

established in  
2016

# MAS JOURNAL of Applied Sciences

ISSN 2757-5675

DOI: <http://dx.doi.org/10.52520/masjaps.41>

Araştırma Makalesi

## Zeytin Karasuyunun Mutajenik Etkisinin Ames Testi ile Belirlenmesi

Ferhan KORKMAZ<sup>1\*</sup>, Cansu POLAT-DEMİREL<sup>1</sup><sup>1</sup>Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Meşelik, Eskişehir

\*Sorumlu yazar: ferhanka@ogu.edu.tr

Geliş Tarihi: 25.02.2021

Kabul Tarihi: 28.03.2021

### Özet

Ülkemizin en önemli tarım ürünleri endüstrilerinden biri zeytin ve zeytinyağı üretimidir. Artan zeytinyağı üretimine karşılık zeytinyağı işleme atık suyu (Zeytin karasuyu) miktarı da artış göstermektedir. Zeytin karasuyu azot ve potasyum gibi önemli bitki besin maddeleri ve organik maddeler içerdiğinden dolayı sıvı ve katı gübre olarak kullanılabilir. Ancak bu atık su arıtımı yapılmadan deşarj edildiği takdirde çevre ve canlı sağlığı açısından büyük bir tehdit oluşturabilmektedir. Zeytin karasuyu, Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ), Biyolojik Oksijen İhtiyacı (BOİ), Askıda Katı Madde (AKM) değerlerinin yüksek olması nedeniyle de büyük bir çevresel problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca yüksek miktardaki asidite ve fenolik madde içeriği nedeniyle de çevre sağlığını tehdit eden bir özellik göstermektedir. Bu çalışmada zeytin karasuyu Ames Test Sistemi Plak İnkorporasyon Yöntemi ile, *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanılarak, S9 karaciğer enzimi fraksiyonu varlığında ve yokluğunda test edilmiştir. Zeytin karasuyunun %100-75-50-25-10-1 konsantrasyonları hazırlanmış ve sitotoksik konsantrasyon %50 olarak belirlenmiştir. TA98 suşu ile yapılan mutajenite deneylerinde hem S9'suz hem de S9'lu ortamda sadece %50 konsantrasyonda; TA100 ile yapılan deneylerde ise, S9'suz ortamda %50 ve %25 konsantrasyonlarda revertant koloni sayılarının, spontan revertant koloni sayılarından iki katından fazla değere ulaştığı, mutajenik olduğu belirlenmiştir. Ancak bu konsantrasyonlar dışındaki bazı konsantrasyonlar da istatistiksel değerlendirmeler sonucunda kontrole göre anlamlı derecede farklılık göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Zeytin karasuyu, endüstriyel atık su, mutajenite, toksisite, *Salmonella typhimurium*

### Determining the Mutagenic Effects of Olive Oil Mill Effluent using the Ames Test

#### Abstract

One of the most important agricultural industries in Turkey is olive and olive oil production. Olive oil processing wastewater discharge (olive oil mill effluent) increases as olive oil production rises. Oil mill effluent can be used as liquid and solid fertilizer thanks to its contents like carbon and potassium, which are important plant nutrients, and other organic matter. But this waste can pose an environmental and a public health risk if it is discharged without processing. Oil mill effluent comes up as an environmental problem because of its high Chemical Oxygen Demand (COD), Biochemical Oxygen Demand (BOD) and Total Suspended Solids (TSS) values. Moreover, it threatens the environment with its high levels of acidity and phenolic matter content. In this study, oil mill effluent was tested with and without the presence of S9 liver enzyme using the Ames Test System, Plate Incorporation Technique and *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains. %100-75-50-25-10-1 concentrations of oil mill effluent were prepared and the cytotoxic concentration was determined as %50. It was found that in experiments done with TA98 strain, with or without S9 present, only in %50 concentration; in experiments done with the TA100 strain without S9 present in %50 and %25 concentrations, revertant colony count doubled the spontaneous revertant colony count and that it was mutagenic. Although some other concentrations showed meaningful difference compared to control as well after statistical evaluations.

**Keywords:** Olive oil mill effluent, industrial wastewater, mutagenicity, toxicity, *Salmonella typhimurium*

## GİRİŞ

Zeytin (*Olea europaea* L.), tarih öncesi zamanlardan bugüne kadar önemini koruyan ve bilinen en eski ve en uzun süre ürün veren meyve ağacıdır. Zeytinin hem meyvesi hem de yağı Türkiye tarımında önemli bir ürün ve besin kaynağıdır. Ülkemiz tarımında zeytin ve zeytinyağına verilen önem her geçen gün artmaktadır (Esetlili ve ark., 2021). Akdeniz ülkelerinin çoğunda yetiştirilen ve çok değerli bazı besin elementleri ile kendine has yağı içeren zeytin bitkisi çok yıllık bir bitkidir. Genellikle zeytinyağı üretimi için yetiştirilmekte ve sofralık olarak da tüketilmektedir. Zeytinyağı üretimi aşamasında açığa çıkan ve bertaraf edilmesi çok zor olan sıvı atık materyale karasu, bununla birlikte oluşan katı atıklara ise pirina denilmektedir (Doğan ve ark., 2018). Dünyada zeytinyağı üretimi büyük oranda İspanya, İtalya, Yunanistan ve Türkiye gibi Akdeniz ülkelerinde yapılmaktadır. Zeytinyağının üretim aşamalarında ortaya çıkan zeytin karasuyunun sebep olduğu sorunlar birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Tunalıoğlu ve Bektaş, 2010; Oruç, 2012; Doğan ve ark., 2016). Yine aynı araştırmacılardan bazıları, zeytin karasuyunun belirli oranlarda organik maddelerle birlikte kullanılması durumunda toprak için yararlı olabileceğini bildirmektedir (Doğan ve ark., 2016; Oruç, 2012). Organik tarımda kimyasal gübre kullanılmaması, üretimde girdi maliyetinin azalmasına, toprak verimliliğine ve sürdürülebilirliğine katkı sağlamaktadır. Ancak mevcut verimli toprağımızın gelecek nesillere aktarılması ve gelecekteki beslenme sorunları halen dikkat çeken sorunlar arasında yer almaktadır. Artan dünya nüfusunu beslemek için uygulanan yoğunlaştırılmış tarımsal işleme yöntemleri, toprakların üretkenliklerini

ve verimliliklerini olumsuz yönde etkilemektedir (Sarioğlu ve ark., 2017). Toprakların kaybettikleri organik maddeleri geri vermek için en iyi yöntem organik madde uygulamalarıdır. Zeytin karasuyu riskli bir organik materyal olmasına karşın, uygun oranlarda solucan gübresi ve çiftlik gübresiyle karıştırıldığında toksisitesi düşürülmekte ve yararlı bir organik gübreye dönüştürülebilmektedir (Oruç, 2012; Doğan ve ark., 2018). Azot ve Potasyum bakımından zengin bir materyal olan zeytin karasuyu, diğer organik maddelerle karıştırılarak kompost haline dönüştürülebilen ve humik maddelerin izole edilebileceği iyi bir kaynak ve organik maddeler bakımından çok zengin bir materyaldir (Çelik, 2010). Ayrıca bazı spesifik özelliklere sahip humik ve fulvik asitler içeren zeytin karasuyunun topraklarda düzenleyici bir etkisi vardır (Oruç, 2012). Zeytin karasuyunun ısıtılmış ve görmemiş solucan gübresi ve çiftlik gübresi ile belirli oranlarda karıştırılıp topraklara uygulandığı bir çalışmada, uygulamanın mikrobiyal açıdan olumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Doğan ve ark., 2018). Zeytin karasuyu hayvan yemi katkı maddesi olarak kullanılabilir. Etlik piliç yemlerinde zeytin karasuyu ve vitamin E kullanımının piliçlerin et kalite özelliklerinden bazılarına olumlu yönde etkilemiştir (Durgut, 2008). Diğer taraftan literatürde zeytin karasuyu biyogaz üretimi için başlıca biyokütle kaynaklarından biri olarak gösterilmektedir (Şenol ve ark., 2017). Zeytin karasuyunun anaerobik olarak artırılması hem biyogaz üretimi hem de sürdürülebilir çevre için umut verici bir yöntem olarak görülmektedir (Tufaner, 2020). Zeytinyağı ekstraksiyonu ve sofralık zeytin hazırlanmasına dayalı gıda işleme sanayisi Akdeniz Bölgesi'nde ekonomik açıdan önemli bir

aktivitedir. İspanya, İtalya, Yunanistan gibi başlıca üretici ülkelerde zeytinyağının yıllık üretimi  $2,5 \times 10^6$  ton ve sofralık zeytinin ise  $10^6$  ton olduğu tahmin edilmektedir. Zeytin Karasuyu (ZKS) olarak ifade edilen atık suyun miktarı ve bu atık suyun çevresel etkisi kullanılan zeytinyağı ekstraksiyon metoduna bağlıdır. Geleneksel soğuk pres metodu zeytinlerin ilk ağırlıkları ile ilişkili olarak ZKS'nin yaklaşık %50'sini üretirken sürekli santrifüj prosesi ZKS'nin %80-110'unu üretmektedir. Bu, zeytin ezmesinden yağın ayrılmasından önce ılık su ile zeytin ezmesinin sürekli yıkanmasından kaynaklanmaktadır. Akdeniz Bölgesi'nde yıllık ZKS üretiminin  $30 \times 10^6 \text{ m}^3$  olduğu düşünülmektedir. ZKS,  $220 \text{ g l}^{-1}$  kadar KOİ değerine sahip olabilir ve organik madde özellikle polisakkarit, şeker, polifenol, polialkol, protein, organik asit ve yağdan oluşmaktadır. (Mantzavinos ve Kalogerakis, 2005). Diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de zeytinin yağa dönüştürülmesi yani zeytinyağı üretimi sırasında ciddi bir karasu sorunu ortaya çıkmaktadır (Özkaya ve ark., 2010). Zeytin karasuyu KOİ, BOİ, AKM değerlerinin yüksek olması nedeniyle büyük bir çevresel problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca yüksek miktardaki asiditeye ve fenolik madde içeriğine sahip olduğu için de çevre sağlığını tehdit eden bir özellik göstermektedir. Endüstriyel atık sular, proste kullanılan hammadde ve kimyasallar ile proses türüne göre çok çeşitli kirleticileri içermektedir. Bu nedenle, bu atık suların çevresel etkilerini kontrol amacıyla fiziksel ve kimyasal parametrelerin yanında toksisitesinin de izlenmesi yönetmeliklerde yer almıştır (Bahadır ve Pagano, 2013). Zeytinyağı üretiminde kullanılan üretim teknolojisine bağlı olarak ortaya çıkan karasu miktarı ve

karasuyun kirlilik özellikleri; zeytininin yetiştirildiği bölgenin toprak ve iklim özelliklerine, ürün alınan ağacın yaşına, hasat sezonuna, zeytin çeşidine, işletmede kullanılan suyun kimyasal özelliklerine ve ekstraksiyon yöntemlerine bağlı olarak değişmektedir. Zeytinyağı üretimi sırasında açığa çıkan atık su miktarı genellikle  $0,5-1,5 \text{ m}^3 \text{ ton}^{-1}$  zeytin olmaktadır (Çelik, 2008). Kirleticilerin risklerinin tek tek veya birlikte belirlenmesi ayrıntılı toksikolojik çalışmalar gerektirmektedir. Endüstriyel ve evsel deşarjların toksikolojik etkisini belirlemek için biyolojik testler önemli bir alternatiftir (Aleem ve Malik, 2003). Genotoksisite ve mutajenite testleri kompleks karışımların hassas bir kimyasal analize gerek kalmadan genotoksisitesini ölçmek için iyi bir araçtır. Genetik hasar organizmaların kompleks karışımlara maruz bırakılmasıyla belirlenmektedir (Lah ve ark., 2008). Sıçan ve fare gibi küçük memelilerde yapılan toksisite testlerinin çoğu oldukça pahalı, zaman gerektiren ve etik açıdan problemlidir. Bu nedenle bakteri veya bitki testleri geliştirilmiştir (Fatima ve Ahmad, 2006). Genotoksisitenin incelenmesinde mutajenite ve DNA hasarının belirlendiği Ames/Salmonella testi, Comet testi, hayvan hücre kültürü ve bitki dokuları sıklıkla kullanılır (Chakraborty ve Mukherjee, 2009). Ames/Salmonella testi genotoksisitenin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir (Lah ve ark., 2008; Mathur ve ark., 2007). Bu yöntemde çok sayıda Salmonella typhimurium suşu, hücre duvarlarının geçirgenliğindeki değişiklikler yoluyla mutajenlerin etkilerine daha duyarlı hale getirilmiştir (Durgo ve ark., 2005). Ames testi gibi kısa zamanlı genetik biyo-analizlerin genotoksik çalışmalarda önemli bir araç olduğu kanıtlanmıştır. Çünkü basit,

genetik hasara duyarlı, az maliyetli ve az miktarda numune gerektiren bir testtir (Mathur ve ark., 2007). Oldukça hızlı ve ucuz bir yöntem olmasına karşın önemli bir dezavantajı ökaryotik metabolik enzim sistemlerinin olmamasıdır. Bu olumsuzluk S9 enzim aktivasyonunun kullanılmasıyla giderilmiştir (Lah ve ark., 2008; Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000). Bu çalışmada zeytin işleme fabrikalarının çok bulunduğu Balıkesir ilinin Edremit ilçesindeki bir fabrikadan alınan zeytin karasuyunun mutajenik etkisi, kısa zamanlı bir bakteriyel test sistemi olan Ames testi ile değerlendirilmiştir.

## MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada Balıkesir/Edremit'te bulunan bir fabrikadan alınan zeytin karasuyunun mutajenitesi, kısaca Ames Testi olarak bilinen, uzun ismiyle Ames/*Salmonella*/Mikrozom Testi'nin Plak-inkorporasyon yöntemiyle belirlenmiştir. Deneysel organizma olarak *Salmonella typhimurium*'dan in vitro mutasyonlarla geliştirilen TA98 (*hisD3052*, *rfa*, *uvrB*, *pkM101*) ve TA100 (*hisG46*, *rfa*, *uvrB*, *pkM101*) suşları kullanılmıştır. Testin güvenilirliği açısından, test suşlarının genotipik özellikleri kontrol edilmiş ve kendiliğinden geriye dönüş sıklığının kontrolü yapılarak spontan revertant koloni sayısı belirlenmiştir (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000; OECD, 1997). Pozitif kontrol olarak Sodyum azid ( $\text{NaN}_3$ ) ve 4-nitro-O-fenilendiamine (NPD) kullanılmıştır.

### Sitotoksik konsantrasyon belirleme

Sitotoksik konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla önce zeytin karasuyunun %1-10-25-50-75-100 konsantrasyonları hazırlanmıştır. 2ml'lik top agar içeren deney tüplerine 100 µl bakteri, 100 µl zeytin karasuyunun değişik konsantrasyonlarından eklenmiş, nutrient agar plaklarına dökülmüş ve

homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Plaklar 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra ortalama koloni sayıları belirlenmiştir. Koloni sayıları kontrol plaklarıyla karşılaştırılmış ve zeytin karasuyunun %50 konsantrasyonu sitotoksik bulunmuştur. Bu ve bunun altındaki konsantrasyonlar mutajenite testine tabi tutulmuştur.

### Mutajenite testi

İçinde 2 ml top agar (üst agar) bulunan tüplere 100 µl hazırlanan konsantrasyonlarda zeytin karasuyu, 200 µl histidin-biyotin çözeltisi ve 100 µl bir gecelik bakteri kültürü ( $1-2 \times 10^9$  bakteri  $\text{mL}^{-1}$ ) eklenmiş, Minimal Glikoz Agar (MGA) plaklarına dökülmüştür. Plaklar, hızla çevrilerek homojen dağılım sağlanmış ve 15 dakika bekletildikten sonra 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. S9 fraksiyonu varlığında yapılan deneylerde 2 ml'lik üst ağara 100 µl bakteri kültürü, 100 µl zeytin karasuyu, 200 µl histidin-biyotin solüsyonu ve 500 µl S9 fraksiyonu eklenmiştir. İyice çalkalanarak yine 37°C 'de ısıtılmış MGA plaklarına dökülerek 37°C 'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda her plaktaki revertant koloni sayıları belirlenerek aritmetik ortalaması alınmıştır. Her konsantrasyon 3 paraleli çalışılmıştır. (Maron ve Ames, 1983; Mortelmans ve Zeiger, 2000; OECD, 1997)

### İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucunda elde edilen veriler, standart sapmaları ile birlikte ortalamaları alınarak SPSS Windows paket programında Student's *t*-testi ile  $p < 0,05$  düzeyinde değerlendirilmiştir.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Zeytin karasuyunun *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ile S9 varlığında ve yokluğunda revertant koloni sayıları Tablo 1'de verilmiştir. Şekil 1 ve 2'de ise test sonuçları

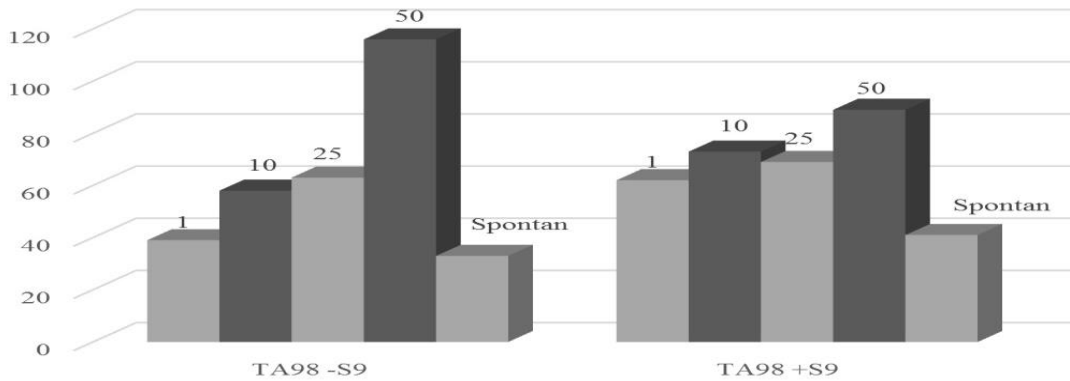
karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Mutajenite deney sonuçlarına bakıldığında, TA98 suşunda hem S9 fraksiyonu varlığında hem de yokluğunda zeytin karasuyunun sadece %50'lik konsantrasyonlarının; TA100 suşunda ise, sadece S9 yokluğunda %25 ve %50 konsantrasyonlarının verdiği revertant koloni sayılarının, spontan revertant koloni sayılarının iki katından fazla olduğu görülmektedir. Ames testi değerlendirme kriterlerinde spontan revertant koloni sayılarının iki katı ve fazlası değerlere ulaşan test maddeleri mutajenik kabul edilmektedir. Ayrıca bu

test sisteminde *S.typhimurium* TA98 suşu çerçeve kayması tipi mutasyonları, TA100 suşu ise baz çifti değişimi mutasyonlarını belirlemek için kullanılır. Bu nedenle, zeytin karasuyunun %50 konsantrasyonunun hem S9 yokluğunda, hem de S9 varlığında çerçeve kayması tipi mutasyonları oluşturabilecek etki gösterdiğini, dolayısıyla da mutajenik olduğu söylenebilir. Ayrıca zeytin karasuyunun %25 ve %50 konsantrasyonlarının S9 yokluğunda, baz çifti değişimi mutasyonlarını oluşturabilecek potansiyele sahip mutajenik etki gösterdiği ifade edilebilir.

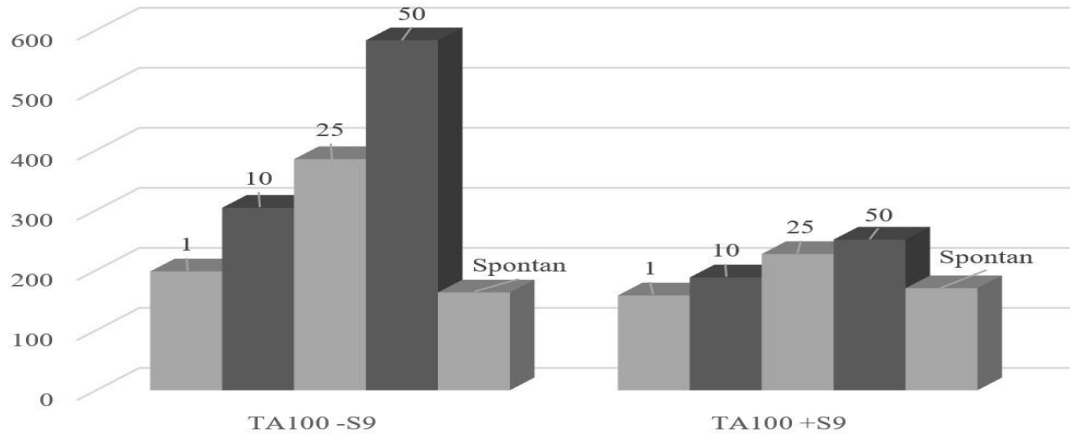
**Çizelge 1.** Zeytin karasuyunun *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ile S9 varlığında ve yokluğunda revertant koloni sayıları (revertant koloni sayısı/plak±SS)

Konsantrasyon %	Revertant Koloni Sayıları ±SS			
	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
1	39±9.56	62±2.1	198±22.2*	158±15.5
10	58±4.1*	73±11.9*	304±74.4*	188±7.5
25	63±14.4*	69±2*	385±21.7*	227±17*
50	116±17*	89±8.1*	583±59.3*	251±31.8*
Spontan	33±9.5	41±6.2	163±19.2	170±15.5
Pozitif Kontrol NPD	2775±476.4	-	-	-
Pozitif Kontrol NaN <sub>3</sub>	-	-	2990±509.7	-

\*Student's t-testine göre  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyinde kontrole göre fark gösterenler; NaN<sub>3</sub>: Sodium azid; NPD: 4-nitro-O-phenylenediamine; SS: Standart sapma



**Şekil 1.** Zeytin karasuyu konsantrasyonlarının S9 varlığında ve yokluğundan *S. typhimurium* TA98 suşu için revertant koloni sayılarının karşılaştırılması



**Şekil 2.** Zeytin karasuyu konsantrasyonlarının S9 varlığında ve yokluğundan *S. typhimurium* TA100 suşu için revertant koloni sayılarının karşılaştırılması

Test sonuçları istatistiksel olarak analiz edildiğinde, TA 98 suşunda, S9 hem yokluğunda hem de S9 varlığında %10 ve %25 konsantrasyonlarının; T100 suşunda ise, S9 yokluğunda %1 ve %10, S9 varlığında ise %25 ve %50 konsantrasyonlarının verdiği revertant koloni sayılarının spontan revertant koloni sayılarının iki katı ya da fazlasına ulaşmadığı halde  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyinde kontrole göre anlamlı bir fark oluşturduğu görülmektedir (Tablo 1). Bu konsantrasyonların mutajenik olmasa bile mutajenik etkiyi uyarıcı bir özellikte olduğu söylenebilir. Zeytin karasuyunun toksisitesi başka araştırmacılar tarafından da çalışılmıştır. Bunlardan bir tanesinde, zeytin karasuyunun ve içeriğindeki altı majör fenolik bileşiğin genotoksisitesi *Vicia faba* micronükleus testi ile çalışılmış ve gallik acid ve oleuropein'in mikronükleus frekansını önemli ölçüde artırmış ve zeytin karasuyu genotoksisitesi ile ilişkilendirilmiştir (El Hajjouji ve ark., 2007). Başka bir çalışmada zeytin karasuyunun genotoksisitesi ve histopatolojisi *Lepomis gibbosus* hücrelerinde denenmiş, balık dokusu üzerinde zararlı bir etkisi olduğu

belirlenmiş ve bu nedenle de zeytin karasuyunun suya bırakılmaması gerektiği önemle vurgulanmıştır (Koca ve Koca, 2016). Zeytin karasuyu toksisitesinin çalışıldığı bir araştırmada, bu atık suyun toksisitesinin genellikle yüksek olduğu belirtilmiş, ancak bu konudaki bilgilerin halen eksik olduğu ve bireysel ve çoklu test sistemleri ile test edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Justino ve ark., 2012). Bu açıdan bakıldığında bizim çalışmamızın da literatürdeki bu eksiğin giderilmesi konusunda bir katkı sağladığını düşünebiliriz.

Literatüre araştırmalarında zeytin karasuyunun toksisitesinin bakteriyel sistem üzerinde denendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

## SONUÇ

Bu çalışmada zeytin karasuyunun belirli konsantrasyonlarda mutajenik etki gösterdiği saptanmıştır. Bu nedenle bu atık suyun ve diğer çevresel ve endüstriyel atıksuların toksik etkilerinin farklı organizmalar üzerinde, farklı test sistemleriyle belirlenmesi ve deşarj edilmeden önce fiziksel, kimyasal ve özellikle de biyolojik arıtıma tabi tutulması çevre ve insan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Ayrıca

organik materyal açısından oldukça iyi bir kaynak olan zeytin karasuyundan tarımda ve hayvancılıkta yararlanmak imkanı da mutlaka değerlendirilmesi gereken önemli konular arasında yer almaktadır.

#### AÇIKLAMA

Bu çalışma, Ekoloji 2015 Sempozyumu'nda sözlü bildiri olarak sunulmuştur. 06-09 Mayıs 2015, SİNOP.

#### KAYNAKÇLAR

- Aleem, A., Malik, A. 2003. Genotoxic hazards of long-term application of wastewater on agricultural soil. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 538: 145-54.
- Bahadır, E.B., Pagano, S.M. 2013. Türkiye'de Endüstriyel atıksularda toksisite izleme yönteminin atıksu parametreleri ile istatistiksel ilişkilendirilmesi. Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 2(2): 1-8.
- Chakraborty, R., Mukherjee, A. 2009. Mutagenicity and genotoxicity of coal fly ash water leachate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 838-42.
- Çelik, G., Seven, Ü., Güçer Ş. 2008. Zeytin karasuyunun değerlendirilmesi. U.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi, I. Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi, p:162-167.
- Çelik, C. 2010. Zeytin karasuyundan humik (HA) ve fulvik (FA) asitlerin eldesi ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Doğan, K., Sarioğlu, A., Coşkan, A. 2016. Contribution of green manure, Rhizobium and humic+fulvic acid on recovering soil biologic activity of olive mill wastewater contaminated soil. *Scientific Papers. Series A. Agronomy*, Vol. LIX, p. 63-68.
- Doğan, K., Sarioğlu, A., Şakar, E., Karanlık, S. 2018. Zeytin karasuyu, ısıl işlem görmüş solucan gübresi ve çiftlik gübresi uygulamalarının toprak mikrobiyal aktivite değişimlerine etkisi. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 151-159.
- Durgo, K., Oreščanin, V., Horvat, T., Oreščanin, V., Mikelić, L., Čolić, J. F., Lulić, S. 2005. Cytotoxicity and mutagenicity study of waste and purified water samples from electroplating industries prepared by use of ferrous sulfate and wood fly ash. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 40(5): 949-957.
- Durgut, G. 2008. Etlik piliç yemlerine karıştırılan zeytin karasuyunun piliçlerin bazı verim özellikleri ile et kalite özelliklerine etkisi. Yüksek lisans tezi, Adnan Menderes Üniversitesi.
- El Hajjouji, H., Pinelli, E., Guiresse, M., Merlina, G., Revel, J.C., Hafidi, M. 2007. Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 634(1-2): 25-31.
- Esetlili, B.Ç., Pekcan, T., Aydoğdu, E., Karaman, H.T., Yaman, Ş., Merken, Ö., Güler, A. 2021. Zeytinde (*Olea europaea* cv. Ayvalık) Farklı potasyumlu gübre uygulamalarının verim ve zeytinyağı içeriği üzerine etkisi. *ISPEC Journal of Agricultural Sciences*, 5(1): 118-126.
- Fatima, R. A., Ahmad. M. 2006. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: A comparison of three bioassays. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 609: 81-91.

- Justino, C.I., Pereira, R., Freitas, A.C., Rocha-Santos, T.A., Panteleitchouk, T.S., Duarte, A.C. 2012. Olive oil mill wastewaters before and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view. *Ecotoxicology*, 21(2): 615-629.
- Koca, S., Koca, Y. B. 2016. Genotoxic and histopathological effects of olive-mill wastewater on *Lepomis gibbosus*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(3): 1-12.
- Lah, B., Vidic, T., Glasencnik, E., Cepeljnik, T., Gorjanc, G., Marinsek-Logar, R. 2008. Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and preliminary *Tradescantia micronucleus* assay. *Environmental monitoring and assessment*, 139(1): 107-118.
- Maron, D.M., Ames, BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research / Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3-4): 173-215.
- Mortelmans, K., Zeiger, E. 2000. The Ames *Salmonella* / microsome mutagenicity assay. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 455 (1-2): 29-60.
- Mantzavinos, D., Kalogerakis, N. 2005. Treatment of olive mill effluents: Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes—an overview. *Environment international*, 31(2): 289-295.
- Mathur, N., Bhatnagar, P., Mohan, K., Bakre, P., Nagar, P., Bijarnia, M. 2007. Mutagenicity evaluation of industrial sludge from common effluent treatment plant. *Chemosphere*, 67(6):1229-1235.
- OECD, 1997. Test No. 471. Bacterial reverse mutation test. OECD guideline for testing of chemicals, Section, 4. Paris, France.
- Oruç, N. 2012. Zeytinyağı fabrikası atığı karasue ekolojik kirlilik yerine toprak düzenleyici olabilir. *SAÜ Fen Edebiyat Dergisi* 2012-1.
- Özkaya, M. T., Tunaloğlu, R., Eken, Ş., Ulaş, M., Tan, M., Danacı, A., İnan, N., Tibet, Ü. 2010. Türkiye zeytinciliğinin sorunları ve çözüm önerileri. *TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi*, p:11-15.
- Sarioğlu, A., Doğan, K., Kızıltuğ, T., Coşkan, A. 2017. Organo-mineral fertilizler applications for sustainable Agriculture. *Scientific Papers. Series A. Agronomy*, Vol. LX:161-166.
- Şenol, H., Elibol, E.A., Açikel, Ü., Şenol, M. 2017. Türkiye’de biyogaz üretimi için başlıca biyokütle kaynakları. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6(2): 81-92.
- Tufaner, F. 2020. Zeytin karasuyunun anaerobik arıtılabilirliği ve biyogaz üretim potansiyelinin araştırılması. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 9(4): 1766-1778.
- Tunaloğlu, R., Bektaş, T. 2010. Türkiye zeytinciliğinde karasu sorunu. *Zeytin Bilimi*, 1(2): 65-71.