

Pyridaben aktif maddesinin Ames *Salmonella*/Mikrozom Metodu ile Mutajenitesinin Değerlendirilmesi

***Makale Bilgisi / Article Info**

Alındı/Received: 28.11.2024

Kabul/Accepted: 27.01.2025

Yayımlandı/Published: 04.08.2025

Assessment of Mutagenicity of Pyridaben by Ames *Salmonella*/Microsome Method

Dilek AKYIL* 

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Afyonkarahisar, Türkiye



© 2025 The Author | Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 (CC BY-NC) International License

Öz

Bu çalışmanın tarım alanında akarisit ve insektisit olarak kullanılan ve pyridaben (Pyridaben 20%WP) aktif maddesinin Ames/*Salmonella* mikrozom testi ile mutajenitesinin değerlendirilmesi olup çalışma S9 fraksiyon varlığı ve yokluğunda olmak üzere iki aşamalı olarak planlanmıştır. Deneyde *Salmonella typhimurium*'a ait en yaygın çalışılan iki suş olan TA100 ve TA98 mutant suşları kullanılmış olup uygulama öncesinde test maddelerinin sitotoksik dozları belirlenmiş ve deney için sitotoksik olmayan 5 farklı doz uygulaması yapılmıştır. Mutajenik aktiviteyi belirlemek amacıyla pyridaben'in 800, 400, 200, 100, 50 ve 25 µg/plak dozları çalışılmış olup bulgular Dunnett-t testi kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiş ve veriler negatif kontrol değerleri ile kıyaslanarak değerlendirme yapılmıştır. Test bulgularına göre; pyridaben'in yalnızca 800 µg/plak dozunun hem S9 fraksiyonu varlığında hem de aynı dozun S9 fraksiyonu yokluğunda her iki suşta da mutajenik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler Ames testi; Akarisit; İnsektisit; Mutajenite, Pestisit

Abstract

This study is to evaluate the mutagenicity of pyridaben (Pyridaben 20%WP), which is used as an insecticide and acaricide in agriculture, by Ames/*Salmonella* microsome test and the study was planned in two stages as in the presence and absence of S9 fraction. In the study, the two most widely studied strains of *Salmonella typhimurium*, TA98 and TA100 mutant strains, were used and the cytotoxic doses of the test substances were determined before the application and 5 different non-cytotoxic doses were applied for the experiment. In order to determine the mutagenic activity, pyridaben doses of 800, 400, 200, 100, 50 and 25 µg/plate were applied and the data were evaluated statistically using Dunnett's-t test and the data were compared with the negative control values. According to the test findings; it was determined that only 800 µg/plate dose of pyridaben showed mutagenic activity in both strains both in the presence of S9 fraction and in the absence of S9 fraction at the same dose.

Keywords Ames test; Acaricide; Insecticide; Mutagenicity, Pesticide

1. Giriş

Pestisitler, hızlı etkileri, kolay kullanımları ve ekonomik olmaları nedeniyle zararlı yönetiminde tarımda yaygın olarak faydalanan maddelerdendir. Ancak, pestisitlerin yanlış veya bilinçsiz kullanımı bitkilere, çevreye, yaban hayatına ve halk sağlığına oldukça ciddi zararlar verebilir. Çünkü tarımsal üretimde kullanılan pestisitler genellikle tüketilen meyve ve sebzeler üzerinde kalıntılar bırakmaktadır ve mahsullerin kirlenmesi günümüzün önemli sorunlarından biri haline gelmiştir. Pestisitlere maruz kalma, kısa vadede mide bulantısı ve baş ağrısı gibi sağlık sorunlarına neden olabilir. Ayrıca, nörotoksikite, sitogenetik hasar, kısırlık ve endokrin sistem sorunları kronik olarak ortaya çıkabilir (Baldi vd. 2001) ve uzun vadede lösemi, Hodgkin dışı lenfoma, beyin, kemik, meme, yumurtalık, prostat, testis ve

karaciğer kanserleri ortaya çıkabilir (Cantor vd. 1992). Bu nedenle, pestisit bakımından ürünlerin sağlık risk değerlendirmesinin yapılması çok önemlidir. Türkiye'de birçok pestisit için kalıntı değerlendirilmeleri yapılmış olup aynı zamanda genotoksik potansiyelleri açısından da yapılan çalışmalar artmasına rağmen, sağlık risk değerlendirmesi üzerine yapılan çalışmalar halen istenen düzeyde değildir.

Pyridaben aktif maddesi, salatalık, patlıcan, domates, biber gibi sebzeler, elma ve turuncgiller üzerindeki birçok akar ve böceğe karşı tarımda sık kullanılan bir insektisit-akaristittir (Rand ve Clark 2000). Pyridazinone grubu pestisitler içerisinde yer alan pyridaben (Yu 2008) akarlar ve böceklerde mitokondriyal elektron taşıma zincirindeki Kompleks I'ı engelleyerek işlev görür (Bose ve Beal 2016) ve Dünya Sağlık Örgütü'nün pestisitlerin tehlikeye göre

sınıflandırılmasında pyridaben orta derecede tehlikeli (Sınıf II) bir pestisit olarak sınıflandırılmaktadır (Dünya Sağlık Örgütü, 2020). Balkan ve Kara (2022)'nin Tokat ilinde üretilen bazı sebzelerde pestisit kalıntılarını taradıkları çalışmada pyridaben konsantrasyonları Avrupa Birliği Maksimum Kalıntı Limitleri'nin belirlediği doz aralığının üstünde çıkmıştır. Kanbolat vd. (2023) tarafından yine Tokat'ta yapılan diğer bir çalışmada ise bazı meyvelerdeki pestisit kalıntılarının belirlenmesi için gerçekleştirilen çalışmada elmalarda pyridaben seviyesinin doz aralığının üstünde olduğu saptanmıştır. Zhang vd. (2005), turuncgillerdeki pyridaben kalıntılarının dinamik değişimini incelemiş ve farklı deney alanlarında portakaldaki pyridaben'in yarı ömrünün 11,9 ila 24,9 gün arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Ma vd. (2007) elmalardaki pyridaben kalıntı dinamiklerini incelemiş ve elmadaki pyridaben'in yarı ömrünün 7,3 gün olduğunu göstermişlerdir. Chen vd. (2011) muzdaki pyridaben kalıntılarının dağılma dinamiklerini belirlemiş ve yarı ömrün 2,8 ila 2,9 gün arasında değiştiğini saptamışlardır.

Gomez vd. (2007)'nin yaptıkları çalışmada Kompleks I'in pyridaben tarafından seçici olarak engellenmesinin, Parkinson hastalığının patojenik mekanizmasının bir parçası olabileceği rapor edilmiştir. Aynı zamanda pyridaben'in domuzlarda erken gebelikte embriyonik kayba neden olabileceği saptanmıştır (Bae vd. 2021), Pyridaben karides (*Mysidopsis bahia*), mavi güneş balığı (*Lepomis macrochirus*), gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ve zebra balığı (*Danio rerio*) gibi suda yaşayan organizmalar için oldukça toksiktir (Rand ve Clark 2000; Ma vd. 2021a). Bal arıları ve yırtıcı akarlar gibi hedef olmayan eklembacaklılar için, pyridaben'in tehlike katsayısı değerleri tetikleyici değerlerin önemli ölçüde üzerinde saptanmıştır (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi 2010). Ayrıca pyridaben uygulaması, *Euseius scutalis*'in yumurtalarında, larvalarında ve yetişkinlerinde yüksek ölüm oranlarına neden olmuş ve sıklıkla kullanılan akarisitler arasında yetişkin dişilerin doğurganlığını olumsuz yönde etkilemiştir (Döker ve Kazak 2020).

Mutasyona neden olan kimyasal maddelerin tespiti son yıllarda o maddenin risk değerlendirmesinde önemli bir parametre haline gelmiş olup, bu tür kimyasallar üreme sorunlarına yol açmakta ve gelecek nesillerde çeşitli sorunlara neden olmaktadır. Bu maddelerin aynı zamanda kansere neden olma potansiyelleri de olup, bu aşamada mutajenite testleri önem kazanmaktadır (Moulas vd. 2013).

Yaşam standartlarındaki artış, son yıllarda tarım ürünlerindeki pestisit kalıntıları ve bu maddelerin

potansiyel genotoksik etkileri konusunda da farkındalığı artırmıştır. Güvenli pestisit kullanımının sağlanması ve risk değerlendirmelerinin yapılması Türkiye'nin tarım ürünü ihracatını teşvik etmede de oldukça önemlidir. Pestisitlerin genotoksik açıdan değerlendirilmesi hem yerel tarımsal kalkınma hem de tüketicilerde farkındalık yaratmak açısından önemlidir. Daha önceki çalışmalar bazı pestisitlerin farklı biyolojik test sistemlerinde klastojenik ve mutajenik olduğunu göstermiştir (Moulas vd. 2013, Özkara 2017, Akyl 2021, Özkara 2022). Ames testi çeşitli kimyasal maddelerin mutajenik ve antimutajenik etkilerinin belirlenmesinde önemli bir test yöntemi olup, genotoksitenin tespitinde %90'ın üzerinde etkiye sahiptir (Kauffmann vd. 2020). Yaygın kullanım alanına sahip olan pyridaben her ne kadar pestisit kalıntısı bakımından araştırılmış olsa da bu etken maddenin mutajenitesi hakkında literatüre rastlanmamıştır.

Pestisitlerin sadece hedef organizmalar üzerinde değil aynı zamanda hedef olmayan canlılar üzerindeki olumsuz etkileri ve ekosisteme olan zararları dünya genelinde bilinen bir gerçektir. Son yıllarda insektisit ve akarisitlerin artan kullanımı Ames testi yoluyla hedef dışı canlılar üzerindeki potansiyel risk etkilerini göstermek açısından oldukça önemlidir. Bu çalışmada tarımda sıklıkla kullanılan pyridaben etken maddesinin Ames/Salmonella mikrozom testi ile mutajenitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Test Suşları ve Kimyasallar

Deneyde, *Salmonella typhimurium* TA100 ve TA98 suşları uygulanmış (Maron ve Ames 1983) olup TA98 çerçeve kayması mutasyonlarına sebep olan mutajen ajanların, TA100 suşu ise baz çifti değişimine neden olan mutajen ajanların belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Çalışmada %20 pyridaben aktif maddesi içeren Puzzle 20 WP'nin ticari preparatı Afyonkarahisar'da bitki koruma ürünleri bayisinden alınmıştır. Deney Sprague Dawley cinsi ratlardan alınmış olan karaciğer homojenatı ile S9 varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiş olup S9 fraksiyonu ticari olarak temin edilmiştir (Sigma-Aldrich-S2067).

2.2. Metod

Puzzle 20 WP insektisit ve akarisinin test dozları deney sırasında taze bir şekilde steril distile su ile hazırlanmış olup çalışmada bu pestisite ait altı ayrı doz (800, 400, 200, 100, 50 ve 25 µg/plak) uygulandı. Dean vd. (1985)'un çalışmasına göre sitotoksik doz belirlemesi gerçekleştirilmiş olup bunun için deney öncesinde bir ön

uygulama kuruldu ve bulunan değerler deney sırasında altı farklı doz şeklinde uygulandı. Çalışmada kullanılacak olan test suşları Mortelmans ve Zeiger (2000)'a göre belirlendi ve suşların genotipleri deneyin güvenilirliği açısından çalışma öncesi kontrol edildi. Mutant bakteri suşlarının spontan his- durumundan his+ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkün olup bu sınırlar; TA100 için 75-200 revertant/plak, TA98 için ise 25-50 revertant/plaktır. Bu çalışmadaki değerler ön çalışma sonucunda bu sınırlar içerisinde bulundu. Çalışma Ames standart plak inkorporasyon testi ile *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanarak metabolik aktivasyon yokluğunda ve varlığında olmak üzere iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiş olup bu deney Maron ve Ames (1983) metoduna göre uygulanıldı. Çalışılmış olan her doz paralel 3 tekrarlı olacak şekilde planlandı ve birbirinden bağımsız iki ayrı deney gerçekleştirildi. Deney sırasında suşlara uygun olarak seçilen pozitif kontroller de uygulanmış olup çıkan değerler negatif kontrol ile kıyaslanıp mutajenite açısından değerlendirildi.

2.3. Spontan geriye dönüş sıklığının kontrolü

Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his- durumundan his+ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 98 için 20-50 revertant/plak; TA 100 için 75-200 revertant/plaktır. Bu test için, 37 °C'de, NB'da büyütülen bir gecelik kültürden 0.1 ml alınıp, 45 °C'deki su banyosunda tutulan 0.25 ml 0.5 M histidin-biyotin solüsyonu içeren 2.5 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılmış ve 37 °C'de 48-72 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır.

2.4. Sitotoksik Dozun Belirlenmesi

Uygulanan bileşiğin toksik olmayan dozları Dean ve arkadaşlarının (Dean vd. 1985) metoduna göre belirlendi ve sitotoksik olmayan 6 farklı konsantrasyon test edildi. Bu bileşiklerin, TA98 ve TA100 suşları için öldürücü dozunun saptanması amacıyla 2 ml top agara 100 µl bakteri kültürü ile 100 µl farklı dozlarda test maddesi ilave edildi. Tüplerdeki bu karışım 3 farklı nütrient agar plağına eklenerek plaklar 37°C'de lik bir inkübatörde 24 saatlik süre ile inkübasyona alındı. İşlem sonrası plaklarda üreyen ortalama koloni sayısı sayılarak negatif kontrol grubu ile kıyaslandı ve toksik olan ve olmayan konsantrasyonlar saptandı. Mutajenik aktivite çalışması sırasında toksik dozun altındaki dozlarla deney gerçekleştirildi.

2.5. Ames Plak İnkorporasyon Testi

Pyridaben aktif maddesinin mutajenik aktivitesini belirlemek için, *S. typhimurium*'un TA100 ve TA98 suşları kullanılarak S9 karışımı yokluğunda ve varlığında plak inkorporasyon metodu uygulandı (Maron ve Ames 1983). Pyridaben'in test konsantrasyonları (800, 400, 200, 100, 50 ve 25 µg/plak) Dean ve arkadaşları (1985)'na göre bir ön çalışmayla belirlendi. Suşlar, çalkalamalı inkübatörde 16 saat boyunca 37°C'de tutuldu. Uygulamaya paralel olarak pozitif kontroller de kullanıldı. S9 fraksiyonu olmayan analizler için su banyosunda (45°C) bekletilen ve 2 ml top agar olan deney tüplerine sırasıyla 100 µl bakteri suşları ve 100 µl pestisit farklı dozları ilave edildi. Tüpler tek tek vortekslenip homojen şekilde dağılımları sağlanarak minimal glukoz agar plaklarına ekildi ve sıvının plak üzerine eşit bir şekilde dağılması sağlandı.

Ames testinde S9 fraksiyonu için yapılan deneyin ikinci aşamasında ise bu karışım içine 500 µl S9 karışımı eklendi ve petri üzerindeki sıvı karışım top agarla birlikte donduktan sonra 37°C'de 48-72 saat kadar inkübe edildi ve inkübasyonun sonunda geri dönen koloniler kaydedildi. Çalışma her pestisit konsantrasyonu için üç tekrarlı uygulandı ve iki ayrı uygulama tasarlandı ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek kontrol grubuyla kıyaslandı.

265. Verilerin İstatistiksel Analizi

Ames testinde pyridaben'in mutajenitesini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışma sonunda istatistiksel analizler SPSS 18.0 for Windows paket programı ile Dunnett-t testi (2 yönlü) uygulanarak değerlendirildi ve verilerin ortalamaları arasındaki $p < 0.05$ düzeyindeki farklılıklar da göz önünde bulunduruldu.

3. Bulgular

Ames testinin temeli, yapay mutasyonla histidin sentezleyemeyen *Salmonella typhimurium* suşlarının test bileşeninin ilavesi ile ikinci bir mutasyon geçirerek histidin sentezleyebilme yeteneği kazanması esasına dayanmaktadır (Ames vd. 1973, Flückiger-Isler vd. 2004). Ames testinde değerlendirme yapılırken uygulanan her doz negatif kontrol grubuyla kıyaslanır ve kontrol grubunun koloni sayısının iki katına çıkan değerler mutajenik şeklinde rapor edilir. Eğer sayılan koloniler doza bağlı bir şekilde artış gösterirse bu da uygulanan maddenin zayıf mutajenik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Mortelmans ve Zeiger 2000). Deneye ait Ames testi sonuçları Çizelge 1'de sunulmuştur. Çalışılan *Salmonella* suşlarının his- fenotipinden his+ fenotipine

dönüşmesi, yani histidin sentezleyebilme yeteneği belirli sınırlar içerisinde mümkündür. Bu çalışmaya ait sonuçlar kullanılan her iki suş için de bu değerler arasında saptanmıştır. Ayrıca çalışma öncesinde suşların mutant olup olmadığını tespit etmek amacıyla suşların genotip kontrolleri yapılmış ve test suşlarının orjinal mutasyonlara sahip olduğu belirlenmiştir. Ames (1973)'e göre mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his- durumundan his+ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 98 için 20-50 revertant/plak; TA 100 için 75-200 revertant/plaktır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sayılar bu değerler arasındadır. Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre TA 98 için ortalama revertant koloni sayısı S9 fraksiyonu varlığında 68.42 ± 9.28 , yokluğunda ise 42.15 ± 3.14 bulunmuştur. TA 100 için ise ortalama revertant koloni sayıları S9 fraksiyonu varlığında 156.32 ± 8.52 iken S9 fraksiyonu yokluğunda 72.33 ± 7.25 olarak bulunmuştur.

Revertant sayısındaki değişiklikler her iki suşun hem S9 fraksiyonu varlığında hem de yokluğunda kontrol grubuna göre azalmış olup bu azalmalar istatistiksel açıdan anlamlıdır.

Uygulanan tüm konsantrasyonlar hem TA98 hem de TA100 suşlarında en yüksek dozda mutajenik etki göstermiş olup geri dönen koloni sayısındaki artış her iki suşta da doza bağlı olarak artış göstermiştir. Ayrıca, negatif kontrolde kendiliğinden geri dönen koloni miktarının, test materyalinin uygulanan tüm dozlarından daha az olduğu saptanmıştır. Ek olarak, pozitif kontrol plakları iki suşta da kendiliğinden mutasyon oranında önemli bir artışa neden olmuştur. Sonuç olarak Puzzle 20 WP'nin Ames testi ile uygulanan her iki suş için de 800 µg/plak dozlarında S9 fraksiyonu yokluğunda da varlığında da mutajenik aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.

Çizelge 1. Pyridaben aktif maddesinin *S. typhimurium* TA100 ve TA98 suşları ile S9 karışımı yokluğunda ve varlığında mutajenik aktivitesi

Madde	Doz (µg/plak)	Revertant Sayısı			
		Aritmetik Ortalama ± Standart Sapma		TA100	
		- S9	+ S9	- S9	+ S9
Pyridaben	800	$98.42 \pm 5.45^*$	$152.21 \pm 7.24^*$	$164.32 \pm 8.21^*$	$326.32 \pm 11.20^*$
	400	80.75 ± 6.24	128.32 ± 6.23	134.41 ± 7.68	258.32 ± 22.32
	200	79.31 ± 4.10	125.35 ± 4.42	132.60 ± 3.44	248.41 ± 10.29
	100	75.63 ± 4.03	98.35 ± 4.24	92.11 ± 6.43	198.45 ± 9.43
	50	54.24 ± 3.58	84.22 ± 3.51	85.42 ± 5.65	181.15 ± 8.21
	25	45.55 ± 4.26	76.42 ± 5.48	75.22 ± 5.68	162.43 ± 7.44
Negatif Kontrol (dH ₂ O)	100	42.15 ± 3.14	68.42 ± 9.28	72.33 ± 7.25	156.32 ± 8.52
SA	10			$2825.45 \pm 42.15^*$	
2AA	5				$2423.21 \pm 39.14^*$
2AF	200		$1228.24 \pm 12.35^*$		
NPD	200	$1441.22 \pm 34.52^*$			

*Kontrol grubuna göre revertant sayısı $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı) *:mutajen, NPD: 4-nitro-o-fenilendiamine, SA: Sodyum azid, 2AF: 2-aminofluorene, 2AA: 2-aminoanthracene

4. Tartışma

Tarımsal zararlıları kontrol etmek için pestisitlerin yaygın kullanımı, gıda zincirinde kalıntıların bulunmasına sebep olmakta ve tüketiciler bu kimyasalların düşük seviyelerine günlük olarak maruz kalabilmektedirler. Son zamanlarda, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), 2008 yılında Avrupa Birliği genelinde analiz edilen 67.887 gıda örneğinin %46.7'sinde pestisit kalıntılarının tespit edildiğini bildirmiştir (EFSA 2010). Son yirmi yılda yayınlanan birkaç epidemiyolojik çalışma, pestisitlerin insan sağlığı üzerindeki zararlı etkilerini, pestisit kullanımı ile Hodgkin dışı lenfoma, lösemi ve çeşitli katı tümör tipleri gibi kanserler arasındaki olası bir ilişki de dahil olmak üzere öne sürmektedir. Bu etkilerin çoğu mesleki

maruziyetlerle ilişkilendirilmektedir (Merhi vd. 2007, Weichenthal vd. 2010). Bununla birlikte, genel popülasyonda çok düşük dozda pestisitlere yaşam boyu maruz kalma ile benzer ilişkilerin olup olmadığı bilinmemektedir. Bunun yanı sıra pestisitlerin son yıllarda katlanarak piyasaya sunulması ve bilinçsiz bir şekilde kullanılması bu maddelerin mutajenik ve genotoksik açıdan herhangi bir etkiye sahip olup olmadıkları sorusunu akla getirmektedir. Bu bağlamda hedef dışı canlılar üzerindeki olumsuz etkilerini de incelemek amacıyla son yıllarda bu konuda çok fazla araştırma yapılmaktadır.

Ames testi, Dr. Bruce Ames tarafından literatüre kazandırılmış olan ve çeşitli kimyasal maddelerin

mutajenik aktivitelerinin araştırılmasında sıklıkla kullanılan, güvenilir, ekonomik, geçerliliği yüksek ve mutajen-karsinojen etkisi en iyi bilinen kısa sürede cevap veren bakteriyel test sistemlerinden biridir (Maron ve Ames 1983). Ames testinde, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini belirlemek için kullanılmak üzere *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla elde edilmiş bakteriyel mutantlar (TA98, TA100, TA102, TA1535 ve TA1537 gibi) kullanılmaktadır (Maron ve Ames 1983). Bu suşlarda histidin sentezlenmeden, büyüme ve koloni oluşumu gerçekleşemez. Suşlar şüpheli kimyasalla muamele edildikten sonra, histidin üretebilmekte ve koloni oluşturmak üzere büyümektedirler (Maron ve Ames 1983, Kumar et al. 2013). Çalışmada, pyridaben'in farklı dozlarıyla yapılan Ames testi, hem TA98 hem de TA100 suşlarında en yüksek doz olan 800 µg/plak konsantrasyonunda mutajenite göstermiştir. *S. typhimurium* TA98 suşu, hisD3052 alelinde -1 delesyonundan oluşan çerçeve kayması mutasyonlarına sahiptir. Bu alel, çerçeve kayması mutajenleri tarafından geri döndürülebilir. TA100 suşunda baz çifti değişimi sonucunda hisG46 aleli, vahşi tip CTC kodonu (prolin) yerine bir CCC kodonundan (lösin) oluşur. Bu mutasyon, G-C çiftlerinde baz değişimine neden olan mutajenler tarafından geri döndürülebilir (Di Sotto et al. 2008). Bu bakteriyel özellikler bağlamında, sonuçlara bakıldığında TA98 suşunda pyridaben'in mutajenitesinin çerçeve kayması mutasyonlarından, TA100 suşunun mutajenitesinin ise baz değişiminden kaynaklandığı düşünülmektedir (Di sotto vd. 2008).

Geçmişten günümüze pyridaben grubu pestisitler üzerinde farklı mikroorganizmalar ile çok sayıda çalışma yapılmıştır. Pyridaben'in *Escherichia coli* ile yapılan bir çalışmada DNA hasarı üzerinde hiçbir etki göstermediği saptanmıştır (Igarashi ve Sakamoto 1994). Laboratuvar çalışmaları pyridaben'e sürekli 48 ila 96 saatlik maruziyetin balıklar (*Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas*, *Oncorhynchus mykiss*, *Cyprinodon variegatus*) ve omurgasızlar (*Daphnia magna*, *Mysidopsis bahia*) için akut olarak toksik olduğunu göstermektedir. Pyridaben *Allium testinde* ise kök büyümesini ve mitotik indeksi istatistiksel olarak azaltarak sitotoksik etki, kromozom aberasyonları (bozulmuş ana-telofaz, kalgın kromozom, yapışıklık, köprü ve poliploidi) ve DNA hasarını istatistiksel olarak artırarak genotoksik etki göstermiştir (Liman 2019). Dönbak (2017) yaptığı bir çalışmada insan periferik lenfositlerinde pyridaben'in 40, 20, 10 ve 5 µg/mL dozlarını çalışmış ve bu dozların kardeş kromatid

değişimini, kromozom aberasyonlarını ve mikronükleus oluşumunu tetiklediğini ve bu dozlarda genotoksik etki gösterdiğini saptamıştır (Dönbak 2017). Bir başka çalışmada ise pyridaben'in EW36 ve ST486 hücre hatları üzerinde apoptozisi indüklediği tespit edilmiştir (Bloom vd. 2005). Audenaert vd. (2014) yaptıkları çalışmada, sentetik piretroitli bileşiklerin akarlar karşı çok toksik olduğunu pyridaben'in ise daha az zararlı olduğunu bildirmişlerdir. EFSA (2010)'ya göre ise pyridaben'in nörotoksik, karsinojenik, genotoksik ya da üreme açısından toksisite göstermediği rapor edilmiştir. Igarashi ve Sakamoto (1994) yapılan akut çalışmalar sonucunda pyridabenin orta ila düşük toksisiteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. N27 hücrelerine uygulanan pyridaben'in reaktif oksijen seviyelerinin (ROS) oluşumunu indüklediği (Charli vd. 2016), Balb/C fareleri ile yapılan bir çalışmada DNA hasarını artırmasının yanı sıra yine kromatin anormalliklerine de neden olduğu (Manas vd. 2013a), ayrıca ROS seviyelerini (Manas vd. 2013b, 2014) de istatistiksel bakımdan artırdığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler literatüre uyumlu bulunmuş olup pyridaben yüksek dozlarda kullanıldığında mutajenik aktivite göstermektedir. Tüm bu çalışmalar sonucunda pyridaben'in oluşturduğu DNA hasarının mitokondriyal elektron taşıma zincirindeki Kompleks I'in inhibe edilerek ROS seviyesinin artış göstermesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (ST-Pierre vd. 2002, Chen vd. 2003).

S. typhimurium TA 98 suşu ile yapılan çalışmada uygulanan tüm dozların S9 varlığında elde edilen ortalama revertant koloni sayılarının S9 yokluğundaki revertant koloni sayılarına göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuca TA 100 suşu ile yapılan çalışmalar sonucunda da rastlanılmıştır. Buna dayanarak test edilen maddenin de canlı vücuduna girdiğinde metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan metabolitlerinin DNA ile etkileşimini bir miktar artırdığı düşünülebilir ancak mutajenite açısından yine de çok büyük bir fark oluşturmamıştır. Ayrıca düşük dozdan yüksek doza doğru giderken doza bağlı bir artış gözlenmiş ve bu artışın en yüksek doz olan 800 µg/plakta mutajenik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Kimyasal maddelerin genotoksik etki gösterip göstermemeleri çeşitli etkenlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Özellikle test materyalinin bakteri hücre duvarını aşmış olması doğrudan DNA ile etkileşime gireceğini gösteren bir parametre değildir. Bileşik sitoplazma içine girse bile bakteri genomunda bulunan spesifik bağlanma bölgeleriyle bir bağlantı sağlayamayabilir. Bu nedenle, bileşik hücre içerisine girmiş olsa bile DNA ile etkileşim gerçekleşmeyebilir

(Kayaalp 1995). Bu durumda DNA ile bağlantıya geçmemiş bir ajanın mutajenitesinden bahsedilemez. Ayrıca uygulanan test bileşeninin kimyasal yapısı da hücre içerisine girdikten sonrası için önemlidir. Kimyasal maddelerin yapısında bulunan halkalar, yan zincirler, bağlanma konumları, kimyasal maddenin niteliği, grup sayıları ve pozisyonları mutajenik aktivitenin değerlendirilmesi açısından oldukça önemlidir (Öztaş 2005). Aynı zamanda pestisitlerin vücuda giriş yolları, yağda çözünürlük oranı, pestisite temas süresi ve maddenin vücutta hidroliz olma kapasitesi gibi birçok neden de toksisite üzerinde belirleyici etkiye sahiptir (Namba vd. 1972; Vural 1996). Tüm bu parametreler göze alındığında bir maddeye mutajenik denilebilmesi için birçok değer gözden geçirilmesi gerektiği kaçınılmazdır.

Sonuç olarak, çalışmada pyridaben'in Ames testi ile mutajenik aktivitesi araştırılmış olup hem TA98 hem de TA100 suşu ile yapılan uygulamalarda S9 fraksiyon varlığı ve yokluğunda bu maddenin yüksek dozlarda mutajenik olduğu tespit edilmiştir. Ames testi sadece bir bakteriyel test sistemi değil aynı zamanda S9 fraksiyonu ile birlikte ökaryotik canlılar üzerinde de fikir sahibi olabileceğimiz bir yöntem olması açısından oldukça güncel bir metottur. Pestisitler sadece hedef değil, hedef olmayan organizmalar üzerinde de etkinliğini gösterdiğinden dolayı bu kimyasal maddelerin toksisite değerlendirilmelerinin yapılması önem arz etmektedir. Bu bağlamda bu maddenin Ames testi ile mutajenitesi belirlenmiş olmakla beraber diğer test metotlarıyla da toksik açıdan değerlendirilmesi piyasaya sunulmadan önce güvenilir sonuçlar vermesi açısından önemlidir. Zira ürünler, dikkatli bir şekilde ve uygun şekilde kullanıldığı takdirde, kullanıcıların ve tüketicilerin güvenliği açısından endişe kaynağı olarak kabul edilmemektedir.

Etik Standartlar Bildirgesi

Yazarlar tüm etik standartlara uyduklarını beyan ederler.

Yazarlık Katkı Beyanı

Yazar: Araştırma, Kavramsallaştırma, Deneysel tasarım, Analiz ve yorumlama, Kaynak sağlama, Yazma/orijinal taslak, Yazma/inceleme ve düzenleme, Görselleştirme

Çıkar Çatışması Beyanı

Bu makale ile ilgili çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Verilerin Kullanılabilirliği

Bu çalışmada analiz edilen ve elde edilen tüm değerler yayınlanan bu makaleye dahil edilmiştir.

5. Kaynaklar

Akyıl, D., 2021. Potential mutagenicity of Udimo 75 WG herbicide in *Salmonella typhimurium* with Ames test. *Afyon Kocatepe University Journal of Science and Engineering*, **21**, 1016-1021. <https://doi.org/10.35414/akufemubid.891586>

- Ames, B.N., Lee, F.D. and Durston, W.E., 1973a. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A*, **70**, 2281-2285. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.3.782>
- Audenaert, J., Vissers, M. and Gobin, B., 2014. Testing side-effects of common pesticides on *A. swirskii* under greenhouse circumstances. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, **79(2)**, 207-210.
- Bae, H., You, S., Lim, W. and Song, G., 2021. Pyridaben leads to inhibition of cell growth and induction of cell death through intracellular mechanisms in early pregnancy. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **171**, 104733. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104733>.
- Balkan, T., and Kara, K. 2022. Determination of pesticide residues and risk assessment in some vegetables grown in Tokat province. *Plant Protection Bulletin*, **62(2)**, 26-35.
- Bloom, S.E., Lemley, A.T. and Muscarella, D.E., 2005. Potentiation of apoptosis by heat stress plus pesticide exposure in stress resistant human B-lymphoma cells and its attenuation through interaction with follicular dendritic cells: role for c-Jun N-terminal kinase signaling. *Toxicological Sciences*, **89**, 214-223.
- Bose, A. and Beal, M.F., 2016. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*. **139**, 216-231.
- Charli, A., Jin, H., Anantharam, V., Kanthasamy, A. and Kanthasamy, A.G., 2016. Alterations in mitochondrial dynamics induced by tebufenpyrad and pyridaben in a dopaminergic neuronal cell culture model. *Neurotoxicology*, **53**, 302-313.
- Chen, Q., Vazques, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L. and Lesnefsky, E.J., 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 36027-36031.
- Chen, L., Cai, E., Guo, J. and Yang, S., 2011. Dissipation dynamics of residual pyridaben in bananas and soils. *Modern Agrochemistry*, **10(5)**, 40-43.
- Dean, B.J., Brooks, T.M., Hodson-Walker, G. and Hutson, D.H., 1985. Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals. *Mutation Research*, **153**, 57-77.
- Di Sotto, A., Evandri, M.G., Mazzanti, G., 2008. Antimutagenic and mutagenic activities of some terpenes in the bacterial reverse mutation assay. *Mutation Research*, **653**, 130-133.
- Döker, İ., Kazak, C., 2020. Toxicity and risk assessment of acaricides on the predatory mite, *Euseius scutalis* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae) under laboratory conditions. *Chemosphere*, **261**, 127760.

- <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127760>
- Dönbak, D.B., 2017. İnsan periferel lenfositlerinde pyridaben insektisitinin ka, kkd ve mn testleri ile genotoksitesinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, 88.
- EFSA, 2010. Annual Report on Pesticide Residues according to Article 32 of Regulation (EC) n° 396/2005.
- European Food Safety Authority, 2010. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pyridaben. EFSA J. **8**,1632. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1632>.
- Fluckiger-Isler, S., Baumeister, M., Braun, K., Gervais, V., Hasler- Nguyen, N., Reimann, R., Van Gompel, J., Wunderlich, H.G. and Engelhardt, G., 2004. Assessment of the performance of the Ames II assay: a collaborative study with 19 coded compounds. *Mutation Research*, **558**, 181-197. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.12.001>.
- Gomez, C., Bandez, M.J. and Navarro, A., 2007. Pesticides and impairment of mitochondrial function in relation with the parkinsonian syndrome. *Frontiers in Bioscience*, **12**, 1079. <https://doi.org/10.2741/2128>.
- Igarashi, H. and Sakamoto, S., 1994. Summary of toxicity studies with pyridaben, *Journal of Pesticide Science*, **29**, 243-251. https://doi.org/10.1584/jpestics.19.4_S243
- Kanbolat, M., Balkan, T. and Kara, K., 2023. Verification of QuEChERS method for the analysis of pesticide residues and their risk assessment in some fruits grown in Tokat, Turkey. *Journal of Agricultural Sciences*, **29(2)**, 573-588. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.1122538>
- Kauffmann, K., Gremm, L., Brendt, J., Schiwiy, A., Bluhm, K., Hollert, H. and Büchs, J., 2020. Alternative type of Ames test allows for dynamic mutagenicity detection by online monitoring of respiration activity. *Science of the Total Environment*, **726**, 137862. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137862>.
- Kayaalp, O. 1995. Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe Taş Yayınları, Ankara.
- Kumar, A., Sharma, K., Tomar, M., Malik, V. and Kataria, S.K., 2013. Determination of mutagenic potential of imidacloprid in *Salmonella typhimurium*—TA 98 and TA 100 following bacterial reverse mutation assay. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, **4(7)**, 2231-1238.
- Liman, R., 2019. % 20 Pyridaben İçeren Primit 20 WP'nin Allium cepa Kök Meristematik Hücrelerine Üzerine Sitotoksik ve Genotoksik etkileri. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **19(1)**, 5-14. <https://doi.org/10.35414/akufemubid.503565>
- Ma, H., Zhang, S., Zhang, D., Chen, Y., Zheng, Z. and Qian, X., 2007. Residues dynamics of pyridaben in apple and soil. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, **11(1)**, 108-110.
- Ma, J.Z., Huang, Y., Jiang, P., Liu, Z., Luo, Q., Zhong, K.Y., Yuan, W., Meng, Y. and Lu, H., 2021a. Pyridaben induced cardiotoxicity during the looping stages of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology*, **237**, 105870. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105870>.
- Manas, G.E., Hasanzadeh, S. and Parivar, K., 2013b. The effects of pyridaben pesticide on the histomorphometric, hormonal alternations and reproductive functions of BALB/c mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, **16**, 1055-1064.
- Manas, G.E., Hasanzadeh, S., Najafi, G., Parivar, K. and Yaghmaei, P., 2013a. The effects of pyridaben pesticide on the DNA integrity of sperms and early *in vitro* embryonic development in mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, **11**, 605-610.
- Manas, G.E., Parivar, K., Hasanzadeh, S., Yaghmayi, P. and Najafi, G., 2014. The effects of pyridaben pesticide on gonadotropic, gonadal hormonal alternations, oxidative and nitrosative stresses in Balb/C mice strain. *Comparative Clinical Pathology*, **23**, 297-303.
- Maron, D.M. and Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, **113**, 173-215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
- Merhi, M., Raynal, H., Cahuzac, E., Vinson, F., Cravedi, J.P. and Gamet-Payrastre, L., 2007. Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: meta-analysis of case-control studies. *Cancer Causes Control*, **18**, 1209-1226.
- Mortelmans, K. And Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, **445**, 29-60. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6)
- Moulas, C., Petsoulas, C., Rousidou, K., Perruchon, C., Karas, P. and Dimitrios, G.K., 2013. Effects of systemic pesticides Imidacloprid and Metalaxyl on the phyllosphere of pepper plants. *BioMed Research International*, **8**. <https://doi.org/10.1155/2013/969750>
- Namba, T., Nolte, C., Jackrel, J. and Grob, D. 1972. Poisoning due to organophosphate insecticides, acute and chronic manifestations. *The American Journal of Medicine*, **50**, 475-492. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(71\)90337-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(71)90337-8)
- Özkara, A., 2017. Evaluation of Siperkor pesticide mutagenicity with Ames test. *Afyon Kocatepe*

University Journal of Sciences and Engineering, **17(2)**, 393-398.
<https://doi.org/10.5578/fmbd.59768>.

Özkara, A., 2022. Assessment of Mutagenic Activity of Karate Zeon Pesticide by Ames Test. *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering*, **22**, 465-469.
<https://doi.org/10.35414/akufemubid.1069842>.

Öztaş, E., 2005. Bazı 9-süstitüe Fenantren Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames/Salmonella/Mikrozom Testi ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 74.

Rand, G.M., and Clark. J.R., 2000. Hazard/risk assessment of pyridaben: I. Aquatic toxicity and environmental chemistry. *Ecotoxicology*, **9**, 157-168.
<https://doi.org/10.1023/A:1008934502348>.

ST-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J. and Brand, M.D., 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 44784–44790.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M207217200>

Vural, N., 1996. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 344-363.

Weichenthal, S., Moase, C. and Chan, P., 2010. A review of pesticide exposure and cancer incidence in the Agricultural Health Study cohort. *Environmental Health Perspectives*, **118**, 1117–1125.
<https://doi.org/10.1590/S1413-81232012000100028>

World Health Organization., 2020. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification, 2019.

Yu, S.J., 2008. The toxicology and biochemistry of insecticides. CRC Press, Taylor and Francis group, New York, ISBN. 25-85.

Zhang, X., Shang, H., Chen, J. And Wu, D., 2005. Studies on the dynamic variation of pyridaben residues in citrus and soil. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, **18 (6)**, 777-781.