar, kontrol plağında belirlenen koloni sayısının yarısının altında olduğu için toksik kabul edildi (Çizelge 4.2).

BNOA için 500 µg/0.1ml ve altındaki dozların kullanılabilir olduğu tespit edildi. Mutajenite denemelerinde ise plak başına 500, 100, 50, 10, ve 1µg BNOA solusyonları kullanıldı. 5000, 2500, 1000 µg/0.1ml dozları tamamen toksik bulundu (Çizelge 4.2).

4-CPA için 100 µg/0.1ml ve altındaki dozların kullanılabilir olduğu tespit edildi. Mutajenite denemelerinde ise plak başına 200, 100, 50, 25 ve 10 µg 4-CPA solusyonları kullanıldı. 5000, 2500, 1000 µg/0.1ml dozları tamamen toksik bulundu. 500 µg/0.1ml dozunda ise koloni gözlemlenmesine rağmen elde edilen sonuçlar, kontrol plağında bulunan koloni sayısının yarı değerinin altında bir değere sahip olduğu için toksik olarak kabul edildi (Çizelge 4.2).

Sitotoksik dozun belirlenmesi sırasında, çözücü olarak kullanılan spektrofotometrik saflıktaki dimetil sülfoksitin (DMSO) test suşları üzerine herhangi

bir etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Buna göre çalışmada kullanılan kontrol plağında 86 koloni görülürken negatif kontrol plağında 78 koloni görülmüştür. Bu sonuca göre çözücü olarak kullanılan DMSO'nun test suşlarına herhangi bir olumsuz etkisi tespit edilmedi.

4.3 Salmonella / Mikrozom Mutajenite Testi Sonuçları

Çalışmada kullanılan bitki gelişim düzenleyicilerin, S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğundaki plak inkorporasyon testi sonuçları *Salmonella typhimurium* TA 98 için Çizelge 4.3.1 de, *Salmonella typhimurium* TA 100 için ise Çizelge 4.3.2 de verilmiştir.

Denemelere başlamadan önce suşların kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları belirlenmiş; ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

TA 98: 36± 6
TA 100: 118±14

Revertant tespit denemeleri, TA 98 için 22; TA 100 için 20 plakta gerçekleştirildi. Elde edilen bu sonuçlara göre TA 98 ve TA 100 suşlarının, çalışma için kullanılabilir olduğu tespit edildi.

Denemeler sırasında test suşlarının kendiliğinden geriye dönme potansiyellerini ve S9 karışımının etkisini doğrulalamak için mutajenik etkileri bilinen kimyasal maddeler (pozitif mutajenler) kullanılarak, rutin olarak pozitif mutajnik etki kontrolleri yapıldı. Deneylerde, pozitif mutajen olarak *Salmonella typhimurium* TA 98 için S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda 2 aminoflouren (10 µg/plak), *Salmonella typhimurium* TA 100 için ise sodyum azid (1.5 µg/plak) kullanıldı.

Çizelge 4.3.1 ***Salmonella typhimurium*** **TA 98 ile denenen bazı bitki gelişim düzenleyicilerin (S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda) plak inkorporasyon testi sonuçları.**

TA 98			
Test EdilenKimyasal Madde	**Deneme Dozu (µg/plak)**	**S9 (-) $\chi \pm S$**	**S9 (+) $\chi \pm S$**
2,4-Diklorofenoksiasetik asit	0	39±4	30±3
	0.1	30±2	24±5
	1	31±4	24±4
	10	29±4	20±4
	50	31±5	24±6
	100	37±6	24±4
Beta Naftoksiasetik asit	0	28±4	30±3
	1	29±4	27±5
	10	27±3	32±6
	50	28±2	30±4
	100	26±7	38±7
	500	29±5	28±5
4 Klorofenoksiasetik asit	0	38±4	39±4
	10	31±3	30±8
	25	34±3	32±6
	50	32±5	29±6
	100	28±3	31±3
	200	32±5	32±5
Pozitif Mutajen (2-Aminoflouren)	10	58±8	>1000

*** Her deney iki defa tekrarlanarak, her doz için 3'er plağa ekim yapılmış ve ortalama değerleri alınmıştır.**
X: Değerlerin aritmetik ortalaması
S: Aritmetik ortalamanın standart sapması

Çizelge 4.3.2 ***Salmonella typhimurium*** **TA 100 ile denenen bazı bazı bitki gelişim düzenleyicilerin (S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda) plak inkorporasyon testi sonuçları.**

TA 100			
Test Edilen Kimyasal Madde	**Deneme Dozu (µg/plak)**	**S9 (-) $\chi \pm S$**	**S9 (+) $\chi \pm S$**
2,4-Diklorofenoksiasetik asit	0	138±4	133±6
	0.1	128±12	144±15
	1	126±12	153±6
	10	134±11	150±3
	50	130±11	140±12
	100	120±10	139±10
Beta Naftoksiasetik asit	0	122±13	137±5
	1	128±18	130±18
	10	112±7	138±16
	50	135±7	180±17
	100	133±13	141±27
	500	120±14	139±12
4-Klorofenoksiasetik asit	0	129±10	163±31
	10	123±24	158±16
	25	125±12	150±32
	50	135±16	138±20
	100	137±15	139±12
	200	131±16	155±11
Pozitif Mutajen (Sodyum Azid)	10	916±57	942±58

*** Her deney iki defa tekrarlanarak, her doz için 3'er plağa ekim yapılmış ve ortalama değerleri alınmıştır.**
X: Değerlerin aritmetik ortalaması
S: Aritmetik ortalamanın standart sapması

Test edilen kimyasal maddelerin *Salmonella typhimurium* TA 98 ve *Salmonella typhimurium* TA 100 üzerinde herhangi bir mutajenik etkisinin olabilmesi için, her madde ile eşzamanlı olarak hazırlanan kontrol plaklarındaki (0 dozu) koloni sayısının; maksimum sayılarının iki katından fazla veya iki katına yakın değerlerde olması gerekmektedir. Elde ettiğimiz sayılar, bu mutajenik etki değerlerine ulaşmamıştır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günlük yaşamda, sık sık karşılaştığımız doğal ya da yapay kimyasal maddelerin bir kısmının mutajenik ve karsinojenik olabileceği tartışılmaktadır (Tomatis 1979). Son 20-30 yıllık süre içinde, insanların kullanımına sunulan yapay kimyasalların sayısı yaklaşık, 70000'e ulaşmış olup, bu sayıya her yıl 70-3000 yeni kimyasal madde eklenmektedir (Schreiner 1983).

Salmonella / mikrozom test sistemi, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenik potansiyellerini saptamak amacıyla geliştirilmiş ve günümüzde oldukça yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı test sistemlerinden biridir (Maron ve Ames 1983). Bu test sisteminde mutasyon, ortamdaki histidin tüketiminden sonra agar üzerinde koloni oluşturan histidin prototroflarının sayıları ile ölçülür. Histidin prototroflarının sayısı kimyasalların mutajenik potansiyellerinin gösterilmesinde en önemli kriter olmasına rağmen, bu sayı çeşitli faktörler tarafından etkilenebilmektedir. Farklı laboratuvarlarda ya da aynı laboratuvarda farklı zamanlarda yapılan çalışmalarda, bu sayıyı aynı oranda bulmak çok zordur. Bu nedenle her mutant suş için, kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı tek bir sayı olarak değil de, belirli bir aralıkta verilir. Birçok araştırmacı, kendiliğinden geriye dönen koloni sayılarına etki eden faktörleri belirlemek üzere çeşitli çalışmalar yapmışlardır. Bu faktörler; minimal ortamın özelliği, Glukoz -6-fosfat'ın derişimi, β-NADP ve fosfat tamponu derişimi, plaklara ekilen bakteri sayısı, plaklardaki minimal agarın hacmi, üst agarın yayılma şekli, etüvün nem oranı, üst agarın sıcaklığı, sıvı üreme ortamının hazırlanması, minimal agarın bileşimi v.b. (Boath ve ark. 1980).

Denemelerimizde test suşları olarak, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan, in vitro mutasyonlarla üretilen *Salmonella typhimurium* TA 98 ve *Salmonella typhimurium* TA 100 kullanılmıştır. Bu mutantlar his (-) olup, histidin üreten gen grubunun değişik bölgelerinde meydana gelmiş mutasyonlar içermektedirler. TA 98, çerçeve kayması mutasyonuna, TA 100 ise baz çifti değişim mutasyonuna sahiptir. Çalışmada kullanılacak kimyasallar, TA 98 suşundaki çerçeve kayması mutasyonunu ve TA 100 suşundaki baz çifti değişim mutasyonunu geri döndürüyor ise, bu maddenin mutajen olduğu söylenebilir.

Salmonella / mikrozom test sisteminin, memelilerde gerçekleşen biyotransformasyon olayına model olması için, sisteme S9 fraksiyonu eklenmiştir. Böylece bu testte kullanılan bakteri suşlarının metabolizması, memelilerdeki detoksifikasyon mekanizmasına benzetilmiştir (Ames ve ark. 1973-b).

Bu çalışmada, örtüaltı sebzeciliğinde (seracılık) önceden geniş ölçüde kullanılmış olan 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ile hala kullanımda olan Beta naftoksiasetik asit (BNOA) ve 4- Klorofenoksiasetik asit (4-CPA) maddeleri, mutajenik etkileri yönünden araştırılmıştır.

Kappas (1983), *Aspergillus nidulans*'da bazı bitki gelişim düzenleyici hormonların genotoksik aktivitesini incelemiştir. Çalışmasında İndol Asetik Asit ve İndol-3- Bütürik Asit'in *Aspergillus nidulans*'da mitotik krossing overi indüklediği sonucuna varmış ve ortama S9 fraksiyonu eklendiğinde mitotik krossing overin daha kısa sürede tamamlandığını belirtmiştir. Ayrıca IAA ve IBA'nın S9 eklenmeden önce kromozomların bağlı kalma seviyesini düşürdüğünü tespit etmiştir.

Rashid ve Mumma (1983), 2,4-Diklorofenoksiasetik asit'in beş farklı amino asit konjugatları (2,4-D-$_L$- Alanin, 2,4-D-$_L$- Aspartik asit, 2,4-D-$_L$-Lösin, 2,4-D-$_L$-Metionin ve 2,4-D-$_L$- Triptofan) ile yaptığı mutajenite çalışmalarında, bu konjugatları *Salmonella typhimurium'*un beş farklı suşunda (TA 1535, TA 100, TA 1538, TA 97, TA 98); 0, 10, 100, 1000 µg/plak dozlarında, S9 fraksiyonu yokluğunda denemiştir. Test edilen beş amino asit konjugatının hiçbirinin, suşlar üzerinde geri dönen sayısını arttırmadığını belirlemişlerdir. Aynı şekilde bizim çalışmamızda 2,4-D (S9 varlığında ve yokluğunda) saf halde herhangi bir mutajenik etki göstermemiştir. Sonuç olarak 2,4-D nin hem saf halinin hem de amino asit konujugatlarının doğrudan bir mutajenik etkilerinin olmadığı söylenebilir. Araştırmacıların sonuçları negatif bulmasının nedeni; test sırasında ortama metabolik aktivasyon enzimlerini eklememesinden kaynaklanabilir.

Rashid ve ark. (1984) yaptıkları çalışmada; oksin grubu bir hormon olan 2,4,5- Triklorofenoksiasetik asit'in 5 farklı amino asit konjugatını (2,4,5-T Aspartik asit, 2,4,5- T Glutamik asit, 2,4,5- T Lösin, 2,4,5-T Metiyonin, 2,4,5 T Triptofan); 0, 10, 100, 1000 µg/plak dozlarında beş farklı Salmonella suşu (TA 1535, TA 100, TA 1538, TA 97, TA 98) kullanarak olası mutajenik aktivitesi yönünden incelemiştir. Bu

denemeleri rat karaciğer mikrozomal ve sitosolik enzimleri (S9) varlığında ve yokluğunda gerçekleştirmişlerdir. Test edilen bu bileşikler aktivasyon sistemi varlığında ve yokluğundaki kontrol plakları ile karşılaştırıldığında önemli bir geri dönüşüme rastlanmamıştır. Ek olarak doğrusal regresyon analizleri önemli bir doz-yanıt ilişkisi göstermemiştir. Böylece test edilen 2,4,5-T amino asit konjugatlarının mutajen veya promutajen olmadığına karar vermişlerdir. Sonuç olarak, 2,4-D'ye bir klor ve bir amino asit eklenmesiyle meydana getirilmiş 2,4,5 T amino asit konjugatları; bizim çalışmamızda kullandığımız 2,4-D gibi mutajenik bir etki göstermemiştir.

Rashid ve Mumma (1986), çalışmalarında Beta Naftoksiasetik Asit'in (BNOA) farklı 10 dozunu (0.1, 1, 10, 100, 1000, 1250, 2500, 5000, 10000 μg/plak), dört *Salmonella typhimurium* suşu (TA 97, TA 98, TA 100, TA 1535) üzerinde metabolik aktivasyon sistemi varlığında ve yokluğunda mutajenite yönünden incelemişlerdir. Kullandıkları bu maddenin toksik dozlarını disk difüzyon metodu ile belirlemişlerdir. Bu durumda TA 1535 ve TA 97 suşları için 500 μg/plak değeri toksik olarak bulunmuş; genel toksitite aralığı ise dört suş için 1000-2000 μg/disk olarak hesaplanmıştır. Bizim çalışmamızda toksik doz hesabında disk difüzyon metodu yerine daha hassas ve kantitatif olan plak inkorporasyon metodu kullanılmıştır. Burada elde ettiğimiz verilere göre 500 μg/plak ve altındaki değerlerin toksik olmadığı, üstünde kalan dozların ise toksik olduğu görülmüştür. Araştırmacıların elde ettiği sonuçlara göre kullanılan standart plak inkorporasyon metodunda, dört suş üzerinde önemli herhangi bir geri dönüşüme rastlanmamıştır. Toksik dozun altında kalan diğer dozlarda BNOA'nın mutajenik bir aktiviteye sahip olmadığı; bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlarla da desteklenmektedir. Sonuç olarak kendi çalışmamızda elde ettiğimiz veriler; BNOA'nın TA 98 ve TA 100 suşları için, S9 varlığında ve yokluğunda mutajenik etkisinin olmadığını gösterirken; Rashid ve Mumma'nın bu çalışması da, BNOA'nın aynı zamanda TA 97 ve TA 1535 üzerinde mutajenik bir etki göstermediğini bildirmektedir.

Kappas (1988) çalışmasında, bitki büyüme düzenleyici hormonlardan, *Aspergillus nidulans* için kuvvetli rekombinojen olan, İndol-3- Asetik Asit (IAA) ve İndol-3- Bütirik Asit (IBA)'i *Salmonella typhimurium* suşlarında (TA 97a, TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538), metabolik aktivasyon varlığında ve

yokluğunda, 1-2000 μg/plak konsantrasyonları arasında histidin revertantları yönünden incelemiş ve mutajenik aktivitenin negatif olduğunu bulmuştur. Ayrıca klorofenoksi grubuna ait üç herbisiti (2,4-Diklorofenoksiasetik asit, 2,4-Diklorofenoksibütirik asit ve 4-kloro-2-metilfenoksiasetik asit) ile triazin grubundan atrazin ve propazin'i *Salmonella typhimurium'*da nokta mutasyonları ve *Aspergillus nidulans'*da mitotik rekombinasyon yönünden incelemiştir. Bu hormonlardan 2,4-D ve MCPA 250-750 μg/plak dozlarında TA 97a suşunda, metabolik aktivasyon varlığında zayıf mutajen olarak bulunmuştur. Yine 2,4-D ve MCPA 1500-3000 μM ve 4-48 μM konsantrasyonlarında *Aspergillus nidulans'*ta mitotik krossing overi indüklediği için, rekombinojen olarak bulunmuştur. 2,4-DB, atrazin, propazin hem Ames testinde hem de Aspergillus testinde mutajenik açıdan negatif olarak bulunmuştur. Çalışmamızda TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde 2,4-D'nin toksik olmayan dozları (0.1, 1, 10, 50, 100 μg/plak) kullanıldı. Bu dozların, S9 varlığında ve yokluğunda mutajenik bir aktiviteye rastlanmadı. Kappas'ın denemiş olduğu 500, 750, 1000 μg/plak konsantrasyonları bizim laboratuvar testlerimizde toksik çıktığı için bizim denemelerimizde bu dozlar kullanılmadı. Kappas ve bizim bulduğumuz sonuçlar; 2,4-D'nin S9 varlığı ve yokluğunda mutajenik etki göstermediği konusunda birbirini doğrulamaktadır.

Charles ve ark. (1999) çalışmalarında 2,4-D ve yedi adet tuzu ile esterlerinin genetik toksisitesini; gen mutasyonu gösteren bakterilerde (Ames testi) ve rat karaciğer hücrelerinde meydana getirdikleri hasarlar ve bunların onarımı bakımından invitro olarak incelemişlerdir. Ek olarak in vivo bir test olan; zamansız DNA sentez test sistemini (UDS), 2,4-D üzerinde çalışmışlardır. Bu denemelerde 2,4-D'nin yada türevlerinin (esterlerinin) genetik toksisite yönünden herhangi bir potansiyel taşımadığını saptamışlardır. Bu sonuç, S9 varlığı ve yokluğunda 2,4-D'nin hem rat hem de farelerde karsinojenik bir potansiyelinin olmadığını göstermiştir.

Kaya ve Yanıkoğlu (1999) çalışmalarında, 2,4-D ve 4-CPA'nın *Drosophila melanogaster*'in F_1, F_2, F_3 kuşaklarında pup olma ve pup evresi süreleri ile ergin çıkış sayıları üzerine olası etkilerini araştırmışlardır. Ana kuşak ve F_1 kuşağında uygulanan 2,4-D'nin 300 ppm'lik derişimi *Drosophila melanogaster*'in F_1 kuşağında pup olma süresini ve pup süresini geciktirip çıkan ergin birey sayısını azalttığını ve diğer etkili bir derişim olan 100 ppm'in F_3 kuşağında pup evresini kısalttığını

gözlemişlerdir. Ana kuşak ve F_1 kuşağında uygulanan 4-CPA'nın en yüksek derişimi olan 100 ppm'in F_1 kuşağında pup olma süresini geciktirdiğini; aynı derişimin F_2 kuşağında çıkan ergin birey sayısını arttırdığını ve buna karşın 20-100 ppm'lik derişimlerin F_2 kuşağında pup olma süresini kısalttığını gözlemişlerdir. Bu sonuçlara göre kullanılan bu hormonların *Drosophila melanogaster*'in üreme süreci üzerinde kalıcı bir etkilerinin olmadığını tespit etmişlerdir.

Charles ve ark. (2000) çalışmalarında, 2,4-DB'nin tuzu olan Dimetil alanin'in genetik toksititesini, Ames testinde araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda 2,4-DB Dimetil alanin tuzunun; Salmonella typhimurium TA98, TA 100, TA 1535, TA 1537 ve TA 1538 suşlarında, S9 varlığında ve yokluğunda genotoksik açıdan bir potansiyel taşımadığını saptamışlardır.

Öksüzoğlu (2000) çalışmasında, bazı bitki büyüme hormonlarının mutajenik etkilerini Salmonella / mikrozom ve SOS kromotest sistemleri ile araştırmıştır. Çalışmada kullandığı bitki büyüme hormonları; İndol-3-Asetik Asit (IAA), α-Naftalenasetik Asit, 4-CPA'nın ticari formu olan Padomin, Gibberellik asit ve bunun ticari formu olan Bereleks ve sitokinin türevi olan Benziladenin'dir. Salmonella / mikrozom test sisteminde, TA 98 ve TA 100 mutant suşlarını kullanmış ve test sistemi, S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir. SOS kromotest sisteminde ise *Escherichia coli* PQ 37 mutant suşu kullanılmıştır. Test edilen bitki büyüme hormonlarından Benziladenin sadece TA 98 suşunda ve S9 fraksiyonu varlığında zayıf mutajenik etki göstermiştir. Test edilen diğer bitki büyüme hormonları ise her iki test sisteminde de mutajenik etki göstermemiştir. Araştırıcı 4-CPA'nın ticari şeklinin (Padomin) 0.726, 1.453, 7.260, 14.530, 145.300 µg/plak dozlarında mutajenik etkili olmadığını bulmuştur. Çalışmamızda ise 4-CPA'nın saf formu, 200, 100, 50, 25 ve 10 µg/plak dozlarında mutajenik aktivite göstermemiştir. Bu da bize; 4-CPA'nın mutajenik aktivite açısından, saf ve ticari formu arasında fark olmadığını göstermektedir.

Sameshima ve ark. (2004) çalışmalarında, tam embriyo kültürlerindeki rat embriyolarında, saf 2,4-D'nin etkisini araştırmışlardır. Daha önceki çalışmalarında, 2,4-D ile besledikleri gebe rat fetuslarında prenatal gelişim etkilerinin maternal toksik, embriyoletal ve rat fetuslarında ürogenital eksikliklere sebep olduğunu belirtmişlerdir. Yine bu çalışmada 2,4-D'nin yukarıda belirtilen her bir kusur için,

doza bağlı olarak bir artış meydana getirdiğini gözlemişlerdir. Embriyonik tabakalarda önemli derecedeki azalmaları 100 µg/ml ve üstündeki dozlarda gözlemişlerdir. Yumurta kesesi oluşumu 100 µg/ml'de normaldir. 200 µg/ml'de kafa uzunluğunda azalma ve bozuk şekilli embriyolar gözlenirken bu konsantrasyonda yumurta kesesi ve kalça bölgesi normaldir. Bu çalışmada 2,4-D'nin embriyonik tabakaların gelişimi üzerine zararlı olduğunu ve embriyo gelişimine doğrudan hasar verdiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise toksik etki, 500 µg/ml'lik dozlardan itibaren başlamıştır. Araştırıcılar; 500 µg/ml'lik doza maruz kalmış kültürlerde, yumurta kesesinde ve kalça bölgesinde önemli derecede küçülmeler olduğunu bildirmişlerdir. Araştırıcıların; toksik dozu 100 µg/ml'lik konsantrasyondan itibaren tespit etmesine rağmen, çalışmamızda bu konsantrasyonun (100 µg/plak) herhangi bir toksik etki ve mutajenite göstermediği saptandı. Bunun nedeni; memeli tümör indüksiyonu çalışmalarının kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerine (Ames testi) göre daha kantitatif sonuçlar vermesi ile açıklanabilir.

Bağcı ve ark. (2005), 4-CPA'nın genotoksik etkisini insan lenfosit kültürlerinde incelemişlerdir. Kardeş Kromatid Değişim (SCE) frekansları değerlendirilen 44 verici ile kontrol grupları arasında denenen üç dozda (10, 15, 20 µg/ml), istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görmemişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız 100 µg/plak ve altındaki dozlarda herhangi bir toksik ve mutajenik etkiye rastlanmamıştır.

Ülkemizde bitki gelişim düzenleyicilerin kullanımı çeşitli sorunlardan dolayı yeterince yaygın değildir. Ancak yine de belirli alanlarda başarıyla kullanılmaktadır. Bu alanların başında örtü altı sebzeciliği gelmektedir. Özellikle domates ve patlıcanda partenokarpik meyve tutumunu sağlamak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla eskiden 2,4-D kullanılırken; bu gelişim düzenleyicinin insan sağlığına zararlı olduğu iddiaları sebebiyle yasaklanmış ve yerine 4-CPA ve BNOA kullanılması tavsiye edilmiştir. Bu hormonların piyasada satılan ticari formlarında etken madde olarak 4-CPA 14 g/l; BNOA ise 50 g/l konsantrasyonlarında bulunmaktadır (Ertekin 1997).

Bitki gelişim düzenleyicilerin kullanımında en önemli konu, bunların insana, çevreye ve hayvanlara zarar vermeyecek düzeyde ve hasattan belirli bir süre önce kullanılmasıdır. Bu ilaçlar genelde çok düşük dozlarda etkili olduklarından çok düşük düzeyde kullanılırlar. Ancak daha yüksek dozlarda veya gıdada kalıntı miktarının yüksek olmasına neden olacak şekilde, bitkiye uygulama zamanına dikkat edilmeden kullanılırsa, hem bitki, hem çevre ve dolaylı olarak da insanın zarar görmesi söz konusu olur.

2,4-D' nin insan sağlığına etkileri, davranış ve şekil bozuklukları, genetik yapıda bozukluklar ve sinir sisteminde oluşturduğu bozukluklar olmak üzere sınıflandırılabilir (Ertekin, 1997).

2,4-D ile ilgili; memeli hayvanlar ve kuşlar üzerinde yapılan çalışmalarda canlı ağırlık başına 100-300 mg 2,4-D verilince ani ölümlerin oluştuğu, canlı ağırlık başına 10 mg'ın üzerindeki dozlarda ise doğum ve üreme kusurlarının meydana geldiği bildirilmiştir. Ayrıca kadınlarda endometriois yani karın içinde tümöre yol açabildiği iddia edilmiştir. Bazı araştırıcılar Vietnam Savaşı sırasında, ağaçların yapraklarını dökmek amacıyla verilen 2,4-D'nin, savaş sonrasında bu maddeyle temas eden insanlarda doğum bozuklukları ve tümör vakalarının arttığı ileri sürülmüştür (Rhimakii ve ark. 1982).

Bitki gelişim düzenleyiciler yeterli dozda ve tam zamanında uygulanırsa insan sağlığı açısından pek zararlı olmamaktadır. Ancak aşırı doz ve zamansız yapılan uygulamalar nedeniyle bitki gelişim düzenleyiciler, meyvelerin üzerinde kalıntı bırakmasından dolayı zararlı olabilmektedir. Öte yandan uygulama esnasında dikkatsizlik sonucu sözkonusu maddeleri göz, cilt vs.'ye teması bazı akut etkiler oluşturabilmektedir (Ertekin 1997).

Ülkemizde hormon kullanımı henüz istenilen seviyede olmamasına karşılık mevcut uygulamalarda da birçok olumsuz durumla karşılaşılmaktadır. Bunlar genellikle yetiştiricilerden kaynaklanan ve yanlış uygulamalara dayanan olumsuzluklardır. Söz konusu yanlış uygulamaları başlıca şu başlıklar altında toplamak mümkündür:

- Ne kadar çok uygulama yaparsam (1 yerine 2 veya daha fazla uygulama) o kadar iyi sonuç alırım düşüncesi
- Uygulama zamanını tam tespit edememe veya buna pek önem vermeme

- Doz ayarlamasında yeterince hassas olamama veya dozu ne kadar artırırsam o kadar iyi etki eder mantığı
- Alıştığı ve sonucunu gördüğü hormonu ne pahasına olursa olsun temin edip uygulama
- Ekonomik kaygıyla aşırı doz kullanımı (Özellikle etilenle meyve olgunlaştırılması amacıyla)
- Teknik bilgileri yetersiz kişilerin tavsiyeleri
- Gereksiz yere ve hiçbir nedene dayanmayan aleyhte propagandalar
- Uygulama esnasında gereken duyarlılığı göstermeme (Akgül 2006)

Bitki gelişim düzenleyicilerin oluşturdukları sağlık ve çevresel riskler, kullanım oran ve sıklığı yanında, aktif maddeye bağlıdır. Bu yönü ile tarımsal ilaçlar ile mukayese edilemeyecek çeşitliliği olan bitki gelişim düzenleyicilerin, insan sağlığı ve çevresel riskleri tarım ilaçlarının çok gerilerindedir. Ancak konunun ülkemizde gündeme getirilmesi, hatalı bir şekilde diğer tarım ilaçlarının önüne geçirilmekte ve daha büyük risk grubu olan tarım ilaçları geri plana atılmaktadır. Kesin olarak bilinmesi gereken, tarım ilaçlarının yanlış kullanımının doğuracağı riskin, hormonlardan daha fazla olduğudur (Akgül 2006).

Sonuç olarak; araştırmamızda denemiş olduğumuz bitki gelişim düzenleyiciler, deneme dozlarında mutajenik bir aktivite göstermemiştir. Bu hormonlar, genellikle düşük dozlarda uygulandıkları zaman verim alınabilen maddelerdir. Bunun yanı sıra hormonların sebep olduğu olumsuz durumlar yüksek oranda bilinçsizlikten kaynaklanmaktadır. Tam bilinçlendirme çalışmaları yapılmalı ve bu konuyla ilgili teknik eleman sayısı arttırılmalıdır. Hormonların gelişigüzel piyasa şartlarında satılması sınırlandırılmalı ve kontrol altına alınmalıdır. İnsanlık için yeni gıdalar elde etme, kaliteli ve daha iri meyve ve sebzeler üretme bakımından faydalı olabilen bu gücü kontrol altında tutmak yine insanoğlunun yararına olacaktır.

6. KAYNAKLAR

Akgül, H. (2006), Bitki gelişim düzenleyiciler ve kullanımı. Derleme http://ebkae.gov.tr/belgeler/bgd.htm.

Akın, A., Sümer, S. (1989), Gıda katkı maddesi olarak kullanılan sodyum benzoat ve sodyum nitratın Salmonella / Mikrozom test sisteminde mutajenik etkilerinin araştırılması. Hacettepe Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, Cilt:10: 21-27.

Ames, B. N. (1972), A Bacterial systems for detecting mutagens and carcinogens, in, Sutton, E. H. and Haris, I. M., (Eds.), Mutagenic Effects of Environmental Contaminants Academic Press. New York, 57-66.

Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., Lee, F. D. (1973-a), Carcinogens are mutagens: A Simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 70, 2281-2285.

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

Bağcı, H., Bağcı, G., Açıkbaş, İ., Demir, G. (2005), In vitro testing for genotoxicity of 4-CPA by sister chromatid exchange in human lymphocyte culture. Turk. J. Med. Sci., 35: 75-78.

Beudot, C., De Me´o, M. P., Dauzonne, D., Eliasc, R., Laget, M., Guiraud, H., Balansard, G., Dume´nil, G. (1998), Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of forty-two 3-substituted flavones in the Ames Test. Mutation Research, 417, 141-153.

Boath, S. C., Welch, A. M. Garner, R. C. (1980), some factors affecting mutant numbers in the Salmonella / microsome assay. Carcinogenesis, 1 (11): 911-923.

Cappuccino, J. G., Sherman, N. (2001), The Ames test: a bacterial test system for chemical carcinogenicity. Microbiology a Laboratory Manual, Sixth Edition, San Francisco, U.S.A.

Catterall, F., Copeland, E., Clıfford, M. N., Ioannides, C. (2003), Effects of black tea theafulvins on aflatoxin B1 mutagenesis in the Ames Test. Mutagenesis, March, Vol:18, No: 2, 145-150.

Charles, J. M., Cifone, M. A., Lawlor, T. E., Murli, H., Young, R. R., Leeming, N. M. (2000), Evaluation of the in vitro genetic toxicity of 4-(2,4-Dichlorophenoxy) butyric acid. Mutation Research, 472: 75-83.

Charles, J. M., Cunny, H. C., Wilson, R. D., Bus, J. S., Lawlor, T. E., Cifone, M. A., Fellows, M., Gollapudi, B. (1999), Ames assays and unscheduled DNA synthesis assays on 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. Mutation Research, 444: 207-216.

Coombs, M. M., Dixon, C., Kissonerghis, A. M. (1976), Evaluation of compounds of known carcinogenicity, belonging to the benzaanthracene, chrysene, and cyclopentaaphenanthrene series using Ames's test. Cancer Research, Vol: 36.

de Paula, J. P., Gomes-Carneiro, M. R., Paumgartten, F. J.R. (2003), Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. Journal of Ethnopharmacology. 88, 253-260.

de Serres, F. J. (1976), Report of the conference on ın vitro mutagenicity and carcinogenicity tests, Mutat. Res., 41, 395-400.

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.

Ertekin, Ü. (1997), Örtüaltı domates yetiştiriciliği, Antalya.

Fırat, B. (1998), Bitki nasıl beslenir. Atlas Kitapevi, 1. Basım, Konya.

Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Willox, P., Dander, R. D., Foster, R. (1998), Baterial mutation assay, basic mutagenic recommended procedure. Avon Research, 227-234.

Gingold, E. B. (1986), The Ames test. experiments in molecular biology. Humana Press. Clifton, U.S.A.

Gomes-Carneiro, M. R., Felzenszwalb, I., Paumgartten, F. J. R. (1998), Mutagenicity testing of camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, menthol and terpineol with the Salmonella / microsome assay. Mutation Research, 416, 129-136.

Gümüş, F., Algül, Ö., Eren, G., Eroğlu, H., Diril, N., Gür, S., Özkul, A. Synthesis, cytotoxic activity on mcf-7 cell line and mutagenic activity of platinum(II) complexes with 2-substituted benzimidazole ligands. European Journal of Medicinal Chemistry. 38, 473-480.

Hedenstedt, A., Jenssen, D., Lidesten, B. M., Ramel, C., Rannung, U., Stern, R. M. (1977), Mutagenicity of fume particles from stainless steel welding, J. Work Environ. Health., 3, 203-211.

Hofnung, M., Quillardet, P.(1986), Recent developments in bacterial short-term for the detection of genotoxic agents. Mutagenesis, 1(5), 319-330.

Houk, V. S., Schalkowsky, S., Claxton, L. D. (1989), Development and validation of the spiral Salmonella assay: An automated approach to bacterial mutagenicity testing. Mutation Research, 223: 49-64.

IARC, (1980), Monographs on the carcinogenic risks of chemicals to humans. Supp. z., long term and short term screening assays for carcinogens.: A Critical Appraisal, IARC Monographs Supplement 2. IARC Lyon, International Agency for Research on Cancer.

Isono, K., Yourna, J. (1974), Chemical carcinogens as frame shift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 1612-1617.

İpek, E., Zeytinoğlu, H., Okay, S., Tüylü, B. A., Kurkcuoglu, M., Baser, K. H. C. (2005), Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. Food Chemistry, 93: 551-556.

İpek, F. M., Gülle, B. (2004), Tekstil endüsrisinde kullanılan boya maddelerinin Ames test sistemi ile mutajenik etkilerinin araştırılması. www.biyoturk.com

İzbırak, A., Sümer, S., Diril, N. (1990), Gıdalara katılan azo boyalarının mutajenik etkilerinin test edilmesi. Mikrobiyoloji Bülteni, 24: 48-56.

Kalaycıoğlu, A., Öner, C., Erdem, G. (1997), Bitki özütlerinin pestisitlere karşı anti-mutajenik özelliğinin *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında gözlenmesi. Turkish Journal of Botany, Vol: 21, No: 3, 127-130.

Kaplan, Ç., Diril, N., Sahin, S., Cehreli, M. C. (2003), Mutagenic potentials of dental cements as detected by the Salmonella/microsome test. Biomaterials. 25, 4019-4027.

Kappas, A. (1983), Genotoxic activity of plant growth regulating hormones in *Aspergillus nidulans.* Carcinogenesis, 11 (4): 1409-1411.

Kappas, A. (1988), On the mutagenic and recombinogenic activity of certain herbicides in *Salmonella typhimurium* and *Aspergillus nidulans.* Mutation Research, 204. 615-621.

Kaya, B., Yanıkoğlu, A. (1999), 2,4-D ve 4-CPA'nın *Drosophila melanogaster*'in F_1, F_2 ve F_3 kuşaklarında gelişim süresi ve ergin birey sayısına etkileri. Turkısh Journal of Zoology, 23, Ek Sayı 1: 297-301.

Kutlu, M., Aydogan, G., Susuz, F., Özata, A. (2004), The Salmonella mutagenicity of water and sediments from the Porsuk River in Turkey. Environmental Toxicology and Pharmacology. 17, 111-116.

Kutlu, M., Aydoğan, G., Işıkdağ, İ. (2006), İki yeni benzimidazol türevinin sentezi, yapısal analizi ve mutajenik aktivitelerinin belirlenmesi. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi. 5 (1-2), 25-36. Türkiye.

La Velle, J. M. (1986), Potasium chromate potentiates frameshit mutagenesis in E. Coli and S.typhimurium. Mutation Research, 171:1-10.

Le Curieux, F., Marzin, D., Erb, F. (1993), Comparison of three short-term assays: results on seven chemicals. Mutat. Res., 319, 223-236.

Levin, D. E., Yamasaki, E., Ames, B. N. (1982), Salmonella tester strain, TA 97 for the detection of frameshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hot-spot. Mutat. Res., 94, 315-330.

Li, Y., Noblitt, T. W., Dunipace, A. J., Stookey, G. K. (1990), Evaluation of mutagenicity of restorative dental materials using the Ames Salmonella / Microsome test. Journal of Dental Research, Vol: 69, 1188-1192.

Mano, H., Yamamato, M., Araya, J. C., Kato, K., Tsutsui, M., Ohta, T., Yoshida, K., Kınebuchi, H., Hayatsu, H. (1993), Mutagenicity of blue rayon extracts of human bile in the Ames test. Mutation Research, 290: 303-309.

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

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

Mc Daniels, C. C., Stelma, G. N. Jr. (1990), Comparision of the Salmonella (Ames) test , UMU tests and SOS chromotests for detecting genetoxines. Environ. And Mol. Mutagenesis. 16, 204-215.

Mc Mahon, R. E., Cline, J. C., Thompson, C. Z. (1979), Assay of 855 test chemicals in ten tester strains using a new modification of the Ames test for bacterial mutagens. Cancer Research, Vol: 39, 3: 682-693.

McClain, R. M., Wolz , E., Davidovich, A., Bausch, J. (2005), Genetic toxicity studies with genistein. Food and Chemical Toxicology. 44, 42-55.

Menevşe, S., Kuştimur, S., Menevşe, A., Ekmekçi, A., Ergin, M. (1984), çevremizdeki mutajenik ve karsinojenik maddelerin *Salmonella typhimurium* TA 104 suşu ile saptanması. Mikrobiyoloji Bülteni, 18: 99-106.

Mercangöz, A., Tüylü, B. A. (2000), 2,4,5 Tri (Sübstitüe) fenil imidazol ve türevlerinin mutajenik etkilerinin Ames / Salmonella test sisteminde saptanması. Turkish Journal of Biology, 24: 57-64.

Miyata, M., Takano, H., Guo, L. Q., Nagata, K., Yamazoe, Y. (2004), Grapefruit juice ıntake does not enhance but rather protects against aflatoxin B1-induced liver DNA damage through a reduction in hepatic CYP3A activity. Carcinogenesis, February, Vol: 25, No: 2, 203-209.

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

Murray, R. K., Mayes, P. A., Granner, D. K., Rodwell, U. W., (1996), Harper's Biochemistry. 799-806, Appleton&Lange press.,U.S.A.

Musatov, S. A., Anisimov, V. N., André, V., Vigreux, C., Godard, T., Gauduchon, P., Sichel, F. (1998), Modulatory effects of melatonin on genotoxic response of reference mutagens in the Ames test and the Comet assay. Mutation Research, 417, 75-84.

Ogawa, H. I., Sakata, K., Inouye, T., Jyosui, S., Niyitani, Y., Kakimoto, K., Morishita, M., Tsurata, S., Kato, Y. (1986), Combined mutagenicity of cobalt(II) salt and heteroaromatic compounds in *Salmonella typhimurium*. Mutation Research, 172: 97-104.

Öksüzoğlu, E., Diril, N., Durusoy, M. (2000), Mutagenic effects of planth growth hormones with the Salmonella/microsome test and the SOS chromotest.Bull. Environ. Contam. Toxicol., 65, 691-698.

Önder, N., Yentür, S. (1997), Bitkilerin gelişme, farklılaşma ve hareket fizyolojisi. İstanbul Üniversitesi Yayınları No:4135.

Pai, C. A. (1985), Foundation of genetics, a science for society. Keyford Pres. USA.

Pandita, T. K. (1988), Assesment of the mutagenic potantial of a fungicide bauistin. using multipl assay. Mutat. Res., 204, 627-643.

Pillai, S. P., Shankel, D. M. (1997), Polyamines and their potential to be antimutagens. Mutation Research, 377, 217-224.

Ramel, C., Rannung, U. (1980), Short term mutagenicity test. Environ. Healt. 6, 1065-1076.

Ramos, A., Rivero, R., Victoriab, M. C., Visozo, A., Piloto, J., Garcıa, A. (2001), Assessment of mutagenicity in *Parthenium hysterophorus* L.. Journal of Ethnopharmacology. 77, 25-30.

Rapp, S. N., Chung, Y., Shın, S. H., Hong, I. S., Jang, J. Y., Seel, D. J. (1988), Mutagenic and anti-mutagenic properties of meju and other korean food products from fermented soybeans. Yonsei Medical Journal, Vol: 29, No: 2, Korea.

Rashid, K. A., Babish, J. G., Muma, R. O. (1984), Testing of 2,4,5-T-amino acid conjugates for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* strains. Mutation Research, 136: 217-221.

Rashid, K. A., Mumma, R. O. (1983), Mutagenicity assay with (2,4-Dichlorophenoxy) acetic acid- amino acid conjugates. J.Agric. Food Chem., 31: 1371-1372.

Rashid, K. A., Mumma, R. O. (1986), Evaluation of beta naphthoxyacetic acid for mutagenic activity in the Salmonella / mammalian microsome assays. J. Environ, SCI. Health, B21 (3), 243-350.

Rasool, A.S., Mushtaq, R. (1991), Genetic activity of certain chemicals in Salmonella-mıcrosomal screening system. Journal of Islamic Academy of Sciences 4:4, 301-304.

Rhimakii, V., Asp, S., Hernberg, S. (1982), Mortality of 2,4-D and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid herbicide applicators in Finland.

Ruiz, M. J., Marzin, D. (1997), Genotoxicity of six pesticides by Salmonella mutagenicity test and SOS chromotest. Mutation Research 390, 245-255.

Sameshima, K., Kobae, H., Fofana, D., Yoshidome, K., Nishi, J., Miyata, K. (2004), Effects of pure 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on cultured rat embryos. Congenital Anomalies, 44: 93-96.

Schreiner, C. A. (1983), Application of short term tests to safety testing of ındustrial chemical cellular systems for toxicity testing in annals New York Academy of Sciences. Press in New york.

Seçer, M. (1989), Doğal büyüme düzenleyicilerin (bitkisel hormonların) bitkilerdeki fizyolojik etkileri ve bu alanda yapılan araştırmalar. Derim 6(3): 109-124.

Stammat, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H-L., von Wright, A. (1999), Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. Food and Chemical Toxicology 37, 813-823.

Sümer, S., Diril, N., İzbırak, A. (1990), Salmonella / Mikrozom test sistemi ile bazı insektisitlerin mutajeniteleri üzerine bir çalışma. Mikrobiyoloji Bülteni, 24: 103-110.

Taira, K., Miyashita, Y., Okamoto, K., Arimoto, S., Takahashi, E., Negishi. T. (2005), Novel antimutagenic factors derived from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. Mutation Research. 586, 115-123.

Tomatis, L. (1979), The Predictive volue of rodent carcinogenicity tests in the evaluation of human risks. Ann. Rev. Pharmacol, Toxical, 19: 511-530.

Umbuzeiro, G. A., Kummrow, F., Roubicek, D. A., Tominaga, M. Y. (2005), Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in relation to the sediment contamination and effluent discharges. Environment International. 32, 359-364.

Varella, S. D., Pozetti, G. L., Vilegas, W., Varanda, E. A., (2004), Mutagenic activity in waste from an aluminum products factory in Salmonella/microsome assay. Toxicology in Vitro. 18, 895-900.

Vargas, V. M. F., Motta, V. E. P., Henriques, J. A. P. (1993), Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the ınfluence of petrochemical industries. Mutation Research, 319: 31-45.

Vural, N. (1984), Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 73, 115-124.

Weng, C. Y., Martines, A. J., Park, D. L. (1997), Anti-aflatoxin mutagenic factors in corn. Food Addit. Contam., April, 14 (2):269-79.

Westwood, M.N. (1993), "Hormones and growth regulators", temparate zone pomology physiology and culture. Timber Press, Inc. 9999 S.W. Wilshire, Suite 124, Portland, Oregon 97225.

Yeşilada, E. (2000), *Drosophila melanogaster*'de EMS ile indüklenmiş somatik mutasyon ve rekombinasyon üzerine kinetin, gibberellik asit ve indol asetik asitin etkisi. Turkish Journal of Biology, 24: 279-284.