



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİ VE
HETEROTROFİK BAKTERİLERİN PCR İLE
KANTİTATİF OLARAK BELİRLENMESİ**

Doktora Tezi

SHADMAN TARIQ SADIQ

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2019

TC. EGE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİ VE HETEROTROFİK BAKTERİLERİN
PCR İLE KANTİTATİF OLARAK BELİRLENMESİ***

SHADMAN TARIQ SADIQ

Danışman: Prof. Dr. İhsan YAŞA

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Doktora Programı

İZMİR

2019

SHADMAN TARIQ SADIQ tarafından Doktora tezi olarak sunulan “Antibiyotik direnç genleri ve heterotrofik bakterilerin PCR ile kantitatif olarak belirlenmesi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 13.12.2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

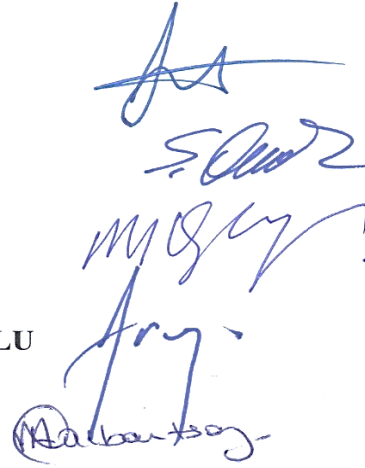
Jüri Başkanı : Prof.Dr.İhsan YAŞA

Raportör Üye : Prof.Dr.Şenol ALPAT

Üye : Prof.Dr.Mustafa OSKAY

Üye : Doç.Dr.Esra ERSOY ÖMEROĞLU

Üye : Doç.Dr.Ayşe NALBANTSOY



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca **Doktora Tezi** olarak sunduğum “ **Antibiyotik direnç genleri ve heterotrofik bakterilerin PCR ile kantitatif olarak belirlenmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

27/ 12 / 2019

 İmzası

SHADMAN SADIQ

ÖZET***ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİ VE HETEROTROFİK BAKTERİLERİN
PCR İLE KANTİTATİF OLARAK BELİRLENMESİ***

SHADMAN TARIQ SADIQ

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. İhsan YAŞA

Aralık, 2019, 92 sayfa

Antibiyotik dirençli bakteriler (ADB) ve antibiyotik direnç genleri (ADG) dünya çapında gittikçe büyümekte olan önemli bir konudur. Nisan 2018 - Mart 2019 arasında Manisa Saruhanlı Atıksu Arıtma Tesisinden giriş ve çıkış noktalarından su numuneleri alınmıştır. Bu tezde ADB ve ADG belirlemek için kültürel ve moleküler biyolojik yöntemler uygulanmıştır, ayrıca kalıntı analizleri için kromatografi tekniği kullanıldı. Yıl boyunca elde edilen total heterotrofik bakteri sayım sonuçları, giriş sularında minimum 4.26×10^6 kob / mL'den 7.525×10^4 kob / mL'ye, çıkış sularında ise maksimum 9.8×10^2 kob/mL'den minimum 9.4×10^2 kob/mL olarak değiştiğini göstermiştir. Dirençli bakteri hücrelerinin sayısı giriş ve çıkış kısımlarında Eritromisin (Er), Ampisilin (AMP), Gentamisin (Gen), Kanamisin (Kan), Tetrasiklin (TC) ve Clindamisin (Cln) gibi yaygın antibiyotiklere karşı test edilmiş. Giriş örnekleri için yıl boyunca toplam dirençli bakteri sayısı değişmiş olup, ilgili antibiyotiğe karşı oluşturulan direnç tüm aylarda yapılan örneklemelede tespit edilmiş olup, sulfonamid dirençli bakteriler ile kanamisin ve klindamisine dirençli bakteriler bahar aylarında tespit edilmemiştir. Yedi özgün antibiyotiğin varlığı ve mevsimsel değişimi Atık Su Arıtma Tesisinde yüksek çözünürlüklü sıvı kromatografi spektroskopisi (LC-Q-ToF-MS) kullanılarak araştırılmıştır. Antibiyotik rezidülerinin tayin sonuçları tüm ilgilenilen antibiyotiklerin dört mevsim örneklerinde bulunduğunu, sulfonamid ve kanamisin ile tespit edilmediğini göstermiştir. Antibiyotik rezidülerinin değerlendirilmesinde kullanılan LC-Q-ToF-MS ile yine pestisit, herbisit ve veteriner ilaçları analiz edilmiş olup en çok bulunan pestisit ve herbisitlerin DDT, dinoterb ve denatonyum olduğunu.

Çalışmamızda 13 farklı metalin (As, Se, Al, Ag, Sb, Ba, Hg, Cd, Pb, Mn, Cr, Fe and Ni) katı ve sıvı formları 4 mevsim boyunca incelenmiştir. Tüm metallerin giriş

sularında %100 ve çıkış sularında ise yaklaşık olarak %90 oranında (toplam konsantrasyon) bulunduğu tespit edilmiş olup. Atık sudaki antibiyotik kalıntılarının tayini yapıldıktan sonra, konvansiyonel PCR ile antibiyotik direnç genleri tespit edilmiştir. Araştırmalarımız ile beş direnç gen bölgesinin (*tetA*, *ermA*, *sul I*, *ant (2")-I* ve *AmpC*) incelenmiştir. 4 antibiyotik direnç gen elde edilen örneklerinin hepsinde %100 olarak tespit edilmiş olup, sadece (*AmpC*) geni tespit edilememiştir. Direnç genlerinin kantitatif belirlenmesi için qPCR yapılmıştır. Bu uygulama için Gentamisin direnç geni (GDG) *ant(2")* seçilmiştir. *ant (2")* kopya sayısı olarak belirtilmiştir. Klasik PCR sonuçlarında görüldüğü gibi GDG bütün mevsimlerde dağılım göstermiştir, sonuçlara göre giriş sularında GDG'de yüksek kopya sayısı bulunmuştur, çıkış sularında ise gen kopya sayısı arıtma işleminden dolayı daha düşük tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik direnç genleri, Antibiyotik dirençli bakteriler, Saruhanlı Atıksu Arıtma Tesisi.

ABSTRACT**QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES AND
HETEROTROPHIC BACTERIA BY PCR**

SHADMAN TARIQ SADIQ
PhD in Biology Department
Supervisor : Prof. Dr. İhsan YAŞA
December,2019, 92 pages

Nowadays, antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARGs) are a hot topic of concern which growing worldwide and considered new classes of water contaminants. In this project, we used cultural and molecular techniques for assessment of ARB & ARG, as well as chromatographic techniques to do antibiotics & pesticide residues analyses. Sample collected from Saruhanli wastewater treatment plant system (WWTPs) in Manisa city of Aegean region between April 2018 – March 2019 meanly 2 campaigns per month. The obtained results of total heterotrophic bacteria (THB) during the year was showed changing from (4.26×10^6) CFU/mL as maximum to (7.52×10^4) CFU/mL as a minimum for influent part and changed from (9.8×10^2) CFU/mL as maximum to (9.4×10^2) CFU/mL as a minimum for effluent. The number of resistant bacterial cells also calculated in both influent and effluent against six commonly used antibiotics, the applied antibiotic solutions were Erythromycin (Er), Ampicillin (Amp), Gentamycin (Gen), Kanamycin (Kan), Tetracycline (TC) and Clindamycin (Cln), as well as susceptibility test was performed to ensure the resistance to antibiotics by the disc diffusion method. The total number of bacteria in influent samples during the year was changed. Most resistance bacteria against interested antibiotics are detected in all months of the sampling. High-Resolution liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-Q-ToF-MS) used for qualification investigates of the occurrence, amount and seasonal change of seven typical antibiotics residues sulfonamide / Sulfamethoxazole, Ampicillin. Tetracycline, Erythromycin, Clindamycin, Gentamycin, and Kanamycin, results showed that all targeted antibiotics founded in four seasons except Sulphonamide and kanamycin not detected.

LC-Q-ToF-MS also used for Pesticides, Herbicides and Veterinary drug residue qualification. Results showed that the most pesticides and herbicides founded was DDT, Dinoterb and Denatonium. As well as residues analyses, 13 metal (As, Se, Al, Ag, Sb, Ba, Hg, Cd, Pb, Mn, Cr, Fe and Ni) assessed. All these metals founded 100% in influent and about 90% for effluent parts. Finally, we detected ARGs in the same samples by Convenient PCR. Our investigations succeeded in assay four ARGs: *tetA*, *ermA*, *sul 1* and *ant (2'')*-I. The results of qualification detection showed that all of these ARGs was founded 100 % during one year of sampling for both influent and effluent samples of WWTP except (*AmpC*) gen not detected, (*ermA*) gen appeared in 20 % of influent samples with no appear in effluent samples. For quantification of ARGs, qPCR method applied and TagMan probe used for determination of gene copy number, among qualified ARGs, Gentamicin resistance gene *ant (2'')* was selected for quantification. The result showed variation in gene copy number and the gene copy number was high in all seasons.

Keywords: Antibiotics resistance genes, Antibiotics resistance bacteria, Saruhanlı wastewater treatment plants.

ÖNSÖZ

Global bir sorun haline gelmiş olan antimikrobiyal dirençle ilgili farkındalık yaratılması ve mevcut durumun saptanmasına yönelik gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasında atık sulardaki bakterilerin mevsimsel antimikrobiyal direnç durumlarını değerlendirdik. Çalışmamızda belirli süreler takibinde, Nisan 2018 - Mart 2019 arasında Manisa Saruhanlı Atıksu Arıtma Tesisi'nin giriş ve çıkış noktalarından su numuneleri alınmıştır. Numuneler, rezistom bakış açısı ile hem çeşitli antibiyotikler hemde ağır metaller için analizlere tabi tutulmuştur. Doktora tezi olarak tamamladığımız bu çalışmanın sonuçlarını bilgilerinize sunmaktan gurur duymaktayım. Tez projesi süresince desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. İhsan YAŞA' ya teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İzmir,30/12/2019

Shadman Tariq Sadiq

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Antibiyotik ve Antimikrobiyal Maddeler	3
2.2 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması	4
2.2.1 Antibiyotikleri Etki Şekline Göre Sınıflandırma	5
2.2.1.1. Bakterisidal ve Bakteriyostatik Antibiyotikler	5
2.2.1.2. Geniş Spektrumlu ve Dar Spektrumlu Antibiyotikler.....	5
2.2.2. Kimyasal Yapısına Göre Sınıflandırma:	5
2.3. Antibiyotik Etki Mekanizmaları:	6
2.3.1. Hücre Duvarını Hedef Alan Antibiyotikler	6
2.3.2. Protein Biyosentezi İnhibitörleri.....	7
2.3.3. Nükleik Asit Sentezinin İnhibisyonu	7
2.3.4. Sitoplazma Membranının Geçirgenliğini Artırarak Etki Gösterenler	7
2.4 Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	8
2.5 Atık Su ve Atık Su Arıtma Tesisleri	9

İÇİNDEKİLER (devam)

2.6. Atık Su ve Antibiyotik Direnci.....	10
2.7. Atık Suda Antibiyotik Kalıntıları	11
2.8. Atık Suda Pestisit Kalıntısı.....	12
2.9. Atık Suda Ağır Metal ve AMD.	13
2.10. PCR ile AMD Araştırmaları	14
3. MATERYAL VE METOD	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar	16
3.1.1.1. TE Tamponu	16
3.1.1.2. GelRed™ (DNA Yükleme Boyası)	16
3.1.1.3. Antibiyotik Stok Solüsyonunun.....	16
3.1.2. Besiyerleri.....	17
3.1.2.1. R2A agar:.....	17
3.1.2.2. Nutrient Agar (NA)	18
3.1.2.3. Luria Bertani Broth (LB)	18
3.1.2.4. Mueller Hinton Agar	18
3.1.2.5. Pseudomonas (Cetrimide) Agar.....	18
3.1.2.6. Mannitol Salt Agar	19
3.1.2.7. Kanlı Agar Besiyeri	19
3.1.3. Kullanılan kitler	19
3.1.3.1. DNA İzolasyon Kiti.....	19
3.1.4. Kullanılan cihazlar.....	20
3.1.5. Diğer Malzemeler	20

İÇİNDEKİLER (devam)

3.2. METOT.....	20
3.2.1. Örnekleme Bölgesi.....	20
3.2.2. Saruhanlı Atıksu Arıtma Tesisi (S.A.A.T).....	22
3.2.3. Örnek Alıma yöntemi.....	23
3.2.4. Toplam Heterotrofik Bakteri ve Toplam Antibiyotik Dirençli Bakteri Sayımı	25
3.2.5. Toplam DNA ekstraksiyonu	27
3.2.6. Genomik DNA'nın Konsantrasyon Tayini	28
3.2.7. DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi	29
3.2.8. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (ADT)	29
3.2.9. Standart Polimeraz Zincir Reaksiyonu – PZR (PCR)	30
3.2.10. Kantitatif Real-Time PCR (qPCR).	32
3.2.11.Dizi Analizi	34
3.2.12. Antibiyotik ve Pestisit Kalıntı Analizi	34
3.2.13. Ağır Metal Analizi	35
3.2.13. Heterotrofik bakteri İzolatların Stoklanması.....	36
3.2.14. İstatistiksel Analizler.....	36
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	37
4.1. Atık Suda Toplam Heterotrofik Bakteri Sayımı	37
4.2. Antibiyotik Dirençli Bakterilerin Sayımı - ADB	39
4.3. Antibiyotik Rezidülerinin Tayini ve Miktarının Belirlenmesi.....	45
4.4. Pestisit, Herbisit ve Veteriner İlaçlarının Analizi	50
4.5 Atık Sudaki Ağır Metallerin Değerlendirilmesi.....	55

İÇİNDEKİLER (devam)

4.6. Antibiyotik Direnç Genlerinin Moleküler İdentifikasyonu	57
KAYNAKLAR	66
TEŞEKKÜR	90
ÖZGEÇMİŞ	91



TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1 Antibiyotik stok solüsyonunun hazırlanması ve saklanması.....	17
Tablo 3.2 Klasik PCR de kullanılan Primerleri	31
Tablo 3.3. PCR koşulları ve basamakları	31
Tablo 3.4 qPCR cihaz protokolü	33
Tablo 3.5 Real-Time PCR reaksiyon karışımı ve miktarları	33
Tablo 4.1. Giriş ve Çıkış suyunda THB sayımı.....	38
Tablo 4.2 Farklı aylarda giriş suyunda ADB sayımı	41
Tablo 4.3 Farklı aylarda çıkış suyunda ADB sayımı.....	43
Tablo 4.4 Dirençli bakterilerin giderim verimi - RE %	45
Tablo 4.5 Antibiyotik kalıntıları	46
Tablo 4.6 Mevsimsel antibiyotik giderimi RE %	49
Tablo 4.7 Pestisit, herbisit ve veteriner ilaçlarının analiz sonuçları	51
Tablo 4.8 Giriş ve çıkış sularında ağır metall analizi(ppb)	55
Tablo 4.9 Direnç genlerin identifikasyonunu ve azalma oranı (RE%).....	58
Tablo 4.10 Gentamicin direnç genleri Kantitatif belirlenmesi.	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Doğada antibiyotik yayılım süreci (Harbarth et al.,2015)	3
Şekil 2.1 Bakteri hücre duvarı ve peptidoglikan tabakası.....	6
Şekil 2.2 Başlıcaantimikrobiyal ajanlar ve etki şekilleri.....	8
Şekil 2.3 Atık su kaynakları.....	10
Şekil 3.1 NorGen kit	19
Şekil 3.2. Saruhanlı ilçe haritası.....	21
Şekil 3.3. Saruhanlı ilçesi.....	22
Şekil 3.4 Saruhanlı AAT.	23
Şekil 3.5. Örnek Alımı yöntemi	24
Şekil 3.6. Su filtrasyon sistemi.....	24
Şekil 3.7 THB seyreltmesi ve sayımı.....	26
Şekil 3.8. Koloni oluşan birimler ve TTC etkisi	27
Şekil 3.9. Total DNA İzolasyonu özeti	28
Şekil 3.10 Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	30
Şekil 3.11. Standart Eğri Aplifikasyonu	32
Şekil 3.12. qPCR standart eğrisi	33
Şekil 3.13 Agilent 1260 Infinity Serisi HPLC cihazı.....	35
Şekil 3.14Agilent ICP-MS 7900 cihazı.....	36
Şekil 4.2. Giriş suyu THB ve ADB oranı- Sonbahar (ekim)	42
Şekil 4.4 Mevsimsel antibiyotik RE%	49
Şekil 4.5 A, B, C ve D LQ-QTOF-MS cihaz sonuçları	52
Şekil 4.6 Tüm DNA örneklerinde ARG varlığı	59

Şekil 4.7 (A) <i>tet A</i> geni	59
Şekil 4.8 (B) <i>ermA</i> geni	59
Şekil 4.9 (C) <i>Sul I</i> geni.....	60
Şekil 4.10 (D) Gentamicin geni (<i>ant (2'')-I</i>)	60



KISALTMALAR

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	Ribozomal RNA
ADB	Antibiyotik Dirençli Bakteriler
ADG	Antibiyotik Direnç Geni
AMD	Antimikrobiyal Direnç

1. GİRİŞ

Antibiyotik dirençli bakteriler (ADB) ve antibiyotik direnç genleri (ADG) dünya çapında gittikçe büyüyen önemli bir konudur (Li et al., 2019; Hernández et al., 2019). Su ekosistemleri ve insan sağlığı üzerindeki potansiyel olumsuz etkileri nedeniyle yeni bir su kontaminantı sınıfı olarak bilinmektedir (Le et al., 2018).

Geçtiğimiz yıllarda, antibiyotik direnci terimi klinik ve veterinerlik vakalarıyla sınırlıydı, ancak son zamanlarda tüm dünyada bir sorun haline gelmiş, insan ve hayvanlar dışında, besinlerin içeriğinde ve çevrede de artık bulunmaktadır. İnsanlara, hayvanlara ve bitkilere uygulanan antibiyotiklerin büyük bir kısmı sonuç olarak çevrede birikmiş olur (Nordgard et al., 2017) .

Sanayileşme, sürekli kentsel gelişim ve özellikle bakterilerin antibiyotiklere maruz kalması nedeniyle gün geçtikçe bu sorun artmaktadır. Tüm bunlar antibiyotik direncine neden olmakta ve bu nedenler antibiyotik direnci kontaminasyonu olarak tanımlanan yeni bir tür kimyasal kontaminasyona yol açmaktadır (Tahrani et al., 2015; Singer et al., 2016; Florica Marinescu et al., 2017) .

Sucul ortamlar, antropojen kaynaklardan gelen ADB ve ADG'lerin doğal sisteme nüfuz etmesi için bir aracı görevi üstlenerek antibiyotik direncinin (Marti et al., 2013) kazanılması ve yayılması için ideal bir ortam sağlayabilmektedir (Rizzo et al., 2013) Şekil 1.1.

Antibiyotiklerin yanlış kullanımı gibi insan faaliyetleri, klinik ortamda meydana gelen antimikrobiyal dirençte (AMD) bir artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, AMR olgusu antibiyotiklerin seri üretimi ve klinik kullanımını 30.000 yıl kadar önceden göstermektedir (Nordgard et al , 2017 ve Perry et al., 2016) .

AMD artışının başka bir nedeni de, patojenik olmayan çevresel mikropların büyük bir kısmının başlangıçta antibiyotiklere dirençli olmaması, daha sonra ortamdaki diğer mikroplar, bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilen kimyasallarla etkileşime girdiklerinde antibiyotiğe karşı direnç göstermesidir. Örneğin, 2016 yılında Tunyakamon Jaidumrong'un hastanelerin atık sularındaki antibiyotik kalıntıları ile ilgili yapmış olduğu bir araştırmada, hastanede insanlardaki bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için uzun süreden beri kullanılan antibiyotikler nedeniyle daha fazla miktarda atık su arıtma tesisine'lerin etkisinde daha fazla antibiyotik rezidü

konsantrasyonu bulmuşlardır. Hastane ortamında, antibiyotik miktarının bu denli çokluğu, hastane atık sularında antibiyotik direncindeki artışın en önemli nedenlerini göz önüne sermektedir (Tunyakamon Jaidumrong et al.,2016)

Bir halk sağlığı sorunu olarak, AMD büyük bir tehdit haline gelmiştir. Bu hastalar, sağlık hizmetleri görevlileri, ilaç endüstrisi ve genel anlamda bütünlükle toplumu etkilemektedir. AMD tehdidinin üstesinden gelmek için sağlık hizmetlerinin tüm branşlarında yoğun bir çabaya ihtiyaç duyulmaktadır (Jindal et al ,2014).

Özellikle Iversen gibi bazı araştırmacılar, bu olgunun çevreden insana doğrudan veya dolaylı temas yoluyla bulaşabileceği sonucuna varmışlardır (Iversen et al., 2004 ; Kim et al., 2005) .

AMD'nin yayılmasının gittikçe artması ile ilgili endişeler göz önünde bulundurulmuştur (Bondarczuk et al., 2016; Rahube. et al., 2016 ve Rizzo et al., 2013).

Norveç Gıda Bilimsel Komitesi (vitenskapskomiteen for mat og miljø - VKM) tarafından 2009 yılında yayınlanan bir raporda, Norveç'te toprak düzenleyici olarak lağım çamuru uygulanmasının ardından toprakta ADB ve ARG görülme riski değerlendirilmiştir (VKM, 2009). VKM'nin literatürdeki çalışmalarına ve rapordaki bulgulara dayanarak vardığı sonuç, AMR'nin atıksu arıtma tesisi suyunda (STPW), çamurda veya toprakta gübre olarak kullanılmasının ardından toprağa uygulamasının faydasız olduğudur.

İçme suyu ve onun kalitesi ile ilgili esas endişe temelde patojenlerin mevcut olmasına ilişkin olmuştur, ancak çevresindeki su kaynaklarında ve tükenmiş içme suyunda antibiyotik ve ADB'yi teşhis etmeye yarayan çalışmaların sayısı artmaktadır (Baquero et al., 2008; Dodd, 2012 ve Schwartz et al., 2003).

Farklı atık su arıtma tesislerinden (AAT) gelen atık sular, evlerden, sanayi bölgelerinden, hastanelerden ve kentsel yaşam alanlarından gelen akar sulardan oluşan bir atık su karışımı olup, Antibiyotikler, Antibiyotik Dirençli Genler ve Farklı Kaynaklardan gelmiş Bakteri Toplanma Yeri olarak da değerlendirilmektedir (Karkman et al., 2018).

Konvansiyonel atık su uygulaması birincil, ikincil ve bazen üçüncül uygulama aşamaları dahil olmak üzere birçok farklı aşamalardan oluşmaktadır. Birincil

uygulama sert parçaların elimine edildiği mekanik ve fiziksel temizlemedir. Organik maddelerin ve gıdaların uzaklaştırıldığı ikinci aşama hem kimyasal hem de biyolojik uygulamanın gerçekleştirildiği için çok önemlidir. Sonuncu, üçüncü aşamada ise fosfor bileşenleri ve nitrojen molekülleri ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Bu aşama, çöktürme ile veya bazı filtre türleri kullanılarak yapılabilir (Michael et al., 2013).



Şekil 1.1 Doğada antibiyotik yayılım süreci (Harbarth et al.,2015)

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Antibiyotik ve Antimikrobiyal Maddeler

Antibiyotikler, belli bir mikroorganizmadan başka bir mikroorganizmayı öldürmek, metabolik fonksiyonlarını bloke ederek veya çoğalmasını durdurmak için üretilen kemoterapötik ajanlardır (Gilmore , 2002 ve Arnold,2009).

1928 yılında, penisilinin antibiyotiklerden ilk defa Alexander Fleming tarafından keşfedilmiş ve bu keşif bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde tıp tarihinde devrim yaratılmıştır (Sengupta et al.,2013). Antibakteriyel tedavi 1935 yılında Domagk'ın sulfonamidleri tedavide kullanmasıyla gelişme safhasına girmiştir. 1929'da Fleming'in gözlemlediği ve 1940'da Chain ve Flarey'in *Penicillium notatum*'dan elde ettiği bir maddenin bakteriler üzerine öldürücü etkisinin belirlenmesi ile antibiyotikler

üzerindeki çalışmalar ve uygulamalar büyük bir şekilde artış göstermiştir (Lambert ,2005).

1940 ve 1962'li yıllarda bu güne kadar bilinen antibiyotiklerin neredeyse tüm sınıfları keşfedilmiştir. Penisilinle başlayarak kinolona doğru gelişim göstererek en son 1960 yılında sonuncu yeni büyük bir bileşenler sınıfı tanımlandı ve tedavide uygulanmaya başlandı. Kinolonların satışa sunulmasından sonra, 2000 yılına kadar oksazolinidonların (1978'de keşfedilen sentetik bileşikler) piyasaya sürülmesine kadar kliniğe yeni bir büyük antibiyotik sınıfı önerilmemiştir. Daha sonra 2003 yılında lipopeptidler (1986 yılında keşfedilmiş daptomisin) piyasaya sürülmüştür. 40 yıllık bir keşif boşluğu sırasında, ilaç endüstrisi yeni antibiyotik geliştirilmesine olan ilgisini kaybetmiştir (Beutler, 2009 ve Claudio et al., 2013).

Antibiyotikler 2 fonksiyonu yerine getirmesi için organizmaya uygulanır. Bakterisid; bakterileri öldürme ve bakteriyostatik; onların çoğalmasını engellemek amacıyla kullanılır (Helen Nankervis,2016).

Antibiyotikler ve antibakteriyal ajanlar her ikisinde bakterileri hedef almaktadır. Bu iki terim iki farklı nesneyi ifade etmektedir. Antibiyotikler tıpta bakteriyal enfeksiyonlardan korunma ve tedavi amaçlı kullanılmaktadır (AbdulRahman et al.,2017), ancak antimikrobiyal ajanlar potansiyel olarak zararlı yahut patojen olmayan bakteri elimine etmek, veya yüzeyleri dezenfekte etmek amaçlı kullanılır. Antibiyotiklerin aksine antibakteriyal ajanları insan ve hayvanlara ilaç amaçlı uygulanmaz, ancak cilt bakım ürünleri, sabunlar, deterjanlar ve ev temizleyicileri gibi ürünlerde bulunmaktadır (Russell , 2004).

2.2 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

1930 ve 1962 yılları arasında 20 antibiyotik sınıfı üretilmiştir. Bugüne kadar sadece 4 yeni antibiyotik sınıfı piyasaya sürülmüştür. Enteresan olarak bu yeni sayılan sınıfların hiç birisi aslında yeni değildir. 2000 senesinde onaylanmış olan daptomisin, 1980'lerin başında geliştirilmiştir; 2000 senesinde onaylanmış olan linezolid, 1970'lerde sentetik öncüsünden üretilmiştir; pleuromutilinler 2007 senesinde türetilmiş ve 30 sene boyunca veteriner tıbbında yaygın olarak kullanılmıştır; 2011 senesinde önerilmiş olan fidaksomisin ise ilk olarak 1970'li yıllarda rapor edilmiştir (Houghton et al., 2010 ve Sutcliffe, 2011).

Aşağıdaki kriterilere göre antibiyotikler sınıflandırılmaktadır.

2.2.1 Antibiyotikleri Etki Şekline Göre Sınıflandırma

2.2.1.1. Bakterisidal ve Bakteriyostatik Antibiyotikler

Bakterisid bakteri öldürme fonksiyonu anlamını gelir ve bu eylemde hücre bir daha asla tekrar aktive olmaz. İkinci sınıf, zamanla bakteriyel hücre büyümesini etkisiz haline getirme veya durdurma fonksiyonuna sahiptir ve bakteriyostatik olarak adlandırılmaktadır (Helen Nankervis, 2016).

2.2.1.2. Geniş Spektrumlu ve Dar Spektrumlu Antibiyotikler

Geniş spektrumlu antibiyotikler, hem Gram pozitif, hem de Gram negatif bakteri türleri üzerinde geniş bir etkiye sahip olmasından dolayı böyle isimlendirilir. Ancak dar spektrumlu antibiyotikler yalnızca birkaç bakteri türüne karşı etkilidir (Saene et al., 1998).

2.2.2. Kimyasal Yapısına Göre Sınıflandırma:

Antibiyotiklerin sınıflandırılması için farklı sistemlerin olmasına rağmen en yaygın sınıflandırma moleküler yapılarına dayanan sınıflandırmadır (Ebimieowei ve Arıkekpar, 2016).

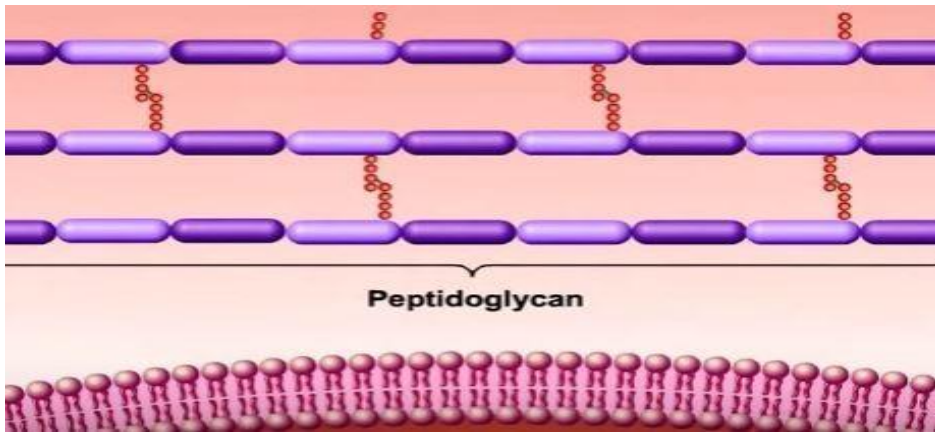
Moleküler yapılarına göre temel antibiyotik sınıfları:

- Beta-laktamlar
- Penisilinler
- Sefalosporinler
- Makrolidler
- Florokinolonlar
- Tetrasiklinler
- Aminoglikozitler (Van Hoek et al., 2011).

2.3. Antibiyotik Etki Mekanizmaları:

2.3.1. Hücre Duvarını Hedef Alan Antibiyotikler

Antibiyotikler, bakteri zarının hem iç, hem de dış hücre duvarı bölgesine veya yakınına etki ederek peptidoglikan biyosentezini inhibe eder. Bakteriyel hücreler, çoğunlukla uzun şeker polimerlerinden oluşan, peptidoglikan diye bilinen biyokimyasal yapıdadır ve çıkıntılı hücre çeperi ile çevrilidir. Peptidoglikanlar, çapraz peptit bağları oluşturarak çok sayıda polimerizasyon reaksiyonuna girer (Kahne et al., 2005) . Peptit zincirinin D-alanin kolu, penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP'ler) varlığında glisin kalıntıları ile çapraz bağlanır (Reynolds P,1989). Bu çapraz bağlanma hücre duvarını güçlendirir. Bu reaksiyonlarla etkileşime giren antibiyotikler hücre duvarı sentezini inhibe eden glikopeptitler ve β -laktamlardır (Claudio et al., 2013). (Şekil 2.1)



Şekil 2.1 Bakteri hücre duvarı ve peptidoglikan tabakası(<http://webders.net/>)

2.3.2. Protein Biyosentezi İnhibitörleri

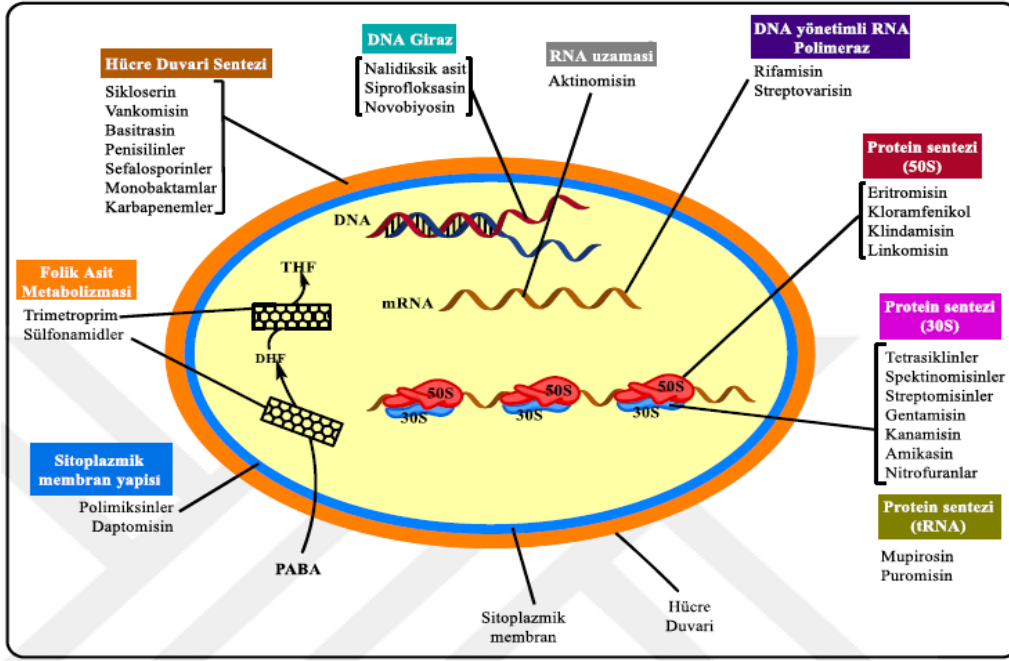
Protein biyosentezi bakteriyel hücre için en önemli biyolojik reaksiyonlardan birisidir. Bunun nedeni diğer tüm reaksiyonların proteine bağlı olmasıdır. Aminoglikozitler gibi antibiyotikler, translasyon sırasında yanlış kodlama yaparak veya peptit bağ oluşumunu engelleyerek 30S ribozom alt birimine veya 50S ribozoma etki ederek protein sentezini inhibe eder (Mehta, and Champney, 2003 ; McGaha, S.M. ve Champney, 2007) .

2.3.3. Nükleik Asit Sentezinin İnhibisyonu

Antibiyotik ilaçlar, iki farklı mekanizma ile nükleik asit sentezini inhibe edebilir. Bunlardan birincisi DNA polimeraz ve DNA helikaz enzimi ile etkileşime girerek (Brown et al., 1986), ikincisi ise, hücrede genetik bilginin ifadesinde merkezi bir işlem olarak replikasyonu veya transkripsiyonu bloke ederek gerçekleştirir. Sonuç olarak RNA polimeraz aktivitesi baskılanmış olur. (Borukhov ve Nudler ,2008). Buna örnek olarak, bakteri DNA giraz enzimini inhibe eden florokinolonları, rifamisinleri, streptolidigin ve Lipiarmisin gösterilebilir (Hugo ve Russell , 1998; Yoneyama ve Katsumata, 2006 ; Higgins et al., 2003).

2.3.4. Sitoplazma Membranının Geçirgenliğini Artırarak Etki Gösterenler

Polimiksinler, siklosporin A, gramisidin, amfoterisin B, nistatin, katyonik deterjanlar. Bu ilaçlar sitoplazmada bulunan amino asid ve nukleotidler gibi önemli bileşiklerin hücre dışına çıkmalarına neden olur ve bakterisidal etki gösterir (Şekil 2.2) (Molina, 2009).



Şekil 2.2 Başlıcaantimikrobiyal ajanlar ve etki şekilleri (Yeliz , 2018)

2.4 Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

İnsanlar ve mikroorganizmalar arasında sonunda hastalıkla sonuçlanan savaş, tarih boyunca çok fazla ölüme neden olmuştur. Bu savaş, penisilin keşfedildiği ve hastalıkların tedavisinde kullanıldığı zamandan itibaren önemli ölçüde azalmıştır. Bununla birlikte, antibiyotiklerin klinikte uygulanmaya başlandığı andan itibaren bakteriyel direnç ortaya çıkmıştır (Abraham ve Chain, 1940 ; Tenover, 2006). Antibiyotik direnci, bir mikroorganizmanın antibiyotiklerin etkilerine karşı dayanabilme yeteneğidir (Adriel ve Kaden , 2009).

İlk antibiyotik direnç mekanizması (penisilinaz) 1940'ta keşfedilmiş (Abraham ve Chain, 1940) ve aynı yıl penisilin klinik kullanıma sunulmuştur (Walsh, 2003). Penisilin mucidi Sir Alexander Fleming, bakteriyel bir enfeksiyonu penisilin ile tedavi ederken “doz altında” kolayca direnç gösterebileceği konusunda hastaları uyarıyordu. Penisilin keşfi, enfeksiyonları tedavi etme yönteminde devrim yarattı ve o zamandan beri sayısız hastanın hayatını kurtarmıştır. Ancak, Fleming'in uyarısına

rağmen, antibiyotik direnci kısa sürede klinik olarak ilgili suşlarda ortaya çıkmıştır (Abraham ve Chain, 1940).

Aşağıda Antibiyotiklere karşı oluşan temel direnç mekanizmaları sıralanmıştır.

İlaç inaktivasyonu / modifikasyonu: örneğin, β -lactamaz üretimi yoluyla Penisilin G nin deaktivasyonu (Lee et al ,2016).

Hedef /bağlanma bölgesinin alterasyonu: örneğin **MRSA** ve diğer penisiline dirençli bakterilerde penisilin bağlanan hedef noktası olan PBP nin alterasyonu (Connell et al.,2003).

Metabolik yolağın alterasyonu:

Örneğin, bazı sülfonamide dirençli bakteriler folik asit ve nükleik asitlerin sentezi için önemli olan para-aminobenzoik asite ihtiyaç duymaz ve önceden sentezledikleri folik asiti kullanmaya başlarlar (Henry ,1943).

Azaltılmış ilaç akümüasyonu:

Bu hücrenin geçirgenliğini zayıflatarak ilaçların sitoplazmaya geçmesini engeller veya ilaç moleküllerini hücre dışına pompalayarak gerçekleştir (Li,2009).

2.5 Atık Su ve Atık Su Arıtma Tesisleri

Genellikle, Atıksu arıtma tesisleri (AAT) faaliyetleri gereği ağır koku kaynağı olarak bilinir. Bu nedenle arıtma tesislerinin bulunduğu alanda kokuya maruz kalan olumsuz reaksiyon sergilemesine ve halkın şikâyetlerine neden olur (Ulutaş ve ark,2017). Her türlü üretim ve tüketim faaliyetleri sonucunda, kimyasal, fiziksel ve bakteriyolojik özellikleri ile karışıkları alıcı ortamların doğal bileşim ve özelliklerinin değişmesine yol açarak dolaylı ve doğrudan zarara yol açabilen ve ortamın kullanım potansiyelini etkileyen gaz, katı, ve sıvı halindeki maddelere atık denir. Sanayi-endüstri kuruluşları, konutlar, enerji santralleri, hayvancılık uygulamaları ve tarım sonucu açığa çıkan ve içinde zararlı biyolojik ve kimyasal

maddeleri barındıran sulara, yoğun atık ve atık sular denir. (T.C. MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI,2011) Şekil (2.3).



Şekil 2.3 Atık su kaynakları

2.6. Atık Su ve Antibiyotik Direnci

Antibiyotik, artık kimyasal kirliliğin bir parçasıdır, antibiyotik kullanımı aynı zamanda insanlar ve hayvanların sağlığı için risk oluşturan antibiyotik direnç genlerinin (ADG'ler) ve dirençli bakterilerin gelişimini de hızlandırabilir (Kemper., 2008). Bu dirençli bakteriler doğrudan veya dolaylı temasla çevreden insana bulaşabilmektedir (Rodríguez et al., 2006).

Atık su arıtma tesisleri önemli bir ilgi kaynağıdır. Bu istasyonlar bir bakteri rezervuarıdır, çok çeşitli organik ve inorganik maddeler barındırmakta ve bu bölgelerden çevreye yüksek miktarda bakteri salınmaktadır (Lupan et al.2017).

Atık sularındaki antibiyotik direnci ile ilgili elde edilmiş veriler, PCR gibi ileri moleküler biyoloji yöntemler sayesinde son birkaç yılda hızla artmıştır. Bununla birlikte henüz bu konuyla ilgili atık sularda yatay gen transferinin ne kadar aktif olduğu ve atık su arıtma tesislerinin çevresel dirençteki rolü ile ilgili cevapsız sorular bulunmaktadır (Karkman *et al.* 2018).

Atık su ve atık su arıtma tesisleri, antibiyotik dirençli bakteri ve antibiyotik dirençli genlerin rezervuarı görevini üstlenirler ve farklı bakteri hücreleri arasında antibiyotik direnç genleri yayan, yatay gen transferi (YGT) noktası olduğu düşünülür, ve atık sular, antibiyotikler gibi farklı kimyasallar ve düşük konsantrasyonlarda bile

antibiyotik direnci ortaya çıkarmak için iyi bir ortam oluşturabilen metalleri içermektedirler (Berendonk et al., 2015).

Antibiyotik direncinin yayılması konusunda küresel bir endişe mevcuttur ve kendini esasen klinikte gösteriyor olmasına rağmen sadece klinikle sınırlı değil. İnsanlara verilen antibiyotiklerin çoğu evlerde kullanılır ve sonuç olarak oradan lağıma geçerek birikir. Bu nedenle de, kentsel atık su arıtma tesisleri (AAT ler), hem antibiyotiğe dirençli bakterilerin (ADB) hem de çevreye salınan antibiyotik dirençli genlerin (ARG) ana kaynakları arasındadır (Bouki et al., 2013).

AAT'lar farklı kaynaklardan lağım suyu ve atıkları, farklı çevrelerden bakterileri alır ve bakterilerin yatay olarak etkileşime girmesini ve aralarında gen alışverişini mümkün kılar (Berendonk et al. 2015). Bununla birlikte, AAT'larda direnç gelişimini ve ARG'lerin yayılımını gösteren net kanıtlar hala yaygın olarak mevcut değildir. Antibiyotikler, biyositler, ilaçlar ve ağır metaller gibi kirletici bileşenlerin neden olduğu yüksek bakteri yoğunluğu, biyofilm ve stres, atık sularda yatay gen transferini destekleyebilir (Aminov, 2011). Aslında, atık su arıtma tesisleri, insan toplumu ve çevre arasında bir arayüz görevi üstlenerek evler ve hastanelerden gelen lağım suyundaki antibiyotik ve insan kaynaklı bakterileri içermektedir.

2.7. Atık Suda Antibiyotik Kalıntıları

Son yıllarda, antibiyotikler ve antimikrobiyaller insan ve hayvan yaşamında geniş bir şekilde kullanılmıştır, Özellikle çiftliklerde hayvan büyümesini destekleyici olarak kullanıldığı kadar enfeksiyonları engelleyici ve/veya tedavi edici olarak da kullanılmaktadır (Gao et al., 2012).

Bu antimikrobiyaller yaklaşık %30 civarında insan ve hayvan tarafından metabolize edilebilirler, bu da normal kullanım sayılır, kalan büyük kısmı dışkı ve idrar yoluyla evsel kanalizasyona hiç değişmeden atılır ve sucul ortam içerisine atıksu arıtma tesisi çıkış sularıyla deşarj edilir (Ohore et al. 2019; Ben et al. 2019 ; Batt et al., 2006).

Türkiyede ve dünya genelinde, sucul ortamlarda, antimikrobia kalıntı sorunu incelenmesi için pek çok çalışma yapılmıştır. Topal ve arkadaşları, Elazığ ilinin AAT giriş sularında antibiyotik kalıntılarının varlığını araştırmışlar ve farklı antibiyotikler makrolidler, beta laktamlar ve sülfonamid gruplarına rastlanmışlardır (Topal et al, 2012).

2.8. Atık Suda Pestisit Kalıntısı

Su kirliliğinin birçok kaynağı vardır bunlardan konumuz ilgili önemli kirleticiler kaynaklarını gübreler, herbisitler ve pestisitlerin tarım arazilerinde kullanımı da kapsamaktadır (Calhoun ,2005).

Günümüzde pestisit kullanımı ve bu kullanımın akıbetleri hep gündemdedir ve gündemde kalacağı da benzemektedir. Çünkü geleneksel tarımda yoğun pestisit kullanımı olduğu gibi, “İyi Tarım Uygulamaları”nda (Good Agricultural Practice, GAP) kontrollü olarak pestisit kullanımı ve organik tarımda da doğal pestisit kullanımı mevcuttur (Tiryaki, 2016).

Pestisit kalıntı analizleri türkiyede 1959 yılında başlamıştır. ilk çalışma Otacı ve Güvener tarafından Ankara Ziraî Mücadele İlaç ve Aletleri Enstitüsü Kalıntı Laboratuvarı’nda yapılmıştır (Tiryaki ,2016).

Pestisitler birçok amaç için kullanılır, gıdalara zararlı böcekleri ,bazı mikropları önlemek amacıyla kimyasallardır ve son yıllarda tarımsal yoğunlaşma için kullanılmıştır (Silva et al., 2019).

Fakat bu kimyasallar yüksek oranda kullanıldığında çeşitli sorunlara sebebiyet verir. Bu sorunlardan biri toprakta ve sucul ortamlarda pestisid kalıntı oluşturulur ve pestisit kalıntı artıka çevre mikroblara dirençlilik gelişmesi ve yaratması sağlar. Ramakrishnan pestisit kalıntı sorunu geniş bir şekilde inceleme yapmıştır ve mikroorganizmalarda transport sistemi, akış pompaları, enzimler ve genetiksel değişiklikleri göstermiştir (Ramakrishnan et al., 2019) Sıfatullah ve Tuncel’in çalışmasında, Ankara’da bir tarlada toprak ve suda GC-MS ile pestisit kalıntısı analiz edilmiştir, analiz sonuçları çevrede yüksek miktarda pestisit kalıntısı ile sonuçlanmıştır (Sıfatullah ve Tuncel, 2015).

2.9. Atık Suda Ağır Metal ve AMD.

Son yıllarda ağır metal kirliliği, tüm dünyada ekotoksikolojiye neden olan en ciddi sorunlardan birini düşündürmektedir (Shamuyarira and Gumbo, 2014; Akpor et al., 2014; Bhuiyan et al., 2015; Abu-El-Halawa & Zabin., 2017) ayrıca gün geçtikçe ortaya çıkan çevre maliyetlerine de etki göstermiştir (Chu et al., 2019) ve bu sorunda arttırmaktadır (Mahmoud et al., 2015) ayrıca antimikrobiyal direnci etkilemektedir (Andrew , 2017).

Su ortamlarının ağır metaller ile kirlenmesinin artması, toplumun sağlığı ile doğrudan bağlantılı olan bu materyalin, göreceli olarak çok düşük konsantrasyonlarda bile toksik etkiye sahip olmasına ve doğada uzun süre kalmasına bağlı olarak birçok araştırmacının (Abu-El-Halawa ve Zabin., 2017) dikkatini çekmeye başlamıştır (Akpor et al., 2014 ; Sapna et al., 2019). Endüstriyel ve Kentsel Atıksu, organik ve inorganik birçok kimyasal ve biyolojik materyal, kimyasal madde içermektedir. Atık suda, özellikle de farklı derecelerde kirlilik oluşturan ve çevre maliyetlerini artıran ağır metallerin yaygınlığı büyük bir tehlike doğurmaktadır (Chu et al., 2019).

Ağır metaller ve AMD arasındaki ilişkisi Andrew Singer (2017) tarafından detaylı bir şekilde açıklanmıştır. Araştırmacılar, sadece aşırı antibiyotik kullanımının değil, biyositlerin ve ağır metallerin kullanımının da AMD'nin yaygınlaşmasına katkıda bulunduğunu ve sadece antibiyotik kullanımının hedeflenmesinin AMD sorununu çözmeceğini belirtmektedirler (Fang et al., 2016).

Biyositler, ev ve hastaneden çiftlik ve sanayiye kadar toplum yaşamının her yerinde kullanılmaktadır. Ev tipi temizleyicilerde, deterjanlarda çok çeşitli ağır metaller bulunur ve üretim ve tarım (hayvancılık ve gıda) endüstrilerinde yaygın olarak kullanılır. Doğal çevremizde ağır metallerin ve biyositlerin varlığı, antimikrobiyal direnç genlerini (ADG'ler) doğrudan veya dolaylı olarak seçebilen ve çevresel antibiyotik direncini önemli ölçüde etkileyen direnç genlerinin seçilimine katkıda bulunur (Ohor et al., 2019).

Ağır metaller, mutasyon oranlarını ve çoklu antibiyotiklere karşı önemli direnç gösteren zenginleştirilmiş *de novo* mutantları tetikleyebilir (Li et al., 2019).

Bu biyoasit direnç genleri, antibiyotik direnç genleriyle aynı genler olabilir (yani çapraz direnç) veya ortak direnç olarak adlandırılan bir fenomen olan hareketli genetik elemanlar (örneğin plazmitler) üzerinde bir veya daha fazla direnç geniyle birlikte yerleştirilebilirler (Pal et al., 2015; Pal et al., 2017; Imran et al., 2019).

2.10. PCR ile AMD Araştırmaları

Son 70 yıldır, antibiyotik direncindeki araştırmalar esasen patojenlere odaklanmıştır. Saf mikroorganizma kültürlerinin izole edilmesi, hala mikrobiyolojide kullanılan en önemli yöntemdir. Diğer taraftan, bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri nispeten ucuzdur ve hastaların klinik tedavisi için ihtiyaç duyulan direnç paternleri ile ilgili önemli veriler sağlamaktadır (Karkman et al., 2018).

Bilimsel raporların çoğu, ADG'leri tanımlama çalışmalarında gerçek zamanlı PCR kullanımına odaklanıldığını göstermiştir. Günümüzde kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Q-PCR) amplifikasyonu, kültür örneğine ihtiyaç duyulmadan çevresel numunelerdeki ARG'nin belirlenmesi için yaygın olarak uygulanır (Zhu et al., 2013). Özellikle antibiyotiğe dirençli bakteriler (ADB) ve antibiyotik direnç genleri (Yuan, et al., 2016) için merkezi bir nokta olarak kabul edilen Atıksu Arıtma Tesisleri bu genlerin çevreye yayılması için ana yol olarak kabul edilmektedirler (An et al., 2018). Atık su arıtma tesislerinde düşük konsantrasyonlarda bulunan çevresel hedef DNA veya RNA kültürlenmeye ihtiyaç duymadan PCR kullanılarak çoğaltılıp, tespit edilebilmektedir (Looft et al., 2012).

Q-PCR ile, sadece bir çalışmada paralel deneyler yapılarak yüzlerce ADG ve diğer hedef genlerin aynı anda ölçülmesi mümkündür. Bu, ilgili birçok ARG'nin, mobil genetik elementlerle ilgili sekansların ve ASAT'lar veya ilgili ortamlardaki belirli bakteri türlerine özgü genlerin kantitatif olarak değerlendirilmesi için bir fırsat yaratmaktadır.

Bu bir örnekteki mutlak veya nispi miktarlarda hedef DNA'yı belirlemek için her DNA amplifikasyon döngüsünden sonra PCR ürünlerinin konsantrasyonundaki değişiklikleri ölçmek için bir floresan raportör kullanma fikrine dayanır .

Hedef genin amplifikasyonu, her bir döngüden sonra ortaya çıkan bir flüoresan sinyali ile gözlenerek ölçülür. Bu sistem, PCR uygulamasından sonra

sonuçların ek deneyler olmadan doğrudan değerlendirilmesini sağlar. Bu nedenle, amplifikasyon ürünlerini tespit etmek için jel elektroforezine gerek yoktur.

qPCR için kullanılan iki yaygın floresan haberci türü vardır: Taqman ve SYBR Green. Taqman problemleri veya hidroliz problemleri, dizinin 5. ucuna kovalent bağla eklenmiş bir flüorofor ile firkete şeklindeki oligonükleotit problemleri ve 3' ucuna eklenmiş bir söndürücüdür. Söndürücü, prob hedefle hibritlenene ve flüorofor salınana kadar flüoroforu bastırır. Bu, mevcut DNA konsantrasyonu ile doğrudan orantılı olan floresans ölçülmesini sağlar (Zhang ve Fang, 2006).

Başka bir yöntem olan SYBR green, çift sarmallı DNA ve flüoresan arasında spesifik olarak bağlantı oluşturmak için baz çiftleri arasında bağlanan bir siyanin boyasıdır. Floresan sinyal, bağlanma veya uzatma döngüsünün sonlandığı zaman ölçülür (Sharkey et al., 2004; Zhang ve Fang 2006). Her iki yöntemin de avantajları ve dezavantajları vardır. TaqMan problemleri, atık sularda bulunan vanA, mecA, tet (O), tet (W), tet (Q) ve ampC genlerini hedef alacak şekilde tasarlanmıştır (Volkman et al., 2004).

SYBR Green yöntemi, aktif çamur ve atık sularda bulunan tet (G), tet (Q), mef ve erm genlerini hedeflemesi açısından çok pratiktir (Reinert et al., 2004; Auerbach et al., 2007; Zhang et al., 2009a).

qPCR, yüksek hassaslık seviyesine sahip hızlı ve etkili bir tekniktir; bununla birlikte, atık sudaki inhibitörler, çevresel ana karışımlar, spiking yöntemleri veya örnek seyreltme kullanılarak üstesinden gelinirse de, performansını etkileyebilmektedir (Shanks et al., 2009 ; Cao et al., 2012 ; Green and Field, 2012).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

3.1.1.1. TE Tamponu

Son konsantrasyonları 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA (Sigma, Almanya) olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlanmıştır.

3.1.1.2. GelRed™ (DNA Yükleme Boyası)

3.1.1.3. Antibiyotik Stok Solüsyonunun

Antibiyotikler Sigma-Aldrich, ABD 'den toz halinde satın alınmıştır, bu yüzden antibiyotiklerin ve R2A agarın tamamen karıştırılması için her bir antibiyotik için stok çözeltiler hazırlanmıştır, Tablo 3.1 de gösterilmiştir .

Stok solüsyonların hazırlanışı:

Tetrasiklin ve eritromisin %70 etanolde çözülmüştür.

Diğer kullanılan antibiyotikler önceden steril edilmiş ultra saf su içerisinde çözülmüş ardından 0.22 µm şırınga filtreden geçirilmiştir.

Yukarıdaki stok solüsyonların çoğu, 1000X konsantrasyonda hazırlanmıştır, direnç plazmidlerini veya diğer direnç genlerini taşıyabilecek genel organizmaları saymak ve seçmek için kullanılmıştır.

48 - 50°C'de eritilmiş R2A agarın litresi başına 1 ml antibiyotik stoğundan ekleyip iyice karıştırılmıştır. İstisnai olarak ampisilin stabil olmadığı için kullanılmadan bir saat önce hazırlanmıştır (CSH,2013).

Tetrasiklin ışığa duyarlıdır, bu nedenle herhangi bir ışık kaynağından uzakta olmalıdır. Stok çözeltiler, sonraki kullanımlar için -20°C 'de muhafaza edilmiştir. (Erlangen, 2013).

Antibiyotik stok çözeltisinin konsantrasyonları, Eritromisin (Er) 18 mg / ml (Sigmaldrich, E6376), Ampisilin (AMP) 50 mg / ml (Sigmaldrich,2016), Gentamisin (Gen) 50 mg / ml (Sigmaldrich G8648), Kanamisin (Kan) 50mg / ml (Sigmaldrich K0879 ; Reynolds, 1996), Tetrasiklin (TC) 16mg / ml (Munir et al., 2011) ve Klindamisin 5mg / ml (Gold Biotechnology)

Tablo 3.1 Antibiyotik stok solüsyonunun hazırlanması ve saklanması

Antibiyotik	Stok konsantrasyonu mg/ml	Çalışma konsantrasyonu $\mu\text{g/mL}$	çözgen	Saklama sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	kaynak
Tetracycline	16	16	EtOH	-20	Munir et al., 2011
Sulfamethoxazole	50.4	50.4	95 % EtOH	-20	Munir et al., 2011
Cyclohexamide	100 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	DMSO	4	Sigmaldrich C7698 and C1988
Erythromycin	50	50	EtOH	-20	Sigmaldrich, E6376
Kanamycin	50	50	H ₂ O	2-8	Sigmaldrich K0879 Reynolds,J.E.,1996
Clindamycin	5	5	DMSO	-20	Gold Biotechnology
Gentamycin	10	10	H ₂ O	-20	Sigmaldrich G8648
Ampicillin	50	50	H ₂ O	-20	Sigmaldrich,2016 ; Perlman, D., et al

3.1.2. Besiyerleri

3.1.2.1. R2A agar:

R₂A Agar sularda ve atıksular da toplam heterotrofik bakteri analizi sıklıkla kullanılan katı besiyeridir. Bu ortamın atıksularda sık kullanılmasının birçok sebebi vardır, düşük besin içeriği ve uzun inkübasyon süresi sayesinde atıksu /içme suyunda özellikle dirençli bakterilerin ve stres altındaki türlerin belirlenmesinde elverişlidir.

Ayrıca kazein hidrolizati, pepton, düşük konsantrasyondaki maya ekstraktı ve glikoz içeriği sayesinde hızlı gelişen bakterilerin yavaş gelişenleri baskılaması önlenir ve çok sayıda bakterinin gelişmesine izin verir. Nişasta ve pirüvat, özellikle hasar görmüş bakterilerin daha çabuk gelişmesine destek olur. Bu ortam 35 C'de, 24-72 saat arası inkübasyondan sonra sonuç vermektedir (Reasoner, 1979).

3.1.2.2. Nutrient Agar (NA)

NA İnhibitör ve indikatör içermeyen ve çok amaçlı kullanımı olan genel besiyeridir.

Bir litre distile suda 75 g tartırıldı sonra steril edilmek üzere 121°C 1.2 atm basınçta 15 dakika otoklavlanmıştır.

3.1.2.3. Luria Bertani Broth (LB)

Bakterileri stoklamak için LB broth ortamı kullanılmıştır. 10 g Tripton (Bacto), 5 g maya ekstrakt (Oxoid, UK), 10 g NaCl (Merck, Almanya) bir miktar distile suda çözüldükten sonra konsantre sodyum hidroksit kullanılarak pH: 7.5'e ayarlanmıştır. Hacmi distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra steril edilmek üzere 121°C 1.2 atm basınçta 15 dakika otoklavlanmıştır.

3.1.2.4. Mueller Hinton Agar

Bu ortam antibiyotik duyarlılık testleri için kullanılmıştır, 38 g toz haldeki hazır besiyeri 1000 mL distile suda eritilmiştir ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. 45°C'ye kadar soğutulup petri kaplarına dökülmüştür.

3.1.2.5. Pseudomonas (Cetrimide) Agar

Katı besiyerinde cetrimide maddesi içeren toz şeklindeki besiyerinden 45.3 g tartılmış, üzerine distile su ilave edilerek çözdürüldükten sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. çözdürüldükten sonra üzerine 10 ml gliserol ilave edilmiş ve iyice çözdürülmüştür, daha sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiş ve petri kaplarına dağıtılmıştır.

3.1.2.6. Mannitol Salt Agar

Oxoid firmasına ait toz şeklindeki besiyerinden 111 g tartılmış, üzerine distile su ilave edilerek çözdürüldükten sonra yine distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiş ve petri kaplarına dağıtılmıştır.

3.1.2.7. Kanlı Agar Besiyeri

Besiyeri ortamına % 5-10 oranında kan ilavesi ile hazırlanır. Amaca göre koyun, tavşan, at, insan kanı kullanılabilir. Koyun kanındaki fibrinin parçalanması ile ,hemoliz tipini belirlemede kullanılmaktadır.

3.1.3. Kullanılan kitler

3.1.3.1. DNA İzolasyon Kiti

Çalışmada Norgen DNA İzolasyon Kiti kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 NorGen kit

3.1.4. Kullanılan cihazlar

Tezde sürekli kullanılan cihazlar Hassas Terazî, pH metre, Isıtmalı manyetik karıştırıcı ,otoklav, İnkübatör, Liyofilizatör, Vorteks, Soğutmalı santrifüj, Klassik PCR cihazı ve Elektroforez Tankı.

3.1.5. Diğer Malzemeler

Çalışmada diğer kullanılan malzemeler :- distile su cihazı (Millipore), örnek filtrasyon için vakum pompası, tek kanallı otomatik pipetler (thermofisher) ve bunlara ait steril edilmiş plastik uçlar, su banyosu, otoklav, derin dondurucu (-80°C), mikrobiyolojik güvenlik kabini, karıştırıcı, falkon tüpleri, steril mikropalaklar kullanılmıştır.

3.2. METOT

3.2.1. Örnekleme Bölgesi

Örnekler Manisa Saruhanlı ilçe Atıksu Arıtma tesisinden toplanmıştır. Saruhanlı ilçesi, düz ve verimli bir arazi olan Gediz Ovası üzerinde yer alır. Yüz ölçümü 842 kilometrekare, denizden yüksekliği 43 metredir. Akdeniz iklimi etkisinde olup yazları kurak ve sıcak, kışları ılık ve yağmurludur. Doğusunda ve Kuzeydoğu Akhisar ile bulunmaktadır, Göl marmara; kuzeybatısında Kınık; güneyinde Ahmetli, Turgutlu; güneybatısında Manisa ile sınırdır. İzmir-İstanbul Devlet Karayolu ilçe topraklarını ikiye böler. Ayrıca Devlet Demiryollarının İzmir-Bandırma, İzmir-Ankara hattı İlçe merkezinden geçmektedir (Şekil 3.2 ve 3.3).

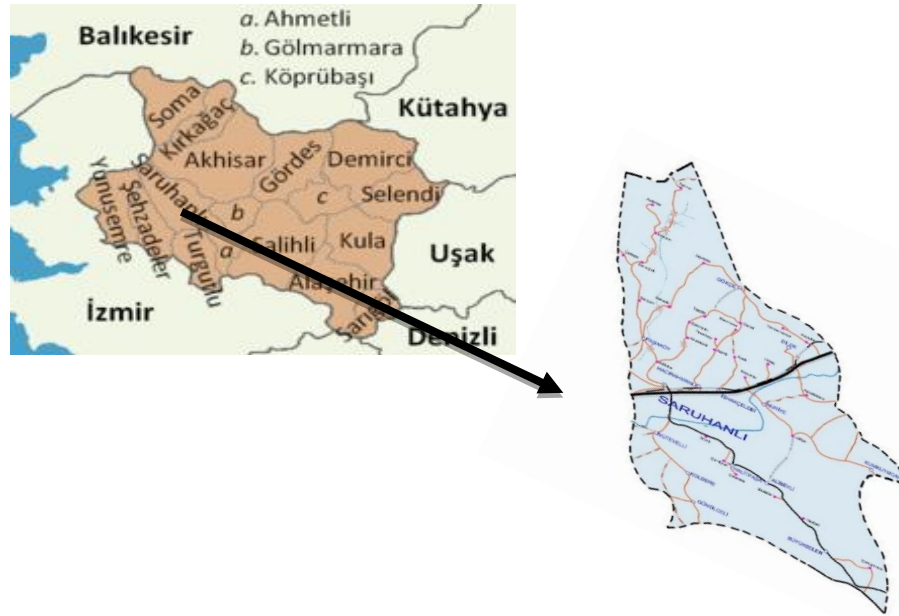
İlçe ekonomisi tarıma dayalı olup, nüfusun %80'i tarımla uğraşmaktadır. İşletmeler, genelde sadece tarım kolunda faaliyet gösteren küçük aile işletmeleri şeklindedir (www.saruhanli.bel.tr/saruhanli/genel-bilgiler/, 2018).

İlçenin Toplam Nüfusu

TÜİK 2014 yılı ADK Sistemi Sonuçlarına Göre

NÜFUSUN CİNSİYETE GÖRE DAĞILIMI

Erkek	26.830
Kadın	26.854
İLÇE TOPLAMI	53.684



Şekil 3.2. Saruhanlı ilçe haritası



Şekil 3.3. Saruhanlı ilçesi

3.2.2. Saruhanlı Atıksu Arıtma Tesisi (S.A.A.T)

Saruhanlı Atıksu Arıtma Tesisi 2013'te İşletmeye başlamış Saruhanlı ilçesine ait merkez, Yaklaşık 12.879 metrekare Alana ve Günlük işlem kapasitesi yaklaşık 3.000 metreküp/gün kurulu olan bir tesistir.

S.A.A.T işlemleri, atıksuyun içerdiği kirletici maddelere, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerine göre çeşitli tekniklerle gerçekleştirilebilmektedir.

SAAT işlemleri

1. Arıtma tesisine gelen atıksuyun önce kaba pislikleri ve kumu uzaklaştırılmakta, ardından atıksu, çökebilen katıların ayrıldığı ön çökeltim işlemine tabi tutulmaktadır.
2. Pislikleri ve kumu uzaklaştırdıktan sonrası anaerobik havuz, havalandırma havuz, son çökeltme havuzu, çamur susuzlaştırma ünitesi, geri devir ve fazla çamur pompa istasyonlarda işlem yapılır.
3. En son aşama UV dezenfeksiyon yapısına sevk edildikten sonra dışarj edilir.

(Şekil3.4).(<https://www.manisasu.gov.tr/Projeler/ProjeDetay/2646/Saruhanli-Merkez-Atıksu-Aritma-Tesisi:2018>)

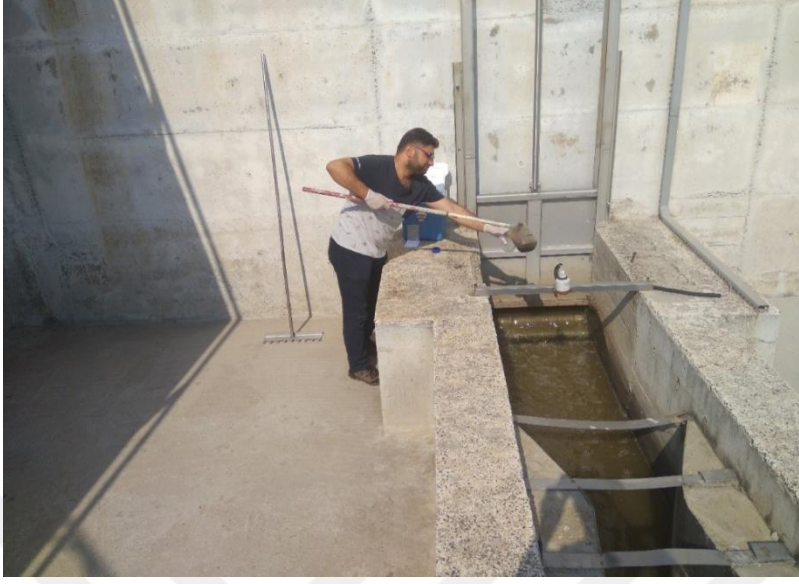


Şekil 3.4 Saruhanlı AAT.

3.2.3. Örnek Alma yöntemi

APHA, 1992 ve ISO 19458/2006 talimatlarına göre Manisa şehrinde SAAT ten su numuneleri alınmıştır. örnekler cam şişede ve buzluk termos ile muhafaza edilerek laboratuvara soğuk zincirde getirilmiştir (Şekil 3.5). Yaklaşık 1 litrelik koyu renkli cam şişeler içerisine alınarak, Ege Üniversitesi biyoloji bölümü mikrobiyoloji 147 nolu laboratuvarına getirilmiştir. Koloni sayımı için doğrudan örnekten 1 mL seyreltmek yapılmıştır. Örnekler 4000 devir 10 dk ve +4 C° 'de santrifüj yapılmış ve 250 mg yaş pellet alınarak DNA izolasyon için kullanılmıştır. Çıkış su numunelerinin için 0.45 mikrometrelik filtre ve (3.6) şeklindeki filtrasyon sistemi kullanılarak örnekler filtreden geçirilmiştir. Örnek alımından sonra 4-8 saat içerisinde liyofilizasyon, DNA izolasyon ve toplam heterotrofik bakteri sayımı için gerekli işlemler yapılmıştır.

Tesisten toplam 24 (Nisan 2018-Mart 2019 arasında) örnekleme yapılarak giriş ve çıkış noktalarından örnekler alınmıştır.



Şekil 3.5. Örnek Alımı yöntemi



Şekil 3.6. Su filtrasyon sistemi

3.2.4. Toplam Heterotrofik Bakteri ve Toplam Antibiyotik Dirençli Bakteri Sayımı

Toplam heterotrof bakteri (THB) sayımı atıksu ve içme suyu numunelerinin değerlendirilmesi için kullanışlı bir araçtır. Çünkü, yüksek heterotrof bakteri sayısı bir proses sorununa ve hatta kamu sağlığı açısından tehlikeye yol açabilir. Ayrıca son yıllarda heterotrof bakteriler antibiyotik dirençli bakteri sınıflardan birisi olarak belirlenmiştir. Böylece THB testinin yapılması ve uygulanması, üretim ve dağıtım sistemleri çapında içme suyu koşullarının anlaşılması için değerli bilgiler sağlamaktadır.

Yüksek THB değerleri yaygın olarak dağıtım sistemlerinin durgun kısımlarında, ev içi tesisatta, şişelenmiş suda bulunur ve yumuşatıcılar ve otomatlar gibi bağlı cihazlarla ilişkilendirilir. THB testleri önceleri su arıtma proseslerini, özellikle kum filtreleme prosesini kontrol etmek amacıyla uygulanıyordu ve bu nedenle su güvenliğinin bir göstergesiydi. Koliform ve toplam koliformlar gibi daha spesifik göstergelere ilişkin izleme teknikleri daha fazla kullanılabilir hale geldikçe, THB'nin bu amaçlar için kullanımı azalmıştır.

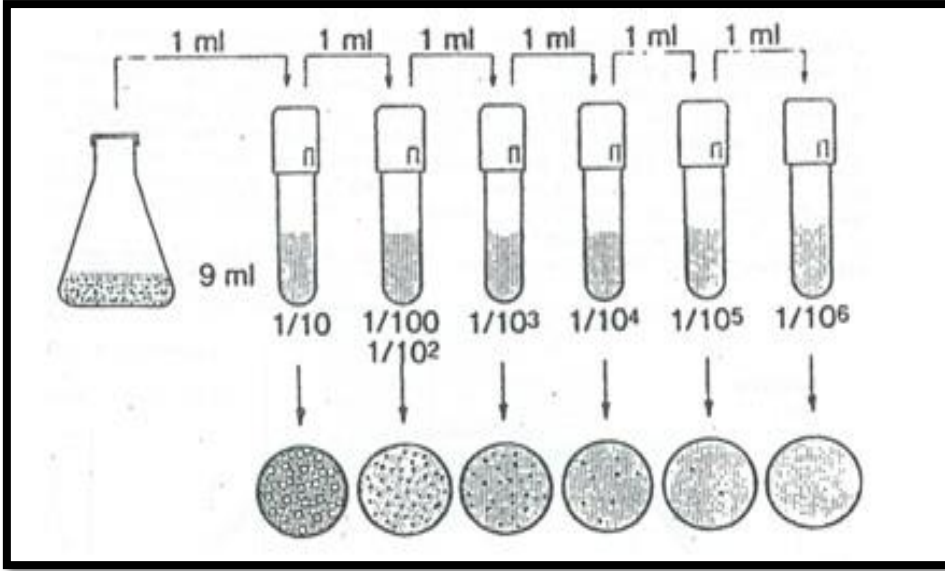
Bu çalışmada THB sayımı hem S.A.A.T in performansı hemde çevreden çevreye giden toplam antibiyotik direnci çeşitliliğini ve miktarlarını saptamak için uygulanmıştır.

THB sayımını gerçekleştirmek için her bir örnekten 1 mL alıp FTS ile deney tüpü içinde 6 desimal seyreltme yapılmıştır, her bir seyreltmeden (3 paralelli) olmak üzere mikro pipetle 1 ml alınarak boş petri kaplarına R₂A agar ve dökme plaka yöntemiyle ekim yapılmıştır, daha sonra 37°C'de 48 saat inkübasyonu takiben besiyerlerinin üzerinde oluşan koloniler sayılmış ve seyreltme faktörü dikkate alınarak örneklerin kob/ml'sinde bulunan toplam heterotrof bakteri sayısı hesaplanmıştır, (şekil 3.7). Ayrıca MaCkonkey agar *Escherichia coli* (E. coli) için , Cetramide agar (*Pseudomonas aeruginosa*) için, SS agar (*Salmonella* ve *Shigella*) için ve TCBS agar *Vibrio cholera* için kullanılmıştır.

Toplam antibiyotik dirençli bakteri sayımı ilgili yukarıda anlatılan aynı yöntem uygulanmıştır fakat 45° C 'a kadar soğutulmuş R2A ortamını petrilere dökmeden önce belirli konsantrasyonlarda antibiyotikler ilave edilmiştir.

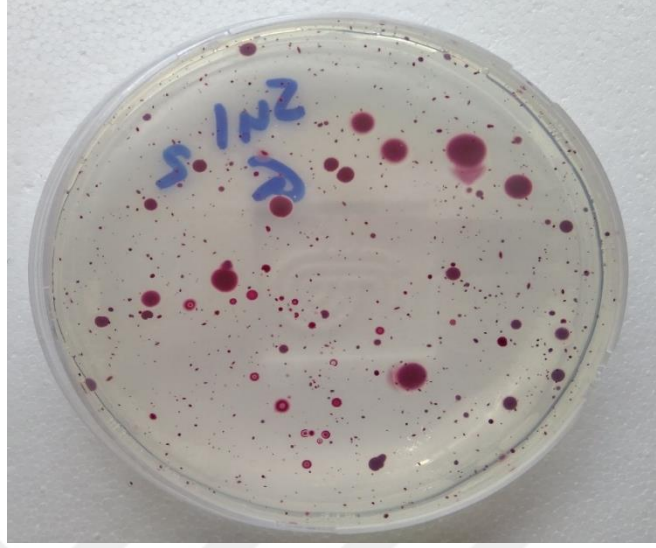
Hem THB hem de toplam antibiyotik dirençli bakteri sayımı için aşağıdaki formül ile 15-300 kob arasındaki koloni içeren seyreltilerdeki ekimler dikkate alınmıştır. 30 koloniden az ve 300 koloniden fazla petri kutuları gösteren hesaplamaya dahil edilmemiştir. Kolonileri kolay saymak için % 1 Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) ortama eklenmiştir (Şekil 3.8) . (Eaton et al., 1995 : Ruoting et al.,2006 ; Rahim et al.,2014)

$$\text{THB kob / mL} = [\text{koloni sayısı} \times \text{seyreltme faktörü} / \text{aktarılan hacim}]$$



KOB=koloni oluşturan birimi

Şekil 3.7 THB seyreltmesi ve sayımı ([baytarizm.blogspot.](http://baytarizm.blogspot.com))

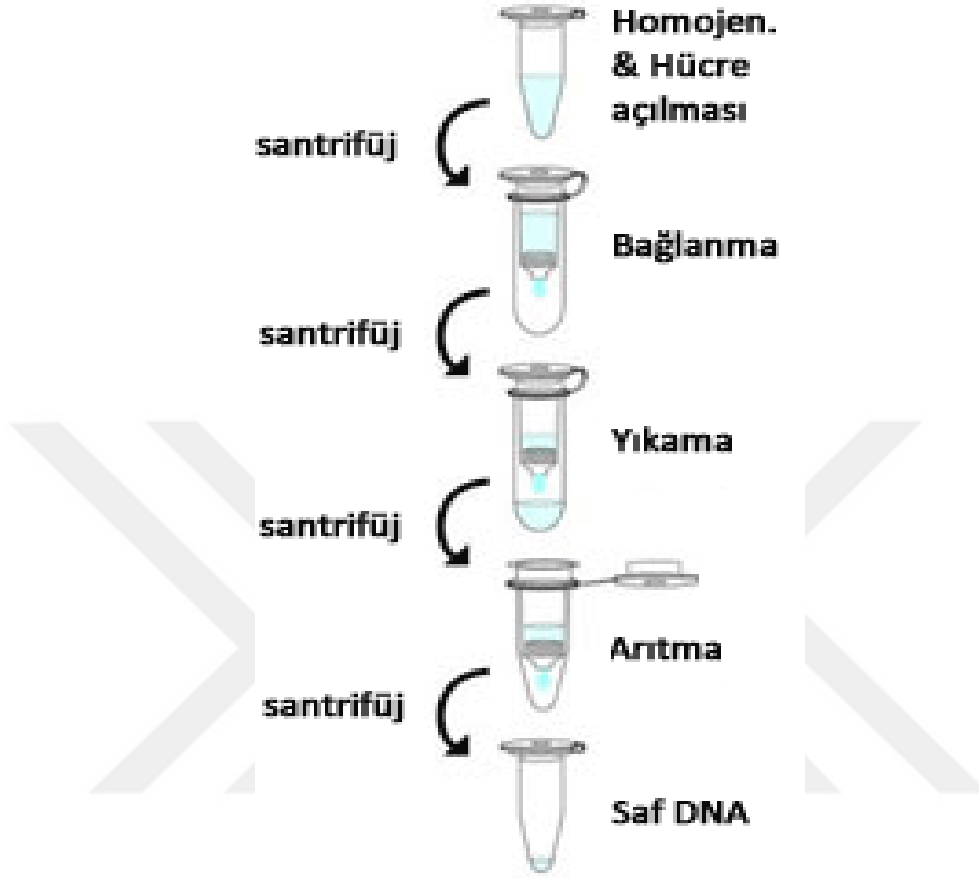


Şekil 3.8. Koloni oluşan birimler ve TTC etkisi

3.2.5. Toplam DNA ekstraksiyonu

Toplam Genomik DNA, Norgen[®] kiti kullanılarak doğrudan konsantre numuneden ekstrakte edilmiştir, kit talimatlarına göre DNA'lar elde edilmiştir. Kit talimatına uygun olarak her bölgeden tam olarak 250 mg numunenin pelletleri kullanılmıştır (Şekil 3.9).

Saflaştırılan DNA'nın miktarı ve kalitesi, sırasıyla 260 nm'lik bir absorbansta bir NanoDrop[™] spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, ABD)kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen DNA'lar, antibiyotik direnç genlerinin analizine ve miktar tayinine kadar -20 ° C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.9. Total DNA İzolasyonu özeti (www.sentromer.com)

3.2.6. Genomik DNA'nın Konsantrasyon Tayini

DNA ekstraktlarının konsantrasyonları NanoDrop spektrofotometre (Thermofisher scient, ABD) ile ölçülmüştür. Absorbans değerleri, her bir örnek için 260 nm ve 280 nm'de ölçülmüştür. DNA, 260 nm'de UV ışığını absorbe eder, ancak DNA örneklerinin saflığını değerlendirmek için proteinlerin 280 nm'de absorbans değerleri de önemlidir. A_{260} / A_{280} oranı, örneklerin saflığını temsil eder. Saf DNA, yaklaşık 1.6-2 olan bir A_{260} / A_{280} oranına sahip olmalıdır. Protein ve aromatik maddelerle kirlenme varsa, A_{260} / A_{280} değeri 1.6'nın altında olur ve A_{260} / A_{280} değerinin 2'nin üzerinde olması ise RNA ile kirlenme olasılığına işaret etmektedir.

Alternatif olarak, fenolat iyonu, tiyosiyanatlar ve diğerk organik bileşiklerin kirlenme durumunda, değerk 0,5'den büyük olmaktadır (Clark ve Christopher, 2001).

3.2.7. DNA'nın Agaroz Jel Elektrofrez ile Görüntülenmesi

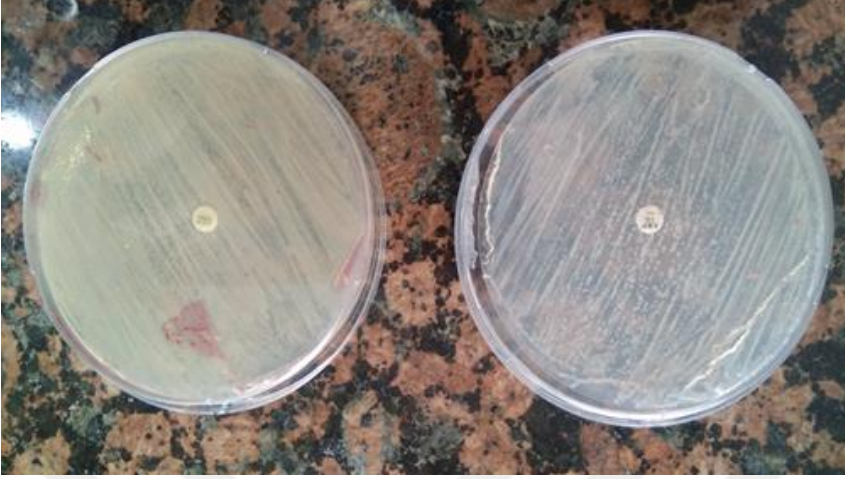
DNA ekstrasyon veya amplifikasyon sonrasında fragmentlerin varlığını gösterebilmek amacı ile ampliconlar agaroz jel içerisine yüklenmiştir. PCR reaksiyon ürünleri için jel hazırlamak üzere ; %1 ila % 1.5 agaroz, 1X TBE tamponu içerisinde karıştırılıp mikrodalgada kaynatılmıştır, sonra soğutulup elektrofrez tablasına dökülmüştür. Analiz edilecek örnekler uygun dilüsyonlarından genellikle 5 µl alınarak, 1 µl yükleme boyası (Loading Dye+Jel Red) ile karıştırılmıştır. Bu şekilde örnekler jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. DNA kontrolü olarak uygun boyutlardaki DNA referansı; 100 baz çiftlik markerleri (Genaid) kullanılmıştır. Elektrofrez tankında 500 mA , jel 95 V altında yürütülmüştür. (Kayhan ve Yusuf ALAN, 2017). Elektrofrezden sonra UV kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.8. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri (ADT)

Antibiyotik dirençli heterotrofik bakterilerin nitel göstermek ve antibiyotiklerin aktivitelerin test etmek için antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır, Kirby-Bauer metoduna göre Mueller-Hinton Agar (MHA) kullanılarak standart disk difüzyon yöntemi ile de AMD testi gerçekleştirilmiştir.

Saflaştırılmış izolatların saf kolonilerden hazırlanan 0,5 McFarland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonu MHA besiyerlerine 0.1 ml yayılarak ekim yapılmıştır. 15 dakika kuruması için bekletildikten sonra besiyerlerine Ampisilin tetrasiklin, , sülfonamid ve diğerk test edilen antibiyotikler yerleştirilmiştir. 37°C' de 18-20 saatlik inkubasyon sonunda saflaştırılmış kolonilerin gösterdikleri üremeye göre hassas, şüpheli ve dirençli suşlar tespit edilmiştir. (Şekil 3.10).

Sonuçlar Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) kriterlerine göre duyarlı ve dirençli olarak kategorize edilmiştir (CLSI,2007).



Şekil 3.10 Antibiyotik Duyarlılık Testi

3.2.9. Standart Polimeraz Zincir Reaksiyonu – PZR (PCR)

Standart PCR, bir kaç saat içinde sonuç vererek atık su örneklerinde spesifik direnç genlerinin varlığını belirleyebilmektedir. PCR yöntemleri nispeten ucuza mal olmakta, kolay uygulanmakta, kültüre ihtiyaç duyulmamakla birlikte, yüksek hassasiyete sahiptir.

Atık su örneklerinden ekstrakte edilen total DNA'daki antibiyotik direnç genlerinin (*tetA*, *ampC*, *ermA*, *Sul I*, *ant(2)-I*) belirlemek için Ultrapure Mastermix ve Thermal-Cycler PCR kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı ise 5 µL PCR Master-Mix (5X); 1 µL forward primer, 1 µL revers primer; 15 µL nükleaz içermeyen ultra saf su karışımına 3 µL kalıp DNA eklenmiştir. Toplam hacim 25 µL olarak PCR denemeleri gerçekleştirilmiştir. 3.2 Tablo de Primerleri gösterilmiştir.

Tablo 3.2 : Klasik PCR de kullanılan Primerleri

Antibiyotik adı	Gen adı	Primer	Amplikon(bp)	kaynak
Tetracyclin	Tet(A)	F: GCTACATCCTGCTTGCCT TC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210	Ng et al. (2001)
Ampicillin	AmpC	F: GTGACCAGATACTGGCCACA R: TTAGTGTAGCGCCTCGAGGA	822	Böckelmann et al., 2008)
Sulfamethoxazole	sul1	ATGGTGGACGGTGTTCGGCATTCTGA 3' CTAGGCATGATCTAAACCCTCGGTCT 3'	789	Toleman et al. 2007; Tolman et al., 2006. Singh et al.,2019; Mazel et al.,2000
Erythromycin	<i>ermA</i>	F: 5'AAGCGGTAAACCCCTCTGA3' R: 5'TTCGCAAATCCCTTCTCAAC3'	190	Strommenger B,2003; Cotar et al., 2013
Gentamicin	ant(2'')-I	F: 5'-GGG CGC GTC ATG GAG GAG TT-3' R: 5'-TAT CGC GAC CTG AAA GCG GC-3'	329	Cameron, F.H et al,1986

Tablo 3.3. PCR koşulları ve basamakları

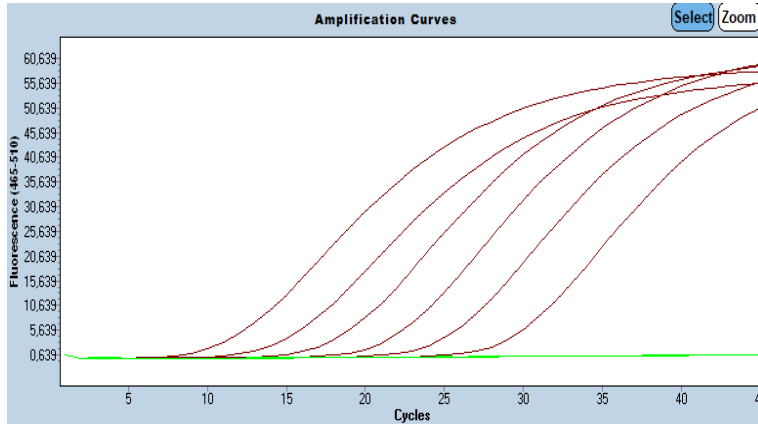
Primerler	<i>Tet(A)</i>	<i>AmpC</i>	<i>sul1</i>	<i>ermA</i>	<i>ant(2'')-I</i>
PCR basamakları					
Başlangıç Denaturasyon	95°C/7min	95°C for 2 min,	95°C/5 min	93°C/3 min	94°C/10 min
Denaturasyon	95°C/45s X40	95°C/ 30 s X35	95°C/15 sec X30	93°C/1 min X 35	94°C/ 1 min x35
Bağlanma	58°C/45 s X30	60°C/ 45s X35	51°C/30 sec X30	52°C/1min X 35	57°C/40 s X35
Uzama	72°C/ 90 s	72°C for 1 min X35	72°C/1 min X30	72°C/1 min X35	72°C/1 min X35
Son uzama	72°C/7min	72°C/7 min	72°C/7 min	72°C/5 min	72°C/10 min
Tm °C	59	59	60	55	63
kaynak	Ayaz et al.,2014	Uta Böckelmann et al (2008) ; <i>Dhabaan, 2011</i>	Singh et al.,2019	Cotar et al., 2013	Sandvang and Aarestrup, 2000

3.2.10. Kantitatif Real-Time PCR (qPCR).

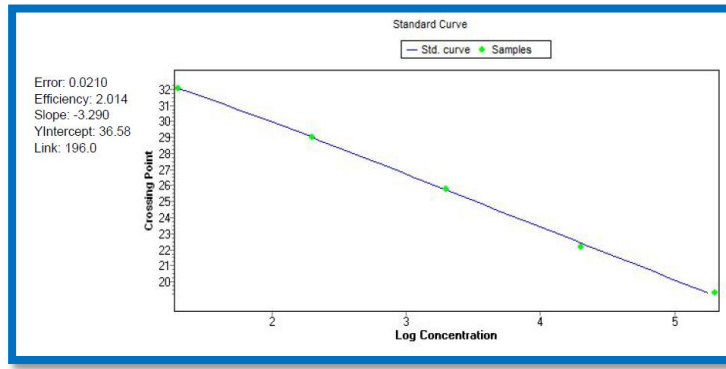
Kantitatif PCR çalışmalarında her bir örnekten DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Standart eğrinin oluşturulması için 10 kat seyreltmeler içeren seri dilüsyonlar hazırlanarak her bir seyreltme 3 paralel olacak şekilde çalışılmıştır (Şekil 3.11 ve 3.12).

Bu çalışmada PCR verimliliğinin (efficiency) % 95'ten coefficient değerinin ise 0,98 değerinde büyük olması gereklidir. Her bir dilüsyon için, LightCycler 480 TagMan Probes Master (Roche CAT NO:4707494001) ve karışımı ile iki set halinde kantitatif Real-Time PCR gerçekleştirilmiştir, cihaz protokolü Tablo 3.4 te gösterilmiştir .

Direnç genlerden Gentamicin geni *ant(2'')* qPCR uygulaması için seçilmiştir, bu genin F : *ant(2'')*I-F 5 GGG CGC GTC ATG GAG GAG TT 3 R: 5'- *ant(2'')*I-R 5TAT CGC GAC CTG AAA GCG GC 3 primer çiftleri ve Prob FAM TGCCCACCAAGCAGGTTCGCA -BBQ) kullanılarak kantitatif olarak tablo 3.5 teki reaksiyon karışımına göre saptanmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak konsantrasyonu bilinen deneye özgü plazmit standartları kullanılırken, negatif kontrol olarak da moleküler çalışmalara uygun (MG) su kullanılmıştır.



Şekil 3.11. Standart Eğri Aplikasyonu



Şekil 3.12. qPCR standart eğrisi

Tablo 3.4 qPCR cihaz protokolü

Program	Denaturasyon	Amplifikasyon			Cooling
Parametre					
Analiz modu	yok	Kuantifikasyon modu			Yok
Döngü	1	45			1
Hedef [°C]	95	95	60	72	40
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:30	00:00:01	00:00:30
Ramp.Rate [°C/s]	20	20	20	20	20
Acquisition Mode	Yok	yok	yok	tek	yok

Tablo 3.5 Real-Time PCR reaksiyon karışımı ve miktarları

Reaksiyon karışımı	Miktar μ l
Nükleaz Free su	6,8
Forward Primer(20 μ M)	0,5
Reverse Primer(20 μ M)	0,5
Taqman probe (10 μ M)	0,2
Enzim ve dNTP	10
Toplam	18

3.2.11.Dizi Analizi

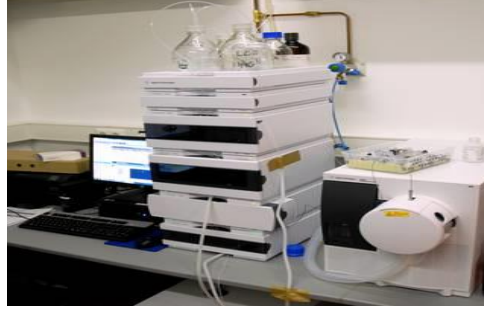
Agaroz jel elektroforezi sonucu pozitif bant gösteren PCR ürünleri Letgen Biotech (İzmir,Türkiye) şirketine dizi analizi için gönderilmiştir.Dizi analizi sonuçlarının biyoinformatik araştırmaları için fasta formatındaki diziler, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) veritabanı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Antibiyotik direnç genlerine ait dizilerin karşılaştırılması için BLAST veritabanının ‘‘blastx’’ seçeneği kullanılmıştır.

3.2.12. Antibiyotik ve Pestisit Kalıntı Analizi

Örnekler, LC-Q-TOF/MS sistemine enjekte edilmiştir.(şekil 3.13). Kromatografik ayırma ikili pompa, çevrimiçi gaz generik, otomatik örnekleyici ve Poroshell 120 EC-C18 kolon(3.0x50 mm, partikül boyutu 2.7µm) (Agilent Technologies) donanımlarına sahip Agilent 1260 Infinity Serisi HPLC cihazı (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz sistemi %0.1 Formik asit içeren su(A) ve Asetonitril (B)`den oluşmaktadır ve gradient elüsyon kolonun dengelenmesi için bu şekilde gerçekleştirilmiştir: 0-0.5dk %10 (B); 0.5-5 dk. %70 (B); 5-7 dk. %95; 7-10 dk %95(B); 10-15 dk. %10 (B). Kolon sıcaklığı 35°C`de tutulmuştur.

Örnek enjeksiyon hacmi 3.0 µL ve akış hızı 0.5 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Tüm örnekler hem pozitif hem negatif modda kalitatif olarak analiz edilmiştir. Kantitatif analiz için ampisilin negatif modda kalibre edilmiştir.

Diğerlerinin pozitif modda kalibrasyonu yapılmıştır. Kalitatif analiz için tanımlamalarda ForTox_AM_PCDL, VetDrug_PCDL, Metlin_PCDL, Metlin_Metabolomics Kütüphane İdentifikasyonu yapılmıştır.

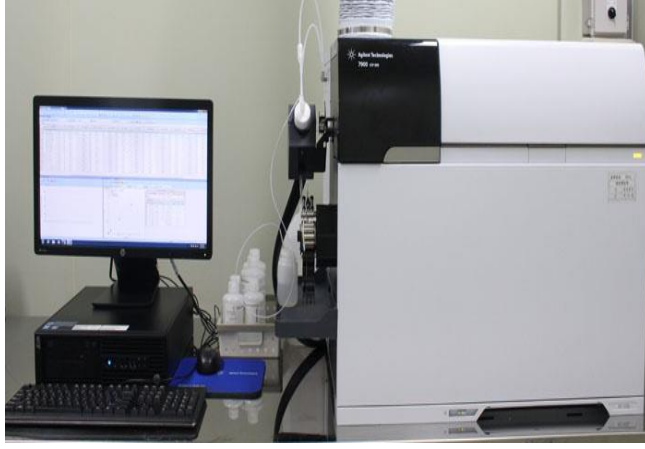


Şekil 3.13 Agilent 1260 Infinity Serisi HPLC cihazı

3.2.13. Ağır Metal Analizi

Atık su örneklerindeki ağır metallerin analizleri gerçekleştirmek için ICP-MS (Endüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi) cihazı kullanılmıştır. ICPMS örneklerin yüksek sıcaklıktaki bir plazmaya, genellikle argon, gönderilerek moleküler bağların kırıldığı ve atomların iyonlaştırıldığı bir analitik tekniktir. Su örneklerinde on üç (As, Se, Al, Ag, Sb, Ba, Hg, Cd, Pb, Mn, Cr, Fe and Ni) metalin kalitatif ve kantitatif tayinleri için stok standart solüsyonlar ve HNO₃ Merck firmasından temin edilmiştir. Örneklerin hazırlanması ve analizleri esnasında ultra saf su kullanılmıştır . Bir yıl boyunca her mevsimde tesisin giriş ve çıkış kısmından bir örnek seçilerek analiz yapılmıştır. Ağır metaller ICP-MS cihazı ile analiz edilmeden önce standart stok çözeltiler kullanılarak ölçüm aralığına uygun kalibrasyon standart çözeltileri hazırlanmıştır. Atık su numuneleri ilk önce 4500 rpm for 20 dk santrifüj işlemi ile katı ve sıvı olarak iki faza ayrılmıştır (Karvelas,2003). Daha sonra sıvı numune 45µm filtrelerden geçirilip, üzerine 30µL %65'lik (Merck Suprapur) Nitrik asit eklenerek hazırlanmıştır. Santrifüj sonrası kalan katı örneğin ise Cem Mars 5 Mikrodalga fırın da 200°C sıcaklık 800 psi basınç altında 7 mL %65'lik Merck Suprapur Nitrik Asit ve 2mL H₂O₂ ile bozundurmak işlemi gerçekleştirildi. Bozundurulmuş örnek daha sonra 50 mL'ye seyreltilmiştir.

Hazırlanan bu örneklerin içerdiği ağır metalleri bulmak için 0.5 ppm'den 250 ppm'ye kadar bir kalibrasyon oluşturulup ölçümleri Agilent ICP-MS 7900 cihazı ile yapılmıştır.(Şekil 3.14). Analizden sonra sonuçlar sayısal olarak elde edilmiştir.



Şekil 3.14 Agilent ICP-MS 7900 cihazı

3.2.13. Heterotrofik bakteri İzolatların Stoklanması

Bakteri izolatlar kısa süreli stoklamalar için %15'lik gliserol içerisinde alınarak -20°C'de saklanmıştır. Uzun süreli saklama için ise, besiyerinde 16 saat geliştirilen bakterilerden 200 µl alınarak 3 dak. 12.000 rpm'de santrifüjlenerek supernatant kısmının uzaklaştırılması ve pelletlerin %30 gliserol içeren LB broth besi ortamında süspansiyon edilip, şok soğutma ile -80°C'de stoklanmıştır.

3.2.14. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler Microsoft Excel programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm mikrobiyolojik veriler (KOB) \log^{10} tabanına dönüştürüldükten sonra istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Atık Suda Toplam Heterotrofik Bakteri Sayımı

Materyal ve Metot bölümünün 3.2.4 kısmında bahsedildiği gibi toplam heterotrofik bakteriler (THB), Nisan 2018 ve Mart 2019 tarihleri arasında yapılan atık su arıtım işleminin öncesi ve sonrasında sayılmış olup, bu sayım ile atık sudaki toplam heterotrofik bakteri (THB) ve antibiyotik dirençli bakterilerin (ADB) kültürü için spesifik olan R2A agar kullanılarak, toplam kültüre edilebilen bakterilerin sayım yapılmıştır.

Çalışmamızda da kullanmış olduğumuz, plak sayım yöntemiyle yapılan geleneksel mikrobiyolojik sınıflandırma metodu hatasız olmamakla birlikte, farklı deney aralıklarında bakterilerdeki sayısal değişikliklerinin hesaplanması için kullanışlıdır.

Bakteriyel analiz metotları daha öncesinde (Wang et al., 2007; Glady-Croue, 2018 ve Zhang, 2019) tarafından belirtilmiştir. Bir seri dilüsyon ile her seyreltmeden 1 ml boş petri kabına aktarılıp 37°C'de 24-48 saat arasında inkübasyona bırakılmıştır. Sayım sonuçları kob/ml cinsinden hesaplanmıştır.

Yıl boyunca elde edilen total heterotrofik bakteri sayım sonuçları, giriş sularında minimum 4.26×10^6 kob/ mL'den 7.525×10^4 kob/ mL'ye, çıkış sularında ise maksimum 9.8×10^2 kob/mL'den minimum 9.4×10^2 kob/mL olarak değiştiğini göstermiştir (tablo 4.1).

Tablo 4.1. Giriş ve Çıkış suyunda THB sayımı

Örnek tarihi	THB (kob/ml)		Azalma oranı %
	Giriş	Çıkış	
Mart	1.2×10^5	1×10^4	98
Nisan	9.13×10^5	2.2×10^4	99
Mayıs	3.855×10^5	8.6×10^3	91
Haziran	3.45×10^5	1.01×10^3	97.5
Temmuz	3.4×10^5	3.4×10^5	97.7
Ağustos	2.875×10^5	2.165×10^3	99.7
Eylül	7.525×10^4	9.8×10^2	93
Ekim	2.36×10^4	9.4×10^2	99
Kasım	1.5525×10^5	2.07×10^3	98.6
Aralık	2.8×10^5	1.35×10^3	96
Ocak	2.85×10^6	4.6×10^4	98.6
Şubat	4.26×10^6	3.47×10^4	99

Dört mevsim boyunca yapılan örneklemede giriş ve çıkış sularının kültürel sayım sonuçlarına bakıldığında, bakteri sayılarının kış ve ilkbahar dönemlerinde arttığı, yaz aylarında ise azaldığı gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar Ziemińska-Buczyńska vd., 2015) tarafından belirtilmiştir.

pH gibi çevresel faktörlerden kaynaklanan bu farklılıkların, özellikle ortama besin yüklendiğinde, bakterilerin yaşaması ve çoğalması üzerine etkisi düşüktür.

Wollast,1991; Velammal, 1993 ve Mahalakshmi vd., 2011) yapmış oldukları çalışmalara benzer bir şekilde, çalışmamızda toplam heterotrofik bakteri (THB) yoğunluklarının su örneklerine kıyasla sedimentlerde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Sıcaklık gibi fiziksel parametrelerde meydana gelen değişiklikler mikrobiyal komünitelerde farklılığa yol açarak mikrobiyal çevreyi değiştirmektedir.

Toplam heterotrofik bakterilerin giderim verimi ve sağkalım oranları farklı mevsimlerde çok düşük farklar ortaya çıkarmıştır. Mayıs ve Eylül ayları için sırasıyla % 9 ve % 7 ile yüksek sağkalım oranı, %91 ve %93 oranlarında ise en düşük giderim verimi gözlemlenirken, yüksek giderim etkinlikleri %96 ve %99 arasında değişkenlik gösteren diğer aylarda ise daha az farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu durum, sağkalımın daha düşük olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada genel olarak elde edilen sonuçlar giderim etkinliği ve düşük sağkalım oranı ile (Turolla vd., 2018) elde ettiği sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Mikrobiyolojik ve biyokimyasal karakterizasyon metotlarına göre, atık su arıtma tesislerinde tanımlanan bakteri topluluğu karıştırılmış ve dört mevsim süresince farklı Patojenik ve patojenik olmayan cinsleri ortaya çıkarmıştır. *E. coli*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus spp*, *Vibrio cholera*, ve *Staphylococcus spp* en çok bulunan bakteri türleridir. Atık su arıtım tesislerinin farklı kaynakları olarak bakterilerin dağılım merkezi haline gelmesi, bakterilerdeki bu çoklu cins farklılıklarını ortaya çıkarmaktadır. Aynı zamanda, farklı heterotrofik bakterilerin atık su arıtma tanklarına bulunması, mikroorganizmaların fizyolojisi ve fenotipinde değişikliklere yol açacaktır. Bu şekilde, normal olan çevresel bakteriler gelecekte antibiyotik dirençli bakterilere ve patojenik bakterilere dönüşmektedir.

4.2. Antibiyotik Dirençli Bakterilerin Sayımı - ADB

Antibiyotik dirençli bakterilerin (ADB) sayımında daha öncesinde tartışıldığı gibi toplam heterotrofik bakteri sayım metodu, istisnai olarak ilgili antibiyotiklerin

petri kabına dökülmesinden önce belirli konsantrasyonlarının R2A agara eklenmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Dirençli bakteri hücrelerinin sayısı girişi ve çıkış kısımlarında Eritromisin (Er), Ampisilin (AMP), Gentamisin (Gen), Kanamisin (Kan), Tetrasiklin (TC) ve Clindamisin (Cln) gibi yaygın antibiyotiklere karşı test edilmiş ve disk difüzyon yöntemiyle antibiyotiklere karşı duyarlılık testi yapılmıştır. Bu antibiyotik gruplarının seçilmesinin nedeni, bu antibiyotiklerin hem klinik hem de veterinerlik alanında yaygın şekilde kullanılmasından kaynaklanmaktadır.

Yıl boyunca toplam antibiyotik dirençli bakterilerin sayısı, antibiyotik dirençli bakterilerin giderim verimi ve hayatta kalma yüzdesini belirlemek için hem giriş ve hem de çıkış atık sularında incelenmiştir.

Antibiyotik dirençli bakterilerin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır ve dolayısıyla bu şekilde çevreye deşarj olan antibiyotik dirençli bakterilerin miktarı gösterilmektedir. Bunun sonucunda antibiyotik direnç probleminin risk seviyeleri öngörülebilmektedir.

Yıl boyunca altı farklı antibiyotik ile elde edilen bulgulara göre, bazı antibiyotiklerin varlığı ve yokluğunda varyasyonlar fark edilmiştir.

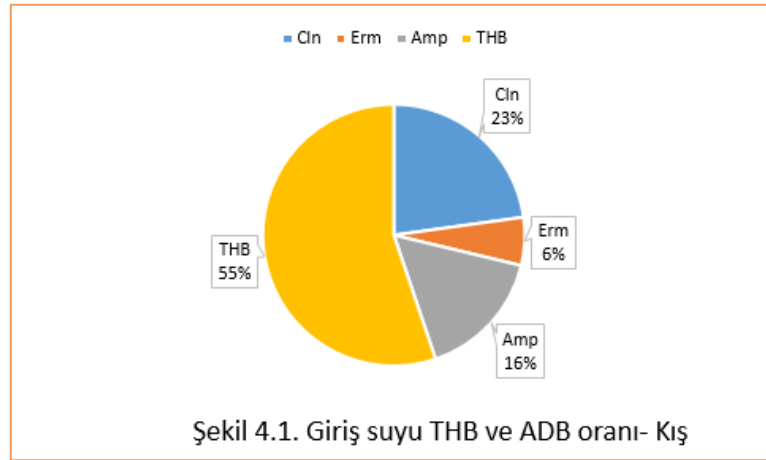
Tablo 4.2’de gösterildiği gibi giriş su numunelerinde, ilgili antibiyotiğe karşı oluşturulan direnç tüm aylarda yapılan örneklemelede tespit edilmiş olup, sulfonamid dirençli bakteriler (Nisan ve Mayıs te) kış (Ocak ve Şubat) aylarında tespit edilememiştir.

Yıl boyunca toplam bakteri sayısı değişmiş olup, özellikle kış sezonunda şubat ayında ampisilin, eritromisin ve klindamisin gibi antibiyotiklere karşı sayılarının arttığı bulunmuştur. Muhtemelen bu durum, kış mevsimindeki gerçekleşen enfeksiyonlar nedeniyle artmaktadır. Bununla birlikte, bakteri hastalıklarını tedavi etmek için bu antibiyotiğin yüksek kullanımı, dirençli bakteri sayısındaki artışa neden olmuş olabilir. (Soufi et al ., 2010 ve Ziemińska-Buczyńska et al ., 2015) da benzer sonuçları elde ederek bakteriyel direncin artışını vurgulamıştır.

Ampisilin ve Eritromisinin geniş bakterisidal spektrumlara sahip olduğu bilinmektedir ve bu antibiyotikler diğer antibiyotiklerden daha sık kullanılmaktadır.

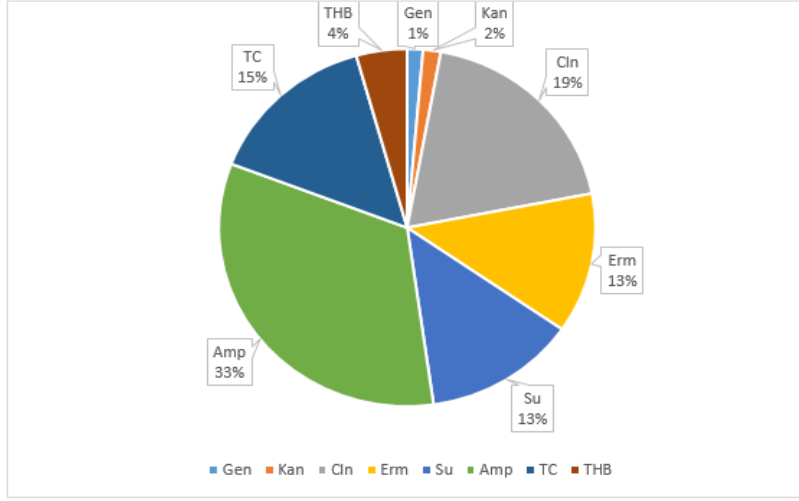
Tablo 4.2 Farklı aylarda giriş suyunda ADB sayımı

antibiyotik Örnek tarihi	ADB kob/ml Giriş						
	TC	Amp	Sul	Erm	Cln	Kan	Gen
İlk Bahar 2018							
Mart	5.1×10^2	8.1×10^3	3.3×10^3	7.5×10^3	2.38×10^4	5.4×10^2	1×10^3
Nisan	5.1×10^2	3.5×10^4	----	3.9×10^4	7.4×10^3	4.6×10^2	5.1×10^3
Mayıs	6×10^2	6.2×10^4	---	2.5×10^2	2.2×10^2	---	7.2×10^2
Yaz 2018							
Haziran	5.2×10^2	7.4×10^4	4.1×10^2	---	---	8.7×10^2	4×10^2
Temmuz	4.1×10^2	7.7×10^3	3.2×10^4	3×10^4	3.2×10^4	1.28×10^3	6.2×10^3
Ağustos	1.28×10^4	3.02×10^4	6.4×10^2	2.55×10^5	2.05×10^5	3.3×10^2	---
Son Bahar 2018							
Eylül	4.1×10^3	6.6×10^3	4×10^3	7.9×10^3	4.9×10^2	---	5.1×10^2
Ekim	3.5×10^3	7.8×10^3	3.1×10^3	2.99×10^4	4.5×10^3	3.6×10^2	3.2×10^2
Kasım	8.5×10^2	1.86×10^4	1.51×10^4	1.92×10^4	1.93×10^4	4.8×10^2	9.2×10^2
Kış 2018_2019							
Aralık	2.1×10^3	1.71×10^4	1.95×10^4	7×10^3	1.5×10^4	3.6×10^2	3.9×10^2
Ocak	2.16×10^4	2.78×10^4	----	5.3×10^4	3.15×10^5	4.5×10^3	6×10^4
Şubat	6.9×10^3	6.78×10^5	----	2.5×10^5	9.6×10^5	7×10^3	4.2×10^4



Bahar döneminde kış mevsim gibi ampisilin, eritromisin ve klindamisin ayrıca gentemisin de yüksek bulunmuştur. Yaz boyunca en yüksek, eritromisin dirençli

bakteri bulunmuştur. Toplam dirençli bakteri sayımı sonbahar ekim ayında yükseklik tespit edilmiş (Şekil 4.2).



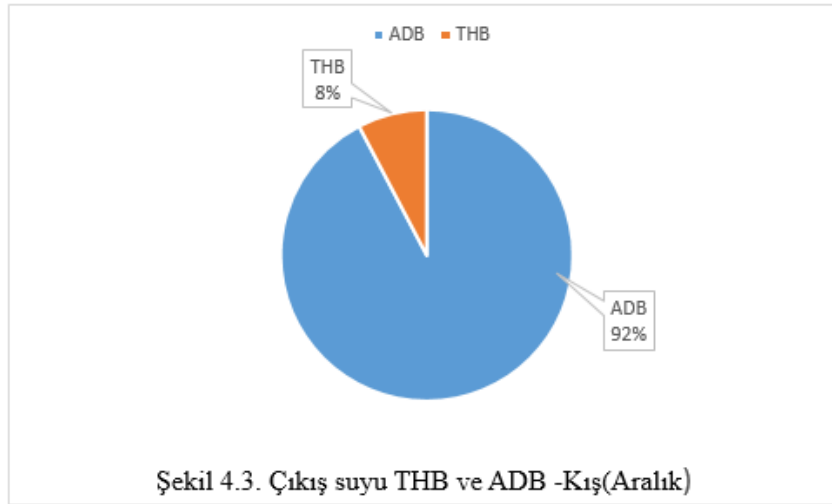
Şekil 4.2. Giriş suyu THB ve ADB oranı- Sonbahar (Ekim)

Tablo 4.3'deki çıkış atık suyundaki numuneler için toplam dirençli bakterilerinin sayısı, Saruhanlı atık su arıtma tesislerindeki farklı arıtma işlemlerinden dolayı azalmıştır. Yıl boyunca, bazı antibiyotik dirençli bakterilerin tüm aylarda toplam sayılarında azalma olduğu tespit edilmiş olup ,kanamicin gibi sadece kasim ayında bulunmuş diğer aylarda tespit edilmemiş, tartışıldığı gibi bunun bir sonucu olarak yüksek sayıda antibiyotik dirençli bakteriler kış ayında(aralık) artmıştır şekil 4.3. Bu önemli bulguya sebep olarak, çoğu antibiyotiğe dirençli bakterilerin bu mevsimde antibiyotiklere daha fazla maruz kalması gösterilebilmektedir. Diğer bir yandan en düşük antibiyotik dirençli bakterilerin sayısı yaz mevsimin ağustos ayında sonbahar ise eylül ve ekim aylarında gözlemlenmiş olup. (Ziemińska-Buczyńska et al.,2015) yaptıkları bir çalışmada benzer sonuçlar elde etmiştir.

Tablo 4.3 Farklı aylarda çıkış suyunda ADB sayımı

Antibiyotik Örnek zamanı	ADB kob/ml Çıkış						
	TC	Amp	Sul	Erm	Cln	Kan	Gen
İlk Bahar 2018							
Mart	---	-----	3×10^2	----	8.2×10^2	-----	-----
Nisan	2.5×10^2	1.8×10^2	----	2.1×10^2	---	---	1.4×10^2
Mayıs	5.5×10^2	3.7×10^3	---	1.1×10^2	---	---	70
Yaz 2018							
Haziran	70	4×10^2	30	---	---	---	---
Temmuz	80	100	40	2.2×10^2	---	---	1.4×10^2
Ağustos	---	---	---	---	4.7×10^2	---	---
Son Bahar 2018							
Eylül	---	---	---	---	---	---	1.2×10^2
Ekim	---	---	---	---	2.1×10^2	---	---
Kasım	4.1×10^2	5.2×10^2	3.6×10^2	7.5×10^2	50	70	3.2×10^2
Kış 2018 _ 2019							
Aralık	4.5×10^2	7.4×10^2	7.9×10^2	6.9×10^2	7.5×10^2	-----	-----
Ocak	---	7.1×10^3	----	8.4×10^3	2×10^3	-----	-----
Şubat	----	2.5×10^2	---	3×10^3	3.5×10^4	-----	----

Kob= koloni oluşturan birimi, TC=Tetracyclin , Amp=Ampicilline, Sul= Sulfunamide, Erm= Erythromycin, Cln=Clindamycin, Kan=Kanamycin, Gen= Gentamicin



Çıkış sularında kalan antibiyotik dirençli bakteriler sucul çevreye yayılacak olup, ortamdaki antibiyotik dirençli bakterilerin sayısını artıran diğer dirençsiz bakteriler ile reaksiyona girebilecektir. Bu konu aynı zamanda 2015'te Lüddeke et al tarafından tartışılmıştır.

Bilindiği kadarıyla, bazı araştırmalar farklı mevsimlerde bütünleşmiş bakteriyel kompozisyon ve karakteristiklerini belirtmektedir (Caucci et al., 2016). Mevsimsel değişikliklerin evsel atık su arıtma tesisindeki antibiyotik dirençli bakterilerin üzerine etkisi ise nadiren rapor edilmektedir.

Çalışmamızda antibiyotik dirençli bakterilerin sucul ortama salınma riskleri üzerinde durmak için, atık su arıtma tesisindeki giderim verimi RE % (Removal efficiency %) ve sağkalım yüzdesi aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir. Giderim etkinliği arttığında sağkalım yüzdesi artmaktadır. Sağkalım yüzdesi çıkış suyunda antibiyotik dirençli bakterileri temsil etmektedir ve sonuç olarak salınan bakteri miktarı, antibiyotik direncinin yayılmasında çevreye giden bir rol oynayacaktır.

$$RE \% = \frac{(G - \text{Ç})}{G} \times 100$$

G = Giriş, Ç = Çıkış

4.4 verilen tabloya göre, en yüksek giderim verimi kanamisin dirençli bakteriler için tespit edilirken, en düşük giderim verimi ise tetrasiklin dirençli bakteriler için belirlenmiştir. Tetrasiklin dirençli bakterilerin sağkalım yüzdesinin diğer antibiyotik dirençli bakterilerden daha yüksek olduğu ve diğer bakterilere göre daha büyük miktarda sucul çevreye deşarj edildiği anlamına gelmektedir.

Giderim verimindeki bu farklılıklar birçok sebepten dolayı ortaya çıkmaktadır. Tetrasiklin antibiyotiklerinin, antimikrobiyal doğası sebebiyle biyodegradasyona karşı direnç göstermesi ve sözde-kalıcı organik kirleticiler olarak sınıflandırılması bu durumun birinci sebeplerinden biri olarak gösterilmektedir. Dolayısıyla, antibiyotik rezidülerinin kalıcı bir şekilde var olması ile daha fazla tetrasiklin dirençli bakterilerin gelişimine olanak sağlamaktadır. Bunun bir sonucu olarak, biyolojik işleme (aktif çamur ve anaerobik arıtma vb.) ve fizikokimyasal işleme metotlarını (koagülasyon, sedimentasyon ve filtrasyon) kullanan atık su arıtma tesislerinden bu tip antibiyotik dirençli bakteriler, geleneksel atık su arıtma yöntemi ile etkili bir şekilde giderilememektedir (Zhai , 2014).

Tablo 4.4 Dirençli bakterilerin giderim verimi - RE %

ADB giderim verimi RE %							
ORNEK	TC	Amp	Sul	Er	Cln	Kan	Gen
OCAK	100	74	100	83.8	99	100	100
ŞUBAT	100	99	ND	98.8	97	100	100
MART	100	100	90	100	96	100	100
NISAN	50.9	99.4	ND	99.46	100	100	97.25
MAYİS	59.9	94	ND	56	100	ND	90
HAZİRAN	86	99.4	92	ND	ND	100	100
TEMMUZ	79.5	95.4	99	99	99	100	97.7
AĞUSTOS	100	100	100	100	99	100	ND
EYLÜL	100	100	100	100	100	100	76
EKİM	100	100	100	100	95	100	100
KASIM	51.7	97	97	96	99.7	85	65
ARALIK	78.5	95	95.9	90	95	100	100

Atık su arıtma sistemlerinin ana bileşeni olan biyolojik arıtmada, sıcaklığın biyolojik dönüşüm sürecini, mikrobiyal komüniteyi ve çamur morfolojisini etkileyebileceği (Arevalo et al., 2014) ve bu şekilde geleneksel aktif çamur işlemlerinde performansı etkilediği bildirilmiştir. Sıcaklık 15°C'ye düşürüldüğünde, metan üreten bakterilerin inaktif, 5°C'ye düşürüldüğünde ise ototrofik bakterilerin hemen hemen işlevini yitirdiği belirtilmiştir (Gurung et al., 2017).

Ducey et al., 2010' da yaptığı bir çalışmada mevsimsel değişimlerin besleme suyunun kalitesini ve uygulama etkinliğini değiştirebildiğini göstermiş olup, kış aylarında amonyak azotunun gideriminin yaz aylarına kıyasla daha düşük olduğunu ve amonyağı okside eden bakterilerin ise yaz aylarında, kış aylarından 4.5 kat daha fazla olduğunu belirtmiştir.

4.3. Antibiyotik Rezidülerinin Tayini ve Miktarının Belirlenmesi

Yedi özgün antibiyotiğin varlığı, miktarı ve mevsimsel değişimi Saruhanlı Atık Su Arıtma Tesisinde yüksek çözünürlüklü sıvı kromatografi spektroskopisi (LC-Q-ToF-MS) kullanılarak araştırılmış olup tespit edilen antibiyotiklerin karakterizasyonları Tablo 4.5'de sunulmuştur.

Tablo 4.5 Antibiyotik kalıntıları

Antibiyotik	Antibiyotik rezidüsü ng/L							
	Kış		Bahar		Yaz		Sonbahar	
	G	Ç	G	Ç	G	Ç	G	Ç
Ampicillin	30413	13738	54131	52627	82875	76510	21343	n.d
Sulphonamide (sulfamethoxazole)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Erythromycin	8571	8535	15799	15464	22475	13681	13268	n.d
Gentamycin	57249	50629	60993	51204	66856	52156	58539	27709
Clindamycin	n.d	n.d	140281	98668	257887	191881	112518	n.d
Tetracycline	n.d	n.d	42349	29910	41208	37189	32725	n.d
Kanamycin	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

G = Giriş, Ç = Çıkış, n.d = bulunmadı

Geniş çeşitlilikteki antibiyotik rezidüleri, atık su artıma tesislerinin nehirlerle karışıp dünyaya deşarj olması ile çeşitli konsantrasyonlarda (çoğunlukla milyon ya da milyar başına parçalar) tespit edilmiş olup, tespit edilen konsantrasyonlar herhangi bir tehlikeye neden olacak kadar yüksek görünmeyebilirken bu antibiyotik rezidülerinin mutlak varlığı, toprakta ve atık su arıtım tesislerinden etkilenen farklı sucul çevrelerdeki antibiyotik dirençli bakteriyel suşlarının çoğalması ile bağlantılıdır.

Antibiyotik rezidülerinin tayin sonuçları tüm ilgilenilen antibiyotiklerin dört mevsimde bulunduğunu, sülfonamid ve kanamisin ile birlikte tetrasiklin ve klindamisin antibiyotiklerinin ise kış aylarında tespit edilmediğini göstermiştir.

Atık su artıma tesislerindeki bu antibiyotiklerin yaygınlığı, kanalizasyon sisteminde bulmasından kaynaklı olarak tüketim seviyeleri ile kısmen ilişkili olabilmektedir.

İlgili antibiyotikler geniş spektrumda antimikrobiyal aktiviteye sahip olup insanlar ve hayvanlar tarafından büyük ölçüde kullanılmaktadır ve dolayısıyla çoğu tüm mevsimlerde bulunmaktadır. Aynı zamanda, (Harrabi et al.,2018) yapmış olduğu bir çalışmada da düşünüldüğü gibi örnek toplama bölgesi olan Saruhanlı semtinin tarıma bağlı olması ve bölgede bir veteriner alanının bulunması ile bu farklı

antibiyotik çeşitliliğinin bulunmasının, atık su arıtım tesisinin hayvan atıklarına maruz kalmasından kaynaklandığı sonucuna varılmaktadır.

Tüm antibiyotiklerin (giriş suları için) toplam konsantrasyonu tüm atık su mevsimlerinde 8571 ng/L ile 2588.7 ng/L arasında olurken, çıkış sularındaki toplam antibiyotik konsantrasyonları 8535ng/L ile 19188.1 ng/L arasında olup giriş sularına kıyasla daha düşüktür. (Zhang et al.,2017) tüm antibiyotiklerin toplam konsantrasyonunun, (belirli atık su örneklerindeki tüm antibiyotiklerin toplamı) tüm atık su örneklerinde 63.6 ng/L ile 5404.6 ng/L arasında olduğunu tespit etmesi ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Giriş sularındaki toplam antibiyotik konsantrasyonları (1795.1–5404.6 ng/L) önemli bir ölçüde ($p<0.05$) çıkış sularından (63.6– 2245.3 ng/L) yüksektir.

Sülfametoksazol, çalışmamızda tespit edilmemiş olup (Harrabi et al.,2018) yapmış olduğu çalışmada tespit edildiği belirtilmiştir. Sülfametoksazol seviyeleri tüm örneklerde 126.70 ng/L'den büyük fakat Çin gibi diğer ülkelerde daha düşük olup, bazı atık su arıtma tesislerinde en yüksek 959.13 ng/L'ye kadar bulunduğu (Wu et al., 2016), İspanyada ise 417.4 ng/L'ye kadar olduğu belirtilmiştir (Rodriguez-Mozaz et al., 2015). Bu durumun aksine, genellikle sülfametoksazol ile birlikte kullanılan trimetoprimin daha düşük konsantrasyonlarda 56.60 ng/L ile 86.67 ng/L arasında olduğu bulunmuştur (Gros et al., 2013).

Tablo 4.5'te gösterilen miktar tayin sonuçlarına göre, en yüksek kalıntı konsantrasyonu tüm mevsimlerde klindamisine ait iken, en düşük kalıntı konsantrasyonu ise eritromisine ait olduğunu bulunmuştur.

Beta laktam ve tetrasiklin grubu antibiyotiklerin Türkiye ve diğer ülkelerdeki yüksek tüketimlerine rağmen, kimyasal kararsızlıklarından ve kolay bir şekilde hidrolize edilmelerinden dolayı ampisilin, ham atık sularında tespit edilmemiştir (Knapp ve ark., 2011). Diğer bir yandan, yaygın olarak kullanılmayan diğer antibiyotiklerden daha düşük olmasına rağmen, ampisilinin sonbahar mevsiminde 21.343 ng/L'ye kadar olan değerlerde olduğu bulunmuştur. PapaGeorgiou ve arkadaşları tarafından ampisilinin Merkez Yunanistan Atık su Arıtım Tesisindeki giriş suyunda 1805 ng/L'ye kadar olan değerler ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Harrabi ve arkadaşları da bu grubu, son yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlardan

daha düşük konsantrasyonlarda, yaklaşık 75.40 ng/L olarak tespit etmiştir (Papageorgiou et al., 2016; Harrabi et al., 2018).

Jiang ve arkadaşları antibiyotik konsantrasyonlarının kış dönemine kıyasla yazın oldukça düşük, ilkbahar ve sonbahardan ise biraz daha düşük olduğunu belirlemiştir. Tüm antibiyotiklerin kış aylarında en yüksek konsantrasyona ulaştığı bulunmuş olup, kış dönemindeki antibiyotiklerin ortalama konsantrasyonları diğer 3 mevsimden yaklaşık olarak 1.10-5.32 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak, bu çalışmanın sonucu ile antibiyotiklerin farklı mevsimlerdeki baskınlıklarının farklı olduğu gösterilmiştir. Örnek olarak, norfloxacin'in ilkbaharda ana bileşen olduğu, penicillinV'nin ise diğer üç mevsimde önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur (Jiang et al., 2018). Benzer sonuçlar (Diwan et al., 2013) tarafından belirtilmiştir.

Sonuç olarak, dirençli bakteri suşlarının olası gelişimi açısından antibiyotiklerin sucul çevrelerde bulunması endişe konusudur. Buna bağlı olarak göl sularında, su arıtım tesislerinde ve içme sularında ampicilin ve siprofloksasin dirençli bakterilerin yaygınlığıyla ilgili çalışmalar mevcuttur (Kuczura et al., 2012).

Dolayısıyla atık su arıtım tesisindeki kaynak ve çıkış sularında antibiyotiklerin varlığı, özellikle potansiyel oluşumları göz önünde bulundurulduğunda büyük ölçüde önemlidir.

Rodriguez Mozaz ve arkadaşları tarafından tartışıldığı gibi, atık su arıtım tesislerinden deşarj olan antibiyotiklerin sucul ortama sürekli girişi, antibiyotiğe dirençli mikroorganizmaların oluşumu açısından halk sağlığı için oldukça büyük bir endişe kaynağı olmaktadır. Antibiyotiklerin bakteri kaynaklı hastalıklara karşı kullanımıyla birlikte, aynı zamanda hayvan besiciliğinde büyümeyi geliştirmek ve enfeksiyonları önlemek amacıyla da kullanılmaktadır. Kullanılan antibiyotiklerin tipine de bağlı olarak, antibiyotiklerin hayvanlarda kullanımı ile dışkılarında (dışkı ve/veya idrar) farklı konsantrasyonlarda oluşmasına sebep olup, dolayısıyla çevreyi etkileyecektir. Antibiyotikler kanalizasyon sisteminde sonlandığı için, atık su arıtım tesislerindeki ham giriş sularında bulunan antibiyotiklerin ve metabolitlerinin prevalansı, tüketim seviyeleri ile ilişkilendirilebilmektedir.

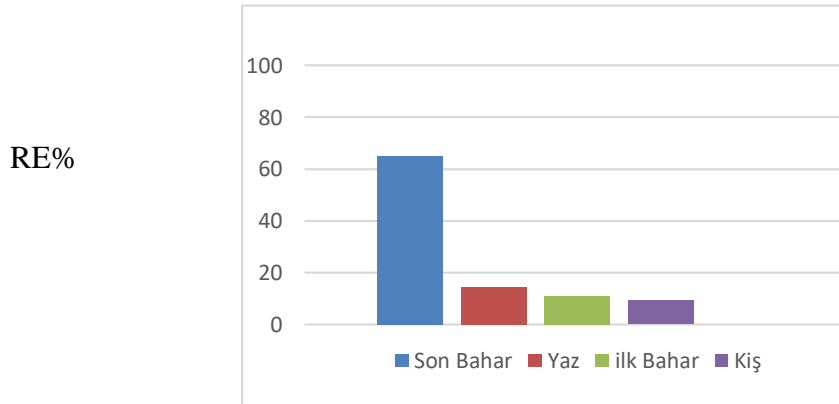
24 örnekleme yapılarak yollar aracılığı ile çevre sularına ve ekinlere ulaşacağından, bu durum, atık suda bulunan antibiyotik dirençli bakterilerin

gelişmesini tetikleyen antibiyotiklerin optimum konsantrasyonlarının altında bulunmasının bir sonucu olarak, hayvanlardan insanlara direnç özelliklerinin geçişini kolaylaştıran dirençli bakterilerden oluşan bir çevresel havuzun gelişmesini arttıracaktır. Bu ilişki aynı zamanda(Adegoke et al., 2016) tarafından tartışılmıştır

Tablo 4.6 Mevsimsel antibiyotik giderimi RE %

Antibiyotik	Antibiyotik rezidüsü RE %			
	Kış	Bahar	Yaz	Sonbahar
Ampicillin	54.82	2.77	7.6	100
Sulphonamide	n.d	n.d	n.d	n.d
Erythromycin	0.42	2.12	39.12	100
Gentamycin	11.5	16.4	21.98	69.7
Clindamycin	n.d	29.6	26.6	100
Tetracycline	n.d	29.37	9.75	100

Antibiyotik giderim etkinlikleri tablo 4.6'te ve şekil 4.4 de gösterilmiştir. Sonuçlar bir yıl boyunca yapılan örneklemelerde farklı mevsimlerdeki önemli varyasyonları göstermektedir. Tablodaki mevsimsel sonuçlara göre en yüksek giderim etkinliği sonbaharda elde edilmiş olup, tüm antibiyotikler için %65.08 iken, %9.25 ile en düşük giderim verimi kış aylarında gözlemlenmiştir. İlkbahar ve yaz aylarında giderim etkinliğinin sırasıyla %11.12 ve %14.55 olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.4 Mevsimsel antibiyotik RE%

İlgilenilen tüm antibiyotikler arasında ve sonbahar mevsimi hariç en düşük giderim etkinliği eritromisin için yaklaşık % 0.42 iken, en yüksek giderim etkinliği

ise ampisilin için % 54.82 olarak gözlemlenmiştir. Daha önceki çalışmalara kıyasla, antibiyotiklerin giderimi ile ilişkili birçok çalışma bulunmaktadır.

Çalışmalarımızdan farklı bir şekilde, atık sular antibiyotik kalıntıları açısından analiz edildiğinde kış aylarında antibiyotik seviyelerinin diğer mevsimlerle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Jiang et al., 2011; Kim ve Carlson, 2007).

Benzer bir şekilde, nehir sularında yaz aylarında daha düşük antibiyotik kalıntılarının olduğu belirtilmiştir (Xu et al., 2006). Antibiyotik kalıntılarında meydana gelen bu değişimler ile Portekiz'deki bir hastanenin çıkış sularındaki antibiyotik seviyelerinin sonbahara kıyasla ilkbaharda daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Pena et al., 2010).

Zhai ve arkadaşları , 2014) tarafından yapılan bir çalışmada, bu mevsimlerde uygulanan geleneksel atık su arıtma işlemleri ile antibiyotik kalıntılarının etkili bir şekilde gideriminin mümkün olmadığını belirtmiş olup sonuç olarak yeni, değiştirilmiş ve geliştirilmiş teknikler atık suyun sucul çevrelere salınımından önce antibiyotik direncini ve bu direnç ile ilgili genleri gidermek zorundadır.

4.4. Pestisit, Herbisit ve Veteriner İlaçlarının Analizi

Geçtiğimiz son on yılda, pestisitler tüm tarımsal alanlardaki çiftçiler tarafından büyük ölçüde kullanılmaktadır ve Saruhanlı ilçesinin ana geçim kaynağının çiftçiliğe ve tarıma bağlı olması sebebiyle, atık sular tarımsal alan ile ilgili kimyasal maddeler ve pestisitler açısından analiz edilmiştir. Bazı çalışmalarda önerilen bu analizin başarılmasının altında iki sebep bulunmaktadır; bazı kimyasal maddelerin antibiyotik direnç genlerinin gelişimi ile ilişkisinin bulunması ve toplam antibiyotik dirençli bakterilerin sayımı üzerine etkili olabilmesidir.

Antibiyotik rezidülerinin değerlendirilmesinde kullanılan LC-Q-ToF-MS ile örnekler analiz edilmiş olup sonuçlar Tablo 4.7 ve Şekil 4.5 A, B, C ve D'de gösterilmiştir.

Sonuçlar en çok bulunan pestisit ve herbisitlerin DDT, dinoterb ve denatonyum olduğunu, farklı mevsimlerde tamamının yaklaşık olarak %70'ini oluşturduğunu göstermiştir. Antimikrobiyal ve veteriner ilaçlarının %10, diğer

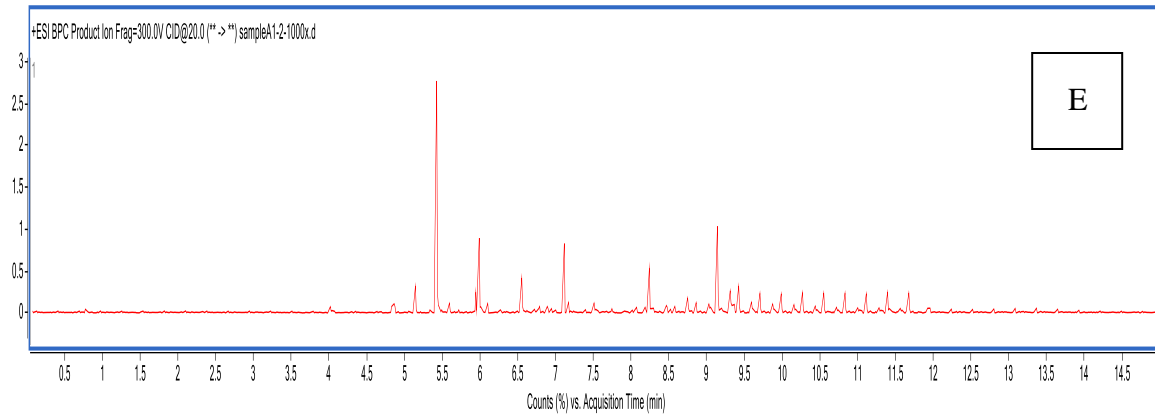
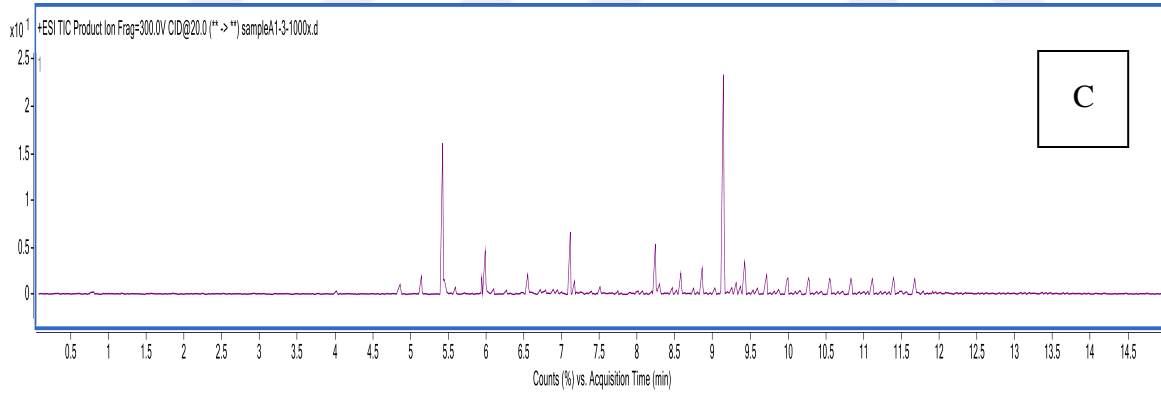
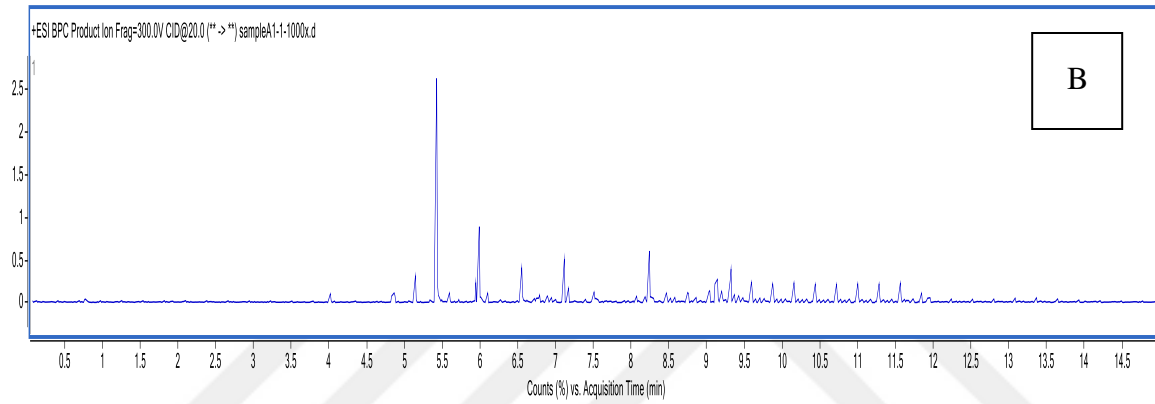
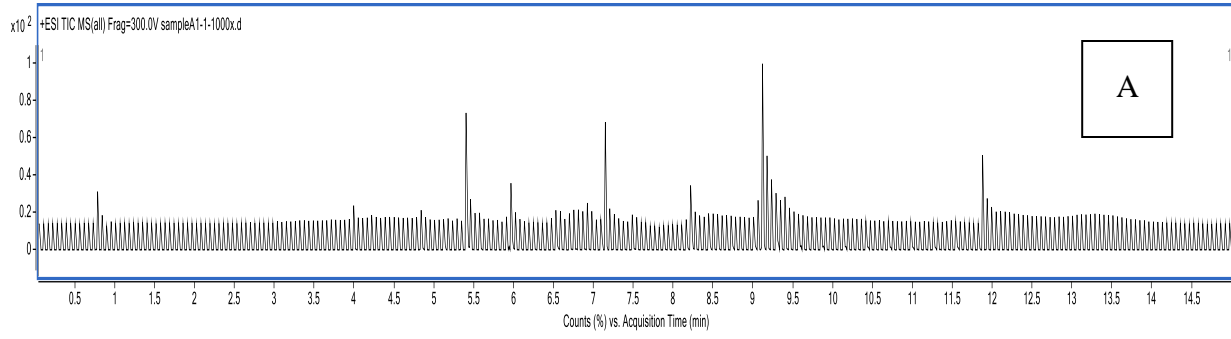
kimyasalların ise %20 olduğu belirlenmiştir. Bulunan başlıca veteriner ilaçları klindamisin ve tetrasiklidir.

Elde edilen kimyasalların saflık oranları 82.01 ve 99.62 arasında değişken olup, alıkonma sürelerinin (retention time), literatür sonuçlarını da doğrularak 4.7 ve 8.07 arasında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Analizler, ilgilenilen kimyasalların bulunmamasından dolayı kromatografik tayin değerlendirmelerinden oluşmaktadır. Aynı zamanda atık suda geniş çeşitlilikte kimyasallar bulunabilmektedir. Tüm detaylar aşağıdaki tabloda sunulmuştur.

Tablo 4.7 Pestisit, herbisit ve veteriner ilaçlarının analiz sonuçları

Bileşenler	Score	Base peak	RT	Uses / Activity	Nots
Denatonium	96.06	86.0965	4.695	Bucek ilacı/ Detergent	G & Ç
Dinoterb	98.95	239.0663	6.574	Pestisit	G & Ç
Embelin	87.54	293.1775	ND	Germisit	G & Ç
Azelaic acid	98.06	125.0967	4.212	Antibakterial	Ç
Cetylpyridinium	99.41	304.2994	6.384	Antiseptik	G & Ç
Benzododecinium	99.62	304.2997	6.058	Antiseptik & Disinfeksiyon	G & Ç
Clindamycin	99.64	126.1279	4.015	V. ilaç	G & Ç
Tetracycline	82.31	410.1226	3.451	V. ilaç	G
Phthalic acid	84.36	149.0232	6.79	Cozmetik	G & Ç
Diocetyl phthalate	97.39	149.0231	8.074	Plasticizer	G & Ç
1-Octadecanamine	83.08	84.9597	6.231	--	G
Monopalmitin	82.01	71.0856	7.301	--	G

- RT (Retention Time), , ND (saptanmadı), V.(Veterinlik).



Şekil 4.5 A, B, C ve D LQ-QTOF-MS cihaz sonuçları

Pestisitler ile tarımsal üretimin zararlı organizmalardan korunması amaçlanmaktadır. Bununla birlikte pestisit atıkları atmosferik, karasal, yeraltı ve yeraltı suyu yollarıyla hedef alanlarının çok ötesine ulaşmaktadır. Yüzeysel akış ve çıkış suları, pestisitlerin sucul çevrelere girmesindeki en önemli giriş yolları arasındadır. Pestisitlerin tarım bahçelerinden kanalizasyon sistemlerine girişi, asfalt yüzeylerdeki tarla sprey doldurma ve temizleme faaliyetleri, kullanılmayan ürün artıklarının doğrudan imha edilmesi, kazara dökülmeler ve tarım dışı kullanımlardan kaynaklanmaktadır. Tarım dışı kullanımlardan kaynaklanan pestisit atıkları kanalizasyon sistemlerinde bulunmuş olup, çim yönetim faaliyetleri (golf sahaları, parklar), endüstriyel yeşillik kontrolü (otoyollar, demir yolları) ve özel evlerde ve bahçelerde pest (haşere) kontrolü bu duruma örnek gösterilebilmektedir (Barceló ve Hennion, 2003; Köck-Schulmeyer et al., 2013; Bach et al., 2000; Kreuger, 1998). Saruhanlı atık sularda bulunabilen başlıca pestisitlerin taranması ve pestisit ve antibiyotik direnci arasındaki bağlantıyı tartışmak araştırmalarımızın temel iki amacını oluşturmakla birlikte, literatürde atık sulardaki pestisitlerin varlığı ile ilgili benzer birçok çalışma mevcuttur (El-Said et al., 2018; Besha et al., 2017 ve anumol et al .,2016).

Dinoterb ve Denatonium çalışmamızda atık su arıtma tesisinin hem giriş hem de çıkış sularında bulunan başlıca pestisitler olup tarımda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, herbisit ve germisitlerin bu pestisitler ile birlikte bir karışım şeklinde kullanılabileceği çalışmamızın diğer bir bulgusudur.

Yapılan diğer araştırmalarla karşılaştırıldığında, çalışmalarımızın aksine Manoli ve arkadaşları atık sudaki 32 pestisiti inceleyerek konsantrasyonlarının 0.15 ng/L - 413.03 ng/L arasında değiştiğini tespit etmiş olup, Siromazin, Schradan ve Ametrin başlıca pestisitlerdir (Manoli et al ., 2018).

Böcek ilacı ve antibiyotik direnci arasındaki ilişki çalışmamızın önemli noktasını oluşturmaktadır. Bu durum yapılan birçok araştırmada da tartışılmış olup, Rangasamy ve arkadaşları pestisit ile kontamine olmuş gıda ürünlerinin tüketimi ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin insanlar ve canlı hayvanlarda kullanımının, doğal seleksiyon yoluyla antibiyotik ve pestisite dirençli bakteri florasının gelişmesini desteklediğini belirtmiştir. Pestisit direnci temel olarak biyofilm oluşumunu,

uyarılmış mutasyonları ve plazmidler veya transpozonlar aracılığı ile gerçekleşen horizontal ve vertikal gen transferini ve bazı hidrolitik enzimlerin artan ifadesi aracılığı ile bakteriyal savunma adaptasyonlarını geliştirmektedir. Pestisit direnç genleri daima gen eleman olarak transfer olur ve aynı zamanda antibiyotik direnç için gerekli olan genleri taşımaktadırlar. Bununla birlikte, bazı uyarılmış mutasyonlarda, enzimin aktif bölgesindeki bir mutasyon ile pestisitlerin ve antibiyotiklerin degradasyonu sağlanmaktadır. Birkaç çalışma herbisitlerin yabancı tip suşlar ile subletal olarak maruz bırakıldığında antibiyotik direncinin uyarıldığını göstermektedir.

Bir bakteriyel suş, bir dizi antibiyotiğe karşı direnç geliştirmesini sağlayan genetik mutasyonlar geçirerek pestisitlere karşı direnç saylabilmektedir. Antibiyotiklere karşı geliştirilen bu yeni direnç, pestisit-antibiyotik çapraz direnç olarak isimlendirilmektedir.

Genetik mutasyonlar aracılı ile pestisit degradasyon yollarının gelişmesi, sürekli pestisit kullanımının olması nedeniyle, toprak bakterileri arasında çoklu ilaç direnç seviyelerinin artmasına neden olmuştur (Bergman, 2003; Kurenbach et al., 2015; Anjum ve Krakat, 2016).

Literatüre incelendiğinde, çeşitli antibiyotiklere ve pestisitlere direnç gösteren bakteriler ile ilgili yapılan çalışmalar mevcuttur (Kirubakaran et al., 2017a). Yapılan bir çalışmada, yabancı tip bakteri türleri (*Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium*) subletal dozlarda herbisitlere maruz bırakıldığında tetrasiklin, siprofloksasin, kanamisin ve kloramfenikol gibi antibiyotiklere direnç gösterdiği belirtilmiştir (Kurenbach et al., 2015). Bu bulgulara rağmen, yapılan çalışmalarda çapraz direnç oluşum mekanizmalarının üzerinde durulmamıştır. Pestisit-antibiyotik çapraz direncinin üstesinden gelmek için terapötik stratejiler geliştirmek amacıyla bu alana odaklanan çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

4.5 Atık Sudaki Ağır Metallerin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda 13 farklı metalin (As, Se, Al, Ag, Sb, Ba, Hg, Cd, Pb, Mn, Cr, Fe and Ni) katı ve sıvı formları 4 mevsim boyunca incelenmiştir. Tüm metallerin giriş sularında %100 ve çıkış sularında ise yaklaşık olarak %90 oranında (toplam konsantrasyon) bulunduğu tespit edilmiş olup, tüm mevsimlerde tamamen giderilen iki metal (Al ve As) haricinde, metal konsantrasyonlarındaki farklılıklar gösterilmiştir.

Tablo 4.8’de yer alan sonuçlara göre, tüm ağır metallerin giriş sularında farklı konsantrasyonlarda bulunduğu gösterilmiştir. Giriş su numunelerindeki en düşük metal konsantrasyonu çevre için toksik olan gümüş (Ag) metalidir. Karvelas ve arkadaşları (2003) en düşük konsantrasyonun paladyum (Pd) metalini olduğunu tespit etmiş olup, çalışmamızda demirin (Fe) en yüksek frekansta bulunması, (Karvelas et al., 2003) elde ettiği sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Giriş suları ile elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak, sularının arıtma sistemine tabi tutulmasından dolayı, bu durumun çevreye olan etkisi doğrulanmamaktadır. Bununla birlikte, genellikle giriş sularında biriken ağır metal yönünden zengin farklı evsel atıklar kullanıldığı için ağır metal konsantrasyonu yüksektir. Bu durum aynı zamanda (Chipasa ,2003 ve Chu et al.,2019) tarafından bildirilmiştir.

Tablo 4.8 Giriş ve çıkış sularında ağır metal analizi(ppb)

Ağır metal	Mevsimsel Örnekleme (ppm)							
	Kış		İlkbahar		Yaz		Sonbahar	
	G	Ç	G	Ç	G	Ç	G	Ç
Al	5342.366	0.000	5825.28	0.000	17182.607	0.000	1944.349	0.000
Cr	46.909	3.44	46.784	0.532	33.969	0.459	40.711	0.644
Mn	419.59	4.858	404.739	8.35	654.55	3.321	714.897	4.232
Fe	7833.129	46.338	8414.34	0.048	38151.867	2.68	10294.424	2.072
Ni	33.123	0.218	27.636	0.003	44.957	<0.000	31.992	<0.000
As	29.185	27.699	31.114	22.645	32.418	20.913	39.378	21.611
Se	5.618	1.132	4.539	0.96	5.005	0.417	6.493	0.42
Ag	0.152	0.000	0.15	0.000	0.096	0.000	0.319	<0.000
Cd	0.464	0.008	0.322	0.044	0.444	0.021	0.19	0.029
Sb	0.795	0.573	0.532	0.51	0.868	0.763	1.296	0.832
Ba	285.683	107.129	274.431	52.594	229.24	60.92	426.658	81.84
Hg	0.342	0.027	0.289	0.021	0.801	0.016	0.626	0.017
Pb	14.909	0.135	12.777	0.33	15.748	0.533	3.717	0.485

İlave arıtma yöntemi kullanılmadan çevreye deşarj olan çoğu ağır metal ekotoksisiteye yol açabileceği için, çıkış sularındaki varlıkları ve konsantrasyonlarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Katı partiküllerin çıkış atık sularındaki yoğunluklarının düşük olması sebebiyle sadece sıvı faz araştırılmış olup ve örnekler filtrasyon yapılmadan doğrudan incelenmiştir. Tablo 4.8’de dört mevsimdeki ağır metal konsantrasyonu gösterilmiş olup, en yüksek metal içeriğinin demir, en düşük metal içeriğinin ise Hg olduğu bulunmuştur

Giriş sularından çıkış sularına deşarj olan ağır metallerin miktarları giderim yüzdesi (RE%) olarak dikkate alınmıştır. Deşarj işleminden önce çıkış sularında az miktarda ağır met al bulunması ile bu sonuçlar atık suyun işlenmesi açısından, atık su arıtma tesis sisteminin kalitesini gösterdiği için büyük önem taşımaktadır. Giderim yüzdesinin yüksek olması, giderilen ağır metal miktarının yüksek olduğu anlamına gelmektedir.

Çalışmamızda en yüksek giderim Al ve Ag met alleri için bulunmuş olup her ikisi de % 100 olarak giderilmiştir. Bu sonuçlar ile şema 1’de gösterilen met allerin gideriminde atık su arıtım tesisinin kalitesinin yüksek olduğu ortaya koyulmaktadır. Çalışmamızdaki atık su yüzdeleri ile benzerlik göstererek, Zhao ve Liu (2019) Cd (II), Ni (II), Pb (II) ve Cu (II) iyonlarının giderim yüzdelerinin %97’den fazla olduğunu göstermiştir. (Yuan et al ., 2019), Pb ve Cd iyonlarının gideriminin sırasıyla %89.1 ve %99.3’e ulaştığını, Pb iyonunun çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara kıyasla daha düşük olduğunu, Cd iyonunun ise daha yüksek olduğunu belirtmiştir.

Antibiyotik ve ağırmetallerin kontaminasyonu çevrede baskın olup, bakteriyel antibiyotik direncinin yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, ağırmet allerin bakteriyel antibiyotik direnci üzerindeki seçici etkileri büyük ölçüde belirsizdir. Bu ilişki Chen ve arkadaşları tarafından açıklanmış olup elde edilen sonuçların arsenat, bakır ve çinko varlığının, LSJC7’nin tetrasikline karşı oluşturduğu direncinin güçlendirilmesinde rol oynadığını göstermiştir. Ağır metal konsantrasyonlarının belirlenmesi antibiyotik direncin oluşturulması için gereklidir. Örnek olarak, minimum ağır metal konsantrasyonlarının (MHC) , LSJC7’nin minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MIC) çok altında (64 kat kadar) olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, tedavi edilen insan ve hayvanlardaki ve kirli çevrelerdeki nispeten düşük ağır metal seviyelerinin, bakteriyel antibiyotik direncini indüklemek

için yeterli olabileceğini göstermektedir. Buna ek olarak, arsenat ve kloramfenikolun LSJC7 suşunda, bakır/çinko ve tetrasiklinin antibiyotiğe duyarlı *Escherichia coli* DH5α suşundaki birlikte kullanımlarının bir sonucu olarak, ağır metal aracılı antibiyotik direnci gözlemlenmiştir. Genel olarak, bu çalışmada ağır met al ile uyarılan antibiyotik direncinin çeşitli mikrobiyal türler arasında yaygın olarak bulunabileceğini göstermekte olup, met al ve antibiyotikler ile kontamine olan çevrelerdeki antibiyotik direncinin ortaya çıkması ve yayılmasında rol oynayabileceğini öne sürmektedir.

Benzer araştırmalar Berg ve arkadaşları tarafından gösterilmiş olup bakırın (Cu) tarımsal topraklardaki değişikliğinin; bakır direnci, ampisilin, kloramfenikol ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı direnç ile bir korelasyon gösterdiği bulunmuştur (Berg et al., 2005).

Antibiyotik direncinin bu şekilde gelişmesinin olası bir açıklaması ağırmetallerin varlığının, antibiyotik direnç genlerini barından mikrobiyal topluluktaki mevcut bakterilerin zenginleşmesini ve büyümesini arttırmasıdır; Diğer bir olasılık, antibiyotiklere duyarlı olan bakterilerdeki direncin, ortamdaki ağır metallerin ve antibiyotiklerin birlikte bulunması nedeniyle indüklenebilmesidir. Bazı araştırmalar, antibiyotik direnç genlerinin büyük oranda bulunması ile çevredeki yüksek antibiyotik ve ağırmet al konsantrasyonları arasındaki pozitif korelasyonu göstermiştir (Zhu et al., 2013; Knapp et al., 2011).

4.6. Antibiyotik Direnç Genlerinin Moleküler İdentifikasyonu

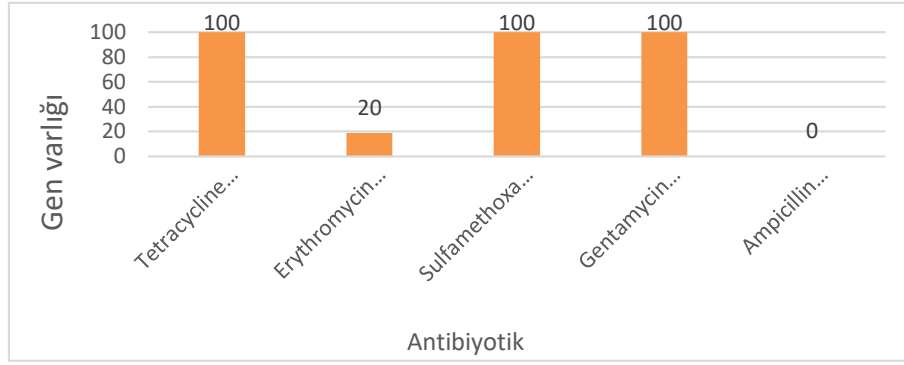
Antimikrobiyal direnç genleri, farklı antibiyotiklere karşı direncin oluşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu genlerinin belirlenmesinde daha uygun, daha basit ve hızlı bir test geliştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır. PCR, sucul çevrelerdeki antibiyotik direnç genlerini tespit etmekte kullanılan yaygın bir yöntemdir. Atık sudaki antibiyotik kalıntılarının tayini yapıldıktan sonra, kısım 3.2.7'de anlatıldığı gibi optimize edilip kurulan konvansiyonel PCR ile antibiyotik direnç genleri tespit edilmiştir. Araştırmalarımız ile beş direnç gen bölgesinin (*tetA*, *ermA*, *sul 1*, *ant (2'')-I* and *AmpC*) testi başarılımış olup, 4 sınıf antibiyotiğe (tetrasiklinler, makrolidler, sülfonamidler ve dört direnç mekanizması içeren (atım

pompası, metiltransferaz, RNA bağlanma, transferaz, Para-amino benzoat (pABA) ve aminoglikozid modifiye eden enzim) aminoglikozidler) karşı direnç doğrulanmıştır. ARG sonuçları (şekil 4.6) ve (4.7 A, B ve C şekillerin’de) gösterilmiştir. Bu çalışmada, antibiyotik direnç gen bölgeleri farklı etki mekanizmaları ile farklı gruplara ait olmaları ve Türkiye’de insan ve hayvan ilaçları arasında çok kullanılmaları sebebiyle araştırılmıştır. Farklı mevsimlerde elde edilen farklı örneklerin total DNA ekstraktlarından PCR yöntemi ile direnç genlerin identifikasyonunu ve ARG azalma oranı (RE%) tablo (4.9)’te gösterilmiştir.

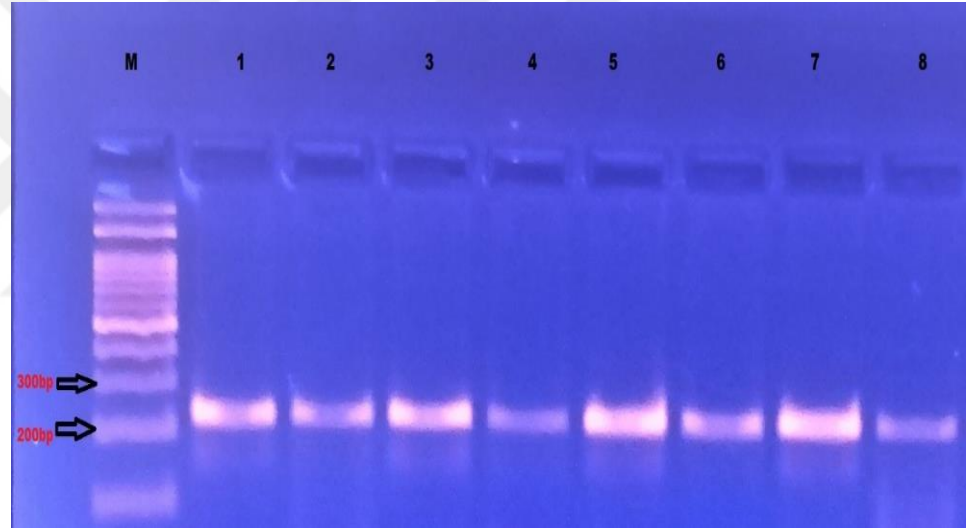
Antibiyotik direnç genleri atık su artıma tesislerinin giriş ve çıkış sularında bir yıl örnekleme süresince elde edilen örneklerinin hepsinde %100 olarak tespit edilmiş olup, fakat (*AmpC*) geni tespit edilememiştir (*ermA*) geni ise % 20 oranında sadece giriş sularında bulunmuştur. Antibiyotik direnç genlerinin büyük orandaki prevalansı, genlerin Saruhanlı ilçesindeki Atık su Arıtma Tesisinde geniş çapta ortaya çıktığını göstererek, artım için bu antibiyotiklerin geniş bir şekilde kullanımını ve dolayısıyla çevrede antibiyotik direnç genlerinin bulunmasını yansıtmaktadır. Bu durum Manisa’nın bir ilçesi olan Saruhanlı’da ilk kez kaydedilmiştir.

Tablo 4.9 Direnç genlerin identifikasyonu ve azalma oranı (RE%)

ARG	Giriş	Çıkış	Mevsimsel değişimi	RE %
Tetracycline (tetA)	% 100	% 100	Kış, Bahar, Yaz, Sonbahar	0
Erythromycin (ermA)	% 20	0	Kış, Bahar	% 100
Sulfamethoxazole (sul 1)	% 100	% 100	Kış, Bahar, Yaz, Sonbahar	0
Gentamycin (ant (2'')-I)	% 100	% 100	Kış, Bahar, Yaz, Sonbahar	0
Ampicillin (AmpC)	0	0	-	0

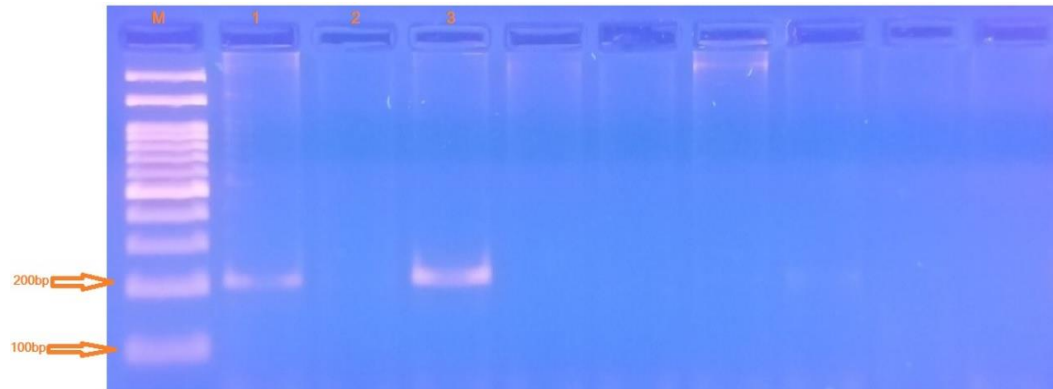


Şekil 4.6 Tüm DNA örneklerinde ARG varlığı



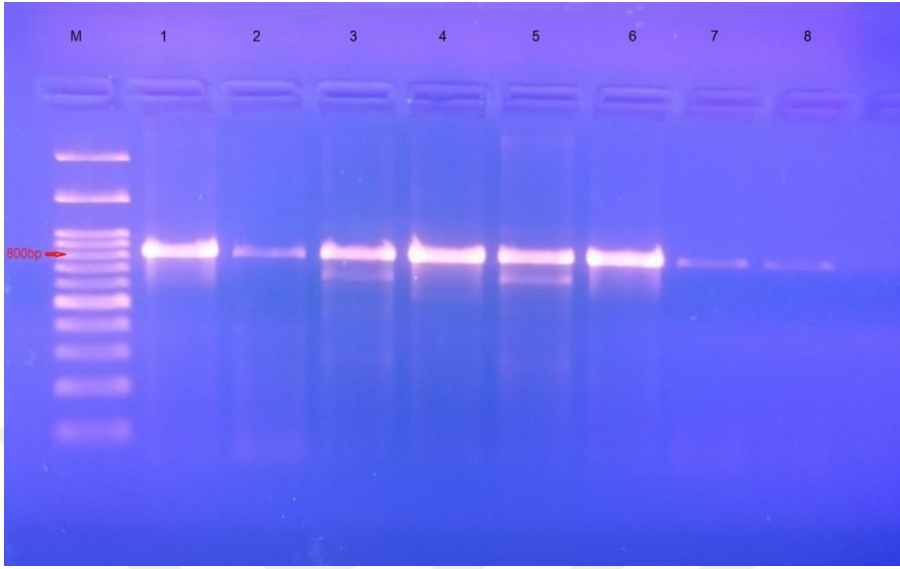
M = marker , 1,2 kış;3,4 Bahar; 5,6 Yaz; 7,8 Sonbahar mevsimlerde giriş ve çıkış örneklerde *tet A* genleri 210 bp

Şekil 4.7 (A) *tet A* geni



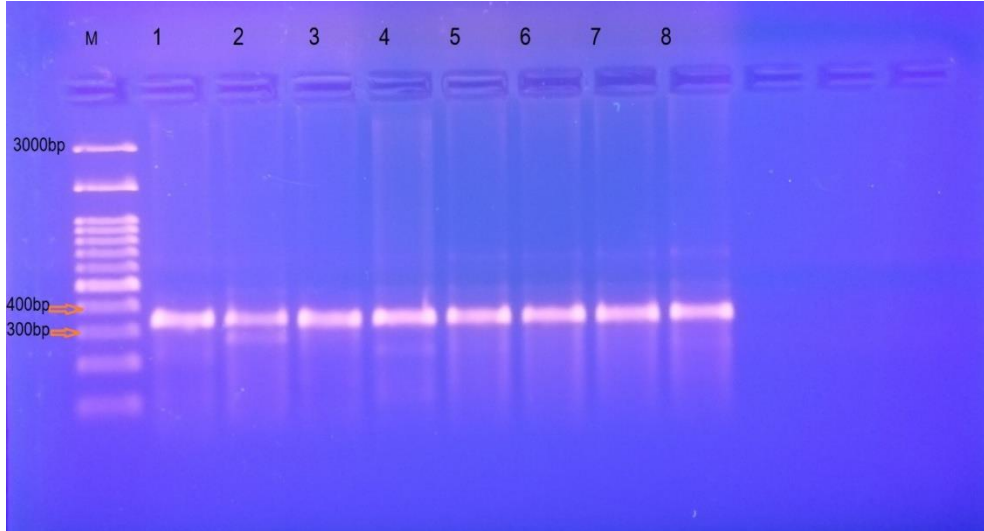
M = marker , 1,3 kış ve bahar ayların giriş örneklerde *ermA* genleri (190 bp)

Şekil 4.8 (B) *ermA* geni



M = marker , 1,2 kış;3,4 Bahar; 5,6 Yaz; 7,8 Sonbahar mevsimlerde giriş ve çıkış örneklerde *Sul I* genleri 800 bp

Şekil 4.9 (C) *Sul I* geni



M = marker , 1,2 kış;3,4 Bahar; 5,6 Yaz; 7,8 Sonbahar mevsimlerde giriş ve çıkış örneklerde *Sul I* genleri 329 bp

Şekil 4.10 (D) Gentamicin geni (*ant(2'')-I*)

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların yanı sıra, aynı zamanda birçok araştırmacı farklı ülkelerin farklı atık sularındaki *tetA* genini araştırmıştır; (Auerbach et al., 2007) Wisconsin'deki iki atık su arıtma tesisinde, (Zhang ve Zhang .,2011) Çin'deki 15 farklı kanalizasyon arıtma tesisinden elde ettikleri aktif çamurda, (Stoll et al., 2012) ise Almanya ve Avustralya'daki yüzey sularında *tetA* genini çalışmışlardır.

Birçok tetrasiklin direnç geni kromozomlarda kodlanırken, *tet* genlerinin çoğu plazmidler, transpozonlar ve ICE'lerde bulunmaktadır. *tet* genlerini taşıyan mobil genetik elementlerinin çoğu konjugatifdir ve diğer antibiyotik bileşenlerine karşı direnci kodlayan genleri taşımaktadırlar. *tet* genlerinin bu şekilde büyük çeşitlilikte olması ile birlikte hareketli genetik elementlerin çeşitliliği ve hareketliliğinin, birçok farklı bakteri cinsi arasında yayılmalarına önemli bir şekilde katkı sağlaması muhtemel gözükmektedir.

Eritromisin direnç geni (*erm*), makrolid direnç genleri arasında en yaygın gen olup plazmidler ve kromozomlarda ve konjugatif olmayan transpozonlarda bulunan ICE'leri (Integrative Conjugative Element) içeren hareketli genetik elementlerle bağlantılıdır. *erm* genleri çevrede yaygın olarak bulunmaktadır. Mikroorganizmalar, antibiyotik-ribozom bağlanma yerinin metilasyon ve mutasyon ile modifikasyonu, hücre zarındaki taşıyıcı proteinler tarafından bakteriyel hücrelerden aktif eritromisinin giderilmesi ve enzimatik inaktivasyon gibi yöntemler aracılığı ile eritromisine karşı çeşitli direnç mekanizmaları oluşturmaktadır (Weisblum, 1995). Eritromisin direncinin genetik kontrolü kromozomal ve plazmidlere kodlanmış bilgilere dayanmaktadır. Metilazlar plazmidlerde bulunan *erm* genleri tarafından kodlanmaktadır. Bu genler makrolid, linkozamid ve streptogramin B antibiyotiklerine karşı çoklu direnç sağlamakta olup gram pozitif ve gram negatif bakterilerde yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Kromozomlarda ya da plazmidlerde lokalize olan *msr* genleri aktif eritromisin pompasını kodlamaktadır (Matsuoka et al., 2003). En yaygın direnç mekanizmaları arasında bağlanma bölgesindeki modifikasyonlar ve aktif antibiyotik giderimi yer almaktadır. Bu sebeple, çalışmamızda *erm* genleri aktif çamurdaki eritromisin direncini izlemek amacıyla seçilmiştir.

Atık sulardaki erm geninin belirlenmesi ile ilgili elde ettiğimiz sonuçlarla birlikte, ermA geni aynı zamanda Brezilya'da ki inek sütlerinde (Duarte et al., 2004) ve Amerika Birleşik Devletleri'nin doğu sahilindeki kümes hayvanları üretim çevrelerinde (Hayes et al., 2005). bulunduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, ermA geni aynı zamanda domuz atık lagünü ile birlikte sığır ve domuz gübrelerinde tespit edilmiştir (Chen J et al., 2007). (Agga et al.,2015 ve Szczepanowski et al .,2009) tarafından yapılan çalışmalarda *ermA* geni hem giriş hem de çıkış sularında bulunmuş olup, çalışmamızla benzerlik gösteren bu sonuçlar ile bu genin atık su arıtım tesislerinden etkili bir şekilde giderilmesinin mümkün olmadığını doğrulamaktadır.

Sülfonamid direnç geni (*sul I*) çevrede yaygın bir şekilde bulunan antibiyotik direnç genlerine bir örnektir. *Sınıf I integronlarının* korunmuş bir parçası olarak bulunan *sulI* geninin (Johnsborh ve Ha°varstein , 2009), bu hareketli genetik elementlerin olduğu yerlerde bulunması beklenebilmektedir. *sul I* geni aynı zamanda nehir suları, Avustralya ve Almanya yüzey suları ile birlikte atık sularda bulunmuştur (Gao et al., 2012; Berglund et al., 2015).

Çalışmamıza benzer bir şekilde, yapılan bir araştırmada atık su örneklerinin giriş ve çıkış sularında *sulI* geninin varlığı tespit edilmiştir (Burch et al., 2013; Laht et al., 2014 ve Marti et al., 2013). Aynı zamanda, *sulI* geni (Eramo et al .,2019) tarafından çıkış sularında tespit edilmiştir.

Gentamisin Saruhanlı ilçesinde geniş bir şekilde kullanıldığı için, gentamisin direnç genleri ile ilgili yapılan çalışmanın sonuçları *tetA* ve *sulI* antibiyotik çalışmalarının sonuçlarına benzerlik göstermiştir. Şekil (4.10 D)'de gösterildiği gibi genler tüm mevsimlerde gözlemlenmiştir. Çevresel bakterilerdeki gentamisin direnç geni (GDG) birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. (Heuer et al .,2002) toprak, rizosfer, domuz gübresi, sığır dışkısı, yumurtlayan ve etlik piliçler, belediye ve hastane atık suları ve kıyı sularından elde ettikleri farklı örneklerdeki gentamisin direnç genlerini incelemiştir. Gentamisin modifiye eden enzimler için altı gen kümesi veritabanı karşılaştırılması ile tanımlanmış olup, her bir gen kümesi için primer sistemler geliştirilmiştir. Farklı çevrelerden izole edilen gentamisin direnç bakterilerinin farklı taksonomik gruplara sahip olduğu belirlenmiştir. Gentamisin direnç genlerinin büyük miktar ve çeşitlilikte olmasına atık su çıkışına yakın olarak toplanan ve deniz suyundan gelen örnekler gösterilebilir.

Ampisilin direnç geni *ampC* ile ilgili yapmış olduğumuz araştırmada, beta laktam direnç genleri gözlemlenmemiş olup, (Gaviria-Figueroa et al., 2019) yapmış olduğu çalışmada beta laktam direnç genlerinin (BLA) antibiyotik direnç genleri arasından en çok rastlanan gen olduğu belirtilmiştir. Sonraki çalışmalar ile beta laktam direnç genleri arasında, serin hidrolazları (sınıf A, C ve D) kodlayan genlerinin yaygın çoğunlukla *sınıf B* ile ilişkilendirildiği, metallo hidrolazları kodlayan genlerin ise daha az sıklıkta bulunduğunu belirtilmiştir.

Çalışmamızda birçok antibiyotik direnç geni araştırılmış olup, çoğu tetrasiklin, aminoglikozid ve sülfametoksazole karşı direnç oluşturmaktadır. Neredeyse her örnekte atım pompaları için genler tespit edilmiş olup benzer bulgular (Zhou et al.,2019) tarafından da elde edilmiştir.

Sonuç olarak, Tablo (4.9)'da gösterilen bulgulara bakıldığında, *ermA* geninin yüksek oranda, *tetA*, *sul I* ve *ant (2)-I* genlerinin ise düşük oranda giderimim sağlandığı gösterilmiştir. Bu durum çıkış sularından çevreye deşarj olan antibiyotik direnç genlerinin çok sayıdaki kopyasından kaynaklandığı anlamına gelmektedir.

Direnç genleri kantitatif belirlenmesi için Roche Light Cycler 480 kullanılarak qPCR uygulandı, direnç genlerden Gentamicin direnç geni (*ant(2")*) seçilmiştir. qPCR aracılığıyla *ant(2")* örneklede kopya sayısı olarak belirtildi. Tablo 4.10 de farklı mevsimlerde gentamicin direnç genlei kopya sayısı gösterilmiştir.

Tablo 4.10 Gentamicin direnç genlei Kantitatif belirlenmesi.

Kopya Sayısı		
Örnek ve mevsim	Giriş	Çıkış
kış	2.76E6	2.16E6
Bahar	4.91E5	1.06E5
Yaz	7.89E6	1.87E4
Sonbahar	2.11E5	1.06E6

Klasik PCR sonuçları gibi gentamicin direnç geni GDG bütün mevsimlerde dağılım göstermiştir, yukardaki sonuçlara göre GDG yüksek kopya sayısı çıkmıştır, çıkış suyunde gen kopya sayısı azalma olmuş, bu azalma kış, Bahar ve Yaz mevsimlerin örnekleri AAT te biyolojik mualece yöntemlere göre etkilenmiş. Çalışmamıza benzer (Kacprzak et al., 2015) tarafından aynı sonuç bulmuş. GDG azalma rağmen gen miktarı yüksek sayılır, ayrıca sonbahar örneğinde çıkış suyunde

giriş suyundan daha yüksek ve bunun en mantıklı açıklaması AAT son aşamasında gen birikimi olmuş. Başka sebep bu gen mikroorganizmalar arası aktarılma ve çoğaltma sebebi olabilir.

Atık su arıtma tesislerinde çıkış sularının çevreye deşarj olmasından kalan antibiyotik direnç genleri *kalıcı antibiyotik direnç genleri (persistence ARG)* olarak isimlendirilmektedir ve bu genlerin atık su arıtma sistemlerinden etkili bir şekilde giderilememesinden dolayı halk sağlığı için büyük risk teşkil etmektedir.

Ham atık suyunda bulunan çok sayıdaki antibiyotik direnç geni, büyük olasılıkla seyrelmenin bir sonucu olarak, daha düşük mutlak yoğunluğun olduğu arıtma tesisinin giriş suyunda da bulunmaktadır. Bu antibiyotik direnç genlerinin önemli bir kısmı uzaklaştırılmamış olup aynı zamanda *tetA* ve diğer genleri tespit etmiş olduğumuz çıkış sularında da bulunmaktadır. Bazı antibiyotik direnç genleri arıtım işleminde azalmış olup ve bu durum organizmaların giderilmesi ile ilişkilidir. Kromozoma lokalize olan direnç genleri, hücrelerin arıtma işlemi ile giderilmesine bağlı olarak giderilmeye yatkın iken, lateral gen transferi ile türler arasında hareket edebilen antibiyotik direnç genleri organizmalar arasında yer değiştirerek var olabilmektedir. Çıkış sularında bulunan bazı direnç genleri, direnç genlerini içeren çıkış atık suyunu taşıyan nehir sularında bulunmayabilmektedir. (Zhou et al.,2019) tarafından da elde edilen benzer bulgular ile birlikte, bu durum direnç genlerine sahip organizmaların muhtemelen nehir su çevrelerinde varlıklarını sürdürememelerinden kaynaklanmaktadır.

Moleküler düzeyde araştırılan antibiyotik direnç genleri ile tablo 4.2'de gösterilen fenotipik direnç sonuçları karşılaştırılarak birçok farklılık gözlemlenmiştir. Tekrasiklin direnç geni *tet A* tüm mevsimlerde ortaya çıkarken, bu antibiyotiğe karşı oluşturulan direnç kış aylarında çıkış sularında tespit edilmemiştir. Bu durumun aksine, yapılan PCR çalışmalarında *ampC* geni için herhangi bir genetik sonuç elde edilmezken, ampisilin direnci sadece fenotipik direnci olarak ortaya çıkmıştır.

SulI geni (sülfametoksazol) giriş ve çıkış suları örneklerinde tüm mevsimlerde incelenirken, ilkbahardaki örneklerde ve kış aylarındaki çıkış sularında fenotipik direnç gözlemlenmemiştir.

Eritromisine karşı fenetipik direnç tüm mevsimlerde gözlemlenirken, genotipik direnç Tablo (4.8 d)'da gösterildiği gibi sadece iki mevsimin giriş sularında tespit edilmiştir.

Atık su arıtım tesislerindeki antibiyotik direnç genlerinin destinasyonu ilgili tartışmalar mevcuttur. Birkaç çalışma atık su arıtma tesislerinin antibiyotiğe dirençli bakterileri ve direnç genlerinin gideriminde etkili olduğunu gösterirken (Huang et al., 2010), çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara benzer şekilde bazı araştırmaların atık su arıtım tesislerinin daha düşük etkisinin olduğunu ya da hiç etkisinin olmadığını göstermektedir (Auerbach et al., 2007). Bununla birlikte atık suyunun tipi, mikroorganizmalar, organik yüklemeler, güneş ışığı ve atık su arıtma sistemlerinin dizaynı ve yönetimi gibi faktörler atık su arıtım tesislerindeki antibiyotik direnç genlerinin destinasyonu etkileyebilmektedir. Bununla birlikte, antibiyotiklere dirençli bakterileri ve direnç genlerinin çevreye yayılmasını önlemek açısından, belediye ve hastanelerdeki varlıklarının ve geleceklerinin belirlenmesi gereklidir.

KAYNAKLAR

AbdulRahman,A., Thirunavukkarasu, S.M., Muruganathan, A., Ravikumar, T., Malini, Saravanan, P., Sopna, Jothi., 2017, Usage of Empirical Antibiotics in Tertiary Care Hospitals- A Prospective Study. *Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS)*,2279-0861.Volume 16, Issue 8 Ver. I.

Abraham, E.P. , Chain, E., 1940, An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 3713:837.

Abu-El-Halawa, R., Zabin, S. A. ,2017, Removal efficiency of Pb, Cd, Cu and Zn from polluted water using dithiocarbamate ligands. *Journal of Taibah University for Science, 11*(1), 57-65. doi:10.1016/j.jtusci.2015.07.002.

Adegoke, A.A., Faleye, A.C., Singh, G., Stenström, T.A., 2016, Antibiotic resistant superbugs: assessment of the interrelationship of occurrence in clinical settings and environmental niches. *Molecules* 22, 29.

Adriel, R., Bonilla., Kaden, P. Muniz.,2009, Antibiotic resistance: causes and risk factors, mechanisms and alternatives . Nova Science Publishers, Inc. New York.

Agga, G.E., Arthur, T.M., Durso, L.M., Harhay, D.M., Schmidt, J.W., 2015, Antimicrobial-resistant bacterial populations and antimicrobial resistance genes obtained from environments impacted by livestock and municipal waste. *PloS One* 10: e0132586.

Akpor, O. B., Ohiobor,G.O. & Olaolu,T.D., 2014, Heavy Metal Pollutants in Wastewater Effluents: Sources, Effects and Remediation. *Advances in Bioscience and Bioengineering, 2*(4), 37. doi:10.11648/j.abb.20140204.11ç

Aminov, R. I. ,2010, A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol.* 1(134):1-7.

KAYNAKLAR (Devam)

- An, X., Su, J., Li, B., Ouyang, W., Zhao, Y., Chen, Q., Zhu, Y.,** 2018, Tracking antibiotic resistance during wastewater treatment using high throughput quantitative PCR. *Environment International*, 117, 146-153.
- Andrew Singer.** ,2017, How chemicals and heavy metals contribute to antimicrobial resistance. *The Pharmaceutical Journal*. doi:10.1211/pj.2017.20202286.
- Arevalo, J., Ruiz, L.M., Perez, J., Gomez, M.A.,** 2014, Effect of temperature on membrane bioreactor performance working with high hydraulic and sludge retention time. *Biochem. Eng. J.* 88, 42e49.
- Arnold L. Demain.,**2009, Antibiotics:Natural Products Essential to Human Health. *Medicinal Research Reviews*, Vol. 29, No. 6, 821—842.
- Auerbach EA, Seyfried EE, McMahon KD.** ,2007, Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water Res* 2007; 41: 1143_51.
- Bach, M., Huber, A., Frede, H.-G., Mohaupt, V., Zullei-Seibert, N.,** 2000, Estimation of Agricultural Pesticide Input into Surface Waters of Germany/Schätzung der Einträge von Pflanzenschutzmitteln aus der Landwirtschaft in die Oberflächengewässer Deutschlands. *Berichte 3/00*. Erich Schmidt Verlag, Berlin, Germany, p. 273 (In German).
- Baquero, F., Martinez, J. L., & Canton, R.,** 2008, Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol*, 19(3), 260-265. doi:10.1016/j.copbio.2008.05.006 .
- Barceló,D., Hennon, M.C.,**2003, Trace determination of pesticides and their degradation products in water, vol. 19. Amsterdam: Elsevier Science B.V.

KAYNAKLAR (Devam)

- Batt, A.L., Snow, D.D., Aga, D.S.**,2006, Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA, *Chemosphere* 64, 1963–1971.
- Ben, Y., Fu, C., Hu, M., Liu, L., Wong, M. H., & Zheng, C.**,2019, Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environmental Research*, 169, 483-493. doi:10.1016/j.envres.2018.11.040.
- Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., et al.**, 2015,Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol* ;13(5):310-7.
- Berg, J.; Tom-Petersen, A.; Nybroe, O.** ,2005, Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Lett. Appl. Microbiol*, 40, 146–151.
- Berglund B, Fick J, Lindgren PE.,**2015, Urban wastewater effluent increases antibiotic resistance gene concentrations in a receiving northern European river. *Environ Toxicol Chem* ; 34: 192_6.
- Bergman, J.**, 2003. Does the acquisition of antibiotic and pesticide resistance provide evidence for evolution? *Journal of Creation*.17, 26-32.
- Besha, A.T., Gebreyohannes, A.Y., Tufa, R.A., Bekele, D.N., Curcio, E., Giorno, L.**,2017, Removal of emerging micropollutants by activated sludge process and membrane bioreactors and the effects of micropollutants on membrane fouling: a review, *J.Environ. Chem. Eng.* 5 2395–2414.
- Beutler, J.A.**,2009, Natural products as a foundation for drug discovery, chapter 9:Unit 9. *Curr Protoc Pharmacol*.

KAYNAKLAR (Devam)

- Bhuiyan, M.A., mi, H., Dampare, S.B., Islam, M.A., Suzuki, S.,** 2015, Source apportionment and pollution evaluation of heavy metals in water and sediments of Buriganga River, Bangladesh, using multivariate analysis and pollution evaluation indices. *Environ. Monit. Assess.* 187, 4075.
- Bockelmann, U., Dorries, H.-H., Ayuso-Gabella, M. N., Marçay, M. S. D., Tandoi, V., Levantesi, C., Grohmann, E.** ,2008,Quantitative PCR Monitoring of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Pathogens in Three European Artificial Groundwater Recharge Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 154–163. doi: 10.1128/aem.01649-08
- Bondarczuk, K., Markowicz, A., & Piotrowska-Seget, Z.** ,2016, The urgent need for risk assessment on the antibiotic resistance spread via sewage sludge land application. *Environment International*, 87, 49–55. doi: 10.1016/j.envint.2015.11.011.
- Borukhov, S. and Nudler, E.** ,2008, RNA polymerase: the vehicle of transcription. *Trends Microbiol.*, 16, 126–134.
- Bouki, C. et al.** ,2013, Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 91, 1–9ç
- Brown N C, Dudycz L W, Wright G E.,1986,** Rational design of substrate analogues targeted to selectively inhibit replication-specific DNA polymerases. *Drugs Exp Clin Res.*12:555–564.
- Burch, T.R, Sadowsky, M.J, Lapara, T.M .,**2013, Aerobic digestion reduces the quantity of antibiotic resistance genes in residual municipal wastewater solids. *Front Microbiol* 4: 17.
- Calhoun, Y.,**2005, Water Pollution. Chelsea House Publisher.

KAYNAKLAR (Devam)

- Cameron, F.H., Groot Obbink, DJ., and Hall, R.M.** ,1986, Nucleotide sequence of the AAD(2") aminoglycoside adenylyltransferase determined aadB. Evolution relationship of this with those surrounding addA in R538-1 and dhfrII in R388. *Nucleic Acids. Res.* 14:8625-8635.
- Cao, Y., Griffith, J.F., Dorevitch, S., Weisberg, S.B.,** 2012, Effectiveness of qPCR permutations, internal controls and dilution as means for minimizing the impact of inhibition while measuring *Enterococcus* in environmental waters. *J Appl Microbiol* 113(1): 66–75. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05305.
- Cauci, S., Karkman, A., Cacace, D., Rybicki, M., Timpel, P., Voolaid, V., Gurke, R., Virta, M., Berendonk, T.U.,** 2016, Seasonality of antibiotic prescriptions for outpatients and resistance genes in sewers and wastewater treatment plant outflow. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 92 (5), 1e9.
- Chen J, Yu Z, Michel FC Jr, Wittum T, Morrison M.,**2007, Development and application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring resistance to macrolides _lincosamides_ streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Appl Environ Microbiol*; 73: 4407_16.
- Chen, S., Li, X., Sun, G., Zhang, Y., Su, J., & Ye, J.** ,2015, Heavy Metal Induced Antibiotic Resistance in Bacterium LSJC7. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 23390–23404. doi: 10.3390/ijms161023390.
- Chipasa, B.K.,** 2003, Accumulation and fate of selected heavy metals in a biological wastewater treatment system. *Waste Manage.* 23 (2), 135–143.
- Chu, Z., Fan, X., Wang, W., & Huang, W.,**2019, Quantitative evaluation of heavy metals' pollution hazards and estimation of heavy metals' environmental costs in leachate during food waste composting. *Waste Management*, 84, 119-128. doi:10.1016/j.wasman.2018.11.031.

KAYNAKLAR (Devam)

- Clark, W. and Christopher, K.**, 2001, An Introduction to DNA: Spectrophotometry, Degradation and Frankengel experiment. In: S. J. Karcher, Editor, Tested Studies for Laboratory Teaching, Volume 22, 81-99.
- Claudio, O.G., Letizia, B., Attilio, F., Cynthiam L.P.** ,2013, Antibiotics Targets, Mechanisms and Resistance, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, Germany.
- Cotar AI, Chifiriuc MC, Banu O, Lazar V.**,2013, Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cardiovascular surgery associated infections. *Biointerface research in applied chemistry J*; 3(1) , 491-497.
- Dhawan, V.K. and Thadepalli, H.** ,1982, Clindamycin: A Review of Fifteen Years of Experience. *Clinical Infectious Diseases*, 4, 1133-1153.
- Diwan V, Sta°lsby Lundborg C, Tamhankar AJ** .,2013, Seasonal and Temporal Variation in Release of Antibiotics in Hospital Wastewater: Estimation Using Continuous and Grab Sampling. *PLoS ONE* 8(7): e68715. doi:10.1371/journal.pone.0068715
- Dodd, M. C.** ,2012, Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. *J Environ Monit*, 14(7), 1754-171. doi:10.1039/c2em00006g.
- Duarte, R.S., Miranda, O.P., Bellei, B.C., Brito, M.A., Teixeira, L.M.** ,2004, Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *J Clin Microbiol*; 42: 4214_22.
- Ducey, T.F., Vanotti, M.B., Shriner, A.D., Szogi, A.A., Ellison, A.Q.**, 2010, Characterization of a microbial community capable of nitrification at cold temperature. *Bioresour. Technol.* 101, 491e500.

KAYNAKLAR (Devam)

Eaton, A.D., Clescri, L.S., Greenberg, A.E. (Eds.), 1995, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Ebimiewei Etebu and Ibemologi Arikekpar ,2016, Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives IJAMBR 4 ,p90-101.

El-Said, W.A., El-Khouly, M.E., Ali,M.H., Rashad, R.T., Elshehy, E.A., Al-Bogami,A.S., 2018, Synthesis of mesoporous silica-polymer composite for the chloridazon pesticide removal from aqueous media, J. Environ. Chem. Eng. 6 2214–2221.

Erlangen, FAU., 2013, Preparing Antibiotics Stock Solution and Ampicillin Agar Plates." Protocol-online. N.p., n.d. Web. 1 Nov.

Fang L, Li X, Li L et al. ,2016, Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3- IncHI2 plasmids from *E. coli* isolates of food-producing animals. *Nat Scient Rep* 6:25312. doi:10.1038/srep25312.

Florica , M. Mariana ,C.C, Luminița ,M . Mihaela,I . Ioana S. Ana-Maria A. Iuliana M. Carmen T and Ecaterina M.,2017, Prevalence of heavy metal and antibiotic resistance in bacterial isolates from wastewater and receiving aquatic environments . Biointerface Research in Applied Chemistry. Volume 7, Issue 5, 2140 – 2144.

Gao, P., Munir, M., Xagorarakis, I. ,2012, Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant, *Science of The Total Environment*, 421–422, 173-183.

KAYNAKLAR (Devam)

- Gaviria-Figueroa, A., Preisner, E. C., Hoque, S., Feigley, C. E., & Norman, R. S.**, 2019, Emission and dispersal of antibiotic resistance genes through bioaerosols generated during the treatment of municipal sewage. *Science of The Total Environment*, 686, 402-412. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.05.454.
- Glady-Croue, J., Niu, X., Ramsay, J. P., Watkin, E., Murphy, R. J., & Croue, J.**, 2018, Survival of antibiotic resistant bacteria following artificial solar radiation of secondary wastewater effluent. *Science of The Total Environment*, 626, 1005-1011. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.01.101.
- Green, H.C., Field, K.G.**, 2012, Sensitive detection of sample interference in environmental qPCR. *Water Res* 46(10): 3251–60.
- Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D.**, 2013, Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1292, 173–188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.072>.
- Gurung, K., Ncibi, M.C., Sillanpaa, M.**, 2017, Assessing membrane fouling and the performance of pilot-scale membrane bioreactor (MBR) to treat real municipal wastewater during winter season in Nordic regions. *Sci. Total. Environ.* 579, 1289e1297.
- Harbarth, S., Balkhy, H. H., Goossens, H., Jarlier, V., Kluytmans, J., Laxminarayan, R., Pittet, D.**, 2015, Antimicrobial resistance: one world, one fight! *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 4(1).
- Harrabi, M., Giustina, S. V., Aloulou, F., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., & Elleuch, B.**, 2018, Analysis of multiclass antibiotic residues in urban wastewater in Tunisia. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 10, 163-170. doi:10.1016/j.enmm.2018.05.006.

KAYNAKLAR (Devam)

- Hayes, J. R., Wagner, D. D., English, L. L., Carr, L. E., & Joseph, S. W.** ,2005, Distribution of streptogramin resistance determinants among *Enterococcus faecium* from a poultry production environment of the USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(1), 123–126. doi: 10.1093/jac/dkh491.
- Helen Nankervis, Kim S Thomas, Finola M Delamere, Sébastien Barbarot, Natasha K Rogers, and Hywel C Williams.**,2016, Scoping systematic review of treatments for eczema. Programme Grants for Applied Research, NIHR Journals Library No. 4.7 Southampton.
- Henry,R.J.**,1943, The mode of action mod sulfonamides , *Bacteriological Reviews*. 7 (4): 175–262.
- Hernández, F., Calisto-Ulloa, N., Gómez-Fuentes, C., Gómez, M., Ferrer, J., González-Rocha, G., Montory, M.** ,2019, Occurrence of antibiotics and bacterial resistance in wastewater and sea water from the Antarctic. *Journal of Hazardous Materials*, 363, 447-456. doi:10.1016/j.jhazmat.2018.07.027.
- Heuer, H. et al.**,2002,Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: Prevalence and transfer. *FEMS Microbiology Ecology*, 42(2), 289-302.
- Higgins PG, Fluit AC, Schmitz FJ.**,2003, Fluoroquinolones: Structure and target sites. *Curr Drug Targets*;4:181-90.
- Houghton, J.L., Green, K.D., Chen, W., and Garneau-Tsodikova, S.**,2010, The future of aminoglycosides: the end or renaissance? *ChemBioChem*, 11, 880–902.
- Hugo, W. B., and Russell, A. D.**,1998, *Pharmaceutical Microbiology*, 6th edition, Blackwell Sciences Ltd., Oxford.

KAYNAKLAR (Devam)

Imran, M., Das, K. R., & Naik, M. M.,2019, Co-selection of multi-antibiotic resistance in bacterial pathogens in metal and microplastic contaminated environments: An emerging health threat. *Chemosphere*, 215, 846-857.

Iversen, A., Kühn, I., Rahman, M., Franklin, A., Burman, L.G., Olsson-Liljequist ,B., Torell, E., Möllby, R. ,2004, Evidence for transmission between humans and the environment of a nosocomial strain of *Enterococcus faecium*. *Environ Microbiol* 6:55–59.

Jäger, T., Hembach, N., Elpers, C., Wieland, A., Alexander, J., Hiller, C., Schwartz, T. ,2018, Reduction of Antibiotic Resistant Bacteria During Conventional and Advanced Wastewater Treatment, and the Disseminated Loads Released to the Environment. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02599.

Jiang, L., Hu, X., Yin, D., Zhang, H., Yu, Z. ,2011, Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere* 82: 822–828.

Jiang, Y., Xu, C., Wu, X., Chen, Y., Han, W., Gin, K., & He, Y. 2018, Occurrence, Seasonal Variation and Risk Assessment of Antibiotics in Qingcaosha Reservoir. *Water*, 10(2), 115. doi: 10.3390/w10020115.

Jindal, A., Pandya, K., & Khan, I., 2015, Antimicrobial resistance: A public health challenge. *Medical Journal Armed Forces India*, 71(2), 178–181. doi: 10.1016/j.mjafi.2014.04.011.

Johnsborg O, Ha^ovarstein LS. ,2009, Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Rev* ; 33: 627_42.

KAYNAKLAR (Devam)

- Kacprzak, M., Fijałkowski, K., Grobelak, A., Rosikoń, K., & Rorat, A.** ,2015, Escherichia coli and Salmonella spp. early diagnosis and seasonal monitoring in the sewage treatment process by EMA-qPCR method. *Polish Journal of Microbiology*, 64(2), 143–148. doi: 10.33073/pjm-2015-021
- Kahne D, Leimkuhler C, Lu W, Walsh C.** ,2005,Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chem Rev* 105:425-48.
- Karkman, A., Do, T. T., Walsh, F., & Virta, M. P.** ,2018, Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends in Microbiology*,26(3), 220-228.
- Karkman, A., Do, T. T., Walsh, F., & Virta, M. P.** ,2018, Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends in Microbiology*, 26(3),
- Karvelas, M., Katsoyiannis, A., & Samara, C.** ,2003, Occurrence and fate of heavy metals in the wastewater treatment process. *Chemosphere*, 53(10), 1201-1210.
- Kayhan, M.**, 2017, Muş yöresindeki yoğurtlardan lactobacillus Plantarum i izolasyonu ve plazmit içeriklerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Muş alpasalan üniversitesi.
- Kemper, N.**, 2008,Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol Indic* 8:1–13 .
- Kim, S., Eichhorn, P., Jensen, J.N, Weber, A.S., Aga, D.S.** ,2005, Removal of antibiotics in wastewater: effect of hydraulic and solid retention times on the fate of tetracycline in the activated sludge process. *Environ Sci Technol* 39:5816–5823.

KAYNAKLAR (Devam)

- Kim, S.C., Carlson, K.**,2007,Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices. *Environ Sci Technol* 41: 50–57.
- Knapp, C.W., McCluskey, S.M., Singh, B.K.,Campbell, C.D., Hudson, G., Graham, D.W.**,2011, Antibiotic resistance gene abundances correlate with metal and geochemical conditions in archived Scottish soils. *PLoS ONE*, 6, e27300.
- Köck-Schulmeyer, M., Villagrasa, M., López de Alda, M., Céspedes-Sánchez, R., Ventura, F., Barceló, D.**, 2013, Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatmentplants and their environmental impact. *Sci. Total Environ.* 458-460, 466–476.
- Kreuger, J.**, 1998, Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990–1996. *Sci. Total Environ.* 216, 227–251.
- Kurenbach, B., Marjoshi, D., Amabile-Cuevas, C.F., Ferguson, G.C., Godsoe, W., Gibson, P., Heinemann, J.A.**,2015, Sublethal exposure to commercial formulations of the herbicides dicamba, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and glyphosate cause changes in antibiotic susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella entericaserovar* Typhimurium. *mBio* 6(2):e00009-15.
- Laht, M., Karkman, A., Voolaid, V., Ritz, C., Tenson, T., Virta, M., Kisand, V.**,2014, Abundances of tetracycline, sulphonamide and beta-lactam antibiotic resistance genes in conventional wastewater treatment plants (WWTPs) with different waste load. *PloS One* 9: e103705.
- Lambert, P.**, 2005, Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10),

KAYNAKLAR (Devam)

- Le, T.-H., Ng, C., Tran, N.H., Chen, H., Yew-Hoong Gin, K.,**2018,Removal of antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in municipal wastewater by membrane bioreactor systems. *Water Research*, 145, 498-508.
- Lee, C.R., Lee, J.H., Park, K.S., Kim, Y.B, Jeong, B.C, Lee, S.H.,**2016, "Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods". *Frontiers in Microbiology*. 7: 895.
- Lee, D-Y., Shannon, K., Beaudette, L.A.,**2006,Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *J. Microbiol. Methods*. 65: 453-467.
- Li, X., Gu, A. Z., Zhang, Y., Xie, B., Li,D., & Chen, J.,**2019,Sub-lethal concentrations of heavy metals induce antibiotic resistance via mutagenesis. *Journal of Hazardous Materials*, 369, 9-16.
- Li, X.Z., Nikaido, H. ,**2009,Effluxmediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, **69**, 1555–1623.
- Looft, T. et al. ,**2012, In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 1691–1696.
- Lüddeke, F., Heß, S., Gallert, C., Winter, J., Güde, H., & Löffler, H. ,**2015, Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. *Water Research*, 69, 243-251. doi:10.1016/j.watres.2014.11.018.

KAYNAKLAR (Devam)

Lupan, I., Carpa, R., Oltean, A., Kelemen, B. S., & Popescu, O. ,2017,Release of Antibiotic Resistant Bacteria by a Waste Treatment Plant from Romania. *Microbes and Environments* *Microbes and Environments*,32(3), 219-225.

Mahalakshmi , M., Srinivasan, M., Murugan,M. , Balakrishnan, S. and Devanathan,K.,2011, Isolation and Identification of Total Heterotrophic Bacteria and Human Pathogens in Water and Sediment from Cuddalore Fishing Harbour after the Tsunami. *Asian Journal of Biological Sciences*, 4: 148-156.

Mahmoud, A. M., Ibrahim, F. A., Shaban, S. A., & Youssef, N. A.,2015, Adsorption of heavy metal ion from aqueous solution by nickel oxide nano catalyst prepared by different methods. *Egyptian Journal of Petroleum*, 24(1), 27-35..

Manoli, K., Morrison, L.M., Sumarah, M.W., Nakhla, G., Ray, A.K., Sharma, V.K., 2018,Pharmaceuticals and pesticides in secondary effluent wastewater: Identification and enhanced removal by acid-activated ferrate(VI), *Water Research*,

Marti E, Jofre J, Balcazar JL ,2013,Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. *PloS One* 8: e78906.

Matsuoka, M., Inoue, M., Endo, Y., Nakajima, Y. ,2003, Characteristic expression of three genes,msr(A),mph(C) anderm(Y), that confer resistance to macrolide antibiotics onStaphylococcus aureus. *FEMS Microbiology Letters*, 220(2), 287–293.

KAYNAKLAR (Devam)

Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V., Davies, J.,2000, Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel aad gene. *Antimicrob Agents Chemother*; 44: 1568–1574. PMID: 10817710.

McGaha, S.M., Champney, W.S.,2007, Hygromycin B inhibition of protein synthesis and ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51** (2), 591–596.

Mehta, R. and Champney, W.S. ,2003, Neomycin and paromomycin inhibit 30S ribosomal subunit assembly in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.*, **47** (3), 237–243.

Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C.S. et al., 2013, Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Res*;**47**: 957–95.

Molina J, Cordero E, Pachón J.,2009, New information about the polymyxin/colistin class of antibiotics. *Expert Opin Pharmacother*:10;2811-28.

Munir, M., Wong, K., Xagorarakis, I., 2011. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Res.* 45, 681–693.

Ng, L.-K., Martin, I., Alfa, M., & Mulvey, M. ,2001, Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and cellular probes*, **15**(4), 209-215 .

Nordgard, L. et al ,2017, Antimicrobial Resistance in Selected Environments in Norway: Occurrence of Antimicrobial resistant bacteria (ADB) and antimicrobial resistant genes (ARG) associated with wastewater treatment plants (WWTPs). Project report, M-736/2017. GenØk, Tromsø, Norway.

KAYNAKLAR (Devam)

- Ohore, O. E., Addo, F. G., Zhang, S., Han, N., & Anim-Larbi, K. ,2019,** Distribution and relationship between antimicrobial resistance genes and heavy metals in surface sediments of Taihu Lake, China. *Journal of Environmental Sciences*, 77, 323-335.
- Otacı, C.ve Güvener, A., 1959,** Hexachlorbenzenle ilaçlanmış tohumluk buğdaylarda hexachlorbenzen tayini. *Bit. Kor. Bül.*, 1 (2): 26-29.
- Pal C, Bengtsson-Palme J, Kristiansson E et al. ,2015,** Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics* 16:964. doi: 10.1186/s12864-015-2153-5.
- Pal, C., Asiani, K., Arya, S., Rensing, C., Stekel, D. J., Larsson, D. J., & Hobman, J. L. ,2017,** Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance. *Microbiology of Metal Ions Advances in Microbial Physiology*, 261-313. doi:10.1016/bs.ampbs.2017.02.001.
- Papageorgiou, M., Kosma, C., Lambropoulou, D., 2016.** Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. *Sci. Total Environ.* 543, 547–569. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.047.
- Perlman, D., et al., 1979,** Use of antibiotics in cell culture. *Meth. Enzymol.*, 58, 110-116.
- Perry, J., Waglechner, N., & Wright, G. ,2016,** The Prehistory of Antibiotic Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(6). *Protoc. Pharmacol.*, 46, 9.11.1–9.11.21.
- Rahim,A. Mahnaz N,Hosseini,K, Zahra,H, Mohammad,K and Akbar,H., 2014,**Fresenius Environmental Bulletin Volume 23 – No 10a.

KAYNAKLAR (Devam)

Rahube, T. O., Marti, R., Scott, A., Tien, Y. C., Murray, R., Sabourin, L., and Topp, E. ,2016, Persistence of antibiotic resistance and plasmid-associated genes in soil following application of sewage sludge and abundance on vegetables at harvest. *Can J Microbiol*, 62(7), 600-607. doi:10.1139/cjm-2016-0034.

Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Megharaj, M. ,2019, Local applications but global implications: Can pesticides drive microorganisms to develop antimicrobial resistance? *Science of The Total Environment*, 654,177-189. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.11.041.

Rangasamy K, Athiappan M, Devarajan N, Samykannu G, Parray JA, Aruljothi KN, Shameem N, Alqarawi AA, Hashem A, Abd_Allah EF.,. 2018, Pesticide degrading natural multidrug resistance bacterial flora, *Microbial Pathogenesis* , doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.013.

Reasoner, D.J., and Geldreich, E.E. ,1979, Paper No. N7, Annual Meeting of The American Society for Microbiology.

Reinert, R.R., Franken, C., van der Linden, M., Luttkien, R., Cil, M., Al-Lahham ,A.,2004, Molecular characterisation of macrolide resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated in Germany, 2002–2003. *Int J Antimicrob Agents* 24(1): 43–47.

Reynolds Martindale The Extra Pharmacopoeia, 1996, 31st ed., Reynolds, J. E. F., ed., Royal Pharmaceutical Society (London, England:), p. 244.

Reynolds Martindale.,1996, The Extra Pharmacopoeia, 31st ed., Royal Pharmaceutical Society (London, England: 1996), p. 244.

Reynolds, PE.,1989, Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*;8:943-50.

KAYNAKLAR (Devam)

- Rizzo, L, Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M.C., Michael, J., Fatta-Kassinos, D.,**2013, Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci. Total Environ.* 447, 345–360 .
- Rodríguez C, Lang L, Wang A, Altendorf K, García F, Lipski A .,**2006, Lettuce for human consumption collected in Costa Rica contains complex communities of culturable oxytetracycline-and gentamicin-resistant bacteria. *Appl Environ Microbiol* 72:5870–5876 .
- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., Balcázar, J. L.,** 2015, Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, 234–242. doi: 10.1016/j.watres.2014.11.021.
- Ruoting Pei, Sung-Chul Kim, Kenneth H. Carlson,** 2006, Effect of River Landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG) *Amy Pruden_water research*, 40; p- 2427 – 2435.
- Russell, A. D. ,**2004, Types of antibiotics and synthetic antimicrobial agents. In: Denyer S. P., Hodges N. A. & German S. P. (eds.) *Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology*. 7th Ed. Blackwell Science, UK. Pp. 152-186.
- Saene, R. V., Fairclough, S., & Petros, A.,**1998, Broad- and narrow-spectrum antibiotics: A different approach. *Clinical Microbiology and Infection*,4(1), 56-57.
- Sapna, Sharma, R., & Kumar, D. ,**2019, Chitosan-Based Membranes for Wastewater Desalination and Heavy Metal Detoxification. *Nanoscale Materials in Water Purification*, 799-814. doi:10.1016/b978-0-12-813926-4.00037-9.

KAYNAKLAR (Devam)

- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., & Obst, U.**, 2003, Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol Ecol*, 43(3), 325-335. doi:10.1111/j.1574-6941.2003.tb01073.
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M.K., Grossart, P.**, 2013, The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol*;4(47):1-13.
- Shamuyarira, K., & Gumbo, J.**, 2014, Assessment of Heavy Metals in Municipal Sewage Sludge: A Case Study of Limpopo Province, South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(3), 2569-2579. doi:10.3390/ijerph110302569.
- Shanks, O.C., Kelty, C.A., Sivaganesan, M., Varma, M., Haugland, R.A.**, 2009, Quantitative PCR for genetic markers of human fecal pollution. *Appl Environ Microbiol* 75(17): 5507–13. doi:10.1128/AEM.00305-09.
- Sharkey, F.H., Banat, I.M., Marchant, R.**, 2004, Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Appl Environ Microbiol* 70(7): 3795–806. doi: 10.1128/ AEM.70.7.3795-3806.2004.
- Sifatullah, K.M , Semra, G.T.**, 2015, Çevresel örneklerde pestisit analizi; su ve toprak kirliliği 6. Ulusal Hava Kirliliği ve Kontrolü Sempozyumu-2015 7-9 Ekim, İzmir.
- Silva, V., Mol, H. G., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C. J., & Geissen, V.**, 2019, Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. *Science of The Total Environment*, 653, 1532-1545.
- Singer AC, Shaw H, Rhodes V, Hart A.**, 2016, Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Front Microbiol*.7:1728.

KAYNAKLAR (Devam)

Singh, T., Singh, P.K., Dar, S.A., Haque, S., Akhter, N., Das, S., 2019, Changing paradigm of antibiotic resistance amongst *Escherichia coli* isolates in Indian pediatric population. PLoS ONE 14(4): e0213850.

Soufi , L., Sáenz, Y., Vinué, L., Abbassi, M.S., Ruiz, E., Zarazaga,M., Hassen,A.B., Hammami, S. & Torres, C.,2010, Escherichia coli of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons, *International Journal of Food Microbiology*, 144, pp. 497–502.

Stoll, C., Sidhu, J.P., Tiehm, A., Toze, S. ,2012,Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia. *Environ Sci Technol*; 46: 9716_26.

Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G., & Witte, W.,2003,Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*,41(9), 4089-4094. doi:10.1128/jcm.41.9.4089-4094.2003.

Sutcliffe, J.A.,2011, Antibiotics in development targeting protein synthesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1241, 122–152.

Szczepanowski, R., Linke, B., Krahn, I., Gartemann, K.H., Gutzkow, T., Eichler, W., Puhler,A, Schluter, A.,2009, Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiol Read Engl* 155: 2306–19.

Tahrani, L., Soufi, L., Mehri, I., Najjari, A., Hassan, A., Loco, J. V., Mansour, H. B. ,2015, Isolation and characterization of antibiotic-resistant bacteria from pharmaceutical industrial wastewaters. *Microbial Pathogenesis*,89, 54-61.

KAYNAKLAR (Devam)

- Tenover, F.C.** ,2006, Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am. J. Infect. Control., 34 (5, Suppl/. 1), S3–S10discussion S64–S73.
- Tiryaki, O.** ,2016, Validation of QuEChERS method for the determination of some pesticide residues in two apple varieties, Journal of Environmental Science and Health, Part B, 51:10, 722-729.
- Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR.2006**, Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. J Antimicrob Chemother;58:1–6.
- Toleman, M.A., Bennett, P.M., Bennett, D.M., Jones, R.N. & Walsh, T.R.,2007**, Global emergence of trimethoprim/ sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes, Emerging Infectious Diseases, 13, pp. 559–565.
- TOPAL, M., Gülşad, U., Mehmet Ş., E. Işıl ARSLAN TOPAL., 2012**, Elazığ Belediyesi Atıksu Arıtma Tesisi Giriş Sularında Antibiyotik Kalıntılarının Varlığının Araştırılması . Tarih Kültür ve Sanat Araştırmaları Dergisi Vol. 1, No. 4, (ISSN: 2147-0626). DOI: 10. 7596/taksad. v1i4.
- Tunyakamon, J., Darak, B. ,Chaiwat R., 2016**, Removal of Antibiotic Residues by Hospital Wastewater Treatment Facilities in Songkhla, Thailand. 5th International Conference on Environmental Engineering, Science and Management ,Bangkok, Thailand .
- Turolla, M. Cattaneo, F. Marazzi, V. Mezzanotte, M. Antonelli.,2018**, Antibiotic resistant bacteria in urban sewage: Role of full-scale wastewater treatment plants on environmental spreading, Chemosphere J, V191, PP 761-769.
- Ulutaş, K. , Pekey,H. , Demir,S., Dinçer,F., 2017**, Olfaktometrik Yöntem ile Atıksu Arıtma Tesisi Ünitelerinde Koku Düzeylerinin Belirlenmesi, Fen ve Mühendislik Dergisi, 19(57). PP 867-877.

- Velammal, A.**, 1993. Studies on *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from Pondicherry coastal environs. (South India). Ph.D. Thesis, Annamalai University.
- VKM.**,2009, Risk assessment of contaminants in sewage sludge applied on Norwegian soils.
- Volkman, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S., Obst, U.**, 2004, Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *J. Microbiol. Meth.* 56: 277-286.
- Walsh, C.**, 2003, Where will new antibiotics come from? *Nature Reviews Microbiology* 1(1):65-69.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R.**, 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (16):5261–5267.
- Weisblum, B.**,1995,Erythromycin resistance by ribosome modification, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, pp. 577–585.
- Wollast, R.**, 1991, The Coastal Organic Carbon Cycle: Fluxes, Sources and Sinks. In: *Ocean Margin Process in Global Change*, Mantoura, R.F.C., J.M. Martin and R. Wollast (Eds.). John Wiley and Sons, New York, pp: 365-381.
- Wu, M., Que, C., Tang, L., Xu, H., Xiang, J., Wang, J., Xu, G.**, 2016, Distribution, fate, and risk assessment of antibiotics in five wastewater treatment plants in Shanghai, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), 18055–18063. doi: 10.1007/s11356-016-6946-0.
- Xu, W.H., Zhang, G., Zou, S.C., Li, X.D., Liu, Y.C.** ,2006, Occurrence and seasonal changes of antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China. *Huan Jing Ke Xue* 27: 2458–2462.

KAYNAKLAR (Devam)

- Yoneyama H, Katsumata R.** ,2006,Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci Biotechnol Biochem*;70:1060-75.
- Yuan, J., Yang, Y., Zhou, X., Ge, Y., & Zeng, Q.,**2019, A new method for simultaneous removal of heavy metals and harmful organics from rape seed meal from metal-contaminated farmland. *Separation and Purification Technology*, 210, 1001-1007. doi:10.1016/j.seppur.2018.09.056
- Yuan, Q., Guo, M., Wei, W., & Yang, J.,**2016, Reductions of bacterial antibiotic resistance through five biological treatment processes treated municipal wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*,23(19), 19495-19503.
- Zhai G.** ,2014,Antibiotic Contamination: A Global Environment Issue. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 05(05). doi:10.4172/2155-6199.1000e157 .
- Zhang, T., Fang, H. H. P.,** 2006, Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(3), 281–289. doi: 10.1007/s00253-006-0333-6.
- Zhang, T., Zhang, M., Zhang, X., Fang, H.H.,**2009a , Tetracycline resistance genes and tetracycline resistant lactose-fermenting Enterobacteriaceae in activated sludge of sewage treatment plants. *Environ Sci Technol* 43: 3455–60.
- Zhang,X., Zhao,H., Du,J., Qu,Y., Shen,C., Tan,F., Chen,J., Quan,.X.,**2017,Occurrence, removal, and risk assessment of antibiotics in 12 wastewater treatment plants from Dalian,CHINA. *Environ Sci Pollut Res Int*,

KAYNAKLAR (Devam)

- Zhang, X.X., Zhang, T.**,2011, Occurrence, abundance, and diversity of tetracycline resistance genes in 15 sewage treatment plants across China and other global locations. *Environ Sci Technol* ; 45: 2598_604.
- Zhang, Z., Li, B., Li, N., Sardar, M. F., Song, T., Zhu, C.,Li, H.** ,2019,Effects of UV disinfection on phenotypes and genotypes of antibiotic-resistant bacteria in secondary effluent from a municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, 157, 546-554. doi:10.1016/j.watres.2019.03.079.
- Zhao, X., & Liu, C.**,2019, Efficient removal of heavy metal ions based on the selective hydrophilic channels. *Chemical Engineering Journal*, 359, 1644-1651. doi:10.1016/j.cej.2018.10.229.
- Zhou, Z., Feng, W., Han, Y., Zheng, J., Chen, T., Wei, Y., Chen, H.**,2019, Prevalence and transmission of antibiotic resistance and microbiota between humans and water environments. *Environment International*, 121, 1155-1161. doi:10.1016/j.envint.2018.10.032
- Zhu, Y.-G. et al.**,2013, Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese wine farms. *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 110, 3435–3440 .
- Ziemińska-Buczyńska, A., Felis, E., Folkert, J., Meresta, A., Stawicka, D., Gnida, A., & Surmacz-Górska, J.** ,2015, Detection of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant – molecular and classical approach. *Archives of Environmental Protection*, 41(4), 23-32. doi:10.1515/aep-2015-0035.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici olan, ilgisini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan değerli danışman hocam Sayın **Prof. Dr. İhsan YAŞA**'ya sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalıőmalarım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme, özellikle eőim Arwa TURKY ve Annem'e sonsuz teőekkürler ederim.

Çalıőmalarım boyunca yardımını hiç esirgemeyen değerli kardeőim Nazenin EFTEKHARİ ve Asiye Esra EREN 'e teőekkürü bir borç bilirim ve baőarılarını uzun yolumuzda görmeyi umuyorum.

Doktora boyunca aldığım, TÜRKİYE BURSLARI (YTB) Burs Programı' desteğine teşekkür ederim.

Shadman Tariq Sadiq

ÖZGEÇMİŞ

SHADMAN TARIQ SADIQ

İnönu Mah, 803 Sok, No:33 Daire:4, BORNOVA/İZMİR

Cep: 05317472600

E-mail: shadmantsm@tu.edu.iq

Doğum yeri : IRAQ

Doğum tarihi : 27/06/1986

Medeni hâl : EVLİ

İkametgah : IRAQ-KERKUK

EĞİTİM DURUMU

2016-2019 Ege Üniversitesi , Fen Fakültesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı,Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Dalı Doktora Eğitimi.

2011-2014 Tikrit Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Eğitimi.

2009-2010 Tikrit Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyolojisi Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Lisans Eğitimi.

Seminerler ve Kurslar

- 1- **Shadman T. sadiq and İhsan Yaşa** .(2018). *Hospitals Wastewater : a new technologies & optimal methods used for treatment of hospital wastewater before discharge into environment* , 5th Ecology and Evolutionary Biology Symposium, 18-20 July 2018, İzmir, Turkey, P : 47.
- 2- **Shadman T. sadiq, İhsan Yaşa and Nazenin eftikhari**. (2018). *Variation of antibiotic resistance bacterial number in wastewater treatment plants*, 4th **International Biocidal Congress, Antalya.**
- 3- **Adnan F. AL-Azzawie ; Akeel H. Al-Assie and Shadman T. Sadiq**.(2017).*Association Between the-308 G/A Promoter Polymorphism of the*

Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene and Some Rheumatoid Arthritis Patients in Iraqi Population, 1st Int student science congress, Izmir/Turkey ,P :87.

YAYINLAR

- 1- **Shadman T. sadiq and İhsan Yaşa.**(2018).Viability study of some antibiotic resistance bacteria percentage isolated from wastewater effluent samples in Manisa / turkey, WJPR, Volume 7, 16, P1830-1841.
- 2- **S. T. Shadman and İ. Yaşa,** "New techniques used for removing antibiotic residues and antibiotic resistance genes from water," *Recent Advances in Biology and Medicine*, vol. 5, pp. 1-5, 2019.
- 3- **Sadiq, S. T., Yasa, I., Ali, S. F., Eren, A. E., & Turkey, A. N.** (2019). Occurrence, Seasonal Changes and Removal Efficiency Assessment of Heavy Metals in Urban Wastewater Treatment Plant. *Journal of Asian Scientific Research*, 9(6), 48–55.

Burslar ve Projeler

TURKIYE BURSLARI (YTB) Doktora Burs Programı

YABANCI DİL

İngilizce: C2 seviyede

Türkçe: C1

Arapça: Çok iyi

Kurtçe : iyi