

ATIK SUDAN İZOLE EDİLEN FENOL DEGRADE EDİCİ BAKTERİLERİN ENZİMATİK VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIK AKTİVİTELERİ

Nilgün POYRAZ ^{1,2}, Mehmet Burçin MUTLU ^{1,*}

¹Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, Türkiye

²Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya, Türkiye

ÖZET

Çalışma kapsamında iki farklı atık su arıtma tesisinin çeşitli ünitelerinden örnek alınmış ve bu örneklerin pH ve element içerikleri belirlenmiştir. Özellikleri belirlenen örneklerden fenollü besiyerine inokülasyon yapılmış ve 19 izolat elde edilmiştir. Bu izole edilen 19 izolattan morfolojik olarak farklı olduğu düşünülen 9 izolatin tanımlaması yapılmıştır. İzolatlar arasında yoğun olarak *Pseudomonas* türleri belirlenmiştir. Tanımlanan bu 9 izolatin atık sulardaki arıtım potansiyellerini değerlendirebilmek için antibiyotik duyarlılık testi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca izolatların amilaz ve proteaz enzim üretim aktiviteleri değerlendirilmiştir. İzolatların ofloksasin, azitromisin ve streptomisine duyarlı oldukları belirlenmiştir. Enzim üretim yetenekleri değerlendirildiğinde ise yalnızca 3 izolat proteaz aktivitesi gösterirken izolatların çoğu amilaz aktivitesi göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Atık su, Antibiyotik, Amilaz, Proteaz

ENZYMATIC AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY ACTIVITIES OF PHENOL DEGRADING BACTERIA ISOLATED FROM WASTE WATER

ABSTRACT

In the scope of the study, samples were taken from various units of two different wastewater treatment plants and pH and element contents of these samples were determined. Samples were inoculated on phenolic media and totally 19 isolates were obtained. Of these 19 isolates, 9 of them thought to be morphologically different were identified. *Pseudomonas* species have been identified dominantly among the isolates. An antibiotic susceptibility test was performed to evaluate the treatment potential of these 9 isolates in the wastewater. In addition, amylase and protease enzyme production activities of isolates were evaluated. It has been determined that isolates are susceptible to ofloxacin, azithromycin and streptomycin. When enzyme production capabilities were evaluated, only 3 isolates showed protease activity, while most isolates showed amylase activity.

Keywords: Wastewater, Antibiotics, Amylase, Protease

1. GİRİŞ

Atık su arıtımı, belediye ve endüstriyel atık suların arıtılması için dünya çapında kullanılan en önemli biyoteknolojik işlemlerden biridir. Tüm tesis türlerinde, prokaryotik mikroorganizmalar hakimdir ve çeşitli dönüşümler gerçekleştirirler [1]. Aktif çamur veya biyofilm reaktörlerinde bulunan prokaryotik mikroorganizma toplulukları, kanalizasyondan alınan karbon ve besin öğelerinin gideriminden sorumludur ve bu nedenle her biyolojik atık su arıtma tesisinin temel bileşeni temsil etmektedir [2]. Bir atık su arıtma tesisi içindeki mikrobiyal topluluğun bileşimi ve etkinliği, arıtma sürecinin etkinliği ve verimliliği üzerinde önemli bir rol oynamaktadır [1].

*Sorumlu Yazar: mbmutlu@anadolu.edu.tr

Atık sulardaki ana organik kirleticiler proteinler, polisakkaritler ve lipidlerdir ve bunlar daha küçük ünitelere hidrolize edilmelidir. Mikrobiyal proteazlar, lipazlar, amilazlar ve selülazlar biyolojik atık su arıtım sürecinde önemli rol oynamaktadır [3]. Endüstriyel biyoteknolojinin önemi ve gelişimi, çeşitli uygulamalarda mikrobiyal enzimlerin kullanılmasına yol açmıştır [4].

Mikrobiyal proteazlar, proteinli atıkları çözünür hale getirmek ve biyolojik oksijen talebini azaltmak için çeşitli gıda işleme endüstrilerinden ve evsel faaliyetlerinden kaynaklanan atık su işletmelerinde kullanılmaktadır [5-6]. Lipazlar, amilazlar ve proteazlar gibi hidrolitik enzimler, şeker, dondurma, süt ve et endüstrisi atık su arıtımında umut verici bir uygulamadır. Atık su arıtımı için kullanılan enzimlerin saflaştırma işlemi gerektirmemesi ve bu nedenle düşük bir üretim maliyeti göstermesi gerekir [7]. Bu özellikler, enzim üretim teknolojisine ve enzim üretme kabiliyetine sahip yeni mikroorganizmaların araştırılmasında artan bir ilgiye sebep olmuştur [8].

Atıkların arıtımında enzimlerin sunduğu yeni olasılıkları araştırmak için son yıllarda önemli araştırmalar yapılmıştır. Çünkü enzimlerin, spesifik kirleticileri hedeflemek için kullanılabilmesi konusunda giderek artan bir görüş bulunmaktadır ve yeni biyoteknolojik ilerlemeler, daha iyi izolasyon ve saflaştırma prosedürleri yoluyla daha ucuz ve daha kolay erişilebilir enzimlerin üretimine izin vermiştir [9].

Potansiyel avantajlara sahip olması nedeniyle, son dönemde gerçekleştirilen çalışmalar genellikle atık su, katı atıklar, tehlikeli atıklar ve toprakların arıtımı için enzim süreçlerinin geliştirilmesi üzerine odaklanmıştır. Bu yüzden çalışmamızda atık suların izole edilen mikroorganizmaların enzim üretme yetenekleri ve ayrıca antibiyotiklere karşı duyarlılıkları araştırılmıştır. Çünkü antibiyotik dirençliliği de atık suların biyolojik arıtımında mikroorganizmaların kullanılmasında önemli bir parametredir. Direnç genlerinin aktarılması ve atık suların yayılması ciddi sorunlara yol açmaktadır.

2. MATERYAL - METOD

2.1. Örneklerin Alınması ve Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolasyon için sonbahar mevsiminde belediye (A) ve endüstriyel (B) atık su arıtma tesisinin kum yağ tutucu, ön çökeltim, havalandırma, geri devir çamur ve son çökeltim ünitelerinden örnekleme yapılmıştır. Örneklerin pH değeri pH metre (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) ile belirlenmiştir. Su örneklerinin içerdiği bazı elementler Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM) bünyesindeki ICP (Perkin Elmer Optical Emission Spectrometer Optima 4300 DV) cihazı ile belirlenmiştir.

2.2. Bakterilerin İzolasyonu

Çalışmada fenolü kullanabilen izolatların eldesi amacıyla fenol içeren mineral tuz besi yeri ve nutrient agar besiyerleri kullanılmıştır. Atık su arıtma tesislerinin çeşitli ünitelerinden alınan örneklerden 100'er mikrolitre yayma plak yöntemi ile besiyerlerine ekimi yapılmış ve 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen kolonilerden saflaştırma amacıyla çizgi ekimler yapılmış ve saf haldeki kültürler -85°C'de stoklanmıştır.

2.3. Bakterilerin Tanımlanması

Bakterilerin moleküler tanımlanması amacıyla DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. DNA ekstraksiyonu için ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep kit (Zymo research, Katalog No:D6005) kullanılmıştır. Elde edilen DNA'dan tanımlama amacıyla 16S rRNA spesifik primerler (27F ve 1492R) ile PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) kurulmuştur. PZR reaksiyonu kurmak için ileri primer olarak 27F, geri primer olarak ise 1492R [10], kalıp DNA ve Biolabs OneTaq® Quick-Load®2X Master Mix (M0486S) kullanılmıştır. Bacteria

üyelerinin 16 S r RNA amplifikasyonu için Bacter 50 programı kullanılmıştır. Bacter 50 programı reaksiyon şartları tablo 1 de gösterildiği gibidir.

Tablo 1. Bacter 50 reaksiyon koşulları

94°C.....3 dakika (Denatürasyon)	
94°C.....30 saniye	30 döngü
50°C.....1 dakika	
72°C.....1 dakika	
72°C.....10 dakika	
4°C.....Süresiz	

Elde edilen PZR ürünleri %1 lik agaroz jele 1X'lik TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu içinde 5V/cm akım uygulanarak gözlenmiştir. Sonrasında pozitif sonuç veren örnekler için dizi analizi yaptırılmıştır. PZR ürünlerinin baz diziliminin belirlenmesinde Refgen Ltd.Şti.'den hizmet alımı yapılmıştır ve elde diziler NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) veri bankasındaki dizilerle karşılaştırılarak tanımlanmıştır.

2.4. Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılıkları

Dizi analizinde belirlenen izolatlar için farklı antibiyotiklerle disk difüzyon yöntemi uygulanarak hassasiyet durumu incelenmiştir. Kontrol grubu olarak *Escherichia coli* ATCC25922, *Enterococcus faecalis* ATCC51299 ve *Listeria monocytogenes* ATCC1911 kullanılmıştır. Tablo 2 'de kullanılan antibiyotikler verilmiştir.

Tablo 2. Antimikrobiyal aktivite deneyinde kullanılan ticari antibiyotikler

ANTİBİYOTİK NO	ANTİBİYOTİK ADI
1	Penisilin G (10mcg/dis)(Himedia)
2	Gentamisin (10mcg/disc) (Himedia)
3	Metisilin (5mcg/disc) (Himedia)
4	Azitromisin (30mcg/disc) (Himedia)
5	Rifampisin (5mcg/disc) (Himedia)
6	Florfenikol (30 µg) (Oxoid)
7	Ertapenem (10 µg) (Oxoid)
8	Ofloksasin (5 mcg/disc) (Himedia)
9	Streptomisin (10mcg/disc)(Himedia)

2.5. Amilaz ve Proteaz Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi

İzole edilip tanımlanan mikroorganizmaların amilaz üretim yeteneklerinin belirlenmesi için Nişasta agar kullanılmıştır. Nişasta agar litreye 5 gr pepton, 3 gr yeast ekstrakt, 2 gr çözünebilir nişasta, 15 gr agar tartılarak hazırlanmıştır. Nişasta agara ekim yapılan petripler 37 ° C sıcaklıkta 24-48 saat inkübe edildikten sonra, Gram'ın iyotu (oda sıcaklığında saklanan 2.5 mg potasyum iyodür çözeltisine 250 mg iyodin kristalleri ve 125 ml su ilave edilerek hazırlanmıştır) ile kaplanarak mavi renkli nişasta-iyodin kompleksi oluşturulmuştur. Parçalanma bölgesinde mavi renk oluşmaması bir amilolitik suşun tespiti ve taranmasının temelini oluşturur [11].

Proteaz üretim yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla ise mikroorganizmalar yağsız süt tozlu agar besi yeri (kazein % 0.5, maya ekstresi % 0.25, dekstroz % 0.1, yağsız süt tozu % 2.8 ve agar % 1.5) hazırlanmıştır.

Bu testte tüm bakteri kültürleri, yağsız süt tozlu agar petrisine ekilmiş ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir ve 24 saat sonra zon oluşumu incelenmiştir [12].

3. SONUÇLAR

3.1. Örnek Özelliklerinin Belirlenmesi

İki farklı tesis tipi için belirlenen pH ve iyon değerleri Tablo 3'te verilmiştir. pH 6.67 ile 8.06 arasında değişmektedir. Belirlenen iyon değerleri açısından ise Ca²⁺ ve Na⁺ iyonları arasında farklılıklar görülmektedir.

Tablo 3. Atık su arıtma tesisinden alınan örneklerin pH ve iyon değerleri

ÖRNEK					
A	pH	Mg²⁺	Ca²⁺	Na⁺	K⁺
1. Kum ve Yağ Tutucu	8.06	58.30 ppm	63.54 ppm	132.2 ppm	37.64 ppm
2. Ön Çökeltim Suyu	8.03	56.32 ppm	65.30 ppm	108.0 ppm	28.06 ppm
3. Havalandırma Havuzu	7.46	72.80 ppm	65.23 ppm	129.9 ppm	59.64 ppm
4. Son Çökeltim Havuzu	7.66	51.44 ppm	63.83 ppm	127.7 ppm	23.32 ppm
B	pH	Mg²⁺	Ca²⁺	Na⁺	K⁺
1. Kum Tutucu	6.79	49.83 ppm	185.4 ppm	356.9 ppm	23.83 ppm
2. Ön Çökeltim	6.67	54.66 ppm	201.7 ppm	440.1 ppm	31.72 ppm
3. Havalandırma Havuzu	7.33	56.22 ppm	204.8 ppm	487.0 ppm	35.04 ppm
4. Son Çökeltim Havuzu	7.74	55.63 ppm	98.16 ppm	576.7 ppm	32.20 ppm

3.2. Bakterilerin Tanımlanması

İzole edilen 19 bakteriden morfolojik olarak farklı koloni özelliklerine sahip olduğu düşünülen 9 tanesinin tanımlanması yapılmıştır. Dizileme verilerine göre elde edilen sonuçlar Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Tanımlanan izolatlar ve izole edildikleri kaynaklar

İzolat Kodu ve Erişim numarası	Tesis Tipi	İzolat Adı	% Benzerlik oranı ve benzerlik gösterdiği izolatın Gen Bankası kodu	İzolasyon Bölgesi
2AF21	A	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	1161/1177(%99) CP015878.1	Kum yağ tutucu ünitesi
2AF13	A	<i>Bordetella petrii</i>	847/852(%99) FJ577503.1	Kum yağ tutucu ünitesi
2AF14	A	<i>Pseudomonas sp.</i>	843/846(%99) KF765795.1	Geri devir çamur ünitesi
2EF1	B	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	684/695(%98) KT337533.1	Ön çökeltim ünitesi
2EF2	B	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	(817/821) (%99) KM503157.1	Kum yağ tutucu ünitesi
2EF3	B	<i>Pseudomonas linyingensis</i>	809/813(%99) HG974513.1	Havalandırma ünitesi
2EF4	B	<i>Ideonella sp.</i>	1122/1130(%99) KT619177.1	Havalandırma ünitesi
2EF8	B	<i>Burkholderia multivorans</i>	1350/1353(%99) CP009832.1	Son çökeltim ünitesi
2EF14	B	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	1274/1281(%99) KT337532.1	Ön çökeltim ünitesi

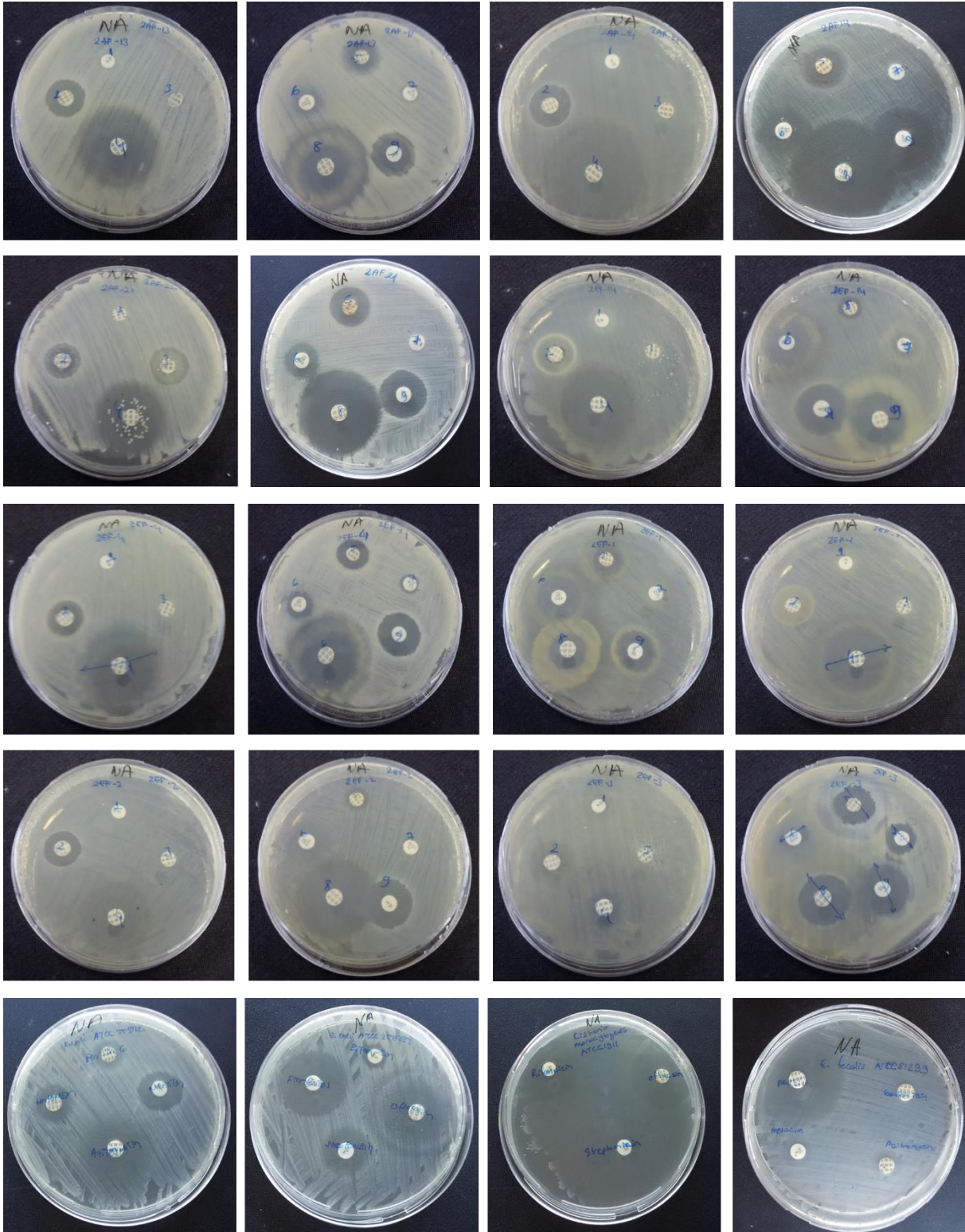
3.3. Antimikrobiyal Aktivenin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için test edilen 9 antibiyotik için 24 saat sonunda zon oluşumu Şekil 1 de gösterildiği gibi ve zon çapları da Tablo 5'teki gibi belirlenmiştir.

Tablo 5. Antimikrobiyal aktivite ölçüm sonuçları

İnhibisyon Zon Çapı (mm)									
Antibiyotik	P	G	M	AT	R	FFC	ETP	OF	S
İzolat Kodu									
2EF3	-	15	-	14	19	11	14	20	20
2EF8	-	-	-	21	-	13	-	18	-
2EF14	-	7	-	29	11	20	-	20	19
2EF4	-	14	-	28	15	11	9	28	18
2AF14	-	17	-	32	18	15	-	40	23
2AF21	-	14	17	20	15	13	-	34	20
2 EF2	-	16	-	18	9	-	-	30	19
2AF13	-	15	-	30	15	10	-	30	17
2EF1	-	-	-	27	14	17	-	15	16
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	12	14	16	27	9	27	*	32	15
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC51299	40	-	10	10	26	*	*	32	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC1911	12	10	-	10	25	*	*	29	-

(-) Antimikrobiyal aktivite gözlenmedi. (*) Belirlenemedi. **P** Penisilin G, **G** Gentamisin, **M** Metisilin, **AT** Azitromisin, **R** Rifampisin, **FFC** Florfenikol, **ETP** Ertapenem, **OF** Ofloksasin, **S** Streptomisin



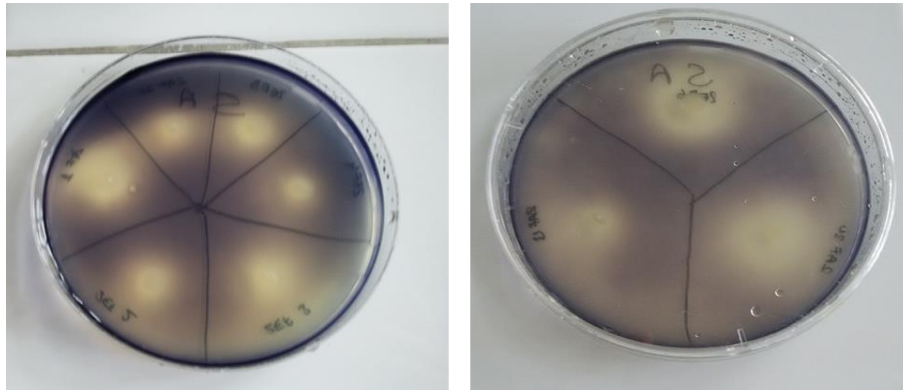
Şekil 1. İzolatların antibiyotik duyarlılık testleri

3.4. İzolatların Amilaz ve Proteaz Üretim Yetenekleri

Tanımlanan izolatların amilaz ve proteaz üretim yeteneklerini belirlemek üzere petride gerçekleştirilen enzim aktivite deneylerinin sonuçları aşağıda Şekil 2 ve 3'te verilmiştir.



Şekil 2. Yağsız süt tozlu agarda proteaz aktivitesinin belirlenmesi



Şekil 3. Nişasta agarda amilaz aktivitesinin belirlenmesi

İzolatların enzim üretim yeteneklerini karşılaştırabilmek için yağsız süt tozlu agar ve nişasta agarlı besiyerinde izolatların proteolitik ve amilolitik zon çaplarının ölçümleri alınmıştır. Ölçüm sonuçları tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Proteolitik ve amilolitik aktivite ölçüm sonuçları

İzolat No	Proteolitik zon çapı	Amilolitik zon çapı
2AF21	-	6 mm
2AF13	-	10 mm
2AF14	-	20 mm
2EF1	-	18 mm
2EF2	7 mm	13 mm
2EF3	-	10 mm
2EF4	8 mm	10 mm
2EF8	27 mm	15 mm
2EF14	-	9 mm

4. TARTIŞMA

Çalışmada kullanılan izolatlar önceki çalışmalarımız kapsamında izole edilip tanımlanmıştır. Bu izolatların atık su arıtımında kullanım potansiyellerini değerlendirmeye yönelik çalışmalar kapsamında da bazı enzimleri üretim yetenekleri ve antibiyotiklere olan duyarlılıkları belirlenmiştir.

Enzim aktivite çalışmaları kapsamında proteaz ve amilaz aktiviteleri incelenmiştir. Atık su arıtımında proteazlar ve amilazlar önemli rollere sahiptir. Atık sudaki organik maddeleri parçalama ve stabilize ettiği tespit edilen ve mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler selüloz, protein, nişasta ve şekerleri ayrıştırılabilme özellikleri nedeniyle önemlidir. İzole edilmiş bakteri türlerinin enzimatik aktiviteleri üzerine yapılan araştırmalar, organik madde parçalanmasını anlamak için kritik veriler sağlayacaktır [13].

Amilaz ve proteaz enzimleri gıda endüstrisi atıkları gibi atıkları parçalamada da son derece önemlidir. Proteazlar atık su sistemlerinde proteinleri çözünür hale getirebilir, böylece geri kazanılabilir sıvı konsantreler veya besin değeri kuru katılar elde edilir. Amilazlar ise, nişastanın eş zamanlı sakarifikasyon ve fermentasyonunda ve nişasta içeren gıda atığı suyunun arıtımında kullanılan polisakkarit hidrolazlardır. Ayrıca amilazların, aktif çamur atık suyunun arıtma süresini azaltarak arıtım kalitesini arttırdığı da görülmüştür [12]. Çalışmamızda proteaz aktivitesi gösteren izolatlar 2EF8 (*Burkholderia multivorans*), 2EF2 (*Pseudomonas nitroreducens*) ve 2EF4 (*Ideonella sp.*) izolatlarıdır. 2EF8 (*Burkholderia multivorans*) proteaz üretim yeteneği açısından oldukça verimli gözükmektedir. Ancak diğer izolatların oluşturduğu zon çapları oldukça küçüktür. Amilaz üretme yetenekleri incelendiğinde ise tüm izolatların amilaz üretim yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. Ancak en aktif izolatların 2AF14 (*Pseudomonas sp.*), 2EF1 (*Pseudomonas denitrificans*) ve 2EF8 (*Burkholderia multivorans*) olduğu belirlenmiştir. Sonuçlarımız ile konu üzerine yapılan farklı çalışmalar karşılaştırıldığında sonuçların değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada evsel, süt ve biyoteknoloji endüstrileri atık sularından izole edilen mikroorganizmaların tanımlamaları yapılmış ve lipaz, amilaz, selüloz, kazeinaz ve jelatinaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışmada oldukça fazla *Pseudomonas* ve *Bacillus* cinsi üyeleri belirlenmiştir. Çalışmada izole edilen *Pseudomonas* cinsi üyelerinin amilaz aktivitesi göstermediği, *Bacillus* cinsi üyelerinin de yoğun aktivite gösterdiği belirlenmiştir [3]. Tarım endüstrisi atıklarından izole edilen mikroorganizmalar üzerine de enzim tarama çalışmaları bulunmaktadır. *Bacillus*, *Serratia*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Lactococcus* ve *Escherichia* cinsi üyeleri izole edilmiş ve proteaz, kazeinaz, amilaz, selüloz ve lipaz taraması yapılmıştır. İzolatların yoğun enzim aktivitesi özellikle de proteaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir [14]. Sonuçlarımız ile kıyaslandığında bizim çalışmamızda sadece amilaz ve proteaz aktivitesi test edilmiştir ve izole edilen türler yoğun olarak amilaz aktivitesi göstermiştir. Elde edilen enzim aktivite verileri arıtım süreçleri açısından önem arz etmektedir. Çünkü bir atık su arıtma tesisinin ham girdisinde baskın olan organik materyal türleri mikroorganizmalar için substrat olarak görev yapmaktadır ve testlerle elde edilen veriler, bakteri popülasyonunun sistemdeki mevcut organik maddeyi parçalama yeteneği konusunda veri sağlamaktadır [15].

Ek olarak izolatların antibiyotik duyarlılık durumları da belirlenmiştir. Antibiyotikler günlük olarak idrar ve dışkılar yoluyla, değişmemiş ksenobiyotik bileşikler ve kısmen insanlar ve hayvanlar tarafından metabolize edilen biyoaktif formların karışımı olarak atılır. Bu salınım, antibiyotiğe dirençli bakteriler ile birlikte, belediye kanalizasyon şebekesi ve kanalizasyon çamurunu toprak çiftliği gübrelemesinde kullanımı gibi çeşitli yollarla oluşabilir [16]. Patojenik, komensal ve çevresel bakterileri de içermesi, yüksek seviyede organik ve inorganik maddeler barındırması, insan faaliyetlerinden kaynaklanan atık su kanalizasyonunu, özellikle antibiyotik direncinin büyümesine ve yayılmasına uyarlanmış ekolojik bir nişe dönüştürür [17]. Atık su arıtma tesisleri bu nedenle bu direnç genlerinin çoğunun buluşma noktasıdır. Fakat atık su arıtımında, bu kirleticilerin atıklardan uzaklaştırılması ve dolayısıyla su kaynakları üzerindeki potansiyel

olumsuz etkilerin azaltılmasını amaçlanmaktadır. Kullanılacak arıtım türünün seçimi, atık suyun niteliğine ve nihai kullanımına bağlı olacaktır. Fakat biyolojik arıtım yoğun tercih edilen yöntemlerdendir. Biyolojik arıtımda mikroorganizmaların rolü büyüktür. Bu yüzden arıtımda kullanılacak mikroorganizmaların ve sistemde var olan mikroorganizmaların sahip olduğu özelliklerin ve rollerin bilinmesi kritik bir nokta haline gelmektedir. Bu yüzden atık sudan izole ettiğimiz ve arıtımda kullanım potansiyeline sahip olduğunu düşündüğümüz izolatların antibiyotik duyarlılıkları test edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testleri incelendiğinde penisilin kontrol grubu bakterilere etki ederken, çalışmada elde edilen hiç bir izolat üzerine etki etmemiştir. Aynı şekilde metisilin de 2AF21 (*Pseudomonas citronellolis*) dışında diğer izolatlara etki etmemiş, *Escherichia coli* ATCC25922 ve *Enterococcus faecalis* ATCC51299 suşlarına etki etmiştir. Ertapenem ise 2EF3 (*Pseudomonas linyingensis*), ve 2EF4 (*Ideonella sp.*) dışındaki izolatlara etki etmemiştir. İzolatlara en fazla etki eden antibiyotikler ise ofloksasin, azitromisin ve streptomisindir. İzolatlar değerlendirildiğinde 2EF8 (*Burkholderia multivorans*) antibiyotiklerden en az etkilenen izolattır. Bu izolat sadece azitromisin, florfenikol ve ofloflaxin'den etkilenmiştir. Filali ve ark., 2000 [18] tarafından gerçekleştirilen çalışmada kanalizasyon örnekleri toplanmış ve bu örneklerden izolasyon yapılarak mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılık ve ağır metal direnç testleri yapılmıştır. İdentifikasyon sonucu izolatların *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, ve *Staphylococcus sp.* oldukları belirlenmiştir. Çalışmada çeşitli antibiyotikler test edilmiş olup, *Pseudomonas* üyelerinin daha dirençli olduğu belirlenmiştir. Belediye atık su arıtma tesisinde yapılan bir çalışmada ise antibiyotiğe dirençli bakterilerin sıklığı belirlenmiştir. Çalışmada penisilin, ampisilin, sefalotin ve kloramfenikole dirençli bakterilerin konsantrasyonlarının yüksek olduğu ve toplam popülasyonun yaklaşık yarısını oluşturduğu belirlenmiştir. Rifampisin ve tetrasikline dirençli bakteri sayısının ise daha az olduğu toplam popülasyonun %10 kadarını oluşturduğu belirlenmiştir. Antibiyotiğe dirençli izolatların ise Enterobacteriaceae üyesi olduğu saptanmıştır [19]. Bizim çalışmamızda da penisilin çoğu bakteriye etki etmemiş, rifampisin ise etki göstermiştir. Atık su arıtma sistemlerinde antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçları atık arıtım etkinliğini yansıtmaktadır. Antibiyotiğe dirençli bakteriler kolayca tespit edilebildiğinden, doğada ve çevresel örneklerde varlıkları çevresel kirliliğin derecesini ölçmek için biyolojik bir gösterge olarak kullanılabilir [20].

5. SONUÇ

Çalışma, elde edilen izolatların çoğunlukla *Pseudomonas* genusu üyeleri olduğu ortaya konmuştur. Bu izolatlardan yüksek enzimatik aktiviteye ve antibiyotik duyarlılığına sahip potansiyel mikrobiyal suşların belirlenmiş olması önemlidir. Çünkü bu bilgiler sayesinde arıtım sürecinin iyileştirilmesine katkıda bulunulacağı gibi, fenol degradasyon yetenekleri nedeniyle biyoteknolojik uygulamalar açısından potansiyelleri olan bu organizmaların başka çalışmalarda değerlendirilebilmesi imkanı doğmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Wagner M, Loy A, Nogueira R, Purkhold U, Lee N, and Daims H. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. A Van Leeuw J Microb, 2002;. 81(1): 665-680.
- [2] Wagner M, & Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. Curr Opin Biotechnol, 2002;13(3): 218-227.
- [3] Facchin S, Alves PDD, de Faria Siqueira F, Barroca TM, Victória JMN, & Kalapothakis E. Biodiversity and secretion of enzymes with potential utility in wastewater treatment. Open Journal of Ecology (OJE), 2013; 3(1): 34-47. <http://dx.doi.org/10.4236/oje.2013.31005>

- [4] Jin B, Van Leeuwen HJ, Patel B, & Yu Q. Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technol*, 1998; 66(3): 201-206.
- [5] Gupta R, Beg Q.K. and Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002;59:15-32. doi:10.1007/s00253-002-0975-y
- [6] Ichida JM, Krizova L, LeFevre CA, Keener HM, Elwell DL and Burt Jr EH Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *J Microbiol Methods*, 2001; 47: 199-208. doi:10.1016/S0167-7012(01)00302-5
- [7] Rigo E, Rigoni RE, Lodea P, Oliveira D, Freire DMG and Luccio M. Application of different lipases as pretreatment in anaerobic treatment of waste- water. *Environ Eng Sci*, 2008;25: 1243-1248. doi:10.1089/ees.2007.0197
- [8] Leal MCCR, Freire DMG, Cammarota MC and Sant'Anna Jr GL. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. *Process Biochem*, 2006; 41: 1173-1178. doi:10.1016/j.procbio.2005.12.014
- [9] Karam J, & Nicell JA Potential applications of enzymes in waste treatment. *J Chem Technol Biot*, 1997; 69(2): 141-153.
- [10] Lane, DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR, Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci*, 1985; 82(20):6955-6959.
- [11] Singh P, & Kumari P. Isolation and characterization of amylase producing *Bacillus* spp. from selected soil sample. *IJRBS*, 2016;5(2);24-29. <http://www.ijrbs.in> ISSN 2319-2844
- [12] Tennalli G, Udupudi B, Naik P. Isolation of Proteolytic Bacteria and Characterization of their Proteolytic Activity. *International Journal of Advances in Engineering, Science and Technology (IAEST)*, 2012; 2(3),ISSN : 2249-913X.
- [13] Xing M, Li X, Yang J. Treatment performance of small-scale vermifilter for domestic wastewater and its relationship to earthworm growth, reproduction and enzymatic activity. *Afr. J Biotechnol*, 2010; 9:7513–7520.
- [14] Mazzucotelli CA, Ponce AG, Kotlar, CE, & Moreira MDR. Isolation and characterization of bacterial strains with a hydrolytic profile with potential use in bioconversion of agroindustrial by-products and waste. *Food Sci. Technol (Campinas) Food*, 2013;33(2):295-303.
- [15] Hankin L, & Sands DC. Bacterial production of enzymes in activated sludge systems. *J Water Pollut Control Fed*, 1974;2015-2025.
- [16] Amador PP, Fernandes RM, Prudêncio MC, Barreto MP, & Duarte IM. Antibiotic resistance in wastewater: Occurrence and fate of Enterobacteriaceae producers of Class A and Class C β -lactamases. *J Environ Sci Health A*, 2015;50(1):26-39.

- [17] Oubrim N. Removal of antibiotic-resistant Salmonella in sewage water from wastewater treatment plants in Settat and Soualem, Morocco. *Eur J Sci Res*, 2012; 68(4): 565–573.
- [18] Filali BK, Taoufik J, Zeroual Y, Dzairi FZ, Talbi M, & Blaghen, M. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Curr Microbiol*, 2000; 41(3): 151-156.
- [19] Huang JJ, Hu HY, Lu SQ, Li Y, Tang F, Lu Y, & Wei B. Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. *Environ Int*, 2012;42,:31-36.
- [20] Al-Bahry SN, Mahmoud IY, Paulson JR, & Al-Musharafi SK. Survival and growth of antibiotic resistant bacteria in treated wastewater and water distribution system and their implication in human health: a review. *Int. Arabic J. Antimicrob. Agents*, 2014; 4: 1-11.