

**SEYDİ ÇAYI (ESKİŞEHİR) ÇEVRESİNDEN
TOPLANAN SU VE TOPRAK ÖRNEKLERİNDE
AMES / SALMONELLA/ MUTAJENİTE TESTİ
İLE BOR ELEMENTİNİN
MUTAJENİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Emel MUMCU
Yüksek Lisans Tezi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Ağustos - 2005**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Emel Mumcu’nun Seydi Çayı (Eskişehir) Çevresinden Toplanan Su ve Toprak Örneklerinde Ames / Salmonella/ Mutajenite Testi İle Bor Elementinin Mutajenitesinin Araştırılması Başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 04. 08. 2005 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı – Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Ahmet ÖZATA

Üye : Doç. Dr. Mehtap KUTLU

Üye : Yard. Doç. Halil BERBER

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**SEYDİ ÇAYI (ESKİŞEHİR) ÇEVRESİNDEN TOPLANAN
SU VE TOPRAK ÖRNEKLERİNDE AMES / SALMONELLA /
MUTAJENİTE TESTİ İLE BOR ELEMENTİNİN MUTAJENİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Emel MUMCU

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÖZATA

2005, 64 Sayfa

Bu çalışmada, Seydi Çayı (Eskişehir) çevresinden toplanan su ve toprak örneklerinde bulunan bor miktarının mutajenejik etkisi araştırılmıştır. Mutajenite *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları ile Ames / *Salmonella* / Mikrozom test yöntemi kullanılarak hem metabolik enzimlerin kullanıldığı S9'lu ortamda hem de S9'suz ortamda araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol grupları ile beraber SPSS programında *student – t* testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bor düzeyinin yüksek olduğu istasyonlarda bazı dozlar için toksisite ve mutajenite belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ames testi, Mutajenite, *Salmonella typhimurium*, Bor, Seydi Çayı

ABSTRACT**Master of Science Thesis****WATER AND SOİL SAMPLES COLLECED FROM SEYDİ STREAM
(ESKİŞEHİR) AROUND DETECTED FOR THE BORON MUTAGENİTY
BY THE AMES / SALMONELLA/ MUTAJENITE TEST****Emel MUMCU****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ÖZATA****2005, 64 pages**

This study evaluates the mutagenic effects of boron water and soil samples that are collected from Seydi Stream by Ames / *Salmonella* / Microsomal test. The mutagenic activity was initially screened using *Salmonella typhimurium* strains TA 98 and TA 100, with or without S9 metabolic activation. The results with control groups are estimated with spss programme by using *student - t* test. At stations which have high boron concentrations some doses indicate significant mutagenicity and toxicity of boron.

Key words: Ames test, Mutagenicity, *Salmonella typhimurium*, Boron, Seydi Stream

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde, değerli bilgilerini, yardım ve önerilerini benden esirgemeyen değerli danışmanım ve bölümün tüm olanaklarından yararlanma sağlayan Fen Fakültesi Dekanı hocam sayın Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'ya, ayrıca yardımlarını gördüğüm Doç.Dr.Mehtap KUTLU'ya ve Araş.Gör.Gözde AYDOĞAN'a teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Çalışmanın laboratuvar aşamasında bana yardımcı olan sayın Uzman Erdoğan ÇAKIR'a özellikle çalışmanın her aşamasında bana yardım eden, beni destekleyen sevgili Biyolog arkadaşlarım Açelya AKDAMAR, Aslı ÖZEN, Tuba BÜYÜKÇOBAN ve emeği geçen tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Tüm yaşamım boyunca her konuda beni destekleyen, beni yönlendiren ve her zaman yanımda olan sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Emel MUMCU

Ağustos 2005

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZGİNİ	vii
 1. GİRİŞ	 1
 2. MUTASYON	 5
2.1. Mutasyon Çeşitleri	5
2.1.1. Kromozom Mutasyonları	5
2.1.1.1. Kromozom Sayı Değişimleri	5
A. Öploidi	6
B. Anöploidi	6
2.1.1.1.Yapısal Kromozom Mutasyonları	7
A. Delesyon.....	7
B. Duplikasyon	7
C. İnversiyon.....	8
D. Translokasyon	8
2.1.2. Gen Mutasyonları.....	8
2.2. Mutasyonların Kökeni (Mutasyonların Etmenleri).....	10
2.2.1. Kendiliğinden (Spontan) Mutasyonlar	10
2.2.2. Yapay (İndüklenmiş) Mutasyonlar	11
2.3. Mutasyonu Oluşturan Faktörler (Mutajenler).....	11
2.3.1. Fiziksel Mutajenler	11
2.3.2. Biyolojik Mutajenler.....	11
2.3.3. Kimyasal Mutajenler.....	12

2.3.3.1. Baz Analogları	12
2.3.3.2. DNA’da Baz Değişiren Maddeler.....	12
2.3.3.3. DNA’dan Baz Çıkaran Maddeler.....	12
2.3.3.4. Akridin Boyalar	13
2.3.3.5. S.O.S Bağımlı Mutajenler.....	13
2.4. Mutajenite Testleri.....	13
2.4.1. Yapısal Kromozom Bozulma Testi (Chromosome Aberration)	14
2.4.2. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE)	14
2.4.3. Mikronukleus (MN) Testi.....	15
2.4.4. UDS Yöntemi.....	15
2.4.5. Comet Yöntemi.....	15
2.4.6. S.O.S. Kromotest	16
2.4.7. Transformasyon Yöntemi	16
2.4.8. Ames / Salmonella / Mikrosom Test Yöntemi	16
2.5. <i>Salmonella typhimurium</i> ’un Genetik Özellikleri.....	18
3. BOR ELEMENTİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	21
3.1. Bor Elementinin Kullanım Alanları.....	22
3.1.1. Cam ve Seramik Sanayisinde Borun Kullanılması.....	22
3.1.2. Yangın Önleyici Maddelerde Borun Kullanılması	24
3.1.3. Sabun ve Deterjan Sanayisinde Borun Kullanılması.....	24
3.1.4. Metalurji Sanayisinde Borun Kullanılması.....	25
3.1.5. Tarım Sektöründe Borun Kullanılması.....	25
3.1.6. Nükleer Sanayide Borun Kullanımı.....	26
3.1.7. Borun Diğer Kullanım Alanları	26
3.2. Toplam Bor Rezervi Ve Türkiye’nin Bor Madeni Açısından Konumu	29
3.3. Çalışılan Alandaki Bor Elementinin Oluşumu	30
3.4. Bor Elementinin Çevresel Etkisi.....	32
3.4.1. Borun Hayvanlara Etkisi.....	32
3.4.2. Borun İnsanlara Etkisi.....	33
3.4.3. Borun Bitkilere Etkisi	34

4. MATERİYAL VE METOD.....	36
4.1. Materyal	36
4.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
4.1.2. <i>Salmonella typhimurium</i> Test Suşları	36
4.1.3. Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları	36
4.1.4. Örneklerin Toplanması ve Saklanması	42
4.2. Metod	42
4.2.1. Master Plakların Hazırlanması.....	43
4.2.2. Salmonella Suşlarının Stoklanması ve Stok Kültürlerin Açılması ...	43
4.2.3. Test Suşlarının Genotip Kontrollerin Yapılması	43
4.2.3.1. Histidin Gereksinimi Kontrolü	44
4.2.3.2. uvr B Mutasyonu Kontrolü	44
4.2.3.3. Rfa Mutasyonu Kontrolü	45
4.2.3.4. R Faktör Varlığının Kontrolü.....	45
4.2.3.5. Spontan Olarak Geriye Dönüş Sıklığının Kontrolü.....	45
4.2.3.6. Test Maddesinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması	46
4.2.4. Su Örneklerinin Hazırlanması.....	46
4.2.5. Toprak Örneklerinin Hazırlanması	47
4.2.6. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı	47
4.2.6.1. S9'suz (-) Deney	48
4.2.6.2. S9'lu (+) Deney	48
4.2.7. Sonuçların Değerlendirilmesi	49
5. BULGULAR.....	50
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
KAYNAKÇA.....	58

ÇİZELGELER DİZGİNİ

	<u>Sayfa</u>
3.1. Dünya Bor Rezervi	30
5.1. Belirlenen İstasyonlardaki Bor Miktarı	51
5.2. TA 98 Suşlarının Su ve Toprak Örneklerindeki Sonuçları.....	52
5.3. TA 100 Suşlarının Su ve Toprak Örneklerindeki Sonuçları.	53

1. GİRİŞ

Bor, stratejik bir madendir. Bor minerallerinin, son derece özel kimyasal yapıları nedeniyle, hammadde, rafine ürün ve nihai ürün şeklinde, büyük çoğunluğunda alternatifsiz olmak üzere, sayısız kullanım alanı mevcuttur. Bor mineralleri, ilave edildikleri malzemelerin katma değerini olağanüstü yükseltmekte, bu nedenle sanayinin tuzu olarak adlandırılmaktadırlar. Gelişen teknolojiler, bor kullanımını ve bor minerallerine olan bağımlılığı artırmaktadır. Hammadde, yarı mamul ve mamul madde olarak, cam, porselen, seramik, tekstil, deterjan, metalurji, tarım, havacılık, savunma gibi çok farklı sektörlerde kullanılan bor mineralleri sanayinin vazgeçilmez hammaddelerindendir. Özellikle uçak ve uzay sanayilerinde, yapı elemanı ve yakıt olarak kullanımları söz konusudur [1].

Türkiye'deki bor yatakları Bursa, Balıkesir, Kütahya ve Eskişehir il sınırları içerisinde olup, bu bölgede dünya bor rezervlerinin % 70'ine sahiptir. Türkiye'de başlıca bor üretimi Kütahya ile Balıkesir il merkezleri arasında, yaklaşık 200 km uzunluğunda ve 70 – 120 km genişliğindeki bir kuşak boyunca yer alan Bigadiç, Kemalpaşa, Emet ve Kırka yörelerinde yapılmaktadır [2].

Açık ocaklarda bor cevheri elde edilirken, cevherin üzerinde bulunan borca zengin örtü tabakası tıraşlanarak atılmaktadır. Borca zengin olan ve pasa adı verilen bu atıklar erozyon ve yağışların etkisiyle hem akarsulara ulaşmakta, hem de geçtiği yerlerdeki toprakları kirletmektedir [3].

Dünyada sucul ortamlardaki bor kirliliğinin kaynakları, ikinci kullanım atık sular olarak tanımlanmaktadır. Türkiye'de ise sucul ortamlardaki bor kirliliği direk olarak bor üretimi yapan işletmelerden artık ve yıkama suları yoluyla olmaktadır [3].

Bor yeryüzünde toprak, kayalar ve suda yaygın olarak bulunan bir elementtir. Canlıların bu elementin varlığına evrim geçirdiği düşünülmektedir [4]. Bor elementinin mikroorganizmalar üzerindeki olumsuz etkilerinin 0,515 – 0,667 ppm'den başladığı saptanmıştır [5]. Sucul ortamda kabul edilen bor konsantrasyonu 0,75 – 1,0 mg/l arasında belirlenmiştir [6]. Deniz sularında

normal olarak bulunan 4,5 mg/lt bor deniz canlıları için zararlı değildir [7]. Birge doğal sularda borun en düşük etki konsantrasyonunu 1,0 mg/lt olarak kaydetmiştir [8]. Aşırı bor insanlar ve hayvanların merkezi sinir sistemini etkilemektedir. Bor içeriği 1 ppm'in üzerinde olan suların, içme suyu olarak kullanılması ABD'de yasaklanmıştır [9]. Yerkabuğunda bor ortalama 10 ppm'den az olarak bulunmaktadır. Bor elementinin yerkabuğundaki genel dağılımı çok az olmasına karşın, belli ortamlardaki bor konsantrasyonlarının çok fazla oranlardaki artışı, ekonomik bor yataklarının oluşumunu sonuçlar [10].

Çalışma bölgemiz, Eskişehir ilinin 70 km güneyinde, Kırka Beldesinin 4,5 km batısında yer almakta. Kırka Bor İşletmesinin kurulu kapasitesine göre yaklaşık 500 yıl kadar yetecek, Eskişehir – Seyitgazi – Kırka'daki rezervimiz yaklaşık 600 milyon ton kadardır [4].

Günümüzde yaşadığımız çevre, insanoğlunun bir takım olumsuz etkileri sonucu giderek bozulmaktadır. Son yıllarda hızla artan nüfus ve aşırı kentleşme ile teknolojik gelişmeler ve bunlara bağlı olarak yaşam düzeyinin yükselişi doğal kaynakları olumsuz yönde etkiler olmuş ve canlıların yaşam ortamlarında bozulmalara ve dengesizliklere sebep olmuştur. Sonuçta bu bozulma ve kirlenmeler canlıların sağlığını tehdit edici boyutlara ulaşmıştır. Bu sebeple çevre sorunları günlük yaşamın en önemli sorunu haline gelmiştir. Ciddi sorunlar oluşturabilen birçok hastalığın ortaya çıkmasına yol açan etmenlerin başında günlük yaşamda sık sık kullanılan sentetik yada doğal kimyasal bileşenler gelmektedir [11].

Bu bileşiklerin pek çoğu canlıların DNA'sında değişikliklere yol açarak genotoksik ve kanserojenik etkilere sahip olmaktadır [12, 13]. İnsan popülasyonunun çevresindeki kanserojen ve mutajen maddelerin etkisinden korunması için çevremizdeki bu özelliğe sahip bileşiklerin tespit edilmesi ve etkilerinin değerlendirilmesi öncelikle gerekli ve önemlidir [12, 14, 15, 16].

Kimyasal maddelerin kanserojenik 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 karsinogenite araştırmalarına esas olabilecek, kısa zamanda sonuç

vereabilen 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 [17].

Genotoksisite araştırmalarında fiziksel ve kimyasal mutajenlerin DNA’da meydana getirdiği hasar, bakteriyel mutasyonları ölçebilen kısa zamanlı testler ile saptamaktadır. Bu testlerde mutajenik etki ileri ve geri mutasyonları belirleyen yöntemlerle ölçülebilmektedir. Bu testler içerisinde en yoğun kullanılan kısa zamanlı ve geri mutasyon testi olan Ames / Salmonella / Mikrozomal (mutajenite) testidir [18].

Salmonella / Mikrozom testi hemen hemen tüm laboratuvarlarda rutin çalışmalarda uygulanır. 1970’li yılların başında geliştirilen bu yöntem, bakteri mutasyonu oluşan mutant kolonilerin saptanması prensibine dayanmaktadır. Bu testle *Salmonella typhimurium*’dan elde edilen mutant suşlar kullanılır. Bu suşlardan TA 1535 ve TA 100 baz çifti değişimi, TA 1537, TA 1538 ve TA 98 çerçeve kayması tipi mutasyonlar için duyarlıdır. Bu suşlar üreyebilmek için besi yerinde histidin aminoasidine duyan oksotrofik mutantlara dönüştürülmüştür [19]. Test suşları histidin mutasyonuna ek olarak belirli mutajenlere karşı duyarlılıklarını arttıran başka mutasyonlar da içerirler. Bu mutasyonlardan biri rfa’dır. Bu mutasyon bakteri yüzeyini kaplayan lipopolisakkarit bariyerin bölgesel kaybına neden olur ve normal hücre duvarından geçemeyen büyük moleküllere karşı geçirgenliğini artırır [15]. Ayrıca DNA onarım mekanizmasında etkili olan uvr B mutasyonlarını ve ampisiline dirençlilik sağlayan PKM 101 plazmitini içermektedir [15].

Bu testte *Salmonella typhimurium*’un mutant suşları test edilen ajanla birlikte, sınırlı miktarda histidin içeren minimal besi yeri plaklarına ekilir. Bulunan histidin miktarı bakterilerin birkaç jenerasyon gelişmesine izin verir. Sonuçta DNA lezyonu mutasyonla sonuçlandığında mutant fenotip ifade edilir. Ortamdaki, histidinin tükenmesinden sonra geri dönüşen (his+) revertant bakteriler besi yerinde histidin aminoasiti olmasa dahi gelişebilmektedir [20].

Kimyasal mutajenlerin büyük bir bölümü promutajen özelliktedir. Yani mutajenik etkiden kendileri değil metabolitleri sorumludur. O halde geçerli sonuca ulaşılabilmesi için test suşu ile yalnızca kimyasal bileşiğin değil metabolitlerinin de temasa geçmesi sağlanmalıdır. Bu amaçla S9'lu yöntemde memeli canlılardan elde edilen karaciğer mikrozomal enzimler kullanılır. Ames testi S9'lu ve S9'suz olmak üzere iki şekilde yapılır [20].

Salmonella plak inkorporasyon deneyi, kompleks bileşiklerin mutajenik özelliklerinin araştırılması, aktif bileşiklerin belirlenmesi ve antimutagenez mekanizmasının çalışması için kullanışlı esnek ve çok yönlüdür [21].

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. Günümüzde teknik olarak kullanılabilir durumda olan tatlı su kaynaklarının oldukça sınırlı olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan tarım alanlarının bilinçsizce kullanılması da sorunu arttırmaktadır.

Bu çalışma ile bor bakımından zengin olduğu belirlenen, Kırka yöresinden toplanan su ve toprak örneklerinde, bulunan bor miktarının mutajen olup olmadığı araştırıldı. Mutajenlerin etki mekanizması kesin olarak aydınlatıldıktan sonra belirli çevresel mutajenlerin insanda kansere sebep olabileceği şüphesi doğmuştur. Mutajenite ve karsinojenite arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma ile belirlenen 175 karsinojenik maddenin 157'sinin aynı zamanda mutajen olduğu ve karsinojenite ile mutajenite arasında % 90 oranında bir bağlantı olduğu sürülmüştür. Bu ajanların, hücrelerde somatik mutasyonları uyararak kansere neden olması, kanserin somatik mutasyon teorisiyle bağdaşmaktadır [22]. Bor elementinin mutajen olması durumunda bu yöredeki tarım alanları, yaşayan insanlar ve su kaynaklarından yararlanan çevre ciddi bir tehdit ile karşı karşıya kalmaktadır.

2. MUTASYON

Canlılarda, genetik materyalin miktar, organizasyon veya içeriğindeki ani ve rastgele ortaya çıkan kalıtsal değişimlere mutasyon adı verilir [23]. Mutasyonlar doğada kendiliğinden (spontan) meydana gelebildiği gibi mutajen adı verilen fiziksel ve kimyasal etmenler tarafından sentetik olarak meydana getirilebilirler. Mutajen, kısaca mutasyona neden olan etmendir. Mutajenler fiziksel ve kimyasal kaynaklı olabilir ve genelde doğal (spontan) olanlara göre daha yüksek mutasyon frekansına neden olurlar. Mutasyon sonucu meydana gelen ürüne mutant denir. Mutasyon, genomda kalıtsal bir değişime neden olur. Çok hücreli ve eşeyli üreyen organizmalarda mutasyonun kalıtsal olması için germ hücrelerinde olması gerekir. Somatik dokulardaki mutasyonlar bireyin fenotipinde gözlenebilir fakat döle geçemediği için o bireyden sonra ortadan kalkar [23, 24].

2.1. Mutasyon Çeşitleri

Mutasyonlar 2 temel grupta incelenebilir. Bunları ‘kromozom mutasyonlar’ ve ‘gen mutasyonları’ olarak sıralayabiliriz. Kromozom mutasyonları da ‘kromozom sayı değişimleri’ ve ‘kromozom yapı değişimleri’ şeklinde iki gruba ayrılabilir [25, 26].

2.1.1. Kromozom mutasyonları

2.1.1.1. Kromozom sayı değişimleri (genom mutasyonları)

Organizmaların hem doğal hem de laboratuvar popülasyonlarında kendiliğinden meydana gelen kromozom sayısındaki değişimlerdir. Kromozomlar bazen mitoz ve mayoz sırasında düzenli olarak ayrılmayabilir ve farklı kromozom sayısına sahip hücreler oluşabilir. Bu şekilde birçok genin oranı değişeceğinden dolayı kalıtsal açıdan birçok sorun (Mongolizm, Turner Sendromu, Klinefelter Sendromu vb.) oluşur [26, 27, 28]. Bu olayda kromozomun bir parçası değil tümü yok olur yada sayıca artar. Öplodi ve anöploidi olarak iki şekli vardır [29].

A. Öploid

Kromozom sayısı takımındaki değişimlerdir. Bir takımındaki kromozomların hepsinin birden sayısının tam katlar halinde yükselmesi veya organizmada sadece tek takım kromozom bulunması biçiminde olabilir. Monoploid ve poliploid olarak iki kısımda incelenir.

Monoploidlerde her kromozomdan sadece bir tane taşındığı için bitin genler de tek kopya halinde bulunur. Mayoz bölünme sırasında monoploidlerde kromozom eşleşmesi olmadığından kromozomların kutuplara çekilişleri düzensizdir, sonuçta da dengesiz eşey hücreleri meydana gelir.

Poliploidi ise bir genomdaki kromozom sayısının hepsinin birden, ikiden fazla kata yükselmesidir. Bu olay; mayozda kromozom sayısının önlenmesi ile somatik hücrelerdeki kadar genoma sahip gametlerin oluşumuyla (yüksek veya düşük sıcaklık ya da bazı kimyasal maddeler kullanıldığında sıklıkla meydana gelmektedir), zigotun ilk mitoz bölünmeleri sırasında kromatidlerin farklı kutuplara çekilmesinin veya enine çeper oluşumunun engellenmesiyle ve en son olarak da bir yumurta hücresinin birden fazla sperm tarafından döllenmesi sonucunda meydana gelmektedir.

Bir poliploidin sahip olduğu takımların hepsi aynı türe ait ise olaya otopoliploidi, farklı türe ait ise allopoliploidi denir [23].

B. Anöploid

Bir takımındaki kromozomlardan birinin veya birkaçının sayısının değişmesine anöploid denir. Bu olay mitoz ve mayozdaki anormallikler sonucu ortaya çıkar (nondisjunction). Çeşitli tipleri vardır.

Monosomi, diploid bir bireyde tek bir kromozomun eksik olma durumudur (Turner sendromu) [23].

Nullisomi, bir organizmada bir kromozomun homologu ile birlikte eksik olması durumudur. Bu bireyler aynı çeşit kromozomu kaybetmiş iki anöploid ($n - 1$) gametin birleşmesiyle meydana gelir [23].

Bir takımındaki kromozomlardan birinin veya birkaçının sayısının artması olayıdır. Kromozom sayısına göre; trisomi (Down ve Patau sendromları), tetrasomi gibi isimler alır [23].

2.1.1.2.Yapısal kromozom mutasyonları

Genomda değişikliğe yol açan olaylar kromozomların yapılarındaki değişimler sonucunda da meydana gelebilir. Bu olaylarda kromozom sayısı aynı kalır fakat kromozomlarda bazı parçaların kaybolması, fazlalaşması veya yer değiştirmesi yoluyla kalıtsal materyal değişime uğrar.

Yapı değişimlerinin hepsinde önce kromozomda veya kromozomu oluşturan kromatidlerden birinde bir veya birden fazla noktada kırılmalar olur. Kırılma kendiliğinden meydana gelebildiği gibi çeşitli dış etkenler (X, gama ışınları, UV ışık, çeşitli kimyasal maddeler vb.) tarafından da meydana getirebilir [23].

A. Delesyon

Kromozomların, parça kaybetmesi olayına delesyon adı verilir. Delesyon meydana gelirken oluşan kromozom parçası ve onun meydana getirdiği delesyon halkası sentromerli ise hücrede varlığını devam ettirir, fakat sentromersiz kısım kaybolur. Delesyon sentromerli bölgede meydana gelirse halka kromozom oluşur. İnsanda kromozom delesyonu sonucu oluşmuş sendromlara örnek olarak Philadelphia kromozomunu ve “Cri du Chat” sendromunu verebiliriz [23].

B. Duplikasyon

Bir diğer yapısal kromozom mutasyonu ise kromozomun herhangi bir parçayı fazla sayıda taşıması olarak bilinen duplikasyonu’dur (Drosophila’da Bar duplikasyonu) [23]. Delesyonun tersine bir parça çoğalması vardır ve sonuçta dölde, duplikasyonlu kromozom taşıyan hücrelerde bazı genler fazla sayıda bulunur.

C. İnversiyon

Bir kromozomun içinden çıkan bir parçanın dönerek koptuğu yere ters yönde yeniden yapışmasına inversiyon denir. Bunun sonucunda kromozomdaki genlerin diziliş sırasında değişme olur. Koptuğu yere ters dönerek yapışan kromozom parçası sentromer içeriyorsa perisentik, içermiyorsa parasentrik inversiyon denir [23].

D. Translokasyon

Homolog olmayan kromozomlar arasında kromozomların yer değiştirmesine translokasyon denir. İnsanda görülen Down sendromunun nedenlerinden biri 21. kromozomun D grubundan bir kromozoma (özellikle 14. kromozoma) eklenmesidir [23].

2.1.2. Gen Mutasyonları

Gen mutasyonları veya diğer bir deyişle ‘Nokta Mutasyonları’ kromozomların yapısında herhangi bir değişikliğe sebep olmaz ve mikroskopla da görülmezler. DNA’da bulunan nükleotit dizisinin yada bazlarının değişmesinden ileri gelir. Baz sırasının veya AT / GC oranının değişmesi, o gene özgü enzimin tamamen kaybolmasına ya da etkisinin azalmasına neden olur. Bir gen, binlerce baz çiftinden meydana gelmiş bir birim olduğundan ve kurumsal olarak her bazda mutasyon olabileceğinden dolayı, bir genin en azından baz çifti kadar mutasyon çeşitli olabilir [27]. Çok değişik biçimlerde meydana gelebilen DNA baz sıralanmasında oluşan bozukluklar birkaç grupta incelenebilir.

1) Bir gen üzerinde tek bir baz çiftini etkileyen değişiklikler : Bu tip mutasyonlara ‘nokta mutasyonları’ (point mutation) denir. Tek bir baz çiftini etkileyen bu mutasyonlar da farklı sınıflara ayrılabilir [26, 29].

a) Bir baz çiftinin yerine başka bir baz çiftinin girmesi (base substitution):

Bu tip değişiklikte, gen yapısındaki bir pürin yerine diğer bir pürinin (A yerine G yada G yerine A) veya bir pirimidin yerine diğer bir pirimidinin (T yerine C veya

C yerine T) girmesi söz konusu olabilir. Nokta mutasyonlarının bu tipine ‘geçiş’ (transisyon) denir. DNA yapısında bir pürin yerine bir pirimidin (A veya G yerine T veya C’nin geçmesi yada bunun tersi) geçmesi de mümkündür. Bu tip mutasyonlara da ‘çapraz geçiş’ (transversiyon) denir [29].

Nokta mutasyonu oluşturan bromüraçil, nitrikasit, formalin, hardal gazı gibi kimyasal maddeler, DNA’daki özel bazlarla tepkimeye girer ve onların yapısını değiştirir. DNA’da bazların yerine geçen bu kimyasallara ‘baz analogları’ denir. Ayrıca nadir de olsa iki pirimidinin ve pürinin birleşerek A - G ve C - T baz çiftlerini meydana getirmesi; daha sonraki DNA replikasyonlarında A - T ve G -C dönüşmesine neden olur [27]. DNA kalıp olarak görev yaptığı sırada bazların herhangi birinde oluşabilecek ‘tautomerik’ bir değişikliğin, (örneğin, timin’nin ‘keto’ formundan ‘enol’ formuna yada adenin’in ‘amino’ formunda ‘imino’ formuna değişmesi) moleküllerin hidrojen bağı oluşturma özelliklerini de değiştirmesi nedeniyle, timinin guaninle veya adeninin sitozinle çiftler oluşturmaya olanağı daima vardır [27].

DNA molekülünün, bir protein için olan kodlarının bir parçasında eğer bir bazın yerine bir başka baz geçerse, bu genin transkripsiyonu sonucu oluşacak mRNA’nın yapısına hatalı bir baz katılacaktır ve sonuçta DNA’da yer değiştiren bazlar protein sentezinde yer değiştiren aminoasitlerle sonlanır. Bu mutasyona ‘yanlış anlamlı mutasyon’ denir. Bazen de yer değiştiren bazların etkisi sonucu mRNA molekülünün ortasında bir stop (anlamsız) kodonun meydana gelmesiyle fonksiyonel bir proteinin sentezi engellenebilir ve protein yalnızca bir fragmenti sentezlenmiş olur. Böyle mutasyonlara ‘anlamsız mutasyon’ denir [30].

b) Gendeki bir bazın aradan çıkması veya yeni bir baz çiftinin yapıya girmesi: DNA molekülü içinde bir nükleotid’in yapıdan ayrılmasına ‘delesyon’, yapıya katılmasına ‘insersiyon’ denir. Örneğin; benzopiren, endüstriyel baca kurumları, sigara katranı ve aflatoksin, besinlerde ve hayvansal ürünlerde bulunmuştur. Bu maddeler DNA’dan baz çıkarır yada DNA’ya baz ekleyerek nokta mutasyonuna sebep olurlar. Nokta mutasyonu geçirmiş bir genin kontrolünde olan bir polipeptit zincirindeki aminoasit sıralanması, söz konusu bölgeden sonra tamamen değişecektir. Böyle bir değişiklik, sentezlenen protein

molekölünün yapısının ve bazı fonksiyonlarının tümüyle bozulması sonucunu doğurur [31].

2) Gende birden fazla baz çiftini ilgilendiren değişiklikler: Bir başka baz çifti mutasyonları da ‘çerçeve kayması mutasyonları’ (frameshift mutation)dır. Burada bir yada birden çok nükleotit çiftleri DNA’dan kopar (delesyon) yada DNA’ya eklenir (insersiyon). Bu durum ise okunan çerçevenin translasyonunu değiştirir. Böylece translasyon sırasında tRNA’ların tanıdığı üçlü baz dizileri değişir. Örneğin, bir genin ortasına bir bir nükleotit çiftinin girmesi, bu bölgeden aşağıda (down stream) birçok aminoasitte değişikliğe yol açar. Çerçeve kayması mutasyonlarında hemen hemen her zaman uzun mesafede yanlış anlamlı ve inaktif protein üretilir yada en sonunda bir anlamsız kodonun translasyonu sonlandırması ile protein sentezi durdurulabilir [26, 30, 32].

2.2.Mutasyonların Kökeni (Mutasyonların Etmenleri)

2.2.1. Kendiliğinden (spontan) mutasyonlar

Tüm canlılar normal hücresel etkinliklerinin yada ortamla gelişigüzel etkileşimlerinin sonucunda bazı mutasyonlara uğrarlar. Bununla beraber, belirli bir dış etki olmaksızın mutasyonların kendiliğinden olma olasılığı çok düşüktür. Tek bir gende kendiliğinden mutasyon meydana gelme olasılığının bakterilerde yaklaşık $10^{-5} - 10^{-6}$ / lokus / jenerasyon olduğu hesaplanmıştır. Ökaryotlarda spontan mutasyon olasılığı hakkında kesin bilgiler bulunmamakla birlikte, onlarda da aşağı yukarı bakterilerdekine benzer değerler olduğu sanılmaktadır. Genellenecek olursa, tek bir gende kendiliğinden mutasyon olasılığının her dölde (her replikasyon sırasında) hücre başına yaklaşık $10^{-5} - 10^{-10}$ olduğu kabul edilmektedir.

2.2.2. Yapay (indüklenmiş) mutasyonlar

“Mutajen” adı verilen kimyasal veya fiziksel etkenlerle meydana gelen mutasyonlardır. Bu etkenlerin kullanılması mutasyon meydana gelme olasılığını çok arttırır. 10^{-5} - 10^{-10} oranındaki kendiliğinden mutasyon olasılığı mutajenler tarafından yaklaşık 10^{-2} ye yükseltilebilir. Mutajenler genellikle genler üzerinde hiç fark gözetmeksizin etkili olurlar. Bu nedenle genlerin yapay mutasyona uğrama şansları eşittir. Bunun dışında, DNA’da bazı bölgelerde (sıcak bölge) mutasyon oranının daha yüksek olduğu ve ayrıca çeşitli mutajenlerin bazı genlerde daha etkili olduğunu gösteren kanıtlar vardır.

2.3. Mutasyonu Oluşturan Faktörler (Mutajenler)

Temel olarak mutasyon oluşturabilen faktörler üç ayrı grupta; fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere sınıflandırılabilir.

2.3.1. Fiziksel mutajenler

Sıcaklık, manyetik alan, elektriksel alan, UV, x, y, proton, nötron ışınları gibi etmenlerdir. Bunlar genellikle bir baz çiftinin yerini bir başka baz çiftinin almasına yol açarlar. Fiziksel mutajenler etki şiddetine ve sürecine göre geçici veya kalıcı değişimlere yol açarlar [11, 33].

2.3.2. Biyolojik mutajenler

Biyolojik mutajenler olarak virüsler ve transpozibil elementler bilinmektedir. Virüs genomu konak hücrenin DNA sına girdiğinde kendi DNA’ sında da azı genleri konak DNA’ sının genetik yapısını değiştirildiğinden dolayı bir mutasyon olarak kabul edilir [25, 28]. Transpozibil elementler ise genom içinde bir pozisyondan diğerine hareket ederler ve kromozom kopması gibi genetiksel değişikliklere neden olurlar [11].

2.3.3. Kimyasal mutajenler

Etki biçimlerine göre 5 alt grupta incelenir.

2.3.3.1. Baz analogları

Bu moleküllerin, moleküller yapıları nükleik asitlerin purin ve pirimidin bazlarına çok benzediğinden mutenejik etkileri replikasyon sırasında yeni sentezlenen DNA zincirinin yapısına normal bazların yerine baz analogları girebilir [11]. Bunun sonucunda da DNA yapısında bulunan H atomlarında pozisyon değişikliği sebebiyle çok sayıda yanlış eşlenmiş bazın oluşumu ile sağlanır. Baz analogları bakteri kültürüne ilave edildiğinde sentezlenen DNA'nın yapısına girerler ve ilk replikasyonda çift yönlü transisyona neden olurlar. Baz analoglarının kullanılmasıyla geri mutasyon meydana getirilebilir [18].

2.3.3.2. DNA'da baz değiştiren maddeler

Bu moleküller dinlenme halindeki DNA'nın yapısına girerek bazlarını değiştirirler. En önemlisi nitroz asidi (HNO_2) dir. Doğrudan doğruya DNA bazlarında amino gruplarını çıkarırlar veya baz sırasını değiştirirler. Örneğin böyle bir etki adenini hipoksantine çevirip sitozinle bağlanmasını sağlar. DNA bazları çok farklı bir yapı kazanabilirler. Bu yeni yapısıyla baz, orijinal bazdan çok farklı bir baz çifti yapmaktadır, tabi genetik kod da değişir [34].

2.3.3.3. DNA'dan baz çıkaran maddeler

En önemlileri alkilleyici maddelerdir. Kükürt, nitrojen, etilenoksit ve daha az toksik olan etil-metan-sülfonat (EMS) bu gruba girer. Alkilleyici maddeler spesifik olarak guaninin N7 pozisyonunu etkiler. Bu etki sonucu DNA'daki deoksiriboz bağı gevşer ve 7-alkik guaninin DNA'dan ayrılır. Sonuçta, DNA'da oluşan pürin boşluğuna 4 bazdan herhangi biri gelebilir. Hem transisyon hemde transisyon tipi mutasyon görülebilir [11].

2.3.3.4. Akridin boyalar

Bu maddeler genellikle C-G...A-T veya A-T...T-A şeklinde transversiyonlara yol açar. Akridin mutasyonları diğer transversiyon mutasyonlarından farklı olarak daima gen fonksiyonlarının tümüyle kaybolmasına yol açar. Birden fazla baz çifti içeren DNA segmenti gen yapısından çıkar (delesyon) yada uzun DNA segmentleri gen yapısına girer (insersiyon). Akridin boyalarının mutasyona yol açtıkları noktalar DNA üzerinde geliş güzel dağıtılmıştır ve bu noktalara ‘hot spots’ (sıcak noktalar) denir.

2.3.3.5. S.O.S bağımlı mutajenler

Bazı mutajen olan kimyasallar etkilerini S.O.S onarım sistemini kullanarak gösterirler. Bu maddelere ‘S.O.S bağımlı mutajenler’ denir. Bunlara 4-nitro kulnolin, benzo (a) piren, aflotoksin, UV ışığı örnek verilebilir. Mutajenler birden fazla bazı etkilediğinde yanlış eşleşen bazların miktarı artacağı için replikasyon engellenecektir. Bunu engellemek için S.O.S yolunun uyarılması gerekir. Araştırmacılar, bitkilerden izole edilen bitki ekstractlarının antimutajen olup olmadığını S.O.S yöntemi ile araştırmışlar, sonuç olarak S.O.S’i baskıladığı düşünülen kimyasal maddelerin, S.O.S aktivitesi sonucu meydana gelebilecek mutasyonları engellediği veya azalttığı, YE’nin (yucca ekstractı) S.O.S de aktivite gösteren umu genini baskılayarak mutasyonu azalttığı tespit edilmiştir [11].

2.4. 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 chroramitid 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.

2.4.1. Yapısal kromozom bozulma testi (chromosome aberration =CA)

Bu test tekniğinde mutasyon sonucu kromozomda oluşmuş olan gaplar (kromatite dislokasyonlar olmadan oluşan akromatid lezyonlar), kırıklar, yer değiştirmeler ve fragmentler sayılır [35]. Anöploidi ve poliploidi gibi sayısal kromozom bozukluklar ile kromozom tipi, kromatid tipi kopmalar ve anormal birleşme gibi yapısal bozukluklar çok yaygın olarak, bölünen hücrelerin metafazda olanların kolsemit yada kolşisin gibi bir tübilin polimerizasyon inhibitörü kullanarak tutuklama ile saptanmaktadır [36]. Herbisit olarak kullanılan triflualin'in insan lenfosit hücrelerinde kromozom aberasyonlarını arttırdığı bildirilmiştir [35].

2.4.2. Kardeş kromatid değişimi (SCE) yöntemi

DNA'da bir kırılma meydana geldiğinde DNA'nın kendi onarım mekanizması çalışmaya başlar. Bazen bu onarım sürecinde, bir kromozomda bulunan iki karşılıklı kromatidlerin (sister chromatids) eş parçaları yer değiştirir. Özel boyama teknikleriyle bu kromatidlerin biri daha koyu, diğeri daha açık boyanarak tam olarak meydana gelen yer değişiklik saptanabilir. Böylece, SCE tehlikeli maddelere maruz kalan hücreler için duyarlı bir indikatör olarak iş görür.

SCE testi, toksik madde-DNA etkileşimini açığa çıkarmadaki duyarlılığı ve genotoksik kimyasalların kültüre edilmiş yada muamele edilmiş hayvanlarda alınan hücre örneklerinde SCE sayısını önemli ölçüde arttırması sebebi ile bireysel olarak maruz kalınan genotoksik karsinojenlerin kan lenfositlerinde yarattığı DNA hasarını belirleyen bir test tekniğidir [36]. Antimikrobiyal ilaç olarak kullanılan Trimethoprim'in insan lenfosit kültürlerinde SCE sıklığını arttırdığı bildirilmiştir [35].

2.4.3. Mikronukleus (MN) testi

Mikronukleus hücre bölünmesi sırasında; kromozom, kromozom parçası, kromozom ve kromatid tipi kırıklardan oluşabileceği gibi asentrik fragmentlerden de meydana gelebilir. Mikronukleus; mitotik bölünme sırasında serbest kalan kromozom fragmenti veya serbest kalan kromozomların ortamda varlığını sürdürmesidir. Bunlar bir nükleoplazma ile sarılarak sitoplazma içersinde ana nükleusun yanında yer alan bir nüklear materyaldir. Mikronukleus oluşumunun temelini DNA hasarı oluşturur. DNA hasarı; oksidasyon sonucu serbest oksijen radikallerinin oluşumu, DNA metilasyonunun normalden az yada fazla olması, organizmanın çeşitli mutajenik, klastojenik ve karsinojenik ajanlara maruz kalması vb. nedenler sayılabilir [37].

DNA defektlerine neden olan etkenler incelenirken, bunların DNA da ne gibi değişimlere yol açtığını belirtmek ve analiz edebilmek için laboratuvar tekniklerine gerek duyulmuştur. DNA düzeyindeki incelemeyi sağlayabilen bu teknik mikronukleus testidir. Tekniğin basit oluşu, kısa zamanda sonuca ulaşılması ve DNA harabiyeti konusunda güvenilir bilgi vermesi önem taşımaktadır. Mikronukleus tekniği, insan periferik kan lökositlerinde, daha sonra kemik iliğinde ve yanak mukoza hücresinde kimyasal ajanların genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır [38].

2.4.4. UDS yöntemi

‘Programlanmamış DNA sentezi’ testi olarak adlandırılır. Bu yöntemin prensibi, primer rat hepatositlerinde DNA tamirinin uyarılmasına dayanmaktadır. UV ile pozitif kontrol deneyleri yapıp otoradyografik olarak değerlendirilmektedir [39, 40].

2.4.5. Comet yöntemi

Bu yöntemde ise hücreler metefaz safhasında incelenerek kromozom hatalarının ortaya çıkarıldığı sitogenetik bir yöntemdir [39, 40].

2.4.6. S.O.S kromotest

Temeli, *E.coli*'de hasarlı DNA da S.O.S. cevabının uyarılması yöneliktir. *E.coli*'de S.O.S. sisteminin genel reseptörleri ile gen kontrol edildiğinden dolayı S.O.S. kromotest, DNA hasarlarını tespit etme olanağı sağlar [42].

2.4.7. Transformasyon yöntemi

Bu yöntemde, M2-C3H fare fibroblast hücrelerinde malignant transformasyonun uyarılmasıyla kimyasal maddelerin mutajenik ve tümorojenik etkileri ölçülür. Kanserojenik maddelerin tespiti için daha uygun bir testtir [14].

2.4.8. Ames / Salmonella / Mikrosom test yöntemi

1975 yılında Prf. Dr. Ames ve Dr. Maron tarafından geliştirilen ve daha sonra yaygın olarak uygulanmaya başlayan bir mutajenite testidir [15]. Bu test, gerek çevre kirlenmesine neden olan kimyasal maddelerin [40, 43, 44, 45], gerekse diğer fiziksel, kimyasal [16, 42, 46, 47] ve biyolojik [48, 49] maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında kullanılabilir. Bu testin temeli, yapay mutasyon oluşturulmuş olan *Salmonella typhymurium*'un histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş (His^- =oksotrof) olan suşlarının test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyona geçirip his^+ hale geri dönüşmesi temeline dayanır. Geri dönüşen (revertant) bakteri kolonileri sayılarak değerlendirilir. Fakat normalde de mutajenlere maruz kalmadan spontan olarak geri dönüşebilen bakteri olmaktadır. Mutajenik etkiden bahsetmek için spontan revertant sayısından daha fazla sayıda revertant koloni sayılması gerekir [15, 30]. Bu test ile bir çok mutajenik madde teşhis edilmiştir [15]. Bu test *Salmonella typhymurium*'un TA ve YG suşları ile uygulanmaktadır. En çok kullanılan bakteri suşları TA 97, TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535, TA 1538 suşlarıdır [48, 50, 51].

Son yıllarda, tıp ve farmakoloji alanlarında yeni ilaçlarının gelişiminde üretilen ilaç hammaddelerinin biyolojik sistemlerdeki toksik ve mutajenik etkilerinin araştırılmasında kısa zamanlı testler kullanılmaktadır. Yukarıda sayılan test yöntemleri kullanılarak ilaç hammaddesi olması düşünülen test maddelerinin toksik, mutajenik-karsinojenik etkilerini incelemek için daha çok Ames testi kullanılmaktadır. Ames testinde mutajenik etkilerin diğer canlı gruplarına göre daha fazla duyarlı olan bakteriler üzerindeki etkilerinin araştırılmasının yanı sıra, bu test ile aynı zamanda ortama ilave edilen memeli metabolik aktivasyon enzimleri ile, test bakterilerinin memeli metabolizmaları sonucunda oluşabilecek metabolitlerinin de mutajenik etkileri araştırılmaktadır [15, 52, 53].

Hayvansal organizmalarla yapılan uzun zamanlı testlere kansorejen ve mutajen olduğu belirlenmiş 300 kimyasal madde Ames / Salmonella / Mikrozom yöntemiyle ‘Tokyo Merkez Kanser Enstitüsü’, ‘Imperial Kimyasal Endüstrileri’ ve ‘Uluslar arası Kanser Araştırma Merkezleri’ nde test edilmiş ve testin geçerliliği onaylanmıştır. Bu mutajen kimyasalların içinde en çok bilinenleri; saç boyası aminleri, dizel ekzosunda bulunan 1-nitropinler, alev önleyiciler, tris (2, 3 - dibromopropil) fosfat ve besinlerin pişirilmesiyle oluşan prolize ürünler olarak sayılabilir [15, 51].

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 [54].

Yapılan bir başka çalışmada ise Ames testi *Vibrio harveyi* adlı deniz mikroorganizmasının kullanıldığı test sistemi karşılaştırılmış ve Ames testinin deniz gibi tuzlu su sistemlerinde değil de tatlı su sistemleri için iyi bir test sistemi olduğu belirtilmiştir [55].

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 [56].

Kanada da yapılan başka bir çalışmada ise *Alternaria alternata* adlı mayanın gıdalar üzerinde yer alan toksinleri gıda güvenliği dairesi tarafından Ames testi ile değerlendirmiştir [57].

İlaç firmaları dahi ürettikleri bazı ilaçların genotoksisitesini Ames testi ile araştırmaktadırlar [58].

2.5. *Salmonella typhimurim*'un Genetik Özellikleri

Bakteri mutantları, bakteri genetiğinin en önemli ve vazgeçilmez araçlarıdır. Mutajenik madde ve etkenleri kullanarak mutant izole etme şansı arttırılabilir. Bazı etkenlerle, bakteri genlerinin %1'inde bakterinin canlılığını etkilemeyen mutasyonlar oluşturabilir ve bazı mutajenler kullanılarak 10^{-5} - 10^{-10} kadar olan spontan mutasyon oranı %3' e kadar yükseltilebilir. Bilinen mutajenlerin hiç biri diğer genlerin mutasyon oranını arttırmaksızın belirli bir genin mutasyon oranını yükseltmezler. Fakat bazen bazı seyrek DNA bölgelerinin mutasyon oranları diğer genlere göre çok yüksek olabilir. Bu bölgelere 'hot spots' (sıcak bölgeler) denir. Bazı mutajen maddeler bu bölgeleri spesifik biçimde etkilemektedir [25, 29, 30].

Testte kullanılan suşlar *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan invitro mutasyonlarla elde edilmiş bir seri mutant suştur. Bu suşların genetik özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

Histidin mutasyonu

Her test suşu histidin operonunun değişik bölgelerinde ya operondaki baz değişimleri yada 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

His D⁺ geninde meydana gelen (-1) çerçeve kayması şeklinde bir mutasyondur ve nükleotid eksikliği His D - geni içinde 8 defa tekrarlanan

-GCGCGCGCGC-

-CGCGCGCGCG- bölgesindedir.

Bu nedenle TA 98 daha çok çerçeve kayması tipi mutasyonlarına sebep olan mutajenik / kanserojenik kimyasallarla his⁺ hale dönüştürülür.

His D6610

Histidinol dehidrogenaz enzimi kodlanmaktadır, his D6610 tipi mutasyon, His D⁺ geninde kodlanan bu enzimde meydana gelen bir mutasyondur, mutasyon bölgelerinde 6 sitozinin birikmesine neden olan sitozin fazlalığı vardır. Bu sebeple çerçeve kayması tipinde bir mutasyondur ve çerçeve kayması mutajenlerin teşhisinde kullanılır. Birikmiş sitozinlerin yakınında birbirine takip eden –G – C - baz çiftlerinin oluşturduğu, bir ikinci sorumlu bölgeye de sahiptir.

His G 428

“ ochre” stop kodonu varlığından dolayı his G geni inaktif durumdadır. başlangıçta geliştirilen his⁻ mutantlarının çeşitli test maddelerine karşı duyarlılığının arttırmak üzere bu suşlara aşağıdaki mutasyonlar eklenmiştir.

Rfa

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.

Uvr B

Bu mutasyon, DNA kesme onarma sistemi için kodlanan bir genin delesyonuna neden olur, sonuçta bir çok mutajenin teşhisinde duyarlılık son derece artmış olur. *UvrB*⁺ içinde normalde *chl* (nitrat redüktaz enzimi kodlayan genidir) ve *bio* (biyotin sentezinden sorumlu bir enzimi kodlar) genleri de bulunur. Fakat *uvrB* geninin delesyonu sırasında istenmeden *chl* ve *bio* genlerinde çıkarılmış olur. Bu sebepten dolayı bakteri gelişmesi için biyotine de ihtiyaç duyar [15, 18, 51].

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 pKM 101 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, TA 1538 suşlarıdır [54, 59].

3. BOR ELEMENTİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Kökeni Arapça da *Buraq/ Baurach* ve Farsça da *Burah* kelimelerinden gelen ve simgesi (B) olan borun atom numarası 5, atom ağırlığı 10,81, yoğunluğu $2,84 \text{ gr/cm}^3$, ergime noktası 2300°C ve kaynama noktası 2550°C olan, metalle ametal arası yarı iletken özelliklere sahip bir elementtir. Periyodik sistemin üçüncü grubunun başında yer almaktadır. Genellikle doğada tek başına değil, başka elementlerle bileşikler halinde bulunur. Tabiatta yaklaşık 230 çeşit bor minerali vardır [4].

Doğada bulunan bor, kütle numaraları 10 (%19,8) ve 11 (%80,2) olan iki kararlı izotopun karışımından oluşmaktadır. Kimyasal olarak ametal bir element olan kristal bor, normal sıcaklıklarda su, hava ve hidroklorik / hidroflorik asitler ile soy davranış göstermekte, sadece yüksek konsantrasyonlu nitrik asit ile sıcak ortamda borik asite dönüşebilmektedir. Öte yandan yüksek sıcaklıklarda saf oksijen ile reaksiyona girerek bor oksit (B_2O_3), aynı koşullarda nitrojen ile bor nitrit (BN), ayrıca bazı metaller ile magnezyum borit (Mg_3B_2) ve titanyum diborit (TiB_2) gibi endüstride kullanılan bileşikler oluşabilmektedir [4].

Çeşitli metal veya ametal elementlerle yaptığı bileşiklerin gösterdiği değişik özellikler, endüstride pek çok çeşit bor bileşiğinin kullanılmasına imkan sağlamaktadır. Bor, bileşiklerinde metal dışı bileşikler gibi davranır, ancak, farklı olarak saf bor, karbon gibi elektrik iletkenidir. Bor hidratlar silikon ve karbon bileşiklerine benzer özellikler gösterir. Kristalize bor görünüm ve optik özellikleri açısından elmasa benzemektedir ve neredeyse elmas kadar serttir. Endüstriyel açıdan önemli bor bileşikleri arasında boraks (tinkal, sodyum kökenli bor bileşikler), kolemanit (kalsiyum kökenli bor bileşikler), üleksit (sodyum-kalsiyum kökenli bor bileşikler) ana gruplaması altında kernit, probertit, szyabelit, datolit, sasolit, boraks dekahidrat, boraks pentahidrat, susuz boraks, borik asit, sodyum per borat, susuz borik asit, hidroborasit sayılabilir. Bor madenlerinin değeri genellikle içindeki B_2O_3 (bor oksit) ile ölçülmekte, yüksek oranda B_2O_3 bileşiğine sahip olanlar daha değerli kabul edilmektedir [2].

Bu mineraller arasında en önemlileri tinkal ve kolemanittir. Üleksit, kernit, probertit ve szyabelit de ticari açıdan önemlidir. Madencilik faaliyetleri

sonucunda genellikle zenginleştirilmiş üleksit, tinkal, kolemanit, boraks veya borik asit gibi mineraller elde edilir. Bor kullanılarak üretilen bor bileşiklerinin ise en önemlileri boraks pentahidrat, susuz boraks, boraks dekahidrat ve borik asittir.

3.1. Bor Elementinin Kullanım Alanları

Bor bileşikleri, özellikle de boraks binlerce yıldan beri kullanılmaktadır. Babillerin bor'u kıymetli eşyaların ergitilmesinde, Mısırlıların mumyalamada, Eski Yunanlıların ve Romalıların temizlikte, Mısırlıların, Mezopotamya uygarlıklarının ve Arapların bazı hastalıkların tedavisinde bor'dan yararlandığı bilinmektedir [60].

Bor bileşikleri, özellikle boraks yüzyıllardır bilindiği halde borun saf elementi ilk kez 1808 yılında Fransız kimyager Joseph Gay-Lussac ve Baron Louis Thenard ve bağımsız olarak İngiliz kimyager Sir Humphry Davy tarafından hazırlanmıştır [4].

Hafifliği, gerilmeye olan direnci ve kimyasal etkilere dayanıklılığı sebebiyle; plastiklerde, sanayi elyafı üretiminde, lastik ve kağıt endüstrisinde, tarımda, nükleer enerji santrallerinde, roket yakıtlarında da kullanılmaktadır. Camın ısıyla genişmesini önemli ölçüde indirgediği, camı asite ve çizilmeye karşı koruduğu, titreşim, yüksek ısı ve ısı şoklarına karşı dayanıklılığı sağladığı için ısıya dayanıklı cam gereçleri ve elektronik ve uzay araştırmalarında kullanılacak üstün nitelikli camların üretiminde de önemli yeri vardır.

3.1.1. Cam ve seramik sanayisinde borun kullanılması

Cam Elyafı Yapımında Bor Ürünleri

Ergimiş cama % 7 bor oksit verecek şekilde bor pentahidrat veya üleksit-probertit katılmaktadır. Maliyetine bağlı olarak sulu veya susuz tipleri kullanmakta, bazan borik asitten yararlanılmaktadır. Kullanılan bor oksitin % 24'ü A.B.D.'de, % 14'ü B.Avrupa'da yalıtıcı cam elyafı imalinde tüketilmektedir. İstenen yalıtkanlık derecesine göre çeşitli spesifikasyonlar tanımlanır. Binalarda asbestin yerine ısı ve ses yalıtımında kullanılmaktadır [4, 61, 62, 63].

Cam Elyafı, kullanıldığı malzemelerde sertlik ve dayanıklılık kazandırmakta, ayrıca malzemenin hafif olmasını sağlamaktadır. Bu nedenle plastiklerde, lastiklerde, sinai elyafalarda, otomotiv, uçak ve diğer sanayi sektörlerinde çelik ve diğer metallerin yerine, spor malzemelerinde kullanılmaktadır. İngiltere'de oto başına 70-75 kg cam yünü tüketilmektedir. Bu gibi ürünlerde rafine kolemanit tercih edilmektedir [4, 61, 62, 63].

Fiberoptik sanayiinde, liflere % 6 borik asit ihtiva etmektedir. Philips'in Hollanda'daki fabrikasında bu lifler üretilmektedir. Optik cam elyafı ışık fotonlarının etkin biçimde transferlerini sağladığından günümüzde telekomünikasyonda tercih edilmekte olup kablo yerine kullanılmaktadır. Örneğin, Ankara - Çankaya ilçesinde Türk Telekom tarafından kullanılmıştır [4, 61, 62, 63].

Borcam Yapımında

Camın ısıya dayanımının artması ve cam imalatı sırasında çabuk ergimesini ve devitrifikasyonun önlenmesini sağlayan bor, aynı zamanda camın yansıtma, kırma, parlama gibi özelliklerini de artırmaktadır. Bor camı asite ve çizilmeye karşı korur. Cam eriyiğinin % 0,5 ile % 0.23'ü bor oksitten oluşmaktadır. Ateşe dayanıklı olan Pyrex camlarda % 13,5 B₂O₃ vardır [4, 61, 62, 63]. Genellikle cama boraks, kolemanit, borik asit halinde karma olarak ilave edilerek borcam elde edilir. Otolar, fırınlar, çamaşır makinası, vb makinalarda bu tür camlar tercih edilir. ABD'de bu tür cam imal eden 100'e yakın firma vardır [4, 61, 62, 63].

Emaye ve Seramik Sırı Yapımında

Emayelerin vizkozitesini ve doymuşlaşma ısını azaltan borik oksit %20'ye kadar kullanılmaktadır. Sulu boraks ve bazı hallerde borik asit veya susuz boraks da kullanılır. Mutfak aletleri, banyolar, kimya sanayii teçhizatı, su tankları, silahlar, vb alanlarda da emaye kaplama kullanılır [4, 61, 62, 63].

Seramiğin çizilmeye karşı dayanıklı kılan bor % 3-24 oranında kolemanit halinde sırlara katılmaktadır. Avrupanın en önde gelen seramik üreticisi olan

Türkiye seramiklerinde, İngiltere, İtalya ve İspanya'da kaolenden mamul eşyaları sırla kaplanır. Tuğlalara da bu sırdan sürülmektedir [4, 61, 62, 63].

3.1.2. Yangın önleyici maddelerde borun kullanılması

Bor kendisinin oksit olması, ergime ısısının 2300 °C olması nedeniyle yanmaya karşı oldukça dayanıklıdır. Bu özelliğinden dolayı yanmayı önleyici madde olarak kullanılır veya bu özellikteki maddelerin içerisine değişik oranlarda katılır [4, 61, 62, 63, 70].

Özellikle, çinko borat, boraks, amonyum florborat ürünleri olan yangın önleyiciler antimon trioksit ile birlikte kullanılmakta olup dumanın emilme hızını uzattığı, kor halindeki ateşi çabuk bastırdığı için daha üstün bir mamuldür. Ancak maliyetleri, (Alümina trihidrat, magnezyum hidroksit) bileşimli olan yangın önleyicilere nazaran daha yüksektir [61, 62, 63].

3.1.3. Sabun ve deterjan sanayisinde borun kullanılması

Temizleyici maddeler klorinli veya peroksitli bileşiklerdir. Deterjanların ağırlığının % 20-25'i sodyum perborattır. En önemli rakip maddeler sodyum hidroksit, sodyum hipoklorit ve hidrojen peroksittir. Bulaşıktan çok çamaşırdaki tercih edilmektedir. Perborat ürününün % 90'i deterjan imalatında kullanılmaktadır [4, 61, 62, 63].

Ancak bilinçsiz ve aşırı deterjan kullanımı nedeniyle, atık suların içerisindeki bor oranı yükseldiğinden çevre kirlenmesine sebep olmakta ve günümüzde bu konuda yoğun tartışmalar yapılmaktadır [4, 61, 62, 63].

Özellikle balıklarda *mankafa* hastalığı olarak bilinen bir hastalığın bordan kaynaklandığı bilinmektedir [61, 62].

3.1.4. Metalurji sanayisinde borun kullanılması

Kolemanit ve borik asit en çok kullanılan ürünlerdir. Çelik alaşımında kullanılan bor bileşiği ferrobora veya sulandırılmış bor alaşımıdır. Ferrobora borat konsantrasyonunun alüminotermik redüklenmesi ile elde edilir. Yüksek borlu (% 5) çelikler nükleer reaktörlerde nötron emilmesini sağlayan önemli bir alaşımdır. Borlu çelikler enerji tasarrufu sağlar. Yeni geliştirilen bazı borlu çelikler mekanik basınca karşı dayanımları nedeniyle soğuk çekme, inşaat, tarım makinaları, vinçler, yaylar, grayder bıçakları, vites dişlileri gibi yerlerde tercih edilen çelik türleridir. Alüminyum izabesinde titanyum ile birlikte borlu bileşikler kullanılır [4, 61, 62].

Diğer bir kullanım alanında çelik yapımında florit yerine kolemanit veya üleksitin kullanılmasıdır [61, 62].

Elektro kaplama sanayinde, kaplama banyosuna borik asit veya serbest florborat ilave edilir [61, 62].

Demir, bor, karbon ve silikon ile yapılan deneysel camlı metal üretimlerinde başarılı olunmuştur. Transformatörlerdeki enerji kaybını 1/3'e indiren bu metaller gelecekte hızlı bir gelişme göstermektedir [4].

3.1.5. Tarım sektöründe borun kullanılması

Bor tarımda gübre, herbisit, pestisit ve algisit dallarında kullanılmaktadır. Herbisitler bitkiye kritik bir miktardan fazla verildiği zaman toksik etki gösterir. Ayrıca sulu bakır metaborat, kereste ve diğer selülozik maddelerde fungusit olarak işlev görmektedir. Bitkinin beslenmesi için az miktarda bora ihtiyaç vardır. Bitkilerde şekerin hücre zarından geçişini kolaylaştırdığı için büyümede etkilidir [4, 61, 62].

Topraklarında bor oranı düşük olan ülkelerde gübrelere katkı maddesi olarak toprağa %1-3 oranında bor verecek şekilde kullanılmaktadır. Bor oranı yüksek olan topraklarda ise verim düşürücü etkisi olmaktadır [62].

Yeni imal edilen, keresteyi böceklerden korumak için borik asit veya boraks pentahidrat banyosu kullanılmaktadır. Dizel ve uçak yakıtlarında gelişen fungilerin önlenmesi için borik asit esteri kullanılmaktadır [62].

Karınca ve hamam böceği için de etkili bir öldürücüdür [61].

3.1.6. Nükleer sanayide borun kullanımı

Tüketim miktarı yönünden önemli olmamasına rağmen teknolojik ilerleme açısından büyük önemi olan bir kullanım alanıdır.

Bor mineral ve bileşikleri ^{10}B ve ^{11}B izotoplarını içerirler. Borun nötron emme gücü çok yüksektir. Bor izotopları nükleer reaksiyon sırasında denetim kurulmasına olanak verdiği gibi, dimetil eter, elementer bor, zenginleştirilmiş bor oksit veya asit veya ferroboron haline dönüştürüldüğünde nükleer reaktörün kontrol çubuklarının yapımında da kullanılır. Bu çubuklar % 2 bor içeren çelik/alüminyum alaşımlarıdır. ^{10}B nükleer reaktörlerde koruyucu kabuk olarak işe yaramaktadır [4, 61, 62].

Bor karpitler Phenix reaktörlerinde koruyucu kabuk olarakta kullanılmaktadır. Bor 304 adı verilen yeni bir paslanmaz çelik atık nükleer yakıtı taşıırken, içine konulduğu kapların yapımında kullanılır. Nükleer sanayiinde borun en yakın rakibi gadolinyum ve samaryumdur.

Kaliforniya üniversitesi'ndeki ^{11}B araştırmalarda ^{11}B 'in proton fizyonlanması sırasında radyoaktivitesiz enerji açığa çıkmıştır. Böylece temiz nükleer enerji elde edilmektedir [4, 61, 62].

3.1.7. Borun diğer kullanım alanları

Borun diğer alanlardaki kullanımlarının giderek gelişeceği yönünde genel bir eğilim olduğu herkes tarafından kabul edilmektedir.

Japon bilim adamlarınca, 2001 yılı Şubat ayında, magnezyum diboridin geleceğin süper iletkeni olabileceği keşfedilmiştir. Süper iletkenlik, sıcaklığın belli bir noktanın altına düşürülmesiyle (kritik sıcaklığın altına) her türlü elektriksel direncin kaybolması durumudur. Süper iletkenliğin genellikle $-273\text{ }^{\circ}\text{C}$

olan mutlak sıfır noktasına yakın sıcaklıkta gerçekleşmesi ve bu derece düşük bir sıcaklığı gerçekleştirmenin pahalı oluşu, çok daha yüksek kritik sıcaklığa sahip olan magnezyum diboridi ucuz ve verimli bir alternatif haline getirmektedir. Süper iletkenler, çok yüksek akım yoğunluklarını hiçbir enerji kaybına neden olmadan taşıyabildikleri için santrallerden şehirlere verimli enerji iletimi, güçlü mıknatıs isteyen uygulamalar (magnetik rezonans, maglev trenleri vs.), büyük miktarlarda enerjinin manyetik alan depolanması ya da mikro elektronikte istenmeyen ısının önlenmesi gibi bir çok uygulama alanına sahiptir [64].

Dizüstü bilgisayarlar, cep telefonları, avuç içi bilgisayarları ve diğer mobil iletişim araçlarında kullanılan akım levhalarının vazgeçilmez hammaddelerinden biri de bordur.

Bor bileşikleri ve bor lifleri (fiber) plastiklerde veya metallerde yüksek dayanıklılığa ve esnekliğe sahiptir. Bu gelişmiş bileşikler askeri alanda, özellikle hava ve uzay araçlarında kullanılmaktadır. Plastiklerde borlu lifler, alüminyum ve titanyumun 6 katı kadar sertlik/yoğunluk oranına sahiptir. Yüksek ısıya dayanıklılığı, esnekliği, hafifliği, güç ve üretim kolaylığı ile birleştirmektedir. Bu özellikleri sebebiyle jet motorlarının kompresör bıçaklarında, kanatçıklarında, dümenlerinde kullanılmaktadır. Bor bileşiklerinin kullanılması, titanyumla karşılaştırıldığında F14, Tomcat, F15 Eagle ve B1 bombardıman uçakların ağırlığını 91 kg azaltmaktadır. Uzay mekiklerinde 137 kg'a kadar ağırlık tasarrufu sağlanabilmektedir [65].

Piyade tüfeği, tabanca, top, tank üretiminde, zırhlı personel taşıyıcıların zırhlarını güçlendirici seramik plaklarda da bor kullanılmaktadır. Borla güçlendirilmiş cam malzemelerin iletken olmayan ve düşük dielektrik özelliği onları radara karşı görünmez kıldığı için askeri teçhizat yapımında önemlidir. ABD ordusu tarafından kullanılan gizli teknoloji ürünü Stealth Fighter (hayalet uçaklar) ve donanımlarının imalinde de bor ve rafine bor ürünlerinin kullanıldığı düşünülmektedir [66].

Bor karbid ve fiber camın bir bileşimi 30 kalibre kurşunu durduracak şekilde geliştirilmiş olup, AH-10 Kobra helikopterlerinin koltuklarında kullanılmaktadır [65].

“BNCT (Boron Neutron Capture Therapy) kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle beyin kanserinin tedavisinde hasta hücrelerin seçilerek imha edilmesine yaraması ve sağlıklı hücrelere zararının minimum düzeyde olması nedeniyle tercih sebebi olabilmektedir” [66].

“Atom reaktörlerinde borlu çelikler, bor karbürler ve titanbor alaşımları kullanılır. Paslanmaz borlu çelik, nötron absorbanı olarak tercih edilmektedir. Yaklaşık her bir bor atomu bir nötron absorbe etmektedir. Atom reaktörlerinin kontrol sistemleri ile soğutma havuzlarında ve reaktörün alarm ile kapatılmasında (^{10}B) bor kullanılır. Ayrıca, nükleer atıkların depolanması için kolemanit kullanılmaktadır.

Nükleer reaktörlerde radyoaktif malzemenin fisyonu sonucunda ısı, alfa ve beta parçacıkları, gama ışınları ve nötronlar açığa çıkar. Nötronlara kalkan olarak kullanılan en önemli malzemeler, hidrojen, lityum, polietilen ve su olup, kalkan olarak kullanılan malzemelerin çoğu ikincil gama ışını yaymakta, bu da ısı düşürme ve tekrar kalkan uygulamayı gerektirmektedir. Bor, termal nötronları emme kabiliyeti açısından tektir. Sadece hafif bir gama ışını çıkarmakta ve alfa parçacıklarını kolayca emmektedir” [65].

“Termal depolama pillerindeki, sodyum sülfat ve su ile yaklaşık %3 ağırlıktaki boraks dekahidratın kimyasal karışımı gündüz güneş enerjisini depolayıp gece ısınma amacıyla kullanılabilir. Ayrıca, binalarda tavan malzemesine konulduğu takdirde güneş ışınlarını emerek, evlerin ısınmasını sağlayabilmektedir” [67].

Çinko borat ve disodyum oktaborat tetrahidrat antimikrobiyal özellikleri sebebiyle ahşap koruyucu olarak kullanılmaktadır [65].

“(…) bor, demir ve nadir toprak elementleri kombinasyonu (metglas) % 70 enerji tasarrufu sağlamaktadır. Bu güçlü manyetik ürün; bilgisayar disk sürücüler, otomobillerde direk akım-motorları ve ev eşyaları ile portatif güç aletlerinde kullanılmaktadır. Sodyum borohidrat, atık sulardaki civa, kurşun, gümüş gibi ağır metallerin sulardan temizlenmesi amacıyla kullanılmaktadır” [67].

Bor bileşiklerini çeşitli endüstriyel kullanımlara uygun hale getirmek için gereken işlemlerin derecesi çok çeşitlilik göstermektedir. Bazı sanayiler mineral konsantreleri kullanırken, diğerleri rafine bor ürünleri kullanır. Bazı durumlarda tüketiciler bulunabilirlik ve fiyata göre mineral konsantrelerle veya rafine borlar arasında veya farklı rafine borlar arasında ikame yapabilmektedirler. Üleksit, borik asit, boraks üretiminde ve sodyumun bulunması istenilmeyen çeşitli direkt uygulamalarda kullanılmaktadır. Boraks pentahidrat, boraks dekahidrat, susuz boraks, borik asit, bor oksit, zenginleştirilmiş kolemanit ve zenginleştirilmiş üleksit gibi hacimli bor ürünleri tüketilen toplam bor'un yüksek bir oranını oluşturmaktadır [62].

3.2. Toplam Bor Rezervi ve Türkiye'nin Bor Madeni Açısından Konumu

Türkiye bor kaynaklarında dünyada birinci durumdadır. Dünya toplam rezervinin % 70'i Türkiye'de bulunmaktadır. Bu rakamların devletleştirmeyi müteakip Eti Holding A.Ş.'de toplanan ve yaklaşık 20,000 km²'lik imtiyazlı sahalarda 15-20 yıl öncesine ait, kısmi çalışılmış bor havzalarına ait veriler olduğu göz önünde bulundurulmalıdır [68]. Türkiye'deki bor madenlerinin yerlerini ve miktarlarını belirleyen kapsamlı bir araştırma henüz yapılmadığından, Türkiye'nin aslında dünya rezervlerinin daha da büyük bir kısmını elinde tutuyor olabileceği düşünülmektedir. Yeni arama çalışmalarının yapılmasıyla Türkiye bor rezervlerinin iki katına bile çıkabileceği iddia edilmektedir [68]. Türkiye'den sonra ikinci kaynak ülke ABD olup, dünya rezervlerinin %13'ü civarında bir payı olduğu bilinmektedir. Ancak ABD, bor'u uzun süredir endüstrinin çeşitli alanlarında kullanmakta olduğundan, yakın gelecekte bor rezervlerinin tükenmesi tehlikesi ile karşı karşıyadır. Bu sebeple ABD, kalan bor madenlerinin bir kısmını "stratejik rezerv" ilan ederek çıkarılmasını durdurmuştur. Türkiye'deki bor madenlerinin kalitesi ABD'dekinden yüksektir. Dünya bor rezervlerinin kalan kısmı Rusya, Çin, Şili, Bolivya, Peru, Arjantin, Sırbistan'da bulunmaktadır [70]. Dünya bor rezerv miktarını çizelge 3.1'de ayrıntılı olarak görmek mümkündür.

Dünyada işletilen toplam 496 milyon tonluk rezervin 375 milyon tonu Türkiye'dedir. Türkiye'nin bor madenlerinin rezerv ömrü 412 yıl iken, dünyanın

ikinci büyük rezerv ülkesi ABD'nin bor rezervleri 76 yıllık ömre sahiptir. Dünya rezervleri ve bu rezervlerin tüketim artış hızları göz önünde bulundurulduğunda 50-80 yıl sonra ülkemiz bor yataklarının dünyadaki tek bor kaynağı olma ihtimali yüksektir [61].

Çizelge 3.1: Dünya bor rezervi

ÜLKE	GÖRÜNÜR EKONOMİK REZERV	TOPLAM REZERV (GÖR. +MUH. +MÜM.)	GÖRÜNÜR EKONOMİK REZERV ÖMRÜ(yıl)	TOPLAM REZERV ÖMRÜ (yıl)
	bin ton B ₂ O ₃			
TÜRKİYE	375. 000	644. 000	240	412
ABD	45. 000	105. 000	33	76
RUSYA	28. 000	140. 000	16	78
ÇİN	27. 000	36. 000	17	23
ŞİLİ	8. 000	41. 000	5	26
BOLİVYA	4. 000	19. 000	3	12
PERU	4. 000	22. 000	3	14
ARJANTİN	2. 000	9. 000	1	6
SIRBİSTAN	3. 000	3. 000	2	2
TOPLAM	496. 000	1. 019. 000	317	652

3.3. Çalışılan Alandaki Bor Elementinin Oluşumu

Batı Anadolu'da geniş yayılım gösteren Neojen havzaları önemli boyutlarda linyit, bitümlüşeyl, uranyum, borat yatakları ve birçok diğer endüstriyel hammadde içermektedir. Dünya ölçeğinde, bu saydığımız madenlerin içersinde yalnızca boratların dünya rezervlerinin %70'inden fazlasını içerdiği düşünülürse,

bölge jeolojisinin, tüm diğer madenler ile birlikte hesap edildiğinde, ülkenin gelecekteki politik-stratejik bağlantısıyla ne denli ilişkili ve önemli olduğu anlaşılır [10].

Türkiye'nin bilinen borat yataklarının tümü Batı Anadolu'da yer almaktadır. Günümüze dek saptanmış olan borat yatakları, Marmara Denizi'nin güneyinde, doğu - batı doğrultusunda yaklaşık 300 km'lik ve kuzey-güney doğrultusunda ise 150 km'lik bir alan içinde Bigadiç, Sultançayırı, Kestelek, Emet ve Kırka bölgelerinde bulunmaktadır. Borat yataklarını oluşturan playa göllerindeki tortulların litolojisi, birbirlerinden az çok farklılıklar göstermesine karşın, genellikle çakıltası, kumtaşı, tuf, tüfit, kıltaşı, marn ve kireçtaşlarından oluşur. Borat yataklarının olduğu düzeylerin alt ve üst kesimleri kireçtaşı ve kıltaşı ile sınırlanırlar. Borat içeren havzalardaki tortullar, yatay ve düşey fasiyes değişimlerine bağlı olarak açık bir devirsellik gösterirler [10, 70].

Borat yataklarını oluşturan playa göllerinin çevresinde volkanik faaliyetler çok yaygın olup, genellikle kalkalen karakterli ve asitten bazıge kadar değişen volkanitlerin yanısıra, tortullarla ardalanmalı olarak bulunan piroklastik kayalar gözlenir. Tüm borat bölgelerinde volkanik kayaların bulunması, borat oluşumu için volkanizmanın gerekli olduğunu ve bor getiriminin ortaç ve asidik volkanik kayalara bağlı olduğunu ortaya koyar. Diğer taraftan borat havzalarındaki tortulların büyük bir bölümünün volkanik kayalardan türemiş gereçler içermesi bu varsayımı destekler yönde değerlendirilebilir [10].

Kırka borat yataklarındaki Neojen volkano-sedimanter istif, Mesozoyik yaşlı ofiyolit karmaşığı ile Paleozoyik yaşlı metamorfik karmaşığı üzerine uyumsuz olarak oturan fosilli Eosen kireçtaşları ile başlar. Diğer kesimlerde temeldeki karmaşık üzerine dogrudan dogruya Miyosen tortulları gelir. Bu bölgedeki Neojen istif, Eosen fosilli kireçtaşları üzerine gelen tüfler ve volkanikler ile başlar, üstedogru alt kireçtaşı, marn ve tuf, kıltaşı – borat zonu, üst kıltaşı, tuf, marn ve ince kömür bantları ile çört düzeyleri içeren üst kireçtaşı ve bazalt birimlerini kapsar.

“**Kırka-Sarıkaya** boraks yatağı Eskişehir ilinin 70 km güneyindeki Kırka bucağının 4,5 km batısındadır. Dünyanın en büyük rezervlerinden biri olup, 1950-1960 yılları arasında vatandaşlarımızın arama ruhsatı alarak yaptığı aramalar

neticesinde bulunmuştur. 1968 yılında MTA'nın yaptığı aramalarda Kırka Sodyum tuzu cevherinin Kaliforniya'daki Tinka-Razorit-Kernit cevherinin benzeri olduğu ve yatakların zengin olduğu tespit edilmiştir [70].” Kırka'daki tinkal cevheri yaklaşık %25-26 civarında B_2O_3 ihtiva etmekte, çıkarılan cevher Kırka'daki 1.150.000 ton/yıl cevheri işleyecek kapasitedeki yoğunlaştırıcı (concentrator) tesislerinde zenginleştirilerek B_2O_3 oranı %32-33'e yükseltilmekte ve tane büyüklüğüne göre sınıflandırmaktadır [71]. Kırka Konsantratör Tesisi 1975 yılından beri faaliyettedir. 1978 yılında Bor türevi tesisleri kurulmaya başlamış ve 1984 yılında faaliyete geçmiştir. Üretilen başlıca ürünler tinkal, boraks pentahidrat ve susuz borakstır [70].

3.4. Bor Elementinin Çevresel Etkisi

Bor çevrede yaygın olarak bulunmakta ve gıdalar yolu ile insanlar tarafından alınmaktadır. Ancak bu kaynaklarla alınan dozlar, insanlarda ve hayvanlarda akut toksititeye neden olacak düzeyde değildir. Oysa, örneğin, borik asit ürünlerinin kaza ile alımı saç dökülmesi, dermatit, sindirim sistemi bozuklukları ve ölümle bile sonuçlanabilir.

3.4.3. Borun hayvanlara etkisi

Borun hayvanlara etkisini incelemek maksadıyla çok sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar borun hayvanlar üzerindeki etkisinin bor miktarı ve temas süresine bağlı olduğunu göstermiştir.

Hayvanlar için öldürücü doz hayvan türüne göre 1.2-3.45 g/kg arasında değişmektedir. 2500 g/l konsantrasyonun büyümeyi önlediği için zararlı olduğu gözlenmiştir.

Farelerin, tavşanların ve sıçanların borik asiti ağızdan alması durumunda düşük toksitite gözlenmektedir. Göz ve deride tahriş çözeltinin alkaliliğine bağlıdır [72]. Ağız yoluyla kg vücut ağırlığına 3000-4000 mg gibi pek yüksek dozlar sıçanlarda kısa sürede depresyon ve titremeler yaratmakta ve hayvanı

ölüme götürmektedir. Ayrıca farelerde ishal, köpeklerde kusma gibi belirtilerde gözlenmektedir [73].

Kronik etkilerin incelenmesi ağızdan bor alımının sıçanlarda büyüme, ölüm oranı ve üremelerinde önemli bir etkisi olmadığını göstermiştir. Genç sıçanlarda içme suyundaki % 0.25 B ancak 30 günde büyümeyi durdurucu etki göstermiştir ve otopsilerinde patolojik lezyona rastlanmamıştır. Yine sıçanlarla yapılan çalışmalar borun 2 kuşak boyunca önemli bir etkisi olmadığını göstermiştir. Solunum yoluyla alınan boraks tozlarının deney domuzlarına etkisi incelenmiş ve bir anormalliğe neden olmadığı bulunmuştur. Sıçanlarda havadaki 100-500 mg/m³ B ancak dört hafta sonra idrardaki keratinde bir miktar artışa neden olmuştur. Havadaki 10 hafta 470 mg/m³ veya 24 hafta 77 mg/m³ B'un etkisi olmadığı bulunmuştur.

Balıklar üzerine etkisi düşük toksite olarak sınıflandırılmaktadır. Bazı larva ve böceklerin imhasında bor iyonu uzun süreden beri kullanılmaktadır. Balıkların daha yüksek konsantrasyonları tolere edebileceği, örneğin 5000 mg/l borun alabalıkta sadece derinin koyulaşmasına neden olduğu veya küçük tatlı su balıklarında hiçbir etki yapmadığı gözlenmiştir. Küçük deniz balıklarının 20 °C de 6 saat süreyle damıtık suda 18 g/l- 19g/l veya sert suda 19-19,5 g/l bor iyonu ile teması öldürücü doz olarak tespit edilmiştir. Bir süt ineğine 40 gün boyunca 16-20 g/gün borik asit verilmesi durumunda herhangi bir etki gözlenmemiştir [74].

3.4.2. Borun insanlara etkisi

Vücuda nasıl girerse girsin, % 90-95 kadarı vücutta birikmeden hemen üre ile dışarı atılmaktadır. Yani vücutta pek tutulmamaktadır. Yalnızca, kemik, tırnak ve kıllarla karaciğer ve dalak gibi organlarda biraz birikmektedir [81].

Yapılan araştırmalar borun toksik etkisinin çok düşük olduğunu göstermiştir. Borun akut etkisi 15-30 g boraks veya 2-5 g borik asit doğrudan alınırsa ortaya çıkmaktadır. Kronik etkisi açısından günde 3 g borik asit veya 5 g boraksın etkisinin olmadığı, 5-10 g boraksın sadece protein metabolizmasını etkilediği ve idrardaki azot miktarını arttırdığı gözlenmiştir [73].

Borun toksik etkisi yetişkinlerde baş ağrısı, kusma, ishal, heyecan veya depresyon; çocuklarda ise daha çok havale, koma gibi beyin zarı tahribi etkileri şeklinde görülmektedir. Parmak uçlarında görülen pembe renk, bor ile zehirlenmeye işaret eden karakteristik görünüşlerdir [7].

Bazı kaynaklarda bor tozlarıyla temas eden işçilerin sperm sayısında düşüklük, cinsel hayatlarında gerileme olduğu iddia edilmiştir. Ancak ülkemizde ve dünyada yapılan pek çok araştırmada borun kısırlığa yol açmadığı sonucuna varılmıştır [81].

Borun insan vücudu için çok yararlı etkileri olduğu da tespit edilmiştir. Borun kalsiyum ve D vitamini olmak üzere vücut minerallerinin düzenlenmesinde rol oynadığı, kalsiyum ve magnezyumun azalmasını önleyerek kemik yapısını koruduğu belirlenmiştir. Ayrıca küçüklerin öğrenme yetenek ve okul becerilerinin artmasına katkıda bulunduğu, sportif performans ve atletik yapının gelişmesi için tablet şeklinde bor alındığı bilinmektedir.

3.4.3. Borun bitkilere etkisi

Bor bitkilerin normal gelişmesi ve optimal derecede ürün vermeleri için gereklidir. Ancak fazla miktarda olması durumunda da zehirli bir elementtir. Gerekli miktarı ile zararlı miktarı arasında ki fark çok azdır. Toplam borun büyük bir kısmı, bitki tarafından kullanılamaz. Toprakların toplam bor kapsamı 2-200 ppm arasında değişir. Bitkiler bu miktarın % 5'inden daha az bir kısmından yararlanabilir.

Topraktan boraks iyonları halinde alınmaktadır. Borun topraktan absorpsiyonu ise; toprağın pH'ına, yapısal karakterine vb. özelliklerine bağlıdır [75].

Borun bitkilerde eksik olması bağlayıcı dokuları etkilediğinden, bitkilerde çeşitli dokuların meydana geliş ve gelişmelerinin normal olarak gerçekleşmesini engellemekte, ürün kalitesi ve verimini azaltmaktadır. Aynı zamanda bitkilerin su düzeni bozulmakta ve karbonhidrat iletimi zorlaşmaktadır. Köklerin normal gelişmesi için kalsiyum yanında fazla miktarda bor iyonuna ihtiyaç vardır [76, 83].

Ancak borun fazla bulunması da bitki gelişmesini geciktirir veya tamamen öldürür. Bor iyonu bitkiler için bir mikronütrienttir. Mikrobeseleyici olarak sulama suyunda 0,5 mg/l'ye kadar bulunması gerekirken bora karşı çok hassas bitkilerde 0,5-1.0 mg/l'de zararlı olabilmektedir. En az etkilenen bitkiler içinse 4 mg/l'nin üstü zararlıdır [73].

Saiki ve arkadaşlarının (1993) yaptığı çalışmada suyun filtre edilmiş olmasının bor miktarında değişmeye neden olmadığı ancak ve ilkbahar ve sonbaharda alınan su örneklerinin bor içeriği arasında fark olduğu gözlenmiştir. Sudaki bor konsantrasyonları kondüktivite, bulanıklık, pH, toplam alkalinite, toplam çözünmüş kuru madde ve toplam sertlikle önemli korelasyon göstermiştir. Suyun hızı, derinliği, sıcaklığı ve çözünmüş oksijen konsantrasyonu ile bor niceliği arasında ise korelasyon bulunamamıştır.

Atık sulardan bor giderimi çevre kirliliğinin önlenmesi, suların zirai amaçlı kullanılabilmesi, kimyasal proseslerde bor varlığının olumsuz etkilerinin giderilebilmesi maksadıyla yapılmaktadır.

Borlu atık sular, içermiş oldukları bor konsantrasyonuna bağlı olarak; iyon değiştiriciler kullanarak, kimyasal çöktürme, fiziksel adsorbsiyon, çözücü ekstraksiyonu, buharlaştırma-kristalizasyon gibi yöntemlerle giderilebilir [73].

4. MATERYAL VE METOD

4.1. Materyal

4.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Nutrient brot No:2 (Oxoid), D- Biotin (F.W.247,3), L- Histidin. Hcl (F.W. 191,7), K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaNH_4(HPO_4 \cdot 4H_2O)$, NaCl (Fluka), Ampisilin trihidrat (Sigma), Sodyum azid (Merck) 4- Nitro – o – fenilendiamin (Aldrich), Sitrik asit monohidrat, NaOH, İRA 743, KCl, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, Na_2HPO_4 , NADP (F.W. 765,4), Glucose – 6 – fosfat.

4.1.2. *Salmonella typhimurium* test suşları

Bu deneyde, Prof. Dr. Bruce N. Ames ve arkadaşları tarafından *Salmonella typhimurium* LT 2 atasal suşundan in vitro mutasyonlarla geliştirilmiş TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Bu iki suş, Ames testi için gereken orijinal mutasyonlara ek olarak oluşturulan bir kısım özellikler ile baz değişimi ve çerçeve kayması mutajenlerine karşı daha duyarlı hale getirilmiştir.

4.1.3. Deneyde kullanılan ortamların içerikleri ve hazırlanmaları

(50 X) Vogel bonner medium

Kullanımı : MGA ve HBA plakları

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10 g
Sitrikasit Monhidrat	100 g
K_2HPO_4	500 g
$NaNH_4(PO_4 \cdot 4H_2O)$	175 g
Distile Su (45° C)	670 ml

Maddelerin her biri yukarıdaki sıraya göre sıcak sıcak suya eklenir ve hacim 1000 ml ` ye tamamlanır. 121°C de 20 ` dakika otoklava konularak steril hale getirilir. Oda sıcaklığında saklanır.

(0,5 Mm) Histidin / Biotin solüsyonu

Kullanımı : Mutajenite deneyi (100ml top agara 10ml olarak)

D- Biotin (F.W.247.3)..... 30,9 mg
L- Histidin (F.W.191.7) 24.0 mg
Distile su 250 ml

Su kaynama noktasına kadar ısıtılır, önce biotin eklenip çözülmesi sağlanır, daha sonra histidin ilave edilip otoklav edilir ve +4°C de saklanır.

(% 0,8 / 0,02 NaOH) Ampisilin solüsyonu

Kullanımı : Ampisiline direnç kontrolü ve HBA plakları hazırlanmasında

Ampisilin trihidrat..... 0,8 g
0,02 Sodyum Hidroksit 100 ml

Ampisilin trihidrat 0,02 M NaOH içinde çözülür ve sterilizasyon için 0,22 µm çaplı filtreden geçirilir ve +4°C de saklanır.

(% 0,1) Kristal viyole

Kullanımı : Rfa mutasyonu 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) Biotin çözeltisi

Kullanımı : Genotip kontrolü ve HBA plaklarının hazırlanmasında

D- Biotin 0,65 mg
Distile su 50 ml

Su kaynama noktasına kadar ısıtılır, biyotin ilave edilip çözülmesi sağlanır. Otaklav edilerek +4°C de saklanır.

(% 0,5) Histidin çözeltisi

Kullanımı : Genotip kontrolü ve HBA plaklarının hazırlanmasında

L- Histidin HCI (F.W.191.7) 2g
Distile su 400 ml

Histidin distile su içinde çözülür. 121°C de 20 dakika otaklav edilir. 4°C de saklanır.

(%40) Glikoz Çözeltisi

Kullanımı : MGA,HB ve HBA plaklarının hazırlanmasında

Glikoz..... 80 g
Distile su 200 ml

Glikoz distile su içinde çözülür. Otaklav edilip 0-4°C de saklanır.

4-Nitro – O - Fenilendiamin (NPD)

Kullanımı : Pozitif kontrol

20 µg / plak başına olmak üzere Dimetilsülfoksit (DMSO) de çözülerek 0,22 mµm çaplı filtreden geçirilir. TA 98 suşu için S9 karışımı gerektirmeyen bir kimyasaldır. Oda ısısında saklanır.

Sodyum azid (AZS)

Kullanımı : Pozitif kontrol

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

(2µg / µl) 2-Aminofluorene (2AF)

Kullanımı : Pozitif kontrol

1.0 mg/petri başına olmak üzere dimetilsülfoksit de (DMSO) çözülerek kullanılır. S9 karışımı gerektirmeyen kimyasaldır. 0,22 µm çaplı filtreden geçirilerek 0-4 °C de saklanır.

Top agar

Kullanımı : Mutasyon deneyi

Agar.....	6 g
NaCl	5 g
Distile su	1000 ml

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

Histidin / Biotin plakları (HB Agar)

Kullanımı : Histidin gereksinim deneyi

Agar.....	15 g
Distile su	914 ml
50XVB tuzu	20 ml
Glikoz.....	50 ml
Histidin HCl H ₂ O (2g/400ml H ₂ O).....	10 ml
0,5 mM Biyotin.....	6 ml

Agar ve distile su karıştırılır 121°C de 20 dakika otoklav edilir. 45°C ye soğutulup %40 lık glikoz, 50XVB tuzu ve histidin çözeltisi eklenir. Solüsyon biraz daha soğutulduktan sonra biyotin eklenip karıştırılır. Petri kutularına 25-30 ml olarak dağıtılır.

Histidin / Biyotin / Ampisilin plakları (HBA Agar)

Kullanımı : Ampisiline dirençlilik testi ve master plak hazırlanmasında

Agar.....	15 g
Distik su	910 ml
50XVB tuzu	20 ml
%40 glikoz	50 ml
Histidin HCl H ₂ O (2g / 400 ml H ₂ O).....	10 ml
0,5 mM Biyotin.....	6 ml
(%0.8 / 0.02 M NaOH) Ampisilin	3,15 ml

Agar ve su karıştırıp otoklav edilir. 45°C ye soğutulup %40 glikoz, 50XVB tuzu ve histidin çözeltisi eklenip karıştırılır ve biraz daha soğuyunca biyotin, arkasından ampisilin eklenip karıştırılarak petrilere 25-30 ml olacak şekilde aktarılır. Bu plaklarda bakteriler +4°C de 2 ay boyunca saklanabilir.

Minimal glikoz agar plakları (MGA)

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

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

Agar ve su karıştırılıp çözülür ve otoklavlanır. 45°C ye soğutulup %40 glikoz ve 50XVB tuzları yavaş yavaş karıştırılarak eklenir, petrilere 25-30 ml olarak aktarılır.

Nutrient agar plakları

Kullanımı : 1) Genotip Kontrol

- a) Kristal viyole
- b) UV` ye duyarlılık

2) Sitotoksik dozun saptanmasında

Oxoid Nutrient Broth No:2	25 g
Agar.....	15 g
Distik su	930 ml

Agar ve Broth distile su içinde karıştırılıp 121°C de 20 dakika otoklav edilir. Petri kutularına 30 ml olacak şekilde aktarılır.

Nutrient broth sıvı kültür ortamı

Kullanımı : Bakterilerin gecelik kültürde büyütülmesinde

Oxsoid nutrient broth no:2	5 g
Distile su	200 ml

Broth ve su karıştırılıp otoklavlanır ve +4°C de saklanır.

S 9 Karışımı

Kullanımı: S 9'lu deneylerin yapımında

Karaciğer mikrozom enzimi	2.0 ml
MgCl ₂ – KCl tuzu.....	1.0 ml
1 M glukos – 6 – fosfat	0.25 ml
0.1 M NADP.....	2.0 ml
0.2 M fosfat tamponu, pH 7.4.....	25.0 ml
Steril distile su.....	19.75 ml

Maddeler sırasıyla ilave edilir, karaciğer mikrozom enzimi en son ilave edilir. Karışım her defasında taze hazırlanır ve buzun içinde bekletilir.

4.1.4. Örneklerin toplanması ve saklanması

Çalışmada kullanılan su ve toprak örnekleri Eylül 2004' de 4 tane istasyon belirlenerek Seydisuyu'ndan toplanmıştır. Bu istasyonlar Kırka Bor madeni ile Çatiören Barajı arasındaki alanda seçilmiştir. Belirlenen her istasyondan 5 litre su örneği alınmıştır, suyun alındığı yerden de yaklaşık 250 gram toprak örneği alınmıştır. Örnekler oda sıcaklığında saklanmıştır.

4.2. Metod

Bu çalışmada, liyofilize olarak temin edilen *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşlarının master plaklarının hazırlanması, genetik özelliklerinin kontrol edilmesi ve stok kültürlerinin hazırlanması ve daha sonra, test maddelerinin mutajenik etkilerinin araştırılması Maron ve Ames (1983)'in geliştirdiği plak inkorporasyon metoduna göre yapılmıştır. Deneyler S9'lu ve S9'suz olarak iki grup halinde yapılmıştır. Her doz paralel 3 plak halinde denenmiş ve farklı zamanlarda iki bağımsız deneyle çalışılmıştır. Ayrıca pozitif kontrol, solvent kontrol ve spontan kontroller deneye paralel olarak denenmiştir.

4.2.1. Master plaklarının hazırlanması

Liyofilize kültürler, steril ortamda, nutrient broth besiyerine aktararak, 37°C de 12 saat inkübe edilmiş ve histidin biyotin (HB) agar çizgi ekimiyle alınmıştır. 37°C de 48 saat inkübasyonun ardından, iyi izole olmuş bir koloni seçilerek, 0,3 ml fosfat tuz tamponu (PBS) içinde süspanse edildikten sonra, histidin-biyotin-ampisilin (HBA) plaklarına çizgi ekimi yapılmış ve yine 37°C de 48 saat inkübe edilmiştir. Deney için kullanılacak uygun bakterileri içeren bu master plaklar +4°C de 1-2 ay süre ile saklanmış ve pasajlar yapılmıştır.

4.2.2. Salmonella suşlarının stoklanması ve stok küştürlerinin 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 2ml Nutrient Broth içeren tüplerde süspanse edilir ve 37°C de bir gece (12-16 saat) inkübe edilir. Bu sürenin sonunda steril Ependorf tüp içersine 1 ml bakteri kültürü ve 0,09 ml Dimetil Sülfoksit (DMSO) ilave edilmiş ve -20°C de donması sağlandıktan sonra -80°C de saklanmıştır.

Kültürün açılması gerektiğinde stok bakteri kültürü oda sıcaklığında eritilip bir öze dolusu alınarak Histidin/Biyotin (HB) agar plaklarına paralel ekim yapılmış ve 37°C de 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°C de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası master plaklar +4°C de iki ay süre ile saklanabilir ve gerektiğinde gecelik kültür hazırlamak için kullanılabilir.

4.2.3. Test suşlarının genotip kontrollerinin yapılması

Test suşlarının genotipleri

- Kültür alındıktan hemen sonra

- Donmuş süreleli yada liyofilize kültürlerinin yeni takımları alındıktan hemen sonra
- Plak başına düşen spontan geriye dönüşüm sayısı normal oranın altında ise
- Standart mutejenlere karşı duyarlılıkları azaldığında yapılmalıdır.

Tüm bu testler için taze broth kültürleri kullanılmaktadır. Kullanılan diğer malzemeler, cam petriler, tüpler, pamuklar....sterildir.

4.2.3.1. Histidin gereksinimi kontrolü

Bakterilerin histidin içermeyen plaklara ekilmeleri sonucu his⁻ bakteriler his⁺ bakterilerden ayırt edilir. Test bakterisinin his⁻ karakterinin doğrulanması, seçici agar plakları üzerinde histidine gereksinim duyan bakterilerin geliştirilmesi ile ispatlanmıştır. *Bio genine* kadar uzanan *UvrB* mutasyonundaki delesyon nedeni ile test suşlarının biyotine olan gereksinimleri de ispat edilmiş olur. Bu amaçla, Nutrient Broth'da bir gece üretilen bakteriler HB agar ve histidin içermeyen HB⁻ agar plaklarını ekilerek 37°C de 48-72 saat inkübe edilir. Inkübasyon sonunda HB plaklarında üreme gözlenirken, HB⁻ plaklarında üreme gözlenmez. Bu sonuç bize bakterilerin His⁻ mutasyonu taşıdığını gösterir.

4.2.3.2. *uvrB* mutasyonu kontrolü

Bu mutasyon ile bakterilerin, ultre viyole (UV) ışınlarının neden olduğu, replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan "DNA onarım mekanizması" engellenmiştir. Bakterilerde bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için, NB'da bir gece büyütülen bakteri kültüründen 1 öze dolusu alınıp Nutrient Agar (NA) plağının tamamına paralel ekim yapılmıştır. Plağın yarısı (çizgileri kesicek şekilde) plastik bir plaka ile kapatılıp 15 watt gücünde bir UV lambası ile 33 cm yüksekten 8 sn süre ile ışınlanmıştır. Işınlamadan sonra petri kapakları kapatılıp 37° C de 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan UV ışığı ile, *uvrB* mutasyonu taşıyan ve bundan dolayı DNA kesme-

tamir etme mekanizması engellenmiş olan bakterileri öldürmektedir. Bundan dolayı UV'ye maruz kalan kısımda üreme olmazken, plastik kapakla kapatılan kısımda normal bir üreme gözlenmiştir ve böylece bakterilerin *uvrB* mutasyonunu taşıdığı gösterilmiştir.

4.2.3.3. Rfa mutasyonu kontrolü

Bu mutasyon bakteri hücre zarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuştur ve hücre zarının geçirgenliği arttırılmıştır. Varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için, NB'da bir gece büyütülen 0,1 ml sıvı kültür, 45°C ye ısıtılmış 2 ml top agar üzerine ilave edilir (Histidin/Biyotin eklemeye gerek yoktur) daha sonra NA plaklarına dökülerek plaklara 8 işareti yaptırılmıştır. 10 dakika donması beklendikten sonra, plağın ortasına steril filtre kağıdı diski yerleştirilip diskin ortasına % 0,1' lik kristal viyole karışımından 10µl damlatılmıştır. Kağıt boyayı emdikten sonra plaklar 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda disk çevresinde üreme olmayan zon gözlenmiştir. Bu zonda, boya maddesi bakterilerin içine kolayca girip, bakterilerin üremesini engellediği için bakterilerin *Rfa* mutasyonunu taşıdıkları anlaşılmıştır.

4.2.3.4. R faktör varlığı kontrolü

Test bakterilerinin içerdiği, R faktör taşıyan pKM101 plazmidlerinin kaybolup kaybolmadıkları, ampisiline dirençliliğinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla, büyütülen NB içinde bakteri kültürü, (%0.8 amphisilin / 0,02 M NaOH) ampisilin içeren HBA plaklarına çizgi ekim yapılarak, 37°C de 24 saat inkübasyon sonunda, plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdükleri gözlenmiştir. Yani bakteriler R faktör plazmidini içermektedirler.

4.2.3.5. Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his^- durumundan his^+ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA98 için

30-50 revertant / plak; TA100 için 120-200 revertant / plaktır (Maron ve Ames 1983). Bunu test etmek için, normal gecelik kültürden 0,1 ml alınıp, 45°C deki su banyosunda ısıtılan 2 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra, 0,2 ml 0.5 M histidin-biyotin solüsyonu da eklenip test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılmış ve 37°C de 48 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır. Normal sınırlar içinde revertant sayı gösteren kültürler deneylerde kullanılmıştır.

4.2.3.6. Test maddesinin sitotoksik etkilerinin saptanması

Kullanılan test maddelerinin *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşları için sitotoksik dozunun bulunması amacıyla yapılan bu deneyde Nutrient Agar plakları kullanılmıştır. Test maddesinin dimetilsülfoksitte çözölmüş 5 ayrı dozu 45°C de su banyosunda tutulan top agar'dan 2 ml tüplere koyulur. Üzerine 0,1 ml bakteri kültürü ve 0,1 ml test maddesi eklendi. Tüpler karıştırılarak bu karışım NA plaklarına dököldü. Plaklar 8 şeklinde hareket ettirilerek karışımın homojen yayılması sağlandı. Top agar donduktan sonra plaklar 37°C de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plaktaki koloniler sayılmış ve kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir. Her doz, iki bakteri suşu içinde çift paralel olarak denenmiştir.

4.2.4. Su örneklerinin hazırlanması

Oda sıcaklığında bekletilen su örnekleri kaba partiköllerden uzaklaştırılmak amacı ile cam filtre kullanılarak süzöldü. Süzölmüş olan su örnekleri İRA 743 kolon maddesinden geçirildi [77, 78, 79].

Kolon maddesinden 20mg alındı, üzerine hacmin iki katı olacak şekilde 2 M HCl eklendi ve aralıkla karıştırılmak sureti ile beklendi. HCl süzöldükten sonra kolon maddesi deiyonize su ile yıkandı. Deiyonize suyun süzölmesinden sonra kolon maddesine 3 M NH₃ ile edildi. Son olarak kolon maddesi, NH₃ süzöldükten

sonra, tekrar deiyonize su ile yıkandı, böylece Amberlite İRA 743 kolon maddesi kullanıma hazır hale getirildi [79].

Her istasyon için ayrı kolon hazırlandı ve istasyonlardan alınan su örneklerinin tamamı (5lt) kolondan geçirildi. Kolonlardan tüm su örnekleri geçirildikten sonra kolonlardan sırasıyla deiyonize su, 3 M NH₃, 1 M HCl geçirildi. Geçirilen tüm maddeler ayrı ayrı kaplarda toplandı ve sırasıyla ocakta kaynatılarak uçuruldu. Kabın dibinde oluşan çökelti DMSO ile çözüldü ve otoklavlanarak oda sıcaklığında saklandı.

Test stokları DMSO ile seyreltilerek 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ konsantrasyonlarında deneylerde kullanıldı.

4.2.5. Toprak örneklerinin hazırlanması

Oda sıcaklığında bekletilen toprak örneklerinden 0,1 gr tartıldı. Toprak örneklerinin üzerine eşit hacimlerde alınarak hazırlanan hekzan, kloroform, aseton karışımından 1 ml ilave edilerek vortekslendi. Örnekler + 4 °C'de 5600 δ 'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant alındı ve santrifüj işlemi 3 kez tekrarlandı.

Ekstratların organik solventleri uçuruldu, oluşan çökelti DMSO ile çözüldü. Test stokları DMSO ile seyreltilerek 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ konsantrasyonlarında deneylerde kullanıldı.

4.2.6. Ames mutanjenite testinin yapılışı

Deneyin amacı, daha önceden büyümesi için histidin amino asidine gereksinim duyan oksotrofik suşların, kullandığımız test maddeleri ile tekrar histidin sentezleyebilir (prototrofik) hale dönüşmesi temeline dayanır.

Deneyler farklı zamanlarda iki bağımsız deney şeklinde S9'lu ve S9'suz olarak 2 safhada, her doz için paralel 3 plak halinde yapılmıştır.

4.2.6.1. S9'suz (-) deney

Bu deney Maron ve Ames (1983)'e uygun olarak plak inkorparasyon metodu uygulanmıştır. İçlerinde 2 ml top agar bulunan deney tüpleri su banyosu yardımı ile 45°C ye getirilir ve içlerine 0,2 ml histidin / biyotin çözeltisi, 0,1 ml test maddesi ve 0,1 ml 12-16 saatlik bakteri kültürü eklenmiştir. Tüpler vortekslenerek MGA (Minimal glikoz agar) plaklarına dökülmüş, plaklara hızla 8 işareti yaptırılarak top agarın plak üzerine homojen dağılması sağlanmıştır. 15 dakika donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilip 37°C lik etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilerdeki koloniler sayılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olmak üzere hazırlanarak yapılmış, sonuçların değerlendirilebilmesi için deneylere paralel olarak spontan kontrol, solvent kontrol (DMSO) ve pozitif (diagnostik) kontrol olarak TA 100 suşu için 1µg/100µl (NaN₃) Sodyum Azid (15), TA 98 suşu için, 200µg/100µl (O₂NC₆H₃(NH₂)₂) 4-nitro-*o*-fenilendiamin (15, 45, 80) kullanılmıştır. Deney sonuçları standart hata ile birlikte ortalamaları alınarak Çizelge 5.2 ve Çizelge 5.3'e kaydedilmiştir.

4.2.6.2. S9'lu (+) deney

S9 karışımı hazırlanmış ve buz içinde bekletilmiştir. Deneyde 45 °C'lik su banyosunda bulunan 2 ml top agar içeren tüplere 200 µl histidin – biyotin solüsyonu ilave edildikten sonra 100 µl test maddesi, 100 µl gecelik bakteri kültürü ve 500 µl buzda bekletilen S9 karışımı ilave edilmiştir. Tüpler çalkalanarak MGA plaklarına dökülmüş ve homojen yayılması sağlanmıştır. 15 dakika donması beklendikten sonra 37 °C'lik etüvde 48 – 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra his⁻ kolonilerin sayımı yapıp standart hata ile birlikte ortalamaları alınarak Çizelge 5.2 ve Çizelge 5.3'e kaydedilmiştir.

Ayrıca deneylerde TA 98 ve TA 100'nin solvent kontrol olan DMSO ve pozitif kontrol olarak da her iki suş için 1g / 100 µl 2 – Aminofluoren [15, 18, 44,

80] deneye paralel olarak denenmiş ve sonuçları Çizelge 5.2 ve Çizelge 5.3'e kaydedilmiştir.

4.2.7. Sonuçların değerlendirilmesi

Deneylerden elde edilen sonuçlar, standart hataları ile birlikte ortalamaları alınarak SPSS programında istatistiksel açıdan *student – t* testi ile değerlendirilmiştir. TA 98 için olan deney sonuçları Çizelge 5.2 ve TA 100 için olan deney sonuçları ise Çizelge 5.3' de verilmiştir. Çizelgelerde, test maddelerinin her dozu için revertant koloni sayılarının ortalamaları 'ortalama $\pm$ stn hata' şeklinde gösterilmiştir. Her deneye paralel olarak çözücü kontrol (DMSO kontrolü) ve pozitif kontroller yapılmıştır ve sonuçları çizergede gösterilmiştir. Ayrıca S9'lu deneylerin sonuçları çizelgelerde gösterilmiştir.

5. BULGULAR

Kırka Bor İşletme Müdürlüğü, Eskişehir ilinin 70km güneyinde, Kırka beldesinin 4,5 km batısında, Sarıkaya mevkiinde kurulmuştur. Bu işletme ile Çatıören Barajı arasında, Seydisuyu üzerinde belirlenen 4 farklı istasyondan su ve toprak örnekleri alınmıştır. Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezinde yapılan ICP – OES analizleri sonucu hem toprak hem de su örneklerinde, maden işletmesine en yakın olan istasyonda bor miktarının en fazla olduğu belirlenmiştir. Maden işletmesinden uzaklaştıkça bor miktarında da azalma görülmüştür. Sonuçlar çizerge 5.1’de verilmiştir.

Alınan toprak örnekleri ön işleme tabi tutulduktan sonra, sitotoksik etki araştırıldıktan sonra her istasyon için 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} belirlenen beş doz uygulanmıştır. Her doz, üç paralel plak ile aynı anda test edilmiş ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca test bileşenlerinin etkinliklerinin memelilerin metabolik aktivasyonuları sonucu değişip değişmediğini belirlemek için S9 fraksiyonu varlığında deney aynen tekrarlanmıştır.

Alınan su örnekleri İRA 743 kolonları ile konsantre edilmiştir. 10^0 dozu sitotoksik olarak belirlendiği için bu doz kullanılmamıştır. Her istasyon için 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} olarak belirlenen beş doz uygulanmıştır. Her doz, üç paralel plak ile aynı anda test edilmiş ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca test bileşenlerinin etkinliklerinin memelilerin metabolik aktivasyonuları sonucu değişip değişmediğini belirlemek için S9 fraksiyonu varlığında deney aynen tekrarlanmıştır.

Sonuçlar standart hataları ile birlikte ortalamaları alınarak istatistiksel açıdan *student – t* testi ile, çözücü kontrol olan DMSO sonuçları karşılaştırılmak suretiyle değerlendirilmiştir. TA 98 için olan deney sonuçlar Çizelge 5.2’de, TA 100 için olan deney sonuçları ise Çizelge 5.3’de verilmiştir. Çizelgelerde her istasyon için kullanılan tüm dozların revertant koloni sayılarının ortalamaları ‘ ortalama $\pm$ snt hata’ şeklinde gösterilmiştir. Her deneye paralel olarak solvent (DMSO) kontrol ve pozitif kontroller yapılmış ve sonuçlar Çizelge 5.2 ve Çizelge 5.3’de aynı şekilde gösterilmiştir.

Çizerge 5.1: Belirlenen istasyonlardaki bor miktarı

T. C. ANADOLU ÜNİVERSİTESİ BİTKİ, İLAÇ VE BİLİMLER ARAŞTIRMALAR MERKEZİ 26470, Eskişehir <i>Tel: (222) 335 05 80 – 3662, Fax: (222) 335 01 27</i> ICP – OES SONUÇ RAPORU NO: BİBAM 687 - 695	
TOPRAK	SU
68,27 ppm	3,755 g/L
17,64 ppm	1,674 g/L
17,38 ppm	1,568 g/L
15,36 ppm	0,694 g/L

B analizi 249,677 nm’de gerçekleştirilmiştir. Perkin Elmer Optical Emission Spectrometer Optima 4300 DV cihazında analizler yapılmıştır.

4 – Nitro o – Fenilendiamin, TA 98 için S9 gerektirmeyen, 2 – Aminofluorene, TA 98 için S9 gerektiren pozitif kontrol, DMSO, çözücü kontrol olarak kullanılmıştır. Her doz, üç paralel plak ile aynı anda test edilerek farklı zamanlarda yapılan iki deneyin ortalamaları alınıp (ort. $\pm$ st.h.) Çizelge 5.2’ye kaydedilmiştir.

Sodyum azid, TA 100 için S9 gerektirmeyen, 2 – Aminofluorene, TA 100 için S9 gerektiren pozitif kontrol, DMSO, çözücü kontrol olarak kullanılmıştır. Her doz, üç paralel plak ile aynı anda test edilerek farklı zamanlarda yapılan iki deneyin ortalamaları alınıp (ort. $\pm$ st.h.) Çizelge 5.3’e kaydedilmiştir.

Çizelge 5.2: TA 98 Suşlarının Su ve Toprak Örneklerindeki Sonuçları. Her doz üç paralel plak ile aynı anda test edilerek farklı zamanlarda yapılan iki deneyin ortalamaları alınıp (ort ± st.h) çizelgeye kaydedilmiştir. Belirlenen 4 farklı istasyondan toplanan örneklerin 5 ayrı dozunun TA 98 ile verdiği revertant koloni sayıları verilmiştir. * işareti mutajen dozları göstermekte.

İSTASYON	DENENEN DOZ	REVERTANT KOLONİ SAYISI TA 98 TOPRAK	
		S9 (-)	S9 (+)
1. İSTASYON	10 ⁰	25 ± 3,060*	29 ± 6,653*
	10 ⁻¹	23 ± 1,940*	24 ± 2,065*
	10 ⁻²	23 ± 1,940*	23 ± 2,167
	10 ⁻³	23 ± 1,861	20 ± 2,000*
	10 ⁻⁴	24 ± 2,875	26 ± 0,816*
2. İSTASYON	10 ⁰	23 ± 2,280	26 ± 1,966*
	10 ⁻¹	23 ± 1,549*	17 ± 0,983
	10 ⁻²	23 ± 1,940*	16 ± 2,167
	10 ⁻³	23 ± 1,940*	18 ± 2,000*
	10 ⁻⁴	22 ± 2,338	18 ± 0,816*
3.İSTASYON	10 ⁰	22 ± 2,683	18 ± 2,065*
	10 ⁻¹	23 ± 2,943	17 ± 1,673*
	10 ⁻²	24 ± 2,732*	16 ± 1,673
	10 ⁻³	23 ± 1,472*	17 ± 2,250
	10 ⁻⁴	22 ± 3,060	18 ± 1,673*
4.İSTASYON	10 ⁰	23 ± 2,804	19 ± 3,970
	10 ⁻¹	23 ± 1,940	16 ± 2,316
	10 ⁻²	23 ± 2,732	24 ± 4,179*
	10 ⁻³	23 ± 1,673*	18 ± 2,190*
	10 ⁻⁴	22 ± 1,861	23 ± 3,141*
DMSO Kontrol		21 ± 1,264	15 ± 1,940
Pozitif Kontrol		372 ± 47,507	1561 ± 118,102
İSTASYON	DENENEN DOZ	REVERTANT KOLONİ SAYISI TA 98 SU	
		S9 (-)	S9 (+)
1. İSTASYON	10 ⁻¹	37 ± 6,782	32 ± 2,137
	10 ⁻²	33 ± 4,535	32 ± 3,507
	10 ⁻³	33 ± 4,885	30 ± 4,033
	10 ⁻⁴	31 ± 4,885	30 ± 2,280
	10 ⁻⁵	36 ± 4,505*	30 ± 2,732
2. İSTASYON	10 ⁻¹	45 ± 4,722*	33 ± 3,188
	10 ⁻²	38 ± 4,966*	32 ± 3,371
	10 ⁻³	34 ± 4,131	34 ± 4,131
	10 ⁻⁴	30 ± 5,958	30 ± 5,958
	10 ⁻⁵	31 ± 5,958	31 ± 4,320
3.İSTASYON	10 ⁻¹	37 ± 6,153	37 ± 6,153
	10 ⁻²	30 ± 9,027	30 ± 9,027
	10 ⁻³	30 ± 4,926	30 ± 4,926
	10 ⁻⁴	30 ± 2,422	30 ± 2,422
	10 ⁻⁵	35 ± 4,381*	35 ± 4,381*
4.İSTASYON	10 ⁻¹	30 ± 0,836	30 ± 0,836
	10 ⁻²	32 ± 4,679	32 ± 4,679
	10 ⁻³	30 ± 5,715	30 ± 5,715
	10 ⁻⁴	33 ± 4,320	33 ± 4,320
	10 ⁻⁵	31 ± 6,911	31 ± 6,911
DMSO Kontrol		29 ± 6,782	29 ± 6,782
Pozitif Kontrol		402 ± 48,013	1232 ± 106,205

Çizelge 5.3: TA 100 Suşlarının Su ve Toprak Örneklerindeki Sonuçları. Her doz üç paralel plak ile aynı anda test edilerek farklı zamanlarda yapılan iki deneyin ortalamaları alınıp (ort $\pm$ st.h) çizelgeye kaydedilmiştir. Belirlenen 4 farklı istasyondan toplanan örneklerin 5 ayrı dozunun TA 100 ile verdiği revertant koloni sayıları verilmiştir. * işareti mutajen dozları göstermekte.

İSTASYON	DENENEN DOZ	REVERTANT KOLONİ SAYISI TA 100 TOPRAK	
		S9 (-)	S9 (+)
1. İSTASYON	10^0	144 $\pm$ 10,534	172 $\pm$ 9,136*
	10^{-1}	141 $\pm$ 15,829	166 $\pm$ 10,053*
	10^{-2}	142 $\pm$ 13,170	158 $\pm$ 4,131*
	10^{-3}	155 $\pm$ 8,501	151 $\pm$ 8,501
	10^{-4}	149 $\pm$ 10,765	152 $\pm$ 3,777*
2. İSTASYON	10^0	144 $\pm$ 21,768	166 $\pm$ 13,475*
	10^{-1}	147 $\pm$ 11,321	149 $\pm$ 1,633*
	10^{-2}	141 $\pm$ 36,302	148 $\pm$ 6,250
	10^{-3}	141 $\pm$ 21,030	162 $\pm$ 9,729*
	10^{-4}	150 $\pm$ 24,630	153 $\pm$ 8,547
3.İSTASYON	10^0	144 $\pm$ 6,013	157 $\pm$ 8,066*
	10^{-1}	141 $\pm$ 26,649	160 $\pm$ 2,401*
	10^{-2}	143 $\pm$ 11,839	153 $\pm$ 3,162*
	10^{-3}	147 $\pm$ 24,375	147 $\pm$ 2,804
	10^{-4}	141 $\pm$ 15,033	152 $\pm$ 6,772
4.İSTASYON	10^0	142 $\pm$ 19,856	152 $\pm$ 3,430*
	10^{-1}	142 $\pm$ 17,497	145 $\pm$ 3,614
	10^{-2}	142 $\pm$ 8,953	153 $\pm$ 1,788*
	10^{-3}	142 $\pm$ 7,339	154 $\pm$ 4,560*
	10^{-4}	141 $\pm$ 39,574	156 $\pm$ 16,231
DMSO Kontrol		140 $\pm$ 22,657	146 $\pm$ 3,141
Pozitif Kontrol		1268 $\pm$ 141,396	415 $\pm$ 55, 012
İSTASYON	DENENEN DOZ	REVERTANT KOLONİ SAYISI TA 100 SU	
		S9 (-)	S9 (+)
1. İSTASYON	10^{-1}	129 $\pm$ 9,325	133 $\pm$ 6,802
	10^{-2}	121 $\pm$ 9,130	132 $\pm$ 5,648
	10^{-3}	122 $\pm$ 14,372	128 $\pm$ 10,054
	10^{-4}	121 $\pm$ 5,810	127 $\pm$ 7,730
	10^{-5}	125 $\pm$ 15,845	126 $\pm$ 5,921
2. İSTASYON	10^{-1}	133 $\pm$ 18,018	130 $\pm$ 7,763
	10^{-2}	126 $\pm$ 5,537	127 $\pm$ 8,485
	10^{-3}	122 $\pm$ 2,483	126 $\pm$ 9,563
	10^{-4}	123 $\pm$ 8,049	126 $\pm$ 7,422
	10^{-5}	122 $\pm$ 12,307	125 $\pm$ 6,274
3.İSTASYON	10^{-1}	131 $\pm$ 15,782	147 $\pm$ 8,066*
	10^{-2}	127 $\pm$ 20,000	140 $\pm$ 13,629*
	10^{-3}	131 $\pm$ 12,077	143 $\pm$ 3,162*
	10^{-4}	122 $\pm$ 9,765	135 $\pm$ 4,516*
	10^{-5}	123 $\pm$ 17,705	142 $\pm$ 6,772*
4.İSTASYON	10^{-1}	127 $\pm$ 12,464	141 $\pm$ 3,430*
	10^{-2}	121 $\pm$ 3,881	135 $\pm$ 2,250*
	10^{-3}	122 $\pm$ 4,020	143 $\pm$ 1,788*
	10^{-4}	123 $\pm$ 5,924	144 $\pm$ 4,560*
	10^{-5}	122 $\pm$ 6,493	139 $\pm$ 8,763*
DMSO Kontrol		120 $\pm$ 16,203	124 $\pm$ 7,521
Pozitif Kontrol		756 $\pm$ 138,111	352 $\pm$ 61,280

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, bor bakımından zengin olduğu belirlenen, Kırka yöresinden toplanan su ve toprak örneklerinde, bulunan bor miktarının mutajen olup olmadığı araştırıldı. Mutajenitenin araştırılması için TA 98 ve TA 100 suşları ile Ames / *Salmonella* / Mikrozom test yöntemi kullanılarak hem metabolik enzimlerin kullanıldığı S9'lu ortamda hem de S9'suz ortamda araştırılmıştır. Belirlenen istasyonlardan toplanan örneklerdeki bor miktarının Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nde yapılan ICP – OES sonuçlarına göre 1. istasyondan 4. istasyona doğru bor miktarında bir azalmanın olduğu belirlenmiştir. Yani 1. istasyondan alınan su ve toprak örneklerindeki bor miktarı en yüksek, 4. istasyondan alınan su ve toprak örneklerindeki bor miktarı ise en düşük olarak belirlenmiştir. Deneyler farklı zamanlarda iki bağımsız deney şeklinde, her doz için paralel 3 plak uygulanarak yapılmıştır. 4 farklı istasyondan alınan toprak örnekleri 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} olmak üzere 5 farklı dozda uygulanmıştır. Aynı istasyonlardan alınan 4 farklı su örneği ise 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} dozlarında uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol grupları ile beraber SPSS programında *student – t* testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

TA 100 suşu ile yapılan toprak ve su örneklerinin değerlendirildiği deneyde, S9'suz ortamda, hiçbir dozda mutajenik etki gözlenmemiştir. Ancak TA 100 suşu ile yapılan S9'lu ortamda toprak örneklerinde, her istasyon için üst dozların mutajen olduğu gözlenmiştir. TA 100 suşu ile değerlendirilen su örneklerinde, 1. ve 2. istasyonlarda mutajenite gözlenmemiş olup 3. ve 4. istasyonların tüm dozlarında mutajenite gözlenmiştir. Bunun nedeni 1. ve 2. istasyonlardaki toksitenin mutajenik etkiyi baskılaması olabilir. Nitekim su örnekleri ile yapılan çalışmada 10^0 dozu toksik etki gösterdiğinden deneylere 10^{-1} dozu ile başlanmıştır. TA 100 suşları ile yapılan deneylerde, S9'lu deneylerin mutajen sonucu vermesi metabolik aktivasyon varlığında örneklerimizdeki bor miktarının mutajen olduğunu göstermektedir.

TA 98 suşu ile yapılan deneylere bakıldığında, TA 100 suşuna kıyasla mutajenitenin daha yoğun olarak gözlemediği belirtilebilir, bu da bor elementinin baz değişimi mutasyonlarında daha fazla etkili bir mutajen olduğu göstermektedir.

TA 98 suşu ile yapılan S9'suz deneylerde, toprak örnekleri incelendiğinde, 1. istasyonun üst dozları mutajen olarak belirlenmiştir, alt dozlarda ise mutajen etki gözlenmemiştir. S9'lu toprak örneklerinde ise yoğun bir mutajenite dikkat çekmektedir. TA 98 suşu ile yapılan S9'suz su örneklerinde 1. istasyonun üst dozlarında mutajenik etki gözlenmezken 1. istasyonun alt dozlarında ve 2. istasyonun üst dozlarında mutajenik etki gözlenmektedir. 4. istasyonun hiçbir dozunda ise mutajenik etki gözlenmemiştir. Bu sonuçlar TA 98 su örneklerinde 1. istasyonun üst dozlarının toksik olması ve mutajeniteyi bastırması olarak değerlendirilebilir. Deneylerde 10^0 dozunun toksik etki göstermesi nedeniyle su örneklerinde 10^{-1} dozundan çalışmalara başlanmıştır. S9'lu su örneklerinde 3. istasyonun en üst ve en alt dozunda mutajenik etki gözlenirken diğer hiç bir istasyon ve dozda mutajenite gözlenmemiştir. Buradaki sonuçlar da ilk istasyonlarda bor miktarının yoğun olması nedeniyle toksik etkiden dolayı mutajenitenin baskılanmış olması, son istasyonlarda ise bor miktarının düşük olması nedeniyle de mutajenitenin kaybolduğunun göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Hem toprak hem de su örnekleri kullanılarak yapılan tüm deneylerde S9'lu ve S9'suz deneylerde 1. istasyonun tüm dozlarının mutajen olarak belirlenmesi olağandır, çünkü bu istasyondaki bor miktarı diğer istasyonlara oranla daha fazladır.

Yapılan deneylerde bor elementinin hem TA 100 hem de TA 98 suşları için mutajenite vermesi, bor elementinin hem baz değişimi mutasyonlarına hem de çerçeve kayması mutasyonlarına yol açan bir mutajen olarak değerlendirilebilir.

S9'suz ortamda yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar, metabolik enzimlere sahip olmayan bakteriler için anlam taşımaktadır. Bu sonuçların memelilere göre yorumlanabilmesi için S9'lu ortamda, memeli karaciğerinden elde edilen metabolize edici enzimler kullanılmıştır. Bir kısım bileşikler memeli karaciğerinde enzimatik yolla parçalanarak farklı metabolitlere çevrilmektedir, yeni oluşan bu bileşikler mutajenik özelliklere sahip olabilir. Yapmış olduğumuz deneylerde gerek TA 100 gerekse TA 98 suşlarındaki S9'lu deneylerde gözlenen

mutajenite yoğunluğu bor elementinin özellikle memeliler için etkin bir mutajen olarak değerlendirilebilir.

Yapılan literatür taramalarında ABD’de 1ppm’in üzerinde bor içeren suların içme suyu olarak yasaklanmış olduğu görülmüştür [9]. Bazı kaynaklarda sucul ortamlar için kabul edilen bor konsantrasyonu 0,75 – 1,0 mg / l olarak verilmiştir. Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi’nde yapılan ICP – OES sonuçlarına göre, IRA 743 kolon maddesinde geçirilerek ön işleme tabi tutulan su örneklerimizdeki [79] bor miktarı 0,694 g / l ile 3,755 g / l arasında değişmektedir. Su örneklerimizde bu kadar yoğun olarak bulunan bor miktarının mutajenik etki göstermesi olağandır. Aşırı borun, insanlar ve hayvanlara zarar verdiği de çeşitli kaynaklarda belirtilmiştir [7, 8, 9]. Toprakta bor miktarının ortalama 0,9 ppm olmalıdır [83]. Bor miktarının 1,5 ppm’i aşması hassas bitkilerde toksiteye yol açmaktadır [81]. Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi’nde yapılan ICP – OES sonuçlarına göre ön işleme tabi tutulan toprak örneklerimizde bor miktarı 15,36 ppm ile 68,27 ppm arasında değişmektedir. Toprak için gözlenen bu değerler yapılan literatür araştırmalarına göre çok yüksek seviyelerde yer almaktadır [10, 75, 81, 83].

Bitkilerin normal gelişimi için bor alınması gereken zorunlu bir maddedir. Fakat gübre, toprak veya sudaki miktarı artarsa bitkiyi kurutur. Asma, elma, zeytin ve pamuk bor noksanlığına duyarlı; bezelye, çeltik, soya, çilek ve buğday ise bor miktarına dirençlidir [81]. Bu ve buna benzer bora duyarlı ve bora dirençli bitkiler tespit edilerek bor bakımından zengin olan topraklara bu bitkilerin ekimi arttırılmalı, böylece tarımda verime gidilebilir.

Bor miktarına ve uygulanma süresine bağlı kalarak kısa, orta ve uzun vadeli etkilerin gözlenmesine neden olur. Fareler, köpekler, tavşanlar ve değişik hayvan türleri ile yapılan deneyler farklı sonuçlar vermiştir, bu sonuçların insanlar için de geçerli olduğunu ileri sürmek yerinde değildir. İnsanların kısa sürede ve yüksek miktarda bor alınca veya tozuna maruz kalınca kusma, ishal, baş dönmesi, titreme gibi zehirlenme belirtileri gözlenirken deride döküntüler oluşur, karaciğer, böbrekler ve merkezi sinir sisteminde bozukluklar ortaya çıkar [81]. Bor bileşikleriyle temasın kansere yol açtığı, genleri değiştirdiği yahut yüksek

yoğunluklarda bile kromozom düzensizliğine sebep olduğu belgelenememiştir [81]. Oysa bizim yaptığımız çalışma Kırka yöresinde bulunan bor miktarının hem çerçeve kayması mutasyonlarına hem de baz değişimi mutasyolarına yol açtığı açıkça görülmekte. Bu etkimin de özellikle metabolik aktivasyon varlığında, yani memelilerde etkili olabileceği görülmektedir.

Çalışma alanı olarak seçilen yörede bor madenin bulunması toprakta bor miktarının yüksek çıkmasının doğal bir sonucudur. Bor kolayca suda eriyebilir, kokusuz olup kristal granüller ve toz halinde bulunabilir. Suyun buharlaşması ile havaya karışabilir, yağmur ve karla tekrar toprağa inip yer altı ve yerüstü sularıyla etrafa yayılır. Bu durumda bor bakımından zengin olan havzayı bordan arındırmak oldukça zordur. Yerüstü su kaynaklarında yapılan barajlar ile borun çeşitli bileşikler halinde baraj yataklarında birikmesi sağlanarak, sulama suyu ve içme suyu olarak kullanılan sulardaki bor miktarının azalması sağlanabilir. Özellikle Kırka yöresinde bu sorun bilindiğinden DSİ bana yönelik çalışmalar yapmakta.

US EPA'ya göre bor D Grubu kimyasal olarak sınıflandırılmıştır (insanlar için karsinogenetik olarak sınıflandırılmaz) [82]. Bor vücudumuza hangi yolla girerse girsin, % 90 – 95 kadarı ilk 24 saatte hiç değişmeden idrarla atılır. İlk 48 saatte çıkarılan miktar % 95 – 96'ya ulaşır. Vücutta pek tutulmayan bor sadece kemik, tırnak ve kıllarla karaciğer ve dalak gibi organlarda biraz birikir. Aynı şekilde ter ve gaitayla da uzaklaştırılır [83].

Borun mutajenitesinin araştırılmasında için bu çalışmada TA 98 ve TA 100 suşları ile Ames / *Salmonella* / Mikrozom test yöntemi kullanılmıştır ve pek çok dozda, özellikle de S9'lu deneylerde borun mutajen olduğu gözlenmektedir. Ancak bu test mutajenite araştırmaları için sadece ön adım teşkil etmektedir. Bu sonuçlar konusuna kesin yargıya varabilmek için diğer testler de yapılmalı ve bu sonuçlar yapılacak olan diğer testlerle desteklenmelidir. Bu testte bakterilerle (*Salmonella*) ile çalışılmıştır, canlı sistemler üzerindeki çalışmaların arttırılması gerekmekte, *Salmonella* ile yapılan testler ve sonuçları göz ardı edilmemelidir.

KAYNAKÇA

- [1] TMMOB Maden Mühendisleri Odası, *İkinci Uluslar Arası Bor Sempozyumu Sonuç Bildirgesi*, Eskişehir, (2004).
- [2] ONACAK. T., *Borlu Atıksuların Kırka (Eskişehir) Yöresi Yüzey Sularına Etkileri*, Yük. Müh. Tezi., H. Ü. Fen Bil. Enst. Jeo. Müh. Anabilim Dalı., Ocak (1990).
- [3] ÖZKURT. Ş., *Çatıören ve Kunduzlar (Kırka – Eskişehir) Baraj Göletlerindeki Sazan (Cyprinus carpio L., 1758) Dokularında Bor Birikimi*, Turk j Biol, **24** (2000) 663 – 676 TÜBİTAK
- [4] CANBULAT. Ü., *Bor Sektörümüz ve Bor'un Geleceği*, Eskişehir Ticaret Odası Dergisi, Sayı **93 (21)**, 21 – 30, Ağustos (2004).
- [5] ÇENGEL. M. ve ÖZKARA, M., *Toprakta Bor ve Mikrobiyolojik Etkileri Üzerinde Araştırmalar*, Toprak İlmi Dergisi, Yayın No:5 (1989).
- [6] JEFFREY, A., BLACK, J., BAMUM B. ve J, BİRGE W. J., *An Integrated Assesment of the Biological Effect of Boron to the Rainbow Trout, Chemosphere*, Vol:26 (7), pp 1383 – 1413 (1993).
- [7] McKEE, J. E. ve WOLF, H. W., *Water Quality Criteria*, California State Water Resources Control Board (1963).
- [8] BİRGE, W. J., *Toxicity of Boron to Embryos to Boron Compounds*, Report No. EPA – 560/1, 76 – 008, Enviromental Protection Agency, Office Of Toxic Substance, Washington, D. C. (1977).
- [9] MUNSUZ, N., ATAMAN,Y., ÜNVER, I. ve OĞUZ, T., *Simav Çayının Bigadiç Yöresi Topraklarında Yarattığı Bor Kirliliği Ve Önlenmesi Olanakları*, TÜBİTAK, ÇAĞ, Proje No. 56, Ankara (1983).
- [10] HELVACI, C., *Türkiye Borat Yatakları: Jeolojik Konumu, Ekonomik Önemi Ve Bor Politikası*, 5. Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu, 13 – 14 Mayıs (2004).
- [11] ERGENE, E., *Bazı 2 – Sübstitüe H – Fenentro (9, 10 – d) İmidizol Bileşiklerinin Mutajenik Etkilerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir (1998).

- [12] Review of Potentially Harmful Substances Carcinogens, *Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution (Gesamp)*. World Health Organization, Reports And Studies, No. **46**.; Geneva (1991).
- [13] GALLI, A. ve SCHIESTL, R.S., *Effects of Salmonella Assay Negative and Positive Carcinogens on Intrachromosomal Recombination in G₁- Arrested Yeast Cells*. Mutant. Res., **370**, 2009 – 221 (1996).
- [14] WYSZYNSKA, K. ve LIRO, W.C., *The Use of Cytogenetic Tests for Evaluation of Mutagenic Properties of Selected Dyes Applied in Textile and Cosmetic Industry*. Genetica Polonica, Vol. **32 (3)** (1991).
- [15] MARON, D. R. ve AMES, B.N., *Revised Methods For The Salmonella Mutagenicity Test*. Mutant. Res., **113**, 173 – 215 (1983).
- [16] DEBNATH, A. K., COMPADRE, R. L., DEBNATH, G., SHUSTERMAN, A. J. ve HANSCH, G., *Structure – Activity Relationship of Mutagenic Aromatic and Heteroaromatic Nitro Compounds. Correlation With Molecular Orbital Energies and Hydrophobicity*. Journal of Medicinal Chemistry, Vol. **34 (2)**, 786 – 797 (1991).
- [17] TEMİZKAN, G., *Moleküler Genetik*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, (1996).
- [18] AYAZ, B., 2, 4, 5 , Tri (Süstitüe) Fenil İmidazol ve Türevlerinin Mutajenik Aktivitesinin Ames / Salmonella / Mikrozom Testi ile Araştırılması, Yüksek lisans Tezi, Eskişehir (2000).
- [19] VURAL, N., *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Ecz. Yayınları, No. **56**, (1984).
- [20] FRIEDBERG, E. C., WALKER, G. C. ve SIEDE, W., *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, D. C., USA (1995).
- [21] FERRER, M., SANCHEZ – LAMAR, A., FUENTES, J. L., BARBE, J. ve LAGOSTERA, M., *Studies on the Antimutagenesis of Phyllanthus Orbicularis: Mechanisms Involved Against Aromatic Amines*, Mutant .Res., **498**, 99 – 105 (2001)
- [22] GRIFFITHS, A. J. F., MILLER, J. H., SUZULI, D. T., LEWONTIN, R. C. ve GELBERT, W. M., *An Introduction to Genetic Analysis*, W. H. Freeman And Company, New York, USA (1996).
- [23] TEMİZKAN, G., *Genetik II. Moleküler Genetik*, İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul (1999).

- [24] BAYDAR, H., *Genetik*, Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, No. **23**, Isparta (2002).
- [25] ERKAN, S., *Moleküler Biyoloji*, Bornova / İzmir (1992).
- [26] SUZUKI, G. ve MILLER, L., *An Introduction to Genetic Analysis*, Fourth Edition, New York (1989).
- [27] DEMİRİSOY, A., *Yaşamın Temel Kuralları / Genel Biyoloji*. Cilt. 1, Kısım. 1, Ankara (1992).
- [28] THERMAN, E., *Human Chromosomes, Structure, Behavior, Effects, Second Edition*, Springer – Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo (1986).
- [29] ŞAHİN, Y., *Genel Biyoloji II*, Bilim Teknik Yayınevi (1995).
- [30] TORTORA, F., *Microbiology in Introduction*, Fourth Edition, 207 – 215 (1992).
- [31] AKMAN, M., *Bakteri Genetiği*, 2. Baskı, Cumhuriyet Üniversitesi Yayını, Sivas (1983).
- [32] STRACHAN, T. ve READ, A. P., *Human Molecular Genetics*. Bios Scientific Edition, New York (1989).
- [33] DİRİL, N., DURUSOY, M., ÖKSÜZOĞLU, E., ÖZTÜRK, K., KARAGÖZ, E. ve KIRTILOĞLU, E., *Kısa Zamanlı Test Sistemleri*, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Yaz Okulu, Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Ders Notları, Ankara (1997).
- [34] SINGER, M. C. ve BERG, P., *Exploring Genetic Mechanisms*, University of Science (1997).
- [35] RIBAS, G., SURRALES, J., CARBONELL, E., XEMENA, N. ve MARCOS, R., *Genotoxic Evaluation of the Herbicide Trifluralin on Human Lymphocytes Exposed in Vitro*, Mut. Res. **371**, 15 – 21 (1996).
- [36] AYAZ TÜYLÜ, B., *Bazı İlaç Öncül Maddelerinin Mutajenik Etkilerinin Bakteriyal ve Hücre Kültürü Testleri ile Araştırılması* Tez (doktora) – Anadolu Üniversitesi (2001).
- [37] ABOU – EISHA, A., CREUS, A. ve MARCOS, R., *Genetic Evaluation of the Antimicrobial Drug, Trimethoprim in Cultured Human Lymphocytes*, Mutation Research, Gen. Tox. Environ. Mut., **440**, 157 – 162 (1999).

- [38] FENECH, M., *The in vitro Micronucleus Technique*, Mutation Research, Found. Mol. Mec. Mut., **455**, 81 – 95 (2000).
- [39] NORPPA, H., FLACK, M. ve GHİTA, C., *What Do Human Micronucleus Contain*, Mutagenesis, Vol. **18 (3)**, pp 221 (2003).
- [40] TROSKO, J. E., *Challenge to the Simple Paradigm That ‘Carcinogens’ are ‘Mutagens’ and to the In Vitro And In vivo Assays Used to Test The Paradigm*, Mutat. Res., **373**, 245 – 249 (1997).
- [41] GRIFFOLL, M., SOLANAS, A. M. ve BAYONA, J. M., *Characterization of Genotoxic Compounds in Sediments by Mass Spectrometric Techniques Combined With Salmonella / Microsome Test*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., **19**, 175 – 184 (1990).
- [42] KASAMATU, T., KOHDA, K. ve KAWAZOA, Y., *Comparison of Chemically Induced DNA Breakage in Cellular and Subcellular Systems Using the Comet Assay*, Mutat. Res., **369**, 1 – 6 (1996).
- [43] HAMASAKI, T., SATO, T., NAGASE, H. ve KİTO, H., *The Genotoxicity of Organotin Compounds in Sos Chromotest and Rec – Assay*, Mutat. Res., **280**, 195 – 203 (1992).
- [44] JARVIS, A. S., HONEYCUTT, M. E., Mc FARLAND, V. A., BULİCH, A. A. ve BOUNDS, H. C., *A Comparison of the Ames Assay and Mutatox in Assessing the Mutagenic Potantial of Contaminated Dredged Sediment*. Ecotoxicology and Envirinmrntal Safety, **33**, 193 – 200 (1996).
- [45] ABE, A. ve URANO, K., *Influence of Chemicals Commonly Found in a Water Environment on the Salmonella Mutagenicity Test*. The Science of The Totaş Environment, **153**, 169 – 175 (1994).
- [46] ALZUET, P. R., GASPES, E. ve RONCO, A. E., *Mutagenicity of Enviromental Samples From an Industrialized Area of The Rio De La Plata Estuary Using the Salmonella / Microsomal Assay*, Environ. Toxicol. Water Quality., Vol. **11**, 231 – 236 (1996).
- [47] LEE, H., BIAN, S. S. ve CHEN, Y. L., *Genotoxicity of 1, 3 – dithiane and 1,4 – dithiane in the CHO / SCE Assay and the Salmonella / Microsomal Assay*, Mutat. Res., **312**, 213 – 218 (1994).

- [48] FORSTER, R., BLOWERS, S. D., CİNELLİ, S., MARQUARDT, H. ve WESTENDORF, J., *Mutagenicity Testing of İmidazoleand Realed Compounds*, Mutat. Res., **292**, 71 – 79 (1992).
- [49] FRANCISSO, M. N., LEONE, R., BRUNELLO, F., MONOSTRA, C., TEZZA, F. ve STORTI, P. W., *Mutagenic Activity in Waster Concentrates From Dye Plants*, Mutat. Res., **298**, 91 – 95 (1992).
- [50] UENOBE, F., NAKAMURA, S. I. ve MİYAZAWA, M., *Antimutajenic Effect of Reveratrol Agaist Trp – P – I*. Mutat. Res., **373**, 197 – 200 (1997).
- [51] KUSAMRAN, W. R., WAKABAYASHİ, K., OGORİ, A., TEPSUWAN, A., NAGAO, M. ve SUGİMURA, T., *Mutagenicities of Bangkok and Tokyo River Waters*, Mutat. Res., **325**, 99 – 104 (1994).
- [52] WAGNER, E. D., WASİLEWSKA, A. C., CONNOLLY, S. ve PLEWA, M. J., *Mutagenic Analysis of 2, 3 – Diaminophenazine and 2 – Amino – 3 Hydroxyphenazine in Salmonella Strains Expressing Different Levels of O – Acetyltransferase With And Without Plannt And Mamalian Activation*, Mutat. Res., **372**, 65 – 74 (1996).
- [53] LEONARD, A. ve GERBER, G. B., *Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity of Antimony Compounds*. Mutat. Res., **366**, 1- 8 (1996).
- [54] GUPTA, R. L., VATS, V. ve JUNEJA, T. R., *Activation of Tinidazole, an Antiprotozoal Drug to a Mutagen by Mamalian Liver S9*. Mutat. Res., **371**, 195 – 201 (1996).
- [55] NAKAMURO, K., VENO, H. ve SAYATO, Y., *Evaluation of Mutagenicity of Municapal River Water Concentrated Using XAD Resin Column Method*, Water Sciences Technology, **25 (11)**, 293 – 299 (1992).
- [56] GUZZELLA, L., FERFETTI, D. ve MONARCA, S., *Advancer Oxidation and Adsorbtion Technologies for Organic Micropollutant Removal From Lake Water Used as Drinking Water Supply*, Water Research, 1 – 13 (2002).
- [57] RAO, S. S., BURNISON, B. K., ROBOSH, D. A., TAYLOR, L. M., *Mutagenicity and Toxicity Assessment of Pulp Mill Effluent*, Chemosphere, **28 (10)**, 1859 – 1870 (1994).

- [58] KATAOKA, H., HAYATSU, T., HIETSCH, G., STEINKELLER, H., NISHIOKA, S., NARIMATSU, S., KNASMULLER, S. ve HAYATSU, H., *Identification of Mutagenic Heterocyclic Amines (IQ, Trp – P – I and AaC) in the Water of the Danube River*, Mutat. Res., **466**, 27 – 35 (2000).
- [59] NOBUKAWA, T. ve SANUKIDA, S., *Contributions of Genotoxic Precursors From Tributary Rivers and Swage to the Yodo River in Japan*, Water Research, **36**, 989 – 995 (2002).
- [60] 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).
- [61] ÖLÇEN, N., *Bor Madeninin Enerji Alanındaki Önemi*, Uludağ Üniversitesi Makine Müh. , Yüksek lisans Tezi, (2001).
- [62] [http:// www.science.ankara.edu.tr](http://www.science.ankara.edu.tr)
- [63] [http:// www.etimaden.gov.tr](http://www.etimaden.gov.tr)
- [64] *Beyaz Altın Bor*, Su Dünyası Dergisi, Sayı. **16**, 26 – 31 (2004).
- [65] YILMAZ, A., *Her Derde Deva Hazinemiz Bor*, TÜBİTAK-Bilim ve Teknik Dergisi, Ankara, Mayıs (2002).
- [66] GARRETT, D., *Borates: Handbook of Deposits, Processing, Properties and Use*, San Diego Academic Press (1998).
- [67] [http:// www.usgs.gov.tr](http://www.usgs.gov.tr)
- [68] DPT, *VIII. Beş Yıllık Kalkınma Planı-Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Raporu*, Devlet Planlama Teşkilatı, Ankara (1999).
- [69] <http://www.maden.org.tr/yeni3/yayinlar/raporlar/borraporu.htm> (Türkiye Mühendis ve Mimarlar Odaları Birliği-TMMOB Bor Raporu)
- [70] ÇINKI, M. M., *Petrol'den Bor'a*, Eskişehir Ticaret Odası Dergisi, Sayı **93** (21) , 31 - 41 (2004).
- [71] [http:// www.etiholding.gov.tr](http://www.etiholding.gov.tr)
- [72] [http:// www.boraxtr.com/boraxtr/Anadosya/bormadennedir.html](http://www.boraxtr.com/boraxtr/Anadosya/bormadennedir.html)
- [73] NIELSEN, F. H., *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements*, Marcel Dekker, New York (1997).
- [74] [http:// www.efsa.u.int/science/nda/nda_opinions/catindex_en.html](http://www.efsa.u.int/science/nda/nda_opinions/catindex_en.html)

- [75] SAYLI, B. S., TUCCAR, E. ve ELHAN, A. H., *An Assessment Of Fertility In Boron – Exposed Turkish Subpopulations*, *Reprod Toxicol*, **12**, 297 – 304 (1998).
- [76] [http:// www.biltek.tubitak.gov.tr/merak_ettikleriniz/index.php](http://www.biltek.tubitak.gov.tr/merak_ettikleriniz/index.php)
- [77] ASAD, A., BLAMEY, F. P. C. ve EDWARDS, D. G., *Effects of Boron Foliar Applications on Vegetative and Reproductive Growth of Sunflower*, *Annals Of Botany*(2003).
- [78] SHIRODKAR, P.V., XIAO, Y. K. ve HAI, L., *Boron and Chlorine Isotopic Signatures of Seawater in the Central Indian Ridge*, *Current Science*, Vol. **85 (3)**, 313 – 320 (2003).
- [79] DEMUTH, N., HEUMANN, K. G. , *Determination of Trace Amounts of Boron in Rainwater by ICP – IDMS and NTI – IDMS and the Dependence on Meteorological and Anthropogenic Influences*, *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**, 1149 – 1453 (1999).
- [80] HERA, C. ve PUEYO, C., *Response of the L – Arabinose Forward Mutation Assay of Salmonella typhimurium to Frameshift – Type Mutagens*, *Mutat. Res.*, **203**, 39 – 45 (1988).
- [81] HACKMAN, J. R., *Boron Needs Of Soil And Crops In New Jersey*, *Fect Sheet* 873
- [82] [http:// www.bormadeni.com](http://www.bormadeni.com)
- [83] US EPA, IRIS – online. Cincinnati, Ohio, US. *Enviromental Protection Agency, Environmental Criteria and Assessment Office* (1994).
- [84] BIN HO, S., *Boron Deficiency Of Crops In Taiwan*, ROC, Taiwan, 203 – 218 (2001).