

**PORSUK NEHRİ 'NİN
GENOTOKSİK ETKİSİ**

Banu DİLEK
Yüksek Lisans Tezi

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Eylül-2004

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Banu DİLEK'in "Porsuk Nehri Mutajenitesinin Ames/Salmonella Test Metodu İle Araştırılması" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi ...28.06.2004...tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

ADI SOYADI

İMZA

Üye (Tez Danışmanı)

: Prof. Dr. Ahmet ÖZATA

Üye

: Doç. Dr. H. Mehtap KUTLU

Üye

:Doç. Dr. Rıdvan SAY

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun...08.09.2004...tarih ve ...29/24...sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Altuğ İFTAR
Fen Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi****PORSUK NEHRİ MUTAJENİTESİNİN AMES/SALMONELLA TEST
METODU İLE ARAŞTIRILMASI****BANU DİLEK****Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman
Prof. Dr. Ahmet ÖZATA****2004, 42 Sayfa**

Bu tezde Porsuk nehrinin değişik örnekleme istasyonlarından alınan su örnekleri Ames/Salmonella mutajenite test sistemi ile TA98 ve TA100 Salmonella typhimurium suşları kullanılarak test edilmiştir. TA98 çerçeve kaymasına yol açan mutajenlerin, TA100 ise baz çifti değişimine yol açan mutajenlerin belirlenmesi için kullanılmıştır. Su örnekleri nonkonsantre olarak test edilmesinin yanısıra XAD-4 ve XAD-16 kolonları kullanılarak ekstre edilmiş ve sonuçlar student-t testi ile değerlendirilmiştir. XAD-4 ekstralarında TA98 suşunda iki istasyonda mutajenite saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Mutajenite, Ames Test, Nehir Suyu, XAD-4, XAD-16.

ABSTRACT**MUTGENIC ACTIVITY DETECTED BY THE AMES TEST IN POSUK
RIVER WATER****Master of Science Thesis****BANU DİLEK****Anadolu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Program****Supervisor:****Prof. Dr. Ahmet ÖZATA****2004, 42 pages**

In this thesis genotoxic characteristics of water from different stations of the Porsuk River were determined by Ames/*Salmonella* mutagenicity systems with *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains. TA98 is designed for frameshift mutagens and TA100 is designed for base-pair mutagens. Different columns of XAD-4 and XAD-16 were used to fractionate the water samples and non-concentrated samples were used. The results were compared with student-t test. Positive results of water samples were obtained in XAD-4 extracts for TA98 in two stations.

Keywords: Mutagenicity, Ames Test, River Water, XAD-4, XAD-16.

TEŞEKKÜR

Anadolu Üniversitesi öğrencisi olmamda büyük katkıları olan hocam Yard.Doç.Dr. Cengiz TÜRE'ye, danışmanlığımı kabul eden hocam Prof.Dr.Ahmet ÖZATA'ya, tezimin tüm aşamalarında desteğini esirgemeyen hocam Doç.Dr.Mehtap KUTLU'ya, laboratuvar çalışmaları boyunca yanımda olan hocam Uzman Erdoğan ÇAKIR'a, dostluklarını ve yardımlarını asla unutamayacağım sevgili dostlarım Arş.Gör. Gözde AYDOĞAN ve Arş.Gör. Volkan KILIÇ'a ve son olarak gelecekteki hayat arkadaşım nişanlım Özkan SARIKAYA'ya yürek dolusu sevgiler ve teşekkürler...

Bu çalışmayı benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem Gülşen DİLEK ve babam Şükrü DİLEK'e ithaf ediyorum.....

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1.GİRİŞ.....	1
1.1.Amaç.....	1
1.2. Mutasyon.....	3
1.2.1. Kromozom Mutasyonları.....	3
1.2.1.1. Kromozom sayı değişimleri (Genom Mutasyonları).....	3
1.2.1.2. Kromozom yapı değişimleri(kromozom mutasyonları).....	3
1.2.2. Gen Mutasyonları.....	3
1.2.2.1. Baz çifti değişimleri.....	4
1.2.2.2. Çerçeve (kodon) kayması (Frame-Shift) mutasyonları.....	4
1.2.2.3. Bazlar arasında bağların oluşması (Dimerizasyon).....	5
1.2.2.4. Bazlarla şekerler ve şekerlerle fosfatlar arasındaki bağların kopması	6
1.2.3. Mutasyonların kökeni.....	6
1.2.3.1.Kendiliğinden (spontan) mutasyonlar.....	7
1.2.3.2 Yapay mutasyonlar	7
1.3. Mutajen ve Kanserojen Maddeler	7
1.3.1. Mutajen maddeler.....	7
1.3.1.1. Fiziksel mutajenler.....	7
1.3.1.2. Kimyasal mutajenler.....	7
1.3.1.2.1. Bazların kimyasal yapısını değiştiren kimyasal maddeler.....	8
1.3.1.2.2. Baz analogları.....	8
1.3.2. Kanserojen maddeler.....	8
1.3.2.1. Primer veya doğrudan etkili kanserojenler.....	10
1.3.2.2. Sekonder kanserojenler.....	11

1.3.2.3. Ko-kanserojenler.....	11
1.4. Mutajenite Testleri.....	12
2.MATERYAL VE METOD.....	15
2.1. Materyal.....	15
2.1.1. <i>Salmonella typhimurium</i> test suşları.....	15
2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	15
2.1.3. Deneyde kullanılan ortamların içerikleri ve hazırlanmaları.....	15
2.1.4. Örneklerin toplanması ve saklanması.....	19
2.2. Metod.....	19
2.2.1. <i>Salmonella</i> suşlarının kültürlerinin ve master plakların hazırlanması	20
2.2.2. <i>Salmonella</i> suşlarının stoklanması ve stok kültürlerin açılması.....	21
2.2.3. Bakterilerin genotiplerinin kontrol edilmesi.....	21
2.2.3.1. Histidin gereksinimi kontrolü.....	21
2.2.3.2. <i>uvrB</i> mutasyonu kontrolü.....	23
2.2.3.3. <i>Rfa</i> mutasyonu kontrolü.....	23
2.2.3.4. R faktör varlığının kontrolü.....	25
2.2.3.5. Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü.....	25
2.2.4. Sıvı kültürün ml.'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi.....	25
2.2.5. Test maddelerinin sitotoksik etkilerinin saptanması.....	25
2.2.6. Su örneklerinin hazırlanması.....	27
2.2.7. Ames testinin yapılışı.....	29
2.2.8. Sonuçların değerlendirilmesi.....	29
3. BULGULAR.....	33
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
5. KAYNAKLAR.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Baz çifti değişimi ile meydana gelen mutasyonlar.....	5
1.2. Çerçeve kayması mutasyonları.....	5
1.3. Bazlar arası bağların oluşması sonucu meydana gelen mutasyon.....	6
1.4. Çeşitli maddelerin oluşturduğu baz çifti değişimi mutasyonları.....	9
1.5. Baz analoglarının yol açtığı baz çifti değişimi mutasyonları.....	10
2.1. Porsuk havzası boyunca örneklerin alındığı istasyonlar.....	20
2.2.a.TA 98 suşunun histidin gereksinimi kontrolü sonucunda HB plaklarında üreme.....	22
2.2.b.TA 100 suşunun histidin gereksinimi kontrolü sonucunda HB plaklarında üreme.....	22
2.3.a.TA 98 suşunda <i>uvrB</i> mutasyonu kontrolünde radyasyona maruz kalan bölgede üreme gerçekleşmemesi	24
2.3.b.TA 100 suşunda <i>uvrB</i> mutasyonu kontrolünde radyasyona maruz kalan bölgede üreme gerçekleşmemesi.....	24
2.4.a.TA 98 suşunda <i>Rfa</i> mutasyonu kontrolü.....	26
2.4.b.TA 100 suşunda <i>Rfa</i> mutasyonu kontrolü.....	26
2.5.a.R faktör varlığının kontrolü sonucundaTA 98 suşunun ampisilinli ortamda gelişmeleri.....	28
2.5.b.R faktör varlığının kontrolü sonucundaTA 100 suşunun ampisilinli ortamda gelişmeleri.....	28
2.6.a.TA 98 suşunda spontan geriye dönüş sayısının kontrolü.....	30
2.6.b.TA 100 suşunda spontan geriye dönüş sayısının kontrolü.....	30
2.7.a.TA 98 suşu için sıvı kültürün ml. sindeki mikroorganizma sayısının belirlenmesi.....	32
2.7.b.TA 100 suşu için sıvı kültürün ml. sindeki mikroorganizma sayısının belirlenmesi.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Kanserojen maddeler ve kanserojen üretim prosesleri.....	11
1.2. Kanserojen olması kuvvetle muhtemel maddeler listesi.....	12
3.1. XAD-4 kolon ile ekstradan edilen su örneklerinin mutajenite analizi.....	34
3.2. XAD-16 kolonu ile ekstradan edilen su örneklerinin mutajenite analizi.....	34
3.3. XAD-4 ve XAD-16 kolonları ile ekstradan edilen örneklerin mutajenite karşılaştırması.....	34
3.4. Nonkonsantre örneklerin mutajenite analizi.....	34

1.GİRİŞ

1.1.Amaç

Günümüzde insanları en fazla ilgilendiren ve yaşamın temeli olan konular arasında gıda sağlık ve çevre konuları önemli yer tutmaktadır. Tüm bu konular ile ilişkili olan temiz kullanılabilir su ise dünya nüfusunu ve yaşam kalitesini doğrudan etkilemektedir. Endüstriyel teknolojinin gelişmesine paralel olarak su, hava ve toprağın sağlığa zararlı maddelerle kirlenmesi insanoğlunun karşısındaki en önemli toksikolojik sorunlardan biridir. Üretim aşırı şekilde artması, doğanın kendini yenileme kapasitesinin üzerine çıktığında kirlenme başlamaktadır. Günümüzde teknik olarak kullanılabilir durumda olan tatlı su kaynaklarının oldukça sınırlı olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan hızla artan nüfus hızlı kentleşme, sanayileşme, tarım alanlarında bilinçsiz gübre ve pestisid kullanımı endüstriyel ve evsel atıkların suya deşarjı, kullanımı sınırlı olan tatlı su kaynaklarının hızla kirlenmesine neden olmaktadır. Sanayinin neden olduğu kirlenme endüstri koluna göre farklılıklar göstermektedir. Bunun yanında içme suyu amacı ile kaynakların klorlanması ve diğer enfeksiyon giderici uygulamalarda kirliliğe neden olmaktadır. Tüm bu etkilerle su kaynaklarında oluşan kirlilik; mutajenik ve kanserojenik madde oluşumuna yol açmakta bu da insan sağlığı ve kanserle doğrudan ilişkisi açısından önemli bir problem haline gelmektedir. [1-5]

Organik kirleticiler ile su kirliliği tüm sucul ekosistemlerin korunması ve içme suları kaynaklarını ilgilendiren en önemli sorundur. Bu organik kirleticilerin belirlenmesi oldukça zordur. Kirleticilerin çoğunun tek veya birlikte biyolojik etkisi tam olarak bilinmemektedir. Sağlık açısından tehlike yarattığı düşünülen bu organik kirleticilerin sruşturulmasında ve biyolojik etkilerinin incelenmesinde en iyi yol küresel geçerliliği olan sonuçlar alınabilecek biyolojik testlerin kullanılmasıdır. [6]

Kimyasal maddelerin karsinojenik risklerini ortaya çıkarmak için en akılcı yaklaşım deney hayvanlarında tümör indüksiyonudur. Ancak bu testlerin sonuçlanması uzun zaman almakta ve maliyetleri yüksek olmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar karsinojenite araştırmalarına esas olabilecek, kısa zamanda sonuç

verebilen ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı test sistemleri geliştirmişlerdir. Bu testler kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini belirlemeye yöneliktir. Kısa zamanlı test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanları bakteriyel testlerdir. Bakteriyel testler bakterilerin basit üreme ortamlarında hızla üreyebilmeleri, basit, çabuk ve ucuz uygulanabilir olmaları nedeni ile tercih edilmektedirler. Karsinojenlerin taranmasında mutajenitenin esas alınması iki nedene dayanır:

1. Genetik kodun ve genetik sistemin evrensel oluşu.
2. Mutajenite ile karsinojenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşu.

Bakteriyel test sistemlerinde mutajen olduğu saptanan birçok bileşiğin aynı zamanda kanserojen olduğu gösterilmiştir. Kanserojen ve mutajenlerin neden olduğu özgül DNA hasarlarının tiplerini saptamada bakteriyel test sistemleri kullanılmaktadır. Kısa zamanlı bakteriyel test sistemleri karmaşık kimyasal örneklerdeki mutajenik bileşiklerin ve metabolik aktivasyon sonucu ortaya çıkan reaktif bileşenlerin saptanmasında analitik araçlar haline gelmişlerdir. [7]

İçme sularında, işlenmemiş doğal kaynaklarda ya da endüstriyel akıma maruz kalan sularda genotoksik etkiye sahip maddelerin belirlenmesi diğer yüksek konsantrasyondaki maddelerin varlığında zordur. Genotoksik aktivitenin belirlenmesi için uygun metodun seçimi kompleks karışımdaki maddelerin sınıfını bilmesi ile ilgilidir. Bu kimyasal tanımlama ise her zaman olanaklı değildir. Sulardaki genotoksisitenin değerlendirilmesi için ideal bir metot konsantre edilmemiş örnek kullanılmasıdır. Bunun yanında bu yöntem organik madde kaybına ya da yer değişimine neden olabilir. Ayrıca bu yöntem düşük seviyedeki kirleticileri belirlemeyebilir. Bu yüzden genotoksisite testlerinde örneğin konsantrasyonu önemli hale gelmiştir. [8]

Bu nedenle çalışmamızda örnekler çeşitli metotlarla konsantre edilerek test edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı Eskişehir ve Kütahya başta olmak üzere bir çok şehrimizin su ihtiyacını karşılayan ve beslediği havza boyunca çeşitli kirletici etkilere maruz kalan Porsuk çayının Eskişehir havzasındaki genotoksisitenin belirlenmesidir.

1.2. Mutasyon

Genetik materyali oluşturan nükleotidlerin sıralanması, sayısı ya da çeşidinde ortaya çıkan ve dolayısı ile sentezlenen polipeptidin yapısını ve/veya işlevini bozan kalıtsal değişikliklere **mutasyon** denir. Genotipte meydana gelen bu olay bir ya da daha fazla karakterdeki değişimle kendini belli eder. Böyle bir değişikliğin ürünü **mutant** olarak adlandırılır. Bu terim bir gen, bir hücre veya bir birey için kullanılabilir. Mutasyonlar kalıtsal, daha önceden şifrelenmemiş, programlanmamış ve oldukça ender meydana gelen değişikliklerdir. Mutasyon kapsamına giren değişimler kolay anlaşılması için iki grup altında toplanabilir. [9-12]

1.2.1. Kromozom mutasyonları

1.2.1.1. Kromozom sayı değişimleri (Genom mutasyonları)

Bireylerin sahip olduğu kromozomların sayısında tam katlar halinde artma (**poliploidi**) ya da azalmalar (**monoploidi**) ya da kromozomlardan bazılarının sayısındaki artma veya azalmaları (**anöploidi**) kapsar.[10]

1.2.1.2. Kromozom yapı değişimleri (kromozom mutasyonları)

Kromozomlarda kırılmalar sonucu meydana gelen parça kayıpları (**delesyon**) veya artışlarını (**duplikasyon**) parça yerleşim düzenlerindeki değişimleri (**inversiyon**) kromozomlar arası parça değiş tokuşlarını (**translokasyon**) kapsar.[10]

1.2.2. Gen mutasyonları

Genlerin yerinde değişim olmaksızın, yapılarında meydana gelen değişimlerdir. Kromozomların morfolojik karakterini değiştirmezler. Mutasyonlar moleküler düzeyde dört tip değişimden köken alarak oluşurlar.[9,10]

1.2.2.1. Baz çifti değişimleri

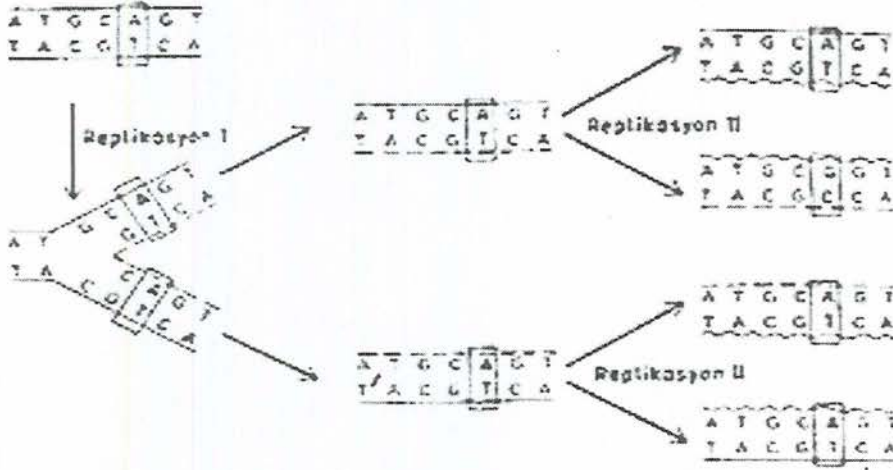
Bu tip değişimler nokta mutasyonları oluştururlar. Genin içindeki bir yada birkaç baz çiftinin yerini başka baz çiftinin almasıyla meydana gelirler. Bu tip mutasyonlarda değişimler pürin-pürin değişimleri (**transizyon**) şeklinde olabileceği gibi pürin- pirimidin değişimleri (**transversiyon**) şeklinde de olabilir. Bunun dışında bazın kimyasal yapısındaki değişimle eşleşme sırasında yapılan H bağlarının sayısı değişir ve yanlış eşleşme yapılır. Bazın kimyasal yapısının değişmesi 2 şekilde meydana gelir. Geçici tautomerik değişimde genlerin yapısında bulunan bazların halka yapısındaki atomların yer değişmesi ile replikasyon sırasında bazlar arasında yanlış eşleşmeler yapılabilir. Örneğin A hatalı olarak G ile eşleşebilir. Kalıcı değişimlerde ise DNA'nın bir bazında kalıcı yapı değişimleri ile mutasyonlara yol açarlar. Bu tip değişimlerin ortaya çıkması için hücrenin replikasyon geçirmesi gereklidir. Bir bazın yerini başka bir bazın alması ile meydana gelen kalıcı değişimlerde replikasyon sırasında meydana gelir ve değişikliğin ortaya çıkması için birkaç replikasyon döngüsünün daha geçirilmesi gereklidir. Baz çifti değişimleri ile meydana gelen mutasyonlarda genin işlevi kalıntı olarak devam eder ve genin ürünü olan protein aktivitesi tam olarak yitirilmez(Şekil 1.1).[9-13]

1.2.2.2 Çerçeve (kodon) kayması (Frame-Shift) mutasyonları

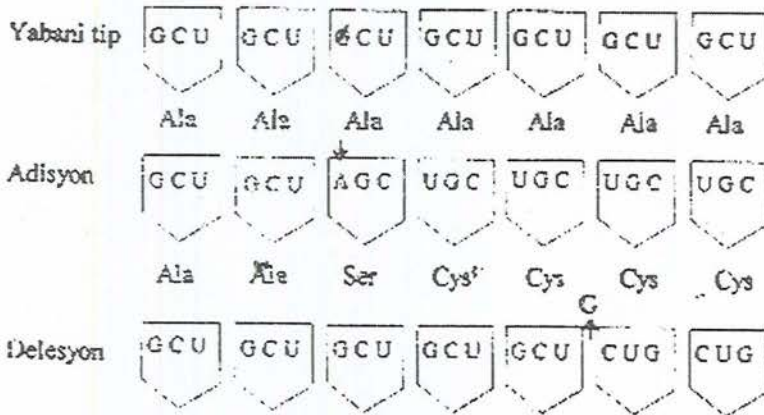
Genin ürününü belirleyecek bölgede kodonların kayması ve genin ürününe ait bilginin değişmesi şeklinde olur. Bu mutasyonlar bir baz çiftinin aradan çıkması (**delesyon**) şeklinde olabileceği gibi yeni bir baz çiftinin yapıya girmesi (**adisyon**) Şekil 1.2.de gösterildiği gibi de olabilir. Her iki biçimde de gerçekleşen mutasyon sonucu mutasyonun meydana geldiği noktadan itibaren tüm kodonlar değişime uğrar ve genin ürünündeki değişiklik oldukça fazla olur. Bu nedenle kodon kayması ile oluşan mutasyonun fenotipde ortaya çıkma olasılığı baz çifti değişimi ile oluşan mutasyonların ortaya çıkma olasılığına göre daha yüksektir. [10,12]

1.2.2.3. Bazlar arasında bağların oluşması (Dimerizasyon)

Pirimidin bazları arasında kovalent bağ oluşumuna dayanan bu mekanizmada başlıca etken UV ışınlarıdır. Dimerizasyon nedeni ile DNA zincirinde yan yana veya karşılıklı olarak yer alan pirimidin bazları arasındaki mesafe kısalmır. Buna



Şekil 1.1. Baz çifti değişimi ile meydana gelen mutasyonlar



Şekil 1.2. Çerçeve kayması mutasyonları

Kendiliğinden (spontan) mutasyon meydana gelme olasılığı oldukça düşük olup her replikasyon sırasında 10^{-5} - 10^{-10} / hücre olarak belirtilmektedir. Kendiliğinden mutasyon ya hücre metabolizmasında oluşan mutasyon yapıcı ara ürünlerin ya da tautomerik değişim nedeni ile yanlış eşleşme sonucu ortaya çıkabilir.[10-12]

1.2.3.2 Yapay mutasyonlar

Yapay olarak gerçekleşen mutasyonlar mutajen adı verilen fiziksel veya kimyasal etkenlerle ortaya çıkar. Bu tür bir etkiye maruz kalan bireyin genlerinde mutasyon görülme olasılığı 10^{-2} ye kadar yükselebilir. Mutajenler genleri ayırmaksızın etki ettiklerinin bilinmesinin yanında bazı mutajenlerin bazı genlerdeki mutasyon olasılığını oldukça artırdığı da bilinmektedir.[10-12]

1.3. Mutajen ve Kanserojen Maddeler

1.3.1. Mutajen maddeler

Sanayiinin hızla gelişmesi ve gerek üretim sürecinin yan ürünleri gerek ürünün kalitesini artırmak için kullanılan kimyasalların sağlığımız üzerine etkileri tam olarak bilinmemektedir. Yapılan testler neticesinde doğal etkenlerin ve her an karşı karşıya kaldığımız kimyasalların mutasyona yol açan maddeler olduğu görülmüş ve bunlara **mutajen** adı verilmiştir. Mutajenler iki ana grup altında toplanmışlardır.[12-13]

1.3.1.1. Fiziksel mutajenler

Sıcaklık, manyetik alan, elektriksel alan, UV, χ , γ , proton, nötron ışınları gibi etmenlerdir. Bunlar genellikle bir baz çiftinin yerini bir başka baz çiftinin almasına yol açarlar. Fiziksel mutajenler etki şiddetine ve süresine göre geçici veya kalıcı değişimlere yol açarlar.[10-13]

1.3.1.2. Kimyasal mutajenler

Bunlar tautomerik değişimden farklı olarak her zaman kalıcı değişimlere yol açarlar. Bu tip mutajenler etki şekillerine göre 2 grup altında toplanırlar.

1.3.1.2.1. Bazların kimyasal yapısını değiştiren kimyasal maddeler

Bazı kimyasal maddeler DNA yı doğrudan etkileyerek onun replikasyon sırasındaki kalıp özelliklerini değiştirirler. Bu mutajenlerin bir kısmı DNA yapısına girmez fakat bazıları modifiye ederek onların replikasyon sırasında yanlış eşleşmesine sebep olur. Bu tip kimyasal mutajenlerden nitroz asidi (HNO_2) bazıları deamine ederken hidroksilamin (NH_2OH) sitozin ile tepkimeye girer ve hidroksilaminositozin oluşumuna yol açar; alkilleyici maddeler ise (etil metan sülfonat, nitrozoguanidin, metil metan sülfonat) bazlardaki azot grubuna bir alkil grubu ekler. Asilleyici ajanlar (asetik, süksinik, maleik anhidrit) ise amino ve karboksil gruplarını etkilerler. Bu mutajenler nötral pH da etkili değildirler. Bu mutajenler bazların H bağı yaptıkları bölgelerde modifikasyon yaptıkları için yanlış baz çiftlerinin oluşumuna yol açarak mutasyona neden olurlar(Şekil 1.4.). Bu mutajenlerin bir kısmı DNA yapısındaki bazlar arasına girer ve çerçeve kaymalarına yol açarlar. Akridin boyaları (akriflavin, proflavin, akridin orange) bu grupta yer alan mutajenlerdir.[10]

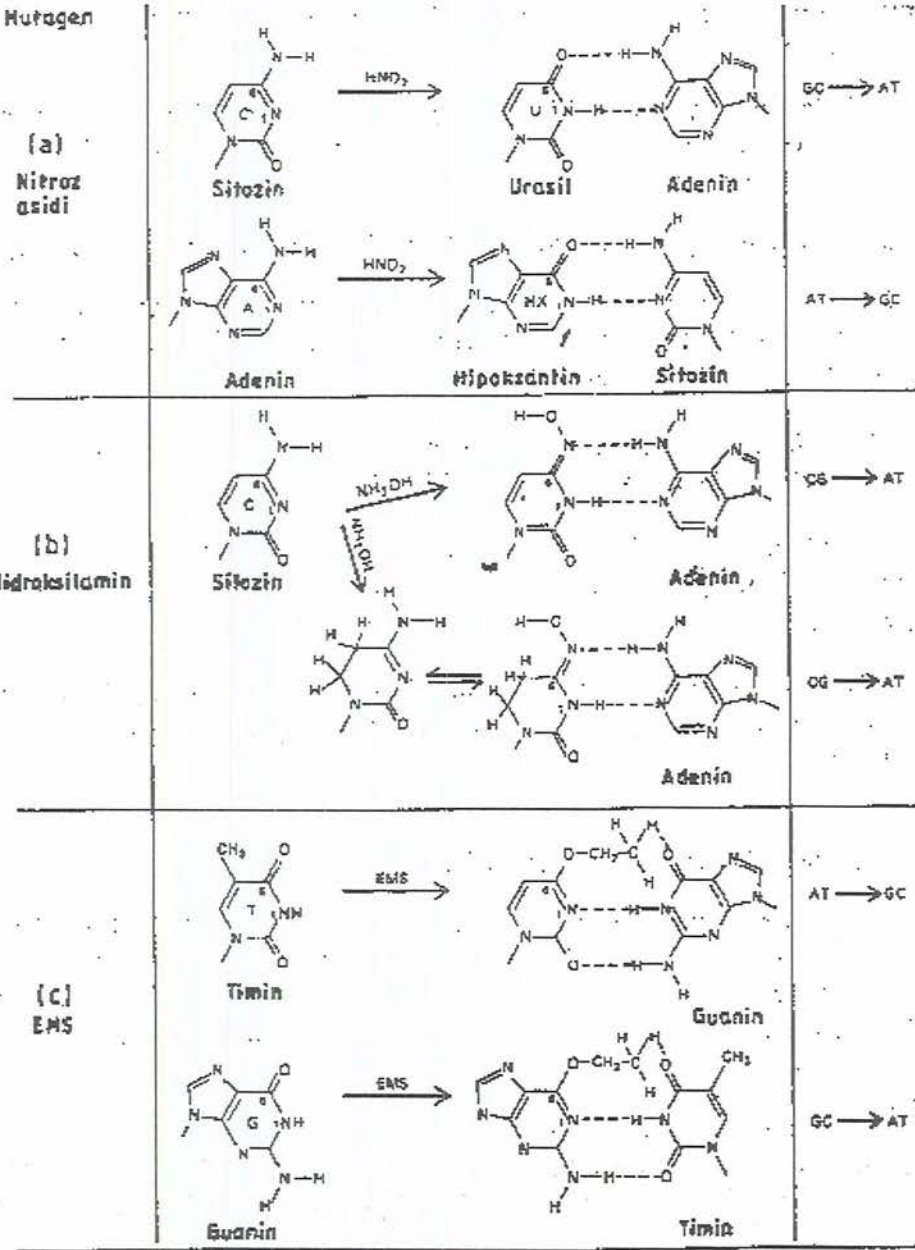
1.3.1.2.2. Baz analogları

Bunlar molekül yapıları pürin ve pirimidinlere çok benzeyen kimyasal maddelerdir. Sadece replikasyon sırasında etkili olurlar. Daha sonraki replikasyonda normal bazdan farklı baz eşleşmesi yaptıkları için sonuçta yanlış bazların oluşumuna neden olurlar. Bu şekilde baz çifti değişimlerine yol açarlar. Örneğin, 2-aminopürin bir adenin analogu iken 5-bromourasil bir timin analogudur. Bunların mutasyon mekanizması Şekil 1.5. de verilmiştir.[10,12-14]

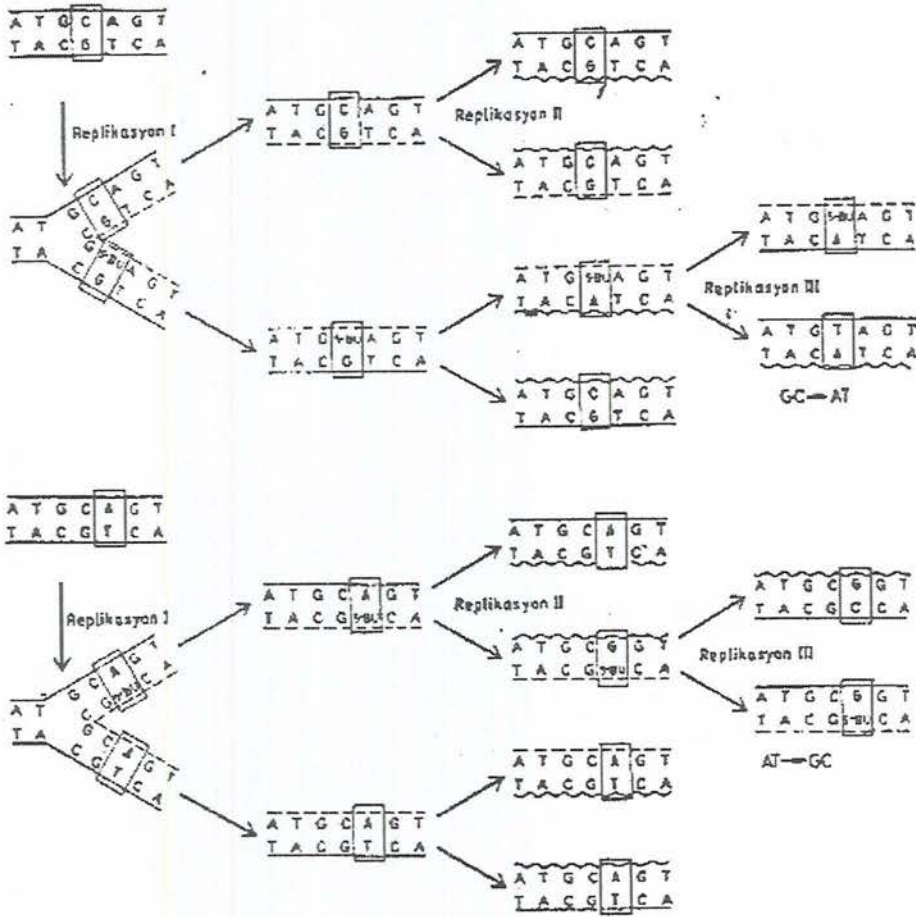
1.3.2. Kanserojen maddeler

Mutasyona neden olan mutajenlerin kanser oluşumuna neden olduğunun ileri sürülmesi sonucu mutajenlerin özellikle kimyasal olanların kanserle olan ilişkisi ortaya konulmaya çalışılmış ve mutajen olan maddelerin bir kısmının kanserojen olarak adlandırılmasına neden olmuştur. Çevremizde bulunan sentetik ve doğal kimyasalların etkilerini tahmin etmek ve bunlardan bir ölçüde kaçınabilmek mümkünken vücudumuzda doğal metabolik olaylar sonucu oluşan çeşitli mutajenlerden kaçınmamız mümkün değildir. Genellikle kabul edilen bir görüşe göre doğrudan veya metabolize edildikten sonra kanserojenik etki gösteren tüm

maddelerin mutajen olabilecekleri vurgulanmaktadır. Bunun akside düşünülmekte yani tüm mutajenlerin kanserojen olmadıkları ileri sürülmektedir. Kimyasal kanserojenler 3 ana grup altında toplanırlar [13-14].



Şekil 1.4. Çeşitli maddelerin oluşturduğu baz çifti değişimi mutasyonları



Şekil 1.5. Baz analoglarının yol açtığı baz çifti değişimi mutasyonları

1.3.2.1. Primer veya doğrudan etkili kanserojenler

Bu maddeler moleküler yapıları itibarı ile kimyasal ve biyolojik olarak aktif bileşiklerdir. Genelde elektrofilik yapıda veya serbest radikal durumu alabilen bu moleküller hücresel moleküllerle (DNA, RNA ve proteinler) doğrudan reaksiyona girebilir ve onları değiştirebilirler. Bu gruba alkilleyici maddeler, inorganik kimyasallar ve trifenilmetan türevleri girer. [13-14]

1.3.2.2. Sekonder kanserojenler

Bu moleküller kimyasal, biyokimyasal ve biyolojik açıdan aktif olmayan bileşiklerdir. Bunların bir kısmı kendiliklerinden hidrolize olarak aktif kanserojen maddeler haline dönüşürler, bir kısmı ise kendilerine özgü metabolik aktivasyonlarla primer kanserojen haline gelirler. Metabolik aktivasyonu yürüten enzimler organizma, organ ve dokulara göre nitelik ve nicelik farklılıklar gösterdiklerinden herhangi bir prokanserojen (sekonder kanserojen) maddenin etkisi de enzim aktivitelerine bağlı olarak farklı organizmalara veya aynı organizmanın farklı organlarına göre farklılıklar gösterebilirler. Sekonder kanserojenlere örnek olarak polinükleararomatik ve heterosiklik hidrokarbonlar, aromatik ve heterosiklik aminler, azo boyaları, nitroaril ve nitrofuran türevleri, nitrözaminler ve nitrözamidler, nitrözüreler, nitrözkarbamatlar, alkiltriazinler, safrol, tiyoamidler, klorlanmış hidrokarbonlar, mikotoksinler verilebilir. [13-14]

1.3.2.3. Ko-kanserojenler

Bu gruptaki kimyasallar kendileri doğrudan bir etkiye sahip değildirler fakat kanserojen veya prokanserojenlerin etkilerini kuvvetlendirirler. Bu kanserojenler arasında asetat türevleri, oleat türevleri, piren türevleri sayılabilir. Kanserojenlerin, kanserojen proseslerin listesini Çizelge 1.1 de kanserojen etkisi olması kuvvetle muhtemel kimyasal maddelerin listesini Çizelge 1.2. de görmek mümkündür. [5,13-14]

Çizelge 1.1. Kanserojen maddeler ve kanserojen üretim prosesleri

KİMYASALLAR		ÜRETİM PROSESLERİ	
Aromatik aminler	İnorganik maddeler	İlaçlar	Auramin üretimi
4-aminobifenil	Arsenik ve bileşikleri	Alkilleyici ilaçlar	İzopropil alkol üretimi
Benzidin	Asbest	Klornafazin	Deri üretimi
2-naftilamin	Krom ve bileşikleri	Melfalan	Mobilya üretimi
Benzen	Civa	Hardalgazı	Hematit madenciliği
Bis(klorometil)eter		Hormonlar	Nikel şaflştırma çalışmaları
Vinilklorid		Konjuge östrojenler	Petrol katran ve baca dumanları
		Dietilstilbestrol	maruz kalma

Çizelge 1.2. Kanserojen olması kuvvetle muhtemel maddeler listesi

Yeterli bilgi sahibi olunanlar	Az miktarda bilgi sahibi olunanlar
İlaçlar	İlaçlar
Klorambusil	Demir dekstran
Siklofosfamid	Oksimetolon
ThioTEPA	Fenasetin
İnorganik bileşikler	Endüstriyel maddeler
Kadmiyum bileşikleri	Akrilonitril
Nikel bileşikleri	Auramin
Yiyecek kontaminasyonları	Karbondetraklorür
Aflatoxinler	Dimetilkarbamil klorür
	Alkilleyici maddeler
	Dimetilsülfat
	Etilenoksit

1.4.Mutajenite Testleri

Mutajenleri tanımlamakta kullanılan test sistemlerinin herbiri farklı bir mutasyonu gösterdiği için değişik test sistemleri geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları DNA hasarlarına sebep olan kimyasalların test edildiği sitogenetik metotlardır. Bu testler kardeş kromatid değişimi (SCE= sister chromatid exchange), mikronukleus testi (MN), kromozom bozulma testi (CA=chromosome aberration), Comet testi (gen dönüşümleri ve DNA kırılmaları), programlanmamış DNA sentezi (UDS=unscheduled DNA syntesis), SOS kromotest, transformasyon yöntemi ve Ames/Salmonella yöntemi şeklinde sıralanabilir. **SCE** yönteminde kardeş kromatidlerin kontrast şekilde boyanmaları esastır. Bu boyanma ile kardeş kromatidlerde değişen parçalar boyanma farklılığından anlaşılmaktadır. **Mikronukleus** testi mitotik aktiviteye sahip hücrelerde çekirdek boyaması ile gerçekleştirilir ve mitoz anomalileri ile kromozom kaybı gibi durumları ortaya çıkarır. **CA** ve **Comet** yönteminde metafazdaki kromozomlar incelenerek buralardaki hatalar gözlenebilir. **UDS** metodu primer rat hepatositlerinde DNA tamirinin uyarılmasına dayanır. Pozitif kontroller UV ile yapılır ve otoradyografik olarak değerlendirilir. **S.O.S. kromotest** sistemi, DNA hasarı ile indüklenen SOS cevabı esas alınarak geliştirilmiştir. Regülatör bir sistem olan S.O.S. sistemi DNA hasarı ile uyarılan bir sistem olup hücrenin çeşitli stres koşulları altında korunmasına yönelik bir sistemdir. S.O.S. yanıtı devreye girdiğinde hücrelerde DNA onarımında rol alan bazı proteinlerin miktarında artış olur. Test bu proteinlerin kolorimetrik olarak ölçülmesi ile yapılır. **Transformasyon**

yönteminde fare fibroblastlarında malign transformasyonun uyarılması ile kimyasal maddelerin mutajenik ve kanserojenik etkileri ölçülür. [5,7,13-17]

Ames testi ise Dr. B. AMES tarafından geliştirilen gerek çevre kirlenmesine neden olan kimyasal maddelerin gerekse diğer fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların mutajenitelerinin araştırılmasında en yaygın olarak kullanılan ,test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş ve mutajen karsinojen etkisi en iyi bilinen kimyasallar ile geçerliliği kabul edilmiş kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden biridir.

Test sistemlerinin karşılaştırılması amacı ile yapılan bir çalışmada Ames testi ile *umu* testi ve SOS kromotest sistemi karşılaştırılmış ve Ames testinin diğer test sistemlerine göre daha hassas olduğu belirtilmiştir [17]

Yapılan bir başka çalışmada ise Ames testi ile *Vibrio harveyi* adlı deniz mikroorganizmasının kullanıldığı test sistemi karşılaştırılmış ve Ames testinin deniz gibi tuzlu su sistemlerinde değilde tatlı su sistemleri için iyi bir test sistemi olduğu belirtilmiştir [18].

Ağır metal kirliliği altındaki bir bölgede yapılan çalışmada Ames testi ve faj indüksiyon testi karşılaştırılmış olup çalışma sonucunda Ames testinin karışık yapıdaki kirleticilere karşı daha etkin cevap verdiği belirtilmiştir [19].

Kanada da yapılan başka bir çalışmada ise *Alternaria alternata* adlı mayanın gıdalar üzerinde yer alan toksinleri gıda güvenliği dairesi tarafından Ames testi ile değerlendirilmiştir [20].

İlaç firmaları dahi ürettikleri bazı ilaçların genotoksisitesini Ames Testi ile araştırmaktadırlar [21].

Ames testinin temeli yapay mutasyon ile histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş (His^- = oksotrof) *Salmonella typhimurium* suşlarının test maddesi ile işleme tabi tutulmasından sonra yeni bir mutasyon geçirip His^+ hale gelmeleri esasına dayanır. Testte kullanılan suşlar *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla elde edilmiş bir seri mutant suşdur. Bu suşların genetik özellikleri aşağıda belirtilmiştir:

Histidin mutasyonu: Her test suşu histidin operonunun değişik bölgelerinde ya operondaki baz değişimleri ya da çerçeve kaymasına yol açan adisyon-delesyon mutasyonları ile mutant hale getirilmiştir.

His G 46: Bu mutasyon histidin biyosentezinde görev alan ilk enzimi kodlayan gende lösin aminoasidi yerine prolin aminoasidi gelmesine neden olur.

His D 3052: Bu genin mutasyonu (-1) çerçeve kayması şeklinde olup daha ziyade çerçeve kaymasına neden olan maddelerle his⁺ hale gelmektedir.

His D 6610: (+1) çerçeve kayması mutasyonu etkilenen bölgede beş yerine altı sitozin dizisi bulunmaktadır.

His G 428: "ochre" stop kodonu varlığından dolayı his G geni inaktif durumdadır. Başlangıçta geliştirilen his⁻ mutantlarının çeşitli test maddelerine karşı duyarlılığının artırmak üzere bu suşlara aşağıdaki mutasyonlar eklenmiştir.

Rfa mutasyonu: Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelmiştir. Lipopolisakkarit tabakanın kısmen yok olması ile normalde hücre içine giremeyen büyük moleküller hücre içine girmektedir.

UvrB mutasyonu: Bu mutasyon DNA onarım sisteminde kesip çıkarma(**excision repair**) görevini üstlenen enzimi kodlayan UvrB genindeki delesyon sonucu oluşmuştur. Bu mutasyon suşları daha duyarlı hale getirmektedir.

R faktörü: Ampisilin dirençlilik geni olup bu geni taşıyan bakterilerde normalde hücrelerde bulunan ve hata frekansı yüksek olan "error-prone" DNA onarım yolunun aktivasyonuna ve gerek pozitif sonuçların artmasına gerekse spontan olan mutasyonların artmasına neden olur. R faktörüne sahip olmayan suşlar zayıf mutajenik sonuçlar verirken R faktör genini taşıyan pKM101 plazmidine sahip yeni suşlar oldukça kuvvetli sonuçlar vermişlerdir. Bu test sisteminde en çok kullanılan bakteri suşları TA 97,TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535, TA1538 suşlarıdır. [17,22-23]

2.MATERYAL VE METOD

2.1-Materyal

2.1.1.Salmonella typhimurium test suşları

Deneyde Ames ve arkadaşları tarafından *Salmonella typhimurium* LT 2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirilen TA98 veTA100 suşları kullanılmış olup bu suşlar Hacettepe Üniversitesinden temin edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

XAD-4, XAD-16, 4-Nitro-o-fenilendiamin (Aldrich), D-Biyotin(F.W.247,3), K_2HPO_4 , $MgSO_4.H_2O$, $NaNH_4(HPO_4.4H_2O)$, NaOH, NaCl, (Fluka), Sitrik asit monohidrat, L-Histidin.HCl(F.W.191,7), Ampisilin trihidrat (Sigma), Sodyum azid (Merck), Nutrient Broth No:2 (Oxoid), Bacto Agar (Difco) dan temin edilmiştir.

2.1.3.Deneyde kullanılan ortamların içerikleri ve hazırlanmaları

(50X) Vogel Bonner Medium

Kullanım:MGA , HB ve HBA (master) plakları.

$MgSO_4.H_2O$	10 g
Sitrik asit monohidrat.....	100 g
K_2HPO_4	500 g
$NaNH_4(PO_4.4H_2O)$	175 g
Distile su(45°C-50°C).....	670 ml

Maddeler yukarıda belirtilen sıra ile suyun içine eklenir ve hacim 1 litreye tamamlanır.

1 litrelik 2 kaba bölünerek 121°C de 20 dakika süre ile otoklav edilir.

(0.05mM) Histidin/Biyotin Solüsyonu

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

D-Biyotin(F.W.247.3).....	30.9 mg
L-Histidin.HCl(F.W.247.3).....	240 mg
Distile su.....	250 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür. Daha sonra histidin ilave edilerek karışım otoklav edilir. +4°C de saklanır.

(%0.8/0.02NaOH) Ampisilin Solüsyonu

Kullanım: Ampisiline direnç kontrolü ve HBA plaklarının hazırlanması.

Ampisilin trihidrat..... .0.08 g

0.02M Sodyum Hidroksit.....100 ml

Ampisilin trihidrat, 0.02M NaOH içinde çözülür ve 0.22µm çaplı filtreden geçirilerek steril edilir. +4°C de saklanır.

(%0.1) Kristal viyole

Kullanım: *Rfa* mutasyonunu denemede.

Kristal viyole..... .0.1 g

Distile su.....100 ml

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

(%0.13) Biyotin çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması.

D-Biyotin.....0.65 g

Distile su.....50 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür ve otoklav edilir.

(%0.5) Histidin çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması.

L-Histidin.HCl (F.W.191.7)..... 2g

Distile su..... 400ml

Histidin ile distile su karıştırılarak otoklav edilir.

(%40) Glikoz çözeltisi**Kullanım:**MGA ve HBA plakları hazırlanması.

Glikoz.....40g

Distile su.....100ml

Glikoz distile su içerisinde çözülerek otoklav edilir, 0-4°C de saklanır.

4-Nitro-o-Fenilendiamin (NPD)**Kullanım:** Pozitif kontrol

2,5µg/petri olmak üzere DMSO da çözülerek kullanılır. TA 98 suşu için S9 karışımı gerektirmeyen bir kimyasaldır. Oda ısısında saklanır.

Sodyum azid (AZS)**Kullanım:** Pozitif kontrol.

5 µg/petri olmak üzere DMSO içinde çözülerek hazırlanır. 0°C ile +4°C arasında saklanır. TA 100 suşu için S9 karışımı gerektirmeyen bir kimyasaldır.

Top agar**Kullanım:**Mutasyon deneyi

Agar......6g

NaCl.....5g

Distile su.....1000ml

Agar, tuz ve su manyetik karıştırıcıda ısıtılarak çözülünceye kadar karıştırılır ve otoklav edilir.

Histidin/Biyotin Plakları (HB Agar)**Kullanım:** Histidin gereksinim deneyi.

Agar..... 15g

Distile su..... 914ml

50XVB tuzları..... 20ml

%40 glikoz..... 50ml

Histidin.HCl.H₂O..... 10ml

0.5mM Biyotin..... 6ml

Agar ve su karıştırıldıktan sonra otoklav edilir. 45°C ye soğutulup %40 glikoz, 50XVB tuzları ve histidin çözeltisi eklenir, solüsyon biraz daha soğuduktan sonra biyotin eklenir, karıştırılıp petri kutularına 30 ml olara dağıtılır.

Histidin/Biyotin/Ampisilin plakları (HBA agar)

Kullanım: Ampisiline dirençlilik testi ve “Master Plate” hazırlanmasında.

Agar.....	15g
Distile su.....	910ml
50XVB tuzları.....	20ml
%40 Glikoz.....	50ml
Histidin.HCl.H ₂ O.....	10ml
0.5mM Biyotin.....	6ml
(%0.8/0.02 M NaOH) Ampisilin	3.15ml

Agar ve su otoklavlanır. 45°C ye soğutulup %40 glikoz, 50XVB tuzları, ve histidin bu solüsyona eklenir. Sıcaklık biraz daha azalınca biyotin ve ampisilin eklenerek petrilere 30ml olarak dağıtılır. Bu plaklarda bakteriler +4°C de 2 ay saklanabilir.

Minimal Glikoz Agar Plakları

Kullanım: Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü, pozitif kontrol, solvent kontrol ve mutasyon deneyi.

Agar.....	15ml
Distile su.....	930ml
50XVB tuzları.....	20ml
%40 Glikoz.....	50ml

Agar ve su karıştırılıp çözülür ve otoklavlanır.45°C ye soğutulup %40 glikoz ve 50XVB tuzları yavaş yavaş karıştırılarak eklenir, petrilere 30ml olarak aktarılır.

Nutrient Agar Plakları

Kullanım: Gecelik kültürün ml’sindeki bakteri sayısını bulma ve genotip kontrolü.

Oxoid nutrient broth no:2.....	25g
--------------------------------	-----

Agar15g

Distile su.....930ml

Agar, broth ve su karıştırılıp otoklavlanır ve petrilere 30ml olarak aktarılır.

Nutrient Broth sıvı kültür ortamı

Kullanım:Bakterilerin gecelik kültürde büyütülmeleri

Oxoid Nutrient Broth no:2.....5g

Distile su.....200ml

Broth ve su karıştırılıp otoklavlanır, +4°C de muhafaza edilir.

2.1.4. Örneklerin toplanması ve saklanması

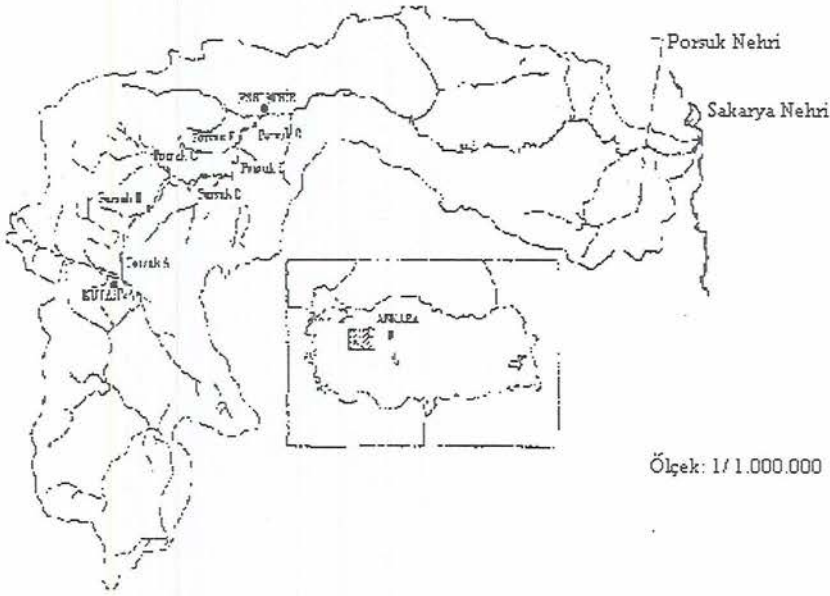
Çalışmamızda kullanılacak su örnekleri Kasım 2002 de 7 adet istasyon belirlenerek Porsuk çayından ve çayı besleyen küçük kollardan alınmıştır. Bu örneklerin alındığı istasyonlar Şekil 2.1. de gösterilmiştir. Çalışmamızda her bir istasyondan 6 litre su örneği alınmıştır. Örnekler +4 °C de 2 saat içinde laboratuvara getirilmiş ve saklamak amacı ile filtre edilmiştir. Çalışmamızda kullanılacak su örnekleri kaba partiküllerden uzaklaştırılmak amacı ile cam filtre kullanılarak süzülmüştür. Süzülen su örneklerinin 1 litresi nonkonsantre olarak test edilmesi için, kalan 5 litre 2,5 litre olacak şekilde 2 ye bölünerek -18° C de saklanmıştır. Çözünmüş organiklerin ekstraksiyonu XAD-4 ve XAD-16 dolgu maddesi üzerine adsorbsiyonu ile gerçekleştirilmiştir. [24-25]

2.2 Metod

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesinden alınan test bakterilerinin stok kültürlerinin hazırlanması, bakterilerin genetik özelliklerinin kontrol edilmesi ve test Maron ve Ames [22] ve Mortelmans ve Zeiger [23] tarafından geliştirilen yönteme uygun olarak yapılmıştır. Deneyler 3 paralel olacak şekilde çalışılmış ve 2 kez tekrar edilmiştir. Ayrıca pozitif,spontan ve solvent kontrollerde deneylere paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.2.1. *Salmonella* suşlarının kültürlerinin ve master plakların hazırlanması

Bakteri kültürlerinin Histidin/Biyotin/Ampisilin (HBA) plaklarına paralel ekimleri yapıp 37°C de 48 saat inkübe edilmiştir. 48 saat sonunda iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2ml Nutrient Broth içinde süspansiyon edilmiş bir gece (12-16 saat) 37°C de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bir öze dolusu sıvı kültür alınıp Histidin/Biyotin/Ampisilin agar üzerine çizgi ekim yapılmış ve 37°Cde 48saat inkübe edilmiştir. Hazırlanan bu plaklar +4°C de iki ay süre ile saklanabilir.



Şekil 2.1. Porsuk havzası boyunca örneklerin alındığı istasyonlar

2.2.2. *Salmonella* suşlarının stoklanması ve stok kültürlerin açılması

Test suşlarının canlılığını ve mutant özelliklerini uzun süre koruyabilmeleri için stoklanmaları gerekir. Bunun için Histidin/Biyotin/Ampisilin agarda üremiş olan *Salmonella* suşlarından iyi izole olmuş bir koloni öze alınıp alınıp 2ml Nutrient Broth içeren tüplerde süspanse edilir ve 37°Cde bir gece (12-16 saat) inkübe edilir. Bu sürenin sonunda steril Ependorf tüp içerisine 1ml bakteri kültürü ve 0.09ml Dimetil Sülfoksit(DMSO) ilave edilmiş ve -20°Cde donması sağlandıktan sonra -80°Cde saklanmıştır.

Kültürün açılması gerektiğinde stok bakteri kültürü oda sıcaklığında eritilip bir öze dolusu alınarak Histidin/Biyotin(HB) agar plaklarına paralel ekim yapılmış ve 37°Cde 48 saat inkübe edilmiş ve bu sürenin sonunda iyi izole olan bir koloni öze ile alınıp Histidin/Biyotin/Ampisilin agar plaklarına paralel ekim yapılmıştır. HBA plakları 37°Cde 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası master plaklar +4°C de iki ay süre ile saklanabilir ve gerektiğinde gecelik kültür hazırlamak için kullanılabilir.

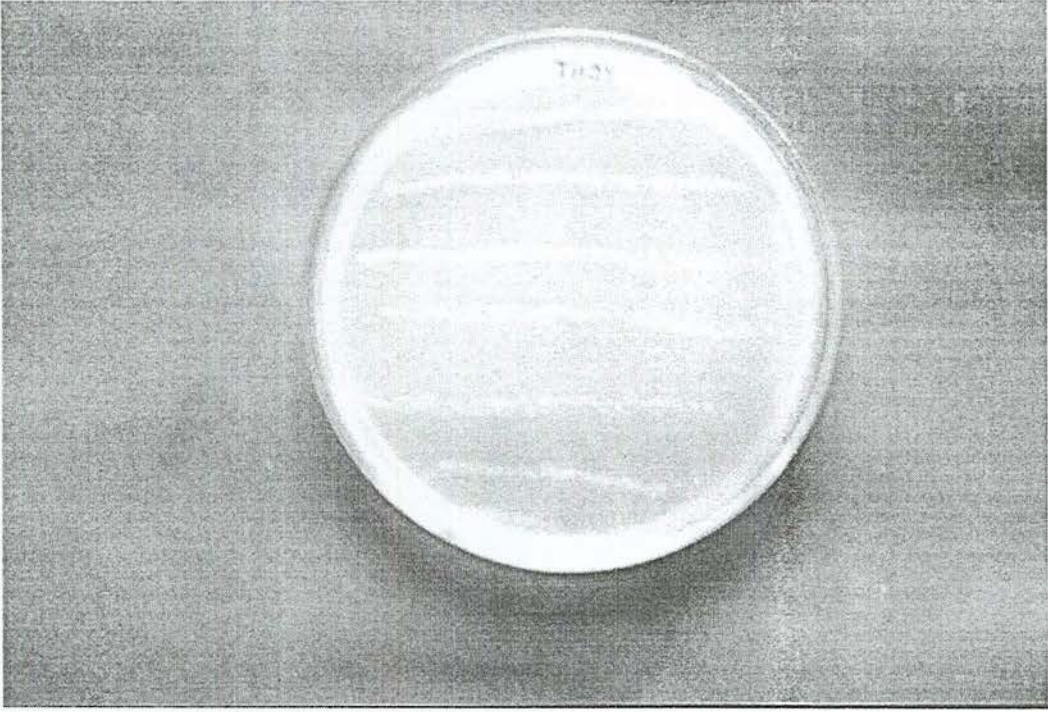
2.2.3. Bakterilerin genotiplerinin kontrol edilmesi

Testin güvenilirliği açısından test suşlarının orijinal mutasyonlara sahip olup olmadığı genetik özelliklerini belirleyecek bazı testlerle saptanmalıdır. Bu amaçla çeşitli kontroller yapılır.

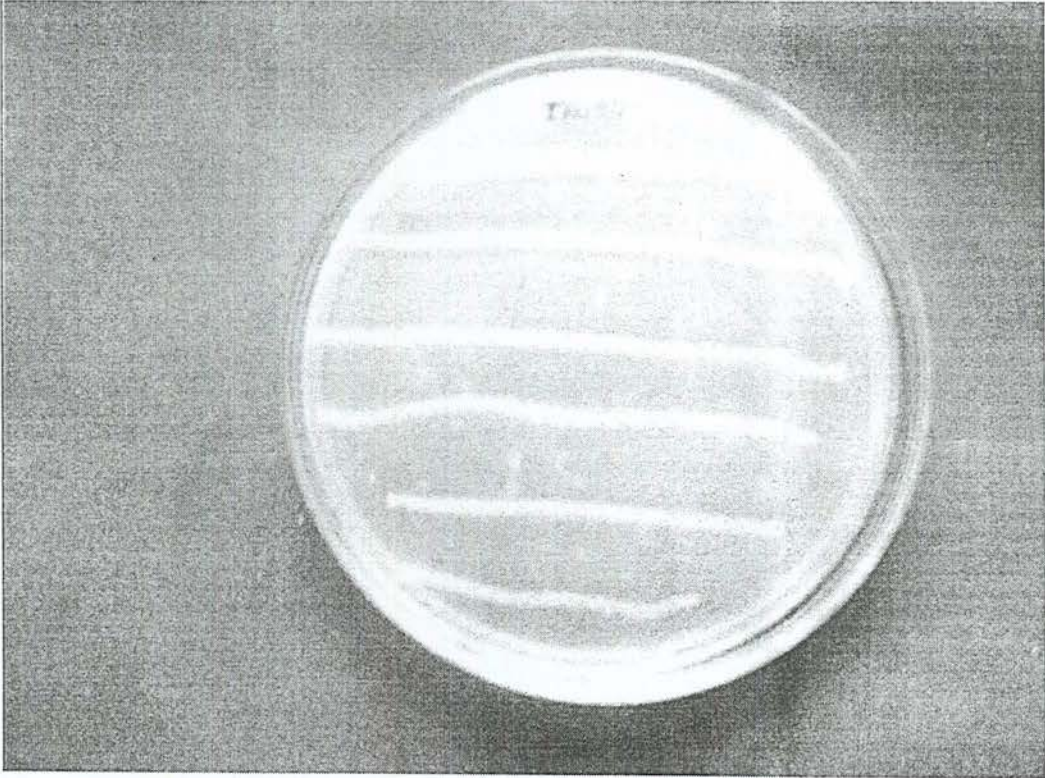
2.2.3.1.Histidin gereksinimi kontrolü:

Bakterilerin histidin içermeyen plaklara ekilmeleri sonucu his⁻ bakteriler his⁺bakterilerden ayırt edilir. Bu amaçla, Nutrient Broth'da bir gece üretilen bakteriler HB agar ve histidin içermeyen HB⁻ agar plaklarına ekilerek 37°Cde 48-72 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda HB plaklarında üreme gözlenirken, HB⁻ plaklarında üreme gözlenmez(Şekil 2.2.a ve b).

Bu sonuç bize bakterilerin His⁻ mutasyonu taşıdığını gösterir.



Şekil 2.2.a. TA 98 suşunun histidin gereksinimi kontrolü sonucunda HB plaklarında üreme



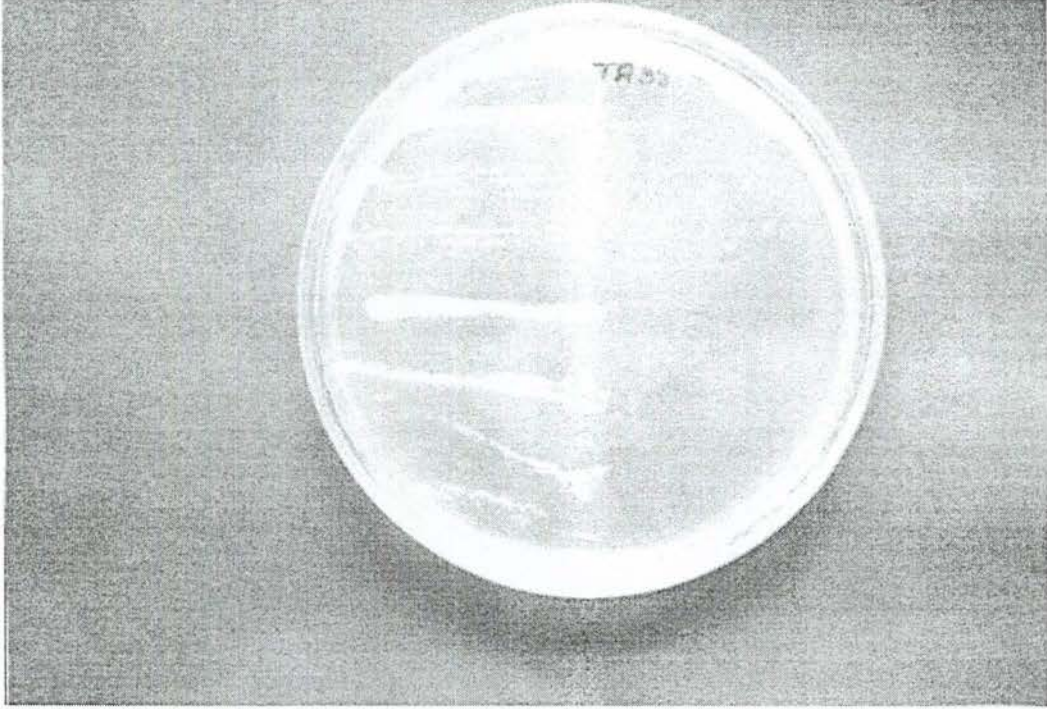
Şekil 2.2.b. TA 100 suşunun histidin gereksinimi kontrolü sonucunda HB plaklarında üreme

2.2.3.2. *uvrB* mutasyonu kontrolü:

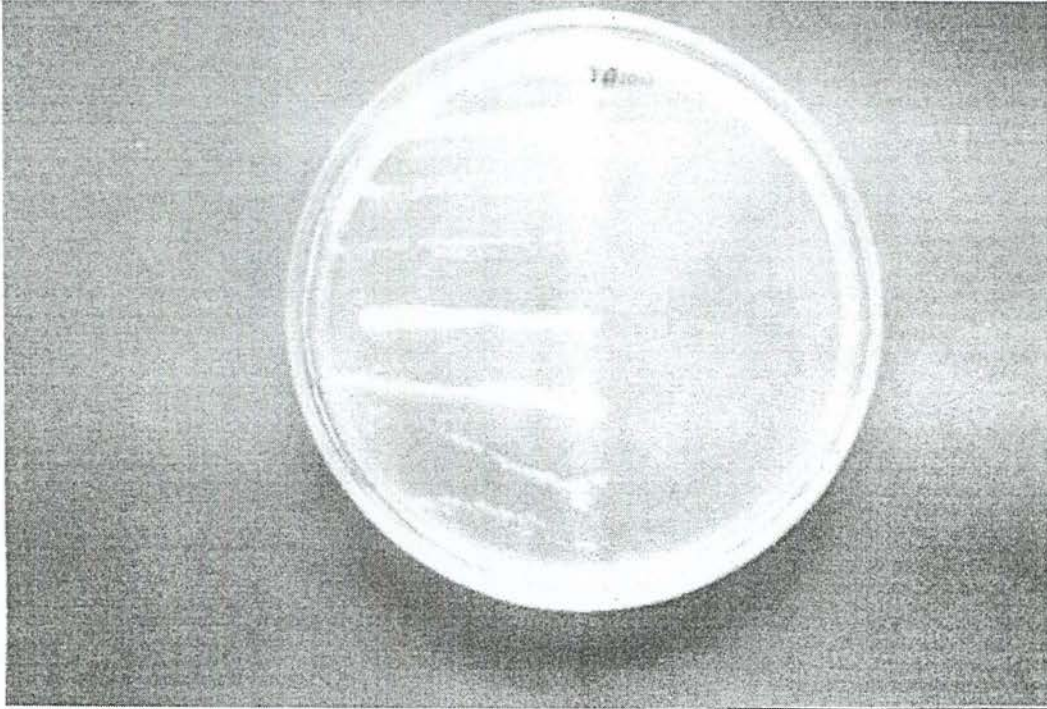
uvrB mutasyonu ile bakterilerin ultraviyole (UV) ışınlarını neden olduğu replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan “DNA onarım mekanizması” engellenmiştir ve bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tespit edilir. Bu test için, Nutrient Broth’da bir gece üretilen bakteri kültüründen bir öze dolusu alınıp Nutrient Agar (NA) plaklarına paralel ekim yapılmıştır. Plağın yarısı (çizgileri kesecek şekilde) plastik bir tabaka ile kapatılıp 15 watt gücünde bir UV lambası ile 33cm yüksekten 8 sn. süre ile ışınlanmıştır. Işınlamadan sonra petri kapakları kapatılıp 37°Cde 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan UV ışığı dozu, *uvrB* mutasyonu taşıyan bakterileri öldürecek dozdadır. Bundan dolayı UV’ye maruz kalan kısımda üreme olmaz, plastik kapakla kapatılan kısımda normal üreme gözlenmiştir. Bu sonuç bize kullanılacak olan bakterilerin *uvrB* mutasyonu taşıdığını göstermiştir (Şekil 2.3.a. ve b.).

2.2.3.3. *Rfa* mutasyonu kontrolü:

Bu mutasyon bakteri hücre zarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuştur ve hücre zarının geçirgenliği arttırılmıştır. Varlığı kristal viyole duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için bakteri kültürü Nutrient Broth’da bir gece büyütülen 0.1ml sıvı kültür, 45°C’lik su banyosunda ısıtılmış 2ml top agar üzerine ilave edilip, Nutrient agar plaklarına dökülerek 8 işareti yaptırılmıştır. Donduktan sonra, plağın ortasına 0.5cm çaplı steril filtre kağıdı diski yerleştirilip diskin ortasına %0.1’lik kristal viyole karışımından 10µl damlatılmıştır. Kağıt boyayı emdikten sonra, plaklar 37°Cde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda diskin çevresinde 2,4 cm’lik üreme olmayan zon gözlenmiştir. Boya maddesi bakterilerin içine kolayca girip etkilediği için bakterilerin üremeleri engellenmiş ve bakterilerin *Rfa* mutasyonu taşıdıkları gösterilmiştir (Şekil 2.4.a. ve b.).



Şekil 2.3.a. TA 98 suşunda *uvrB* mutasyonu kontrolünde radyasyona maruz kalan bölgede üreme gerçekleşmemesi



Şekil 2.3.b. TA 100 suşunda *uvrB* mutasyonu kontrolünde radyasyona maruz kalan bölgede üreme gerçekleşmemesi

2.2.3.4.R faktör varlığının kontrolü:

Test bakterilerinin içerdiği R faktör taşıyan pKM101 plazmidlerinin varlığı ampisiline dirençlilik testi ile belirlenir. Bu amaçla büyütülen NB içinde bakteri kültürü (%0.8 Ampisilin/0.02M NaOH) Ampisilin içeren HB plaklarına çizgi ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonunda plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdüğü gözlenmiştir. Yani bakteriler R faktör plazmidini içermektedirler(Şekil 2.5.a. ve b.).

2.2.3.5.Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü

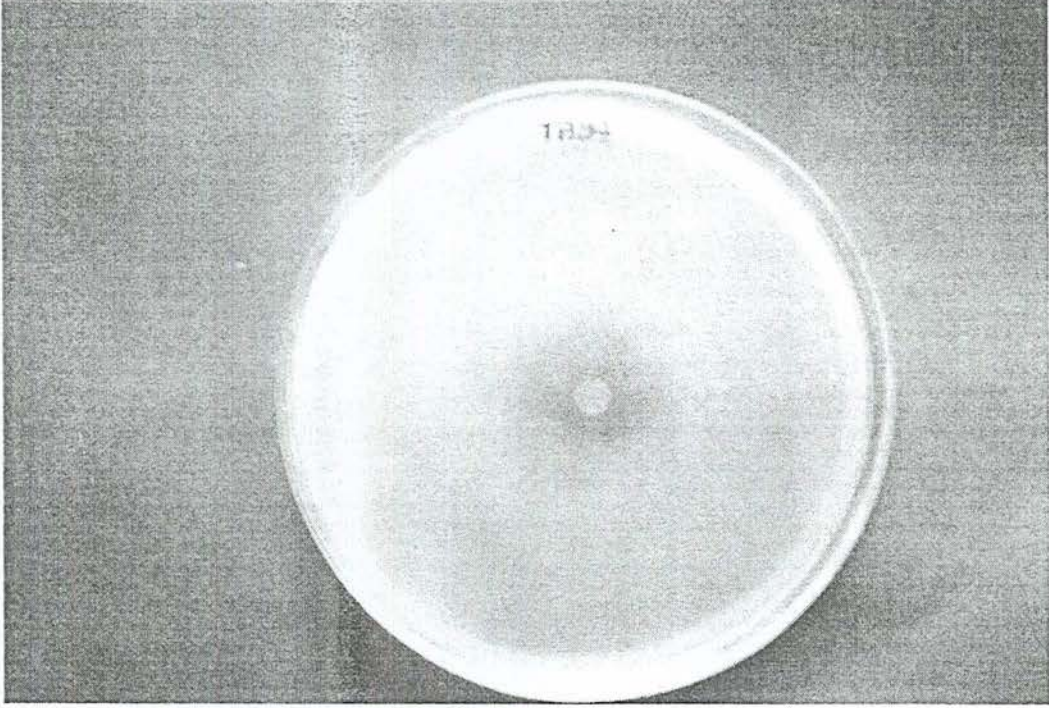
Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his⁻ durumdan his⁺ durumuna dönüşmesi belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 98 için 30-50 revertant/plak; TA 100 için 120-200 revertant/plaktır. Bu test için 37°C'de NB 'de büyütülen gecelik kültürden 0.1 ml alınıp 45°C'deki su banyosunda ısıtılan 2 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra 0.2 ml 0.5M Histidin/ Biotin solüsyonunda eklenip test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılmış ve 37°C'de 48 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır(Şekil2.6.a. ve b.).

2.2.4.Sıvı kültürün ml.'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi

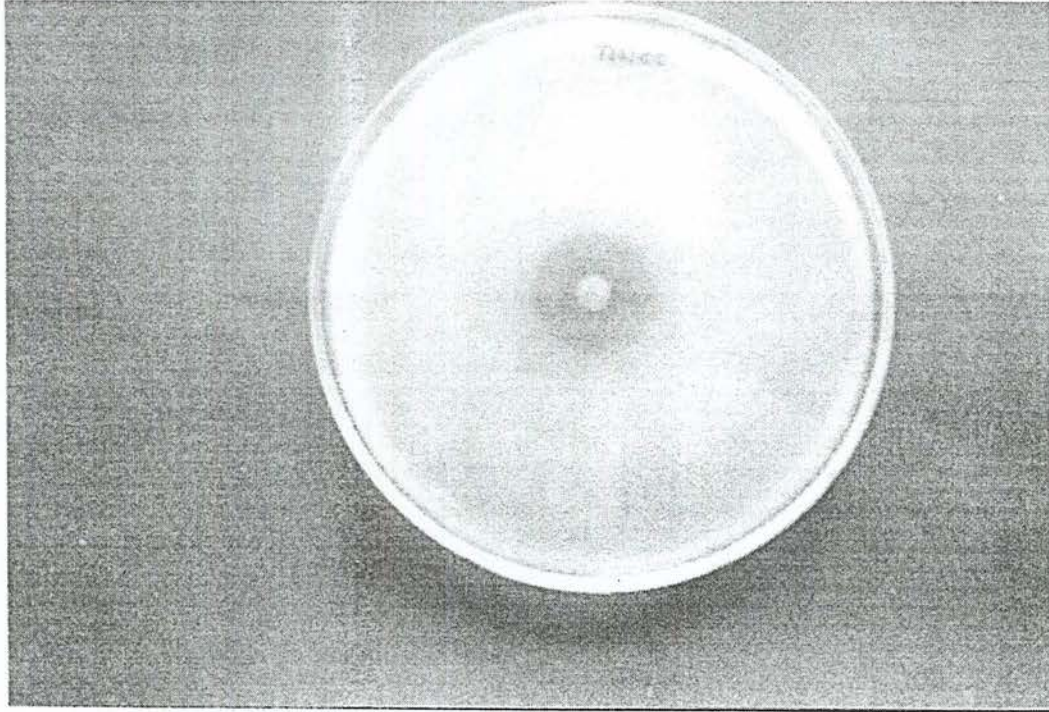
Deneyde kullanılan gecelik kültürün ml'sinde bulunan bakteri sayısını bulmak için HBA plaklarından bir koloni alınarak NB içinde süspanse edilmiş çalkalamalı inkübatörde 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gecelik kültürün 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, olacak şekilde bir dizi seyreltmeleri hazırlanmıştır. Bu seyreltmelerden NA plaklarına 10µl'lik miktarlarda damlatarak ekim yapıp 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra plaklardaki koloniler sayılmış ve bakteri sıvı kültürünün ml'sinde 2,4x10⁹ bakteri olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bakteri kültürünün optik dansitesi 650nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülüp saf kültürün(10⁰) optik dansitesi 0,165 olarak belirlenmiştir(Şekil 2.7.a. ve b.).

2.2.5. Test maddelerinin sitotoksik etkilerinin saptanması

Kullanılan test maddelerinin test bakterileri için öldürücü dozunun saptanması amacıyla top agara 0.1ml bakteri kültürü ve değişik miktarlarda konsantre ve



Şekil 2.4.a. TA 98 suşunda *Rfa* mutasyonu kontrolü



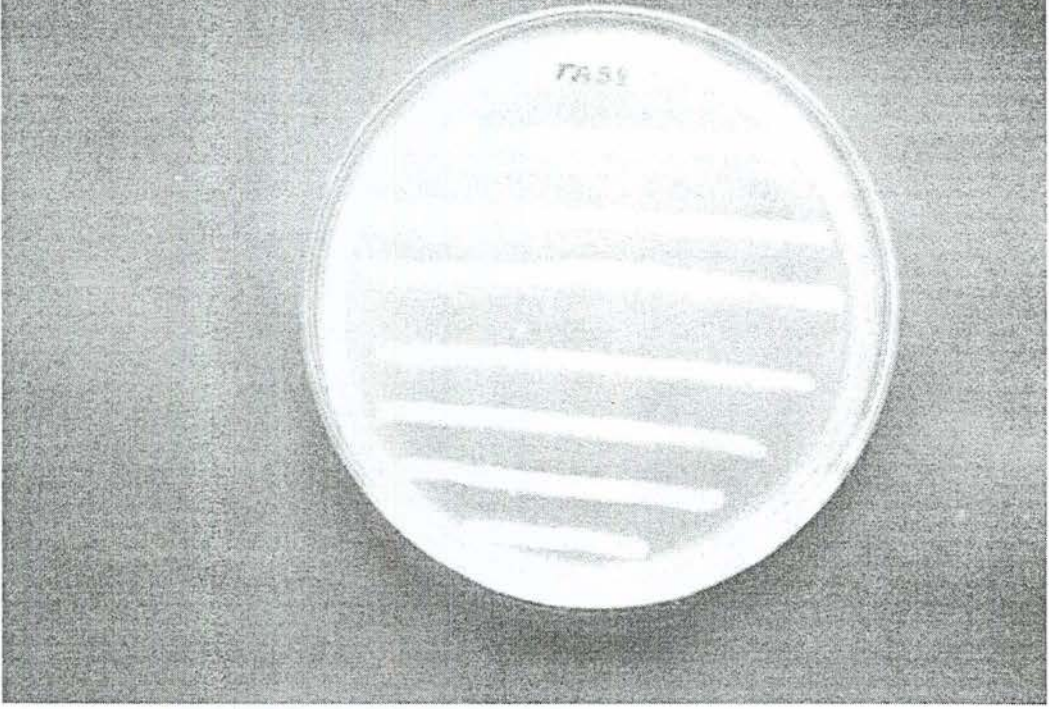
Şekil 2.4.b. TA 100 suşunda *Rfa* mutasyonu kontrolü

nonkonsantre su örnekleri test tüpüne eklenmiştir. Tüpteki karışım NA plaklarına dökülerek plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra plaklardaki koloniler sayılmış ve kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir. Buna göre konsantre su örneğinin 0,4ml/plak ,nonkonsantre örneğin 2ml/ plak dozunun toksik olduğu bulunmuş ve konsantre örnek için 0,2ml/plak, nonkonsantre örneğin 1ml/plak doz seviyesinde mutajenite deneyinin yapılmasına karar verilmiştir.[2,7,15,22-23]

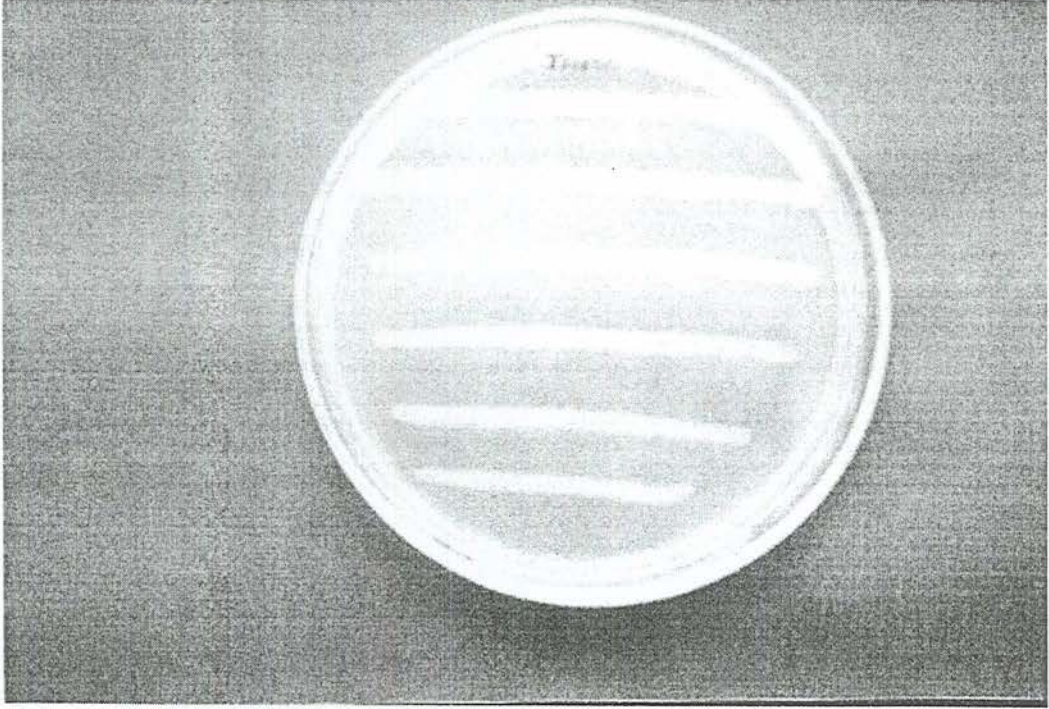
2.2.6. Su örneklerinin hazırlanması

Laboratuvara getirilip prosedüre uygun şekilde saklanan su örnekleri nonkonsantre ve konsantre şekilde test edileceğinden daha önce ikiye bölünen örneklerden konsantre edilecek örnekler için kolon dolgu maddeleri hazırlanmıştır. 10 ar gram XAD-4 ve XAD-16 tartılarak ayrı ayrı mezürlere konulmuş,üzerlerine hacmin iki katı olacak şekilde aseton eklenerek kısa aralıklarla karıştırmak sureti ile 1-1.5 saat bekletilmiştir. Daha sonra aseton süzölmüş ve aynı işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Bu işlem sonrası metanol ile yıkama işlemine geçilmiştir. Tıpkı asetonda olduğu gibi dolgu maddesi metanol ile 1-1,5 saat bekletilmiş ve bu işlem metanolde bulanıklık kalmayıp berraklaşınca kadar devam etmiştir. Daha sonra dolgu maddesi 5-6 kez deiyonize su ile yıkanmış ve cam kolon içine paketlenmiştir. Kullanılan cam kolonlar 1,5 cm çapında ve 30 cm yüksekliğindedir. 10 gram dolgu maddesi şiştikten sonra cam kolon içinde 15 cm yer kaplamaktadır. Cam kolona yerleştirilen dolgu maddesinden 250 ml %1 lik NaOH geçirilmiş, kolonu nötralize etmek için %5 lik HCl kullanılmıştır. En son aşama olarak kolondan 1 litre distile su geçirilmiş ve kolon kullanıma hazır hale getirilmiştir. [24]

Her istasyona ait su örneklerinin yarısı XAD-4 kolonundan diğer yarısı ise XAD-16 kolonundan akış hızı 5 ml/dak. olacak şekilde geçirilmiştir. Su örnekleri kolondan geçirildikten sonra kolonda kalan suyun adsorbe olan çözünmüş maddeleri toplarken işlemi etkilememesi için kolondan suyu uzaklaştırmak amacı ile kolona azot gazı verilerek kalan su uzaklaştırılmış ve kolon kurutulmuştur. Su örneklerinden organik maddeleri toplamak amacı ile elüsyon işlemine geçilmiştir. Bu işlemde sırası ile diklorometan (CH_2Cl_2), aseton (CH_3COCH_3), dietileter



Şekil 2.5.a. R faktör varlığının kontrolü sonucundaTA 98 suşunun ampisilinli ortamda gelişmeleri



Şekil 2.5.b. R faktör varlığının kontrolü sonucundaTA 100 suşunun ampisilinli ortamda gelişmeleri

((C₂H₅)₂O) ve metanol (CH₃OH) kullanılmıştır. Her bir çözücü 300 ml miktarında akış hızı 5 ml/dak. olacak şekilde kolondan geçirilmiş ve temiz bir beherde toplanmıştır. Daha sonra çözücüler içinde toplanan fraksiyonlar çözücülerinden 40⁰C ye ayarlanmış su banyosu ve rotary evaporatör yardımı ile ayrılmış kalan kuru kısımlar 3 ml DMSO ile çözülerek deney için hazır hale getirilmiştir. Böylelikle her örnek 100 kez konsantre edilmiştir. [24-25]

2.2.7. Ames Testinin yapılışı

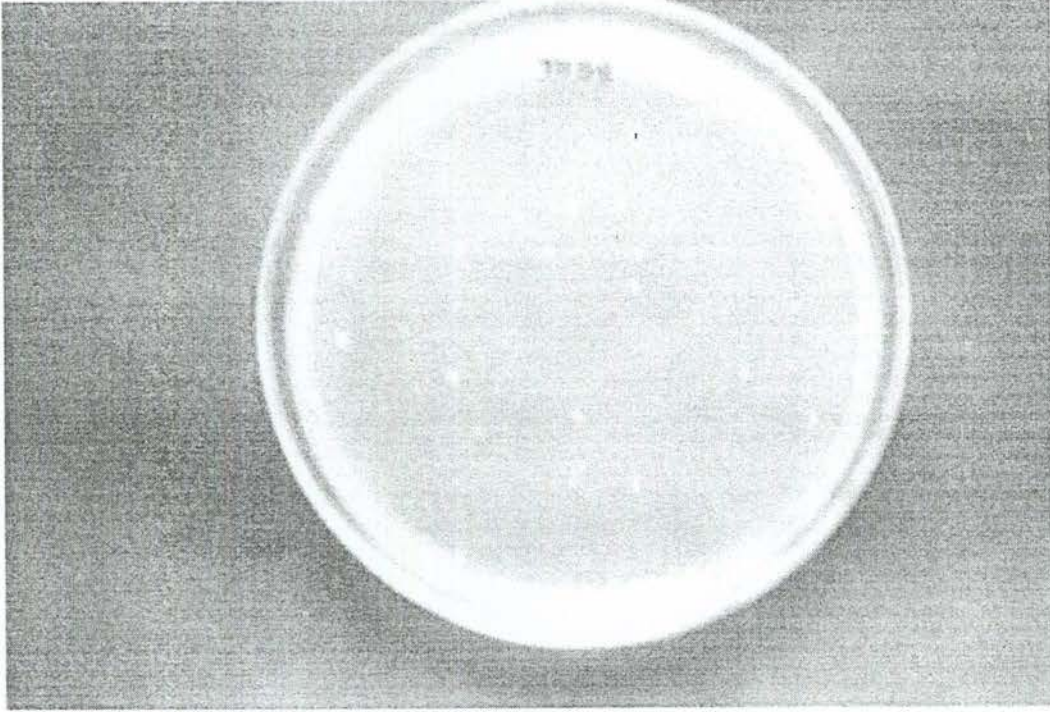
Bu çalışmada Ames/*Salmonella* testinin Maron ve Ames' in [22] yöntemine uygun olarak plak inkorporasyon metodu uygulanmıştır.

Plak-inkorporasyon metodunda içlerinde 2 ml lik top agar bulunan deney tüpleri su banyosu yardımı ile 45⁰C ye getirilir ve içlerine 0,2 ml histidin-biyotin çözeltisi, 0,1 ml 12-16 saatlik bakteri kültürü ve su örnekleri ilave edilir. Su örnekleri konsantre ve nonkonsantre olmaları nedeni ile iki farklı yöntem izlenerek ilave edilir. Konsantre edilmemiş örneklerde top agar 5 kez konsantre edilerek hazırlanmış ve yukarıda geçen miktarlarda histidin-biyotin,bakteri kültürü eklendikten sonra 1ml su örneği eklenmiştir. Konsantre edilmiş su örnekleri ise normal top agar üzerine ilave edilmiş aynı miktarlardaki histidin-biyotin, bakteri kültüründen sonra 0,2 ml olacak şekilde eklenir.

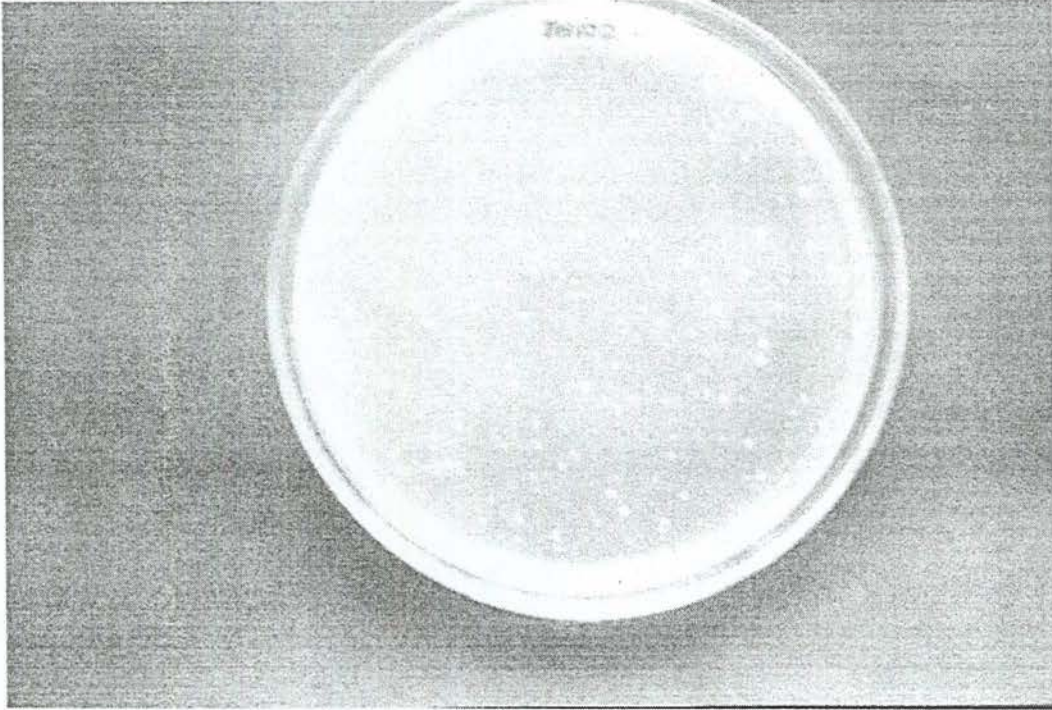
Bu işlemden sonra tüpler hızla çalkalanarak 37 ⁰C ye ısıtılmış MGA (minimal glukoz agar) petrilere dökülmüş ve hızla sekiz işareti yapılarak tüm petri üzerine homojen şekilde dağılması sağlanmıştır. Petrilerin oda sıcaklığında 15 dak. bekletilerek donması sağlanmış daha sonra ters çevrilen petriler 37 ⁰C lik etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilerdeki koloniler sayılmış ve kaydedilmiştir. Deneyler tüm örnekler için 3 paralel şekilde yürütülmüş; sonuçların değerlendirilmesi için deneylere paralel olarak pozitif, spontan ve solvent kontrollerde gerçekleştirilmiştir.[2,7,15,22-23]

2.2.8.Sonuçların değerlendirilmesi:

Bu çalışmada Porsuk havzası boyunca 7 istasyondan alınan su örnekleri mutajenite testine tabi tutulmuştur. Örneklerin belirlenen dozları 3 paralel olarak

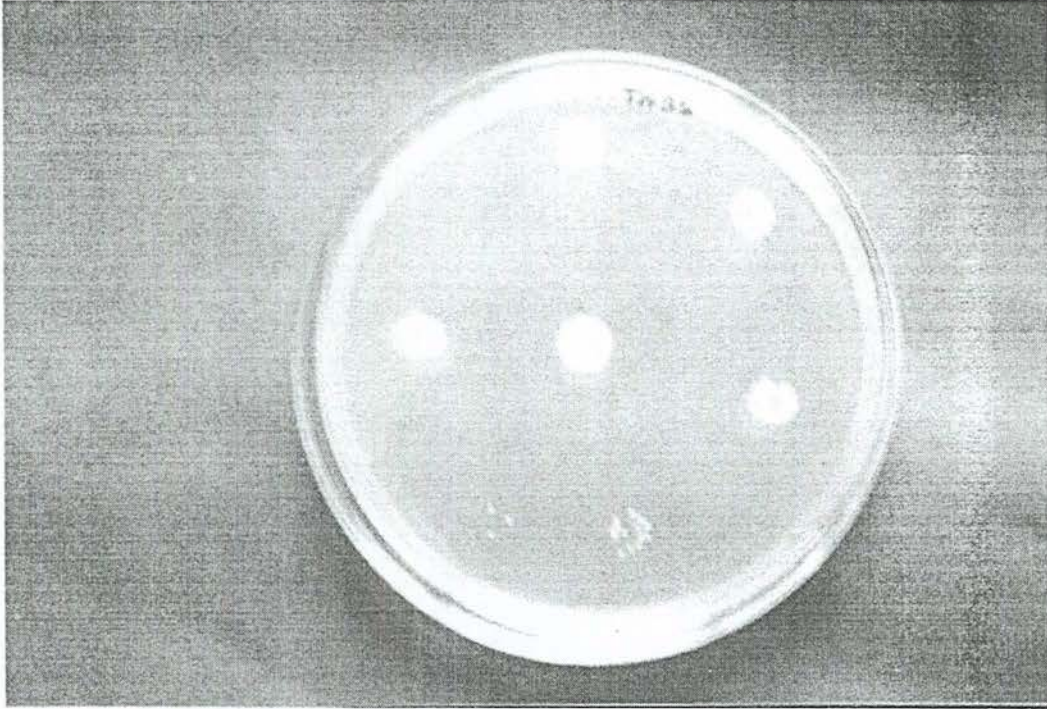


Şekil 2.6.a. TA 98 suşunda spontan geriye dönüş sayısının kontrolü

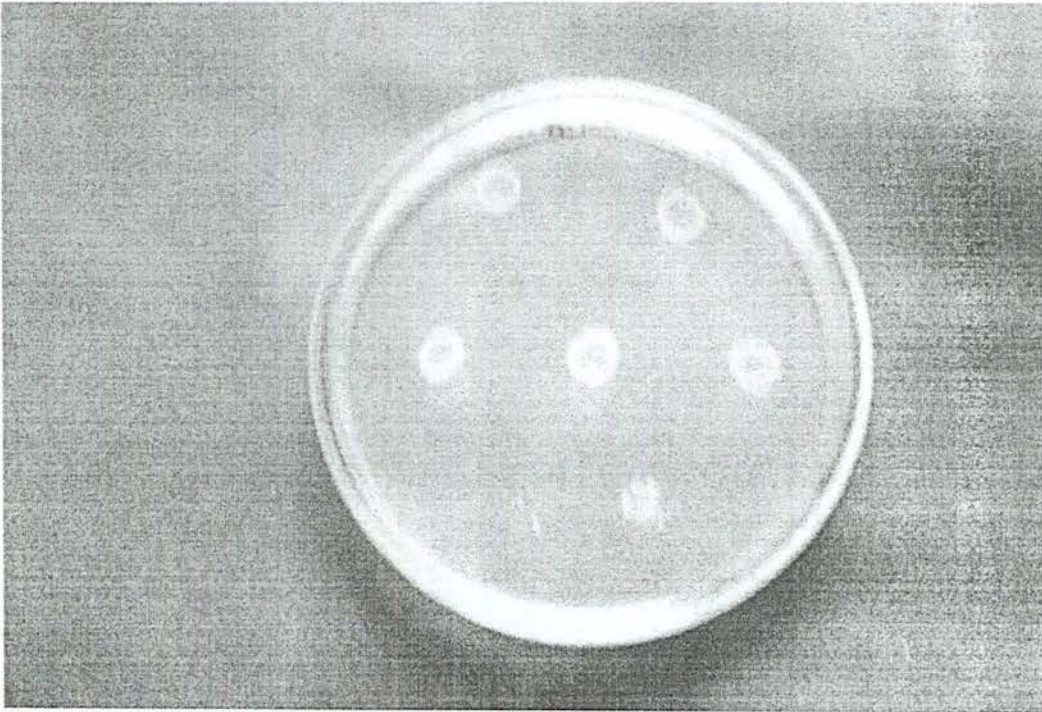


Şekil 2.6.b. TA 100 suşunda spontan geriye dönüş sayısının kontrolü

aynı anda test edilmiş ve birbirinden bağımsız olarak farklı zamanlarda 2 deney yapılmıştır. Ayrıca örnekler sahip oldukları organik maddelerin mutajenesinin araştırılması amacı ile XAD-4 ve XAD-16 kolonlarında konsantre edilerek test edilmiştir. Sonuçlar standart hataları ile birlikte ortalamaları alınarak istatistiksel açıdan *Student-t* testi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi İstatistik Bölümünden alınan 'SPSS-WINDOWS' paket programı kullanılmıştır. Sonuçların verildiği çizelgelerde her örnek için revertant koloni sayılarının ortalamaları "ortalama \pm stn hata" şeklinde gösterilmiştir.



Şekil 2.7.a. TA 98 suşu için sıvı kültürün ml. sindeki mikroorganizma sayısının belirlenmesi



Şekil 2.7.b. TA 100 suşu için sıvı kültürün ml. sindeki mikroorganizma sayısının belirlenmesi

3.BULGULAR

Bu çalışmada Porsuk havzası boyunca 7 istasyondan alınan su örneklerinin mutajeniteleri araştırılmıştır. Örnekler konsantre ve nonkonsantre olmak üzere iki ayrı şekilde Ames / *Salmonella* testine metabolik aktivasyon olmadan tabi tutulmuştur. Alınan örnekler XAD-4 ve XAD-16 kolonları ile konsantre edilmiştir.

XAD-4 kolonu ile konsantre edilen örneklerden elde edilen sonuçlara göre 2 bölgede TA 98 suşu için mutajenik aktivite belirlenirken TA 100 suşu için mutajenik aktiviteye rastlanmamıştır(Çizelge3.1.).

Buna ek olarak XAD-16 kolonu ile konsantre edilen ve her 2 suş ile teste tabi tutulan örnekler mutajenite göstermemiştir(Çizelge 3.2.).

XAD-4 ve XAD-16 kolonu ile konsantre edilen örneklerin mutajenite karşılaştırılması Çizelge 3. 3. de verilmiştir.

Nonkonsantre örneklerden alınan sonuçlar ise Çizelge 3.4. de verilmiş olup uygulanan testlerde mutajenik aktiviteye rastlanmamıştır.

Bu karşılaştırmalar istatistiki açıdan SPSS programının *Student-t* testi ile değerlendirilmiştir.

Test edilen hiçbir örnekte sitotoksik etkiye rastlanmamıştır.

Çizelge 3.1.XAD-4 kolon ile ekstre edilen su örneklerinin mutajenite analizi

Örnekler	TA98			TA100		
	Rev/pl	I	M	Rev/pl	I	M
Negatif kontrol	21±4,7			115±32,5		
Porsuk A	47±7,6	2,2	+	176±8,6	1,5	-
Porsuk B	46±5,1	2,2	+	150±26,0	1,3	-
Porsuk C	37±6,5	1,1	-	125±16,0	1	-
Porsuk D	37±6,5	1,8	-	157±26,4	1,4	-
Porsuk E	37±7,0	1,8	-	139±35,5	1,2	-
Porsuk F	35±12,2	1,7	-	125±38,1	1,1	-
Porsuk G	29±7,4	1,4	-	133±28,2	1	-

Çizelge 3.2. XAD-16 kolonu ile ekstre edilen su örneklerinin mutajenite analizi

Örnekler	TA98			TA100		
	Rev/pl	I	M	Rev/pl	I	M
Negatif kontrol	21±2,9			93±10,1		
Porsuk A	40±6,3	1,9	-	152±26,8	1,6	-
Porsuk B	31±5,6	1,4	-	160±36,2	1,7	-
Porsuk C	34±7,9	1,6	-	116±31,6	1,2	-
Porsuk D	23±2,9	1	-	130±43,0	1,4	-
Porsuk E	23±6,0	1	-	118±55,3	1,3	-
Porsuk F	31±9,2	1,5	-	111±33,4	1,2	-
Porsuk G	29±7,4	1,8	-	121±39,5	1,3	-

Çizelge 3.3. XAD-4 ve XAD-16 kolonları ile ekstre edilen örneklerin mutajenite karşılaştırması

Örnekler	TA98 Rev/pl			TA100 Rev/pl		
	XAD 4	XAD 16	P	XAD 4	XAD 16	P
Porsuk A	47±7,6	40±6,3	0,032	176±8,6	152±26,8	0,032
Porsuk B	46±5,1	31±5,6	0	150±26,0	160±36,2	0,266
Porsuk C	37±6,5	34±7,9	0,004	125±16,0	116±31,6	0,478
Porsuk D	37±6,5	23±2,9	0	157±26,4	130±43,0	0,117
Porsuk E	37±7,0	23±6,0	0	139±35,5	118±55,3	0,368
Porsuk F	35±12,2	31±9,2	0,66	125±38,1	111±33,4	0,406
Porsuk G	29±7,4	29±7,4	0,515	133±28,2	121±39,5	0,474

Çizelge 3.4. Nonkonsantre örneklerin mutajenite analizi

Örnekler	TA98			TA100		
	Rev/pl	I	M	Rev/pl	I	M
Negatif kontrol	21±5,1			133±25,7		
Porsuk A	49±6,2	1,8	-	171±21,4	1,3	-
Porsuk B	25±5,2	0,9	-	151±13,1	1,1	-
Porsuk C	25±7,9	0,9	-	131±11,1	1	-
Porsuk D	27±6,5	1	-	144±28,0	1	-
Porsuk E	32±8,0	1,1	-	126±18,6	0,9	-
Porsuk F	26±5,6	0,9	-	115±21,5	0,8	-
Porsuk G	30±6,5	1,1	-	147±21,2	1,1	-

Rev/pl: Revertant koloni sayısı/petri.

I: Mutajenik indeks (örneklerde belirlenen his⁺ koloniler/spontan his⁺ koloniler).

M: Mutajenite.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmanın amacı toksik maddelerle kontamine olduğu düşünülen Porsuk Çayının Ames/*Salmonella* test sistemi ile mutajenik potansiyelinin sorgulanmasıdır.

XAD-4 ve XAD-16 kolonları ile su örnekleri konsantre edilmiştir. XAD-4 kolon dolgu maddesi ile çözülmüş olan organik maddelerin büyük bir çoğunluğu adsorblanırken XAD-16 kolonu ile yüksek molekül ağırlıklı çözülmüş maddeler adsorblanır. [24-26]

Yapılan bir çalışmada XAD-2, XAD-4 ve XAD-8 kolonları kullanılmış ve diğerlerine göre daha küçük por çapına sahip XAD-2 kolonu daha mutajenik sonuçlar vermiştir.[25]

Meriç deltasında yapılan bir çalışmada ise XAD-2 ve XAD-4 kolonları kullanılmış ve yapılan testte ekstre edilen örneklerin mutajenik olduğu ortaya konmuştur. [27]

Yapılan bir çalışmada kağıt fabrikası akıntısı çeşitli kolonlar kullanılarak konsantre edilmiş ve XAD-4 kolonu XAD-8 kolonuna göre daha mutajenik sonuçlar vermiştir. [28]

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre su örneklerinde bulunan mutajenik maddelerin çoğunun XAD-4 kolonu üzerine adsorblandığı önerilebilir.

Bizim çalışmamızda XAD-4 kolonu ile konsantre edilen ve TA98 suşu için mutajenik sonuçlar veren örneklerin TA100 için negatif sonuçlar vermesi ışığında Porsuk çayında çerçeve kayması mutasyonuna yol açan mutajenler olduğu önerilebilir.

Yapılan bir çalışmada Porsuk çayına benzer şekilde bir şehri besleyen ve çeşitli kirletici etkiler altında bulunduğu düşünülen bir nehirden alınan su örnekleri XAD kolonları kullanılarak konsantre edilmiş ve örnekler TA98 suşu için mutajenik etki gösterirken TA 100 suşu için mutajenik etkiye rastlanmamıştır. Bu sonuçlar ışığında mutajenlerin, çerçeve kayması mutasyonuna yol açtığı belirtilmiştir. [25]

Çalışmamızda mutajenik sonuçlar gösteren A ve B istasyonlarından alınan örneklerin yoğun bir şekilde endüstriyel kirliliğe maruz kaldığı bilinmektedir.

Yoğun atık su deşarjına maruz kalan bir nehirde yapılan bir çalışmada mutajenite araştırması yapılmış ve alınan örneklerde mutajenik aktiviteler rapor edilmiş ve yapılan analizlerle örneklerde mutajenik heterosiklik aminlerin varlığı belirlenmiştir.[29]

Yapılan bir çalışmada çeşitli endüstriyel kirliliklere maruz kalan bir akarsuyun boşaldığı ve suları içme suyu kaynağı olarak kullanılan bir gölde örnekler XAD-4 kolonu kullanılarak konsantre edilmiş ve yüksek oranda mutajenik aktivite rapor edilmiştir.[26]

Yapılan bir başka çalışmada petrokimya endüstri alanında kalan nehirden alınan örneklerde çerçeve kayması ve baz çifti değişimlerine yol açan mutajenlerin neden olabileceği mutasyonlar belirtilmiş ve bu tür alanların gerek insan gerekse çevre sağlığı açısından gözlemlenmesi tavsiye edilmiştir.[3]

Aynı çalışmanın devamı olan bir çalışmada ise TA 98 suşunun diğersuşlardan daha hassas olduğu belirtilmiş ve petrokimyasal alandan alınan örneklerin yüksek mutajenik aktivitesi belirtilmiştir. [30]

Yapılan bir çalışmada kanalizasyon sularının ve nehir sularından alınan örnekler klorlanmış ve daha sonra XAD-2 kolonu kullanılarak konsantre edilmiş ve mutajenite testleri gerçekleştirilerek gerek mutajenitesi gerekse mutasyon oluşturma potansiyelleri hesaplanmıştır. Yapılan çalışmada belirtildiği üzere kanalizasyon sularında yüksek mutajenik aktiviteye rastlanmış nehir sularında ise mutasyon oluşturma potansiyeli tespit edilmiş bu potansiyelde klorlama etkisi ile oluşabilecek organik maddelere bağlanmıştır. [31]

Yapılan bir çalışmada yüzey suları ve arıtma tesislerinden aldıkları örneklerde; yüzey sularının sanayi ile ilişkili kısımları mutajenik etkiler gösterirken arıtma tesisine giren ve çıkan suda mutajenik etkiler yüzey sularına göre daha yüksek olarak saptanmış ve arıtma tesislerin yeterliliğine dikkat çekilmiştir. [6]

Yapılan bir çalışmada içme sularının mutajenitesi araştırılmış ve her iki suş için pozitif sonuçlar alınmıştır. Bu sonuçlara göre hem çerçeve kayması hem de baz çifti değişimleri mutasyonlarına yol açan mutajenlerin içme suyunda olabileceği belirtilmiştir. [32]

İtalya'da 2000 yılında yapılan bir çalışmada biyolojik olarak işlenmiş ve kimyasal olarak işlenmiş atık suyun mutajenitesi araştırılmış ve aktif çamurla biyolojik

olarak işlenmiş atık suda mutajenik etki görülmezken klordioksit(ClO_2), ozon (O_3) ve perasetik asit ile dezenfektasyona tabi tutulmuş sularda mutajeniteye rastlanmış ve dezenfektasyonun bakterisidal etkisinin yanında genotoksik etkisinin göz ardı edilmemesi gerektiği belirtilmiştir. [33]

Kore'de içme suları ile yapılan bir çalışmada şehirlerden alınan örnekler XAD-2 kolonu ile konsantre edilmiş ve mutajenitesi araştırılarak örneklerin mutajen olduğu belirtilmiştir. Mutasyona yol açan maddelerin ise dezenfektan olarak kullanılan klor ve türevlerinin yarattığı kanserle ilişkili halojenlenmiş ürünler olabileceği belirtilmiştir. [4]

Japonya'da suları içme suyu kaynağı olarak kullanılan üç nehirden alınan örneklerle yapılan çalışmada Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) belirttiği üzere nehir sularında kolaylıkla birikebilen, çerçeve kayması mutasyonuna yol açan ve kanserle yakından ilişkili poliaromatikhidrokarbonların (PAH) mutajenitesi araştırılmış ve pozitif sonuçlar alınmıştır. [34]

Belçika Laebeeck nehrinden alınan örneklerle yapılan bir çalışmada Ames testinde TA98 ve TA100 suşları kullanılmış ve TA 98 suşu ile mutajenik sonuçlar alınarak su örneklerinin test edilmesinde TA 98 suşunun daha uygun olacağı tavsiye edilmiştir. Bizimde yaptığımız çalışmada bu çalışmayla benzer şekilde TA 98 suşu ile mutajenik sonuçlar almamız anlamlıdır. [35]

Eskişehir'in su ihtiyacını karşılayan, geçtiği havza boyunca bu havzayı besleyen ve Eskişehir'e ayrı bir canlılık kazandıran Porsuk çayının bulunduğu bölgede ne kadar öneme sahip olduğu açıktır. Eskişehir'de yaşayan yaklaşık 700.000 insanın sağlığını 1. dereceden etkileyen Porsuk çayının su kalitesi oldukça önemlidir. Bu nedenle gerek DSİ gerekse belediyeye suyun kalitesinin sağlanması ve bu kalitenin korunması ile büyük görevler düşmektedir. Suyun doğru işlenmesi, doğru kullanımı konusunda bu ve benzeri çalışmaların yol göstereceği inancındayız.

Çalışmamızda alınan sonuçlar ışığında özellikle fabrika etkisi altında bulunan bölgedeki değerler dikkat çekicidir. Bu bölgenin baraj alanına yakınlığı ise barajda arıtılan ve şehre dağıtılan suyun sağlık açısından sorgulanması gerektiğini ortaya çıkarmaktadır. Bunun yanında yeni arıtma tekniklerinin uygulanabilirliği gerek çevre gerekse insan sağlığı açısından oldukça önem kazanmıştır.

Suyun ekolojik dengesinin genotoksisite açısından sorgulandığı çalışmamız bundan sonra bu dengenin hangi tür maddelerle bozulduğu ve bunları en aza indirecek çalışmalara yardımcı olabilir.

KAYNAKLAR

1. YÜCEL, E., Doğan, F., Öztürk, M., *Porsuk Çayında Ağır Metal Kirlilik Düzeyleri ve Halk Sağlığı İlişkisi*. Ekoloji, **17**, 29-32, (1995).
2. KORKMAZ, F. Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, (1995)
3. VARGAS, V.M.F., MOTTA, V.E.P. ve HENRÍQUES, J.A.P., *Analysis of Mutagenicity of Waters Under The Influence of Petrochemical Industrial Complexes By The Ames Test (Salmonella/Microsome)*, Brasil Journal of Genetics, **11**, **3**, 505-518, (1988).
4. PARK, J.H., LEE, B.J., LEE, S.K., KİM, K., LEE, K.H., CHE, J.H., KANG, K.S. ve LEE, Y.S., *Genotoxicity of Drinking Water From Three Korean Cities*, Mutation Research, **466**, 173-178, (2000).
5. FLİPİC, M. ve TOMAN, M.J., *Ecotoxicological Studies Using Modified Ames Bioassay*, Water Sciences Technologies, **34**, No:7-8, 1-7, (1996).
6. VARGAS, V.M.F., GUIDOBONO, R.R., JORDAO, C. ve HENRÍQUES, J.A.P., *Use of Two Short-term Tests to Evaluate The Genotoxicity of River Water Treated With Different Concentration/Extraction Procedures*, Mutation Research, **343**, 31-52, (1995).
7. TEMİZKAN, G., *Moleküler Genetik*, İstanbul Üniversitesi yayınları, (1996).
8. YEŞİLBAĞ, K., *Mutasyonel Değişimler ve Veteriner Virolojideki Önemi*, Uludağ Üniversitesi Journal of Veterinary Medical, **21**, 125-131, (2002).
9. BAĞCI, H., Ortadoğu Teknik Üniversitesi, *Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları*, Ankara, (1985).
10. DİRİL, N., DURUSOY, M., ÖKSÜZOĞLU, E., ÖZTURK, K., KARAGÖZ ve E., KIRTILOĞLU, E., *Kısa Zamanlı Test Sistemleri*, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Yaz Okulu, Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Ders Notları, Ankara, (1997).
11. NAGAI, A., KANO, Y., FUNASAK, R. ve NAKAMURO, K., *Mutagenic Characteristics and Contribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Mutagenicity of Concentrates From Municipal River Water By Blue Chitin Column*, Journal of Health Science, **48** (3), 232-241, (2002).

12. MONARCA, S., FERETTİ, D., COLLIVINARELLİ, C., GUZZELLA, L., BERTANZA, G. ve PEDRAZZANİ, R., *The Influence of Different Disinfectants On Mutagenicity and Toxicity of Urban Wastewater*, Water Research, **34**, 17, 4261-4269, (2000).
13. ERGENE, E., Bazı 2-Substitue 1H-Fenantro[9,10-d] İmidazol Bileşiklerinin Mutajenik Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, (1998).
14. MARON, D.M. ve AMES, B.N., *Revised Methods for The Salmonella Mutagenicity Test*, Mutation Research, **113**, 173-215, (1983).
15. MORTELMANS, K. ve ZEİGER, E., *The Ames Salmonella/Microsome Mutagenicity Assay*, Mutation Research, **455**, 29-60, (2000).
16. JUNK, G.A., RICHARD, J.J., GRİESER, M.D., WITIAK, D., WITIAK, J.L., ARGUELLO, M.D., VICK, R., SVEC, H.K., FRITZ, J.S. ve CALDER, G.V., *Use of Macroreticular Resins The Analysis of Water For Trace Organic Contaminants*, Journal Of Chromatography, **99**, 745-765, (1974).
17. NAKAMURO, K., VENO, H. ve SAYATO, Y., *Evaluation of Mutagenicity of Municipal River Water Concentrated Using XAD Resin Column Method*, Water Sciences Technology, **25**, 11, 293-299, (1992).
18. GUZZELLA, L., FERFETTİ, D. ve MONARCA, S., *Advanced Oxidation and Adsorbition Technologies For Organic Micropollutant Removal From Lake Water Used as Drinking Water Supply*, Water Research, 1-13, (2002).
19. RAO, S.S., BURNİSON, B.K., ROBOSH, D.A. ve TAYLOR, L.M., *Mutagenicity and Toxicity Assessment of Pulp Mill Effluent*, Chemosphere, **28**, 10, 1859-1870, (1994).
20. KATAOKA, H., HAYATSU, T., HİETSCH, G., STEİNKELLER, H., NISHIOKA, S., NARIMATSU, S., KNASMULLER, S. ve HAYATSU, H., *Identification of Mutagenic Heterocyclic Amines (IQ, Trp-P-1 and AaC) In The Water of The Danube River*, Mutation Research, **466**, 27-35, (2000).

21. NOBUKAWA, T. ve SANUKIDA, S., *Contributions of Genotoxic Precursors From Tributary Rivers and Sewage Effluents to The Yodo River in Japan*, Water Research, **36**, 989-995, (2002).
22. CĚRNA, M., PASTORKOVEA, A., SMID, J., DOBIAS, L. ve ROSSNER, P., *The Use of YG Bacterial Tester Strains For The Monitoring of Drinking Water Mutagenicity*, Toxicology Letters, **96**, 335-339, (1998).
23. DURUSOY, M. ve KAMBUR, S., *The Application of the Umu Test System for Screening Mutagenicity of Surface Water*, Türk Biyokimya Dergisi, **28**, 1, 3-7, (2003).
24. MAMBER, S.W., KOLEK, B., BROOKSHIRE, K.W., BONNER, D.P. ve TOMC, J.F., *Activity of Quinolones in the Ames Salmonella TA102 Mutagenicity Test and Other Bacterial Genotoxicity Assays*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **37**, :2, 213-217, (1993).
25. SCHRADER, T.J., CHERRY, W., SOPER, K., LANGLOIS, I. ve VIJAY, H.M., *Examinations of Alternaria alternata Mutagenicity and Effects of Nitrosylation Using the Ames Salmonella Test*, Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, **21**, 261-274, (2001).
26. CZYZ, A., SZPILEWSKA, H., DUTKIEWICZ, E., KOWALSKA, W., GODLEWSKA, A.B. ve WEGRZYN, G., *Comparison of the Ames Test and a Newly Developed Assay for Detection of Mutagenic Pollution of Marine Environments*, Mutation Research, **519**, 67-74, (2002).
27. McDANIELS, A.E., REYES, A.L., WYMER, L.J., RANKIN, C.C ve STELMA Jr., G.N., *Comparison of the Salmonella (Ames) Test, Umu Tests and the SOS Chromotests for Detecting Genotoxins*, Environmental and Molecular Mutagenesis, **16**, 204-215, (1990).
28. GÜVEN, K., *Biyokimyasal ve Moleküler Toksikoloji*, (1999).
29. DÖKMECİ, İ., *Toksikoloji, Nobel Tıp Kitapevleri*, (1994).
30. VARGAS, V.M.F., MOTTA, V.E.P. ve HENRIQUES, J.A.P., *Mutagenic Activity Detected by the Ames Test in River Water Under the Influence of Petrochemical Industries*, Mutation Research, **319**, 31-45, (1993).

31. VARGAS, V.M.F., MIGLIAVACCA, S.B., de MELO, A.C., HORN, R.C., GUIDOBONO, R.R., Sa FERREIRA, I.C.F. ve PESTANA, M.H.D., *Genotoxicity Assessment in Aquatic Envorinments Under the Influence of Heavy Metals and Organic Contaminants*, Mutation Research, **490**, 141-158, (2001).
32. TORTORA, F.C., *Microbiology in Introduction*, Fourth Edition, (1992).
33. VERRSCHAEVE, L., BRITS, E., *The Ames Test*.
34. WITTEKINDT, E., FISCHER B. ve HANSEN, P.D., *Genotoxicity Assay:umu-test*.