

# Antibiyotik etken maddelerinin metanojenik aktivite üzerinde kronik etkileri

Zeynep ÇETECİOĞLU\*, Derin ORHON, Orhan İNCE

İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Biyoteknolojisi Programı, 34469, Ayazağa, İstanbul

## Özet

Yıllık üretimi tüm dünyada yaklaşık 500 tonu bulan antibiyotikler, konvansiyonel arıtma teknolojileri ile giderime dirençli özellikleri ile ön plana çıkmaktadırlar. Antibiyotik içeren evsel ve hastane atıksuları, arıtma tesislerinde bulunan biyolojik reaktörlerde kısmi olarak ayrışarak ya da hiçbir değişime uğramadan doğrudan alıcı ortama deşarj edilmektedirler. Antibiyotik konsantrasyonları daha yüksek mertebelerde bulunan ilaç endüstrisi atıksuları ise tesislerde fiziko-kimyasal teknolojiler ile arıtılmaktadır. Miktarları her geçen gün ekosistemde artan bu ilaç etken maddeleri, doğada antibiyotiğe dirençli patojen organizmaların artışına sebep olmakta ve bu durum halk sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Bu çalışmada yüksek KOİ ve inhibitör madde içeriğiyle ön plana çıkan ilaç endüstrisi atıksularının anaerobik arıtımında metanojenik aktivite üzerindeki kronik etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda dizayn edilen spesifik metanojenik aktivite testleri, çalışma kapsamında seçilen üç farklı antibiyotiğin kronik inhibisyon profillerini ortaya koymuştur. Bu çalışmada kullanılan sülfometaksazol, eritromisin ve tetrasiklin antibiyotiklerinin anaerobik deşarjının son adımı olan metanojenesis üzerindeki kronik etkilerinin farklı olduğu görülmüştür. Sülfometaksazol ile beslenen sistemin çamur numunelerinde metanojenik aktivite antibiyotik konsantrasyonu ile paralel artarken, eritromisin ve tetrasiklin beslenen sistemlerde metanojenik aktivite düşmüştür. Sisteme eritromisin beslenmesi kesildiğinde metanojenik aktivite düşmeye devam etmiştir. Bu etken maddenin anaerobik sistemlerdeki kronik etkisini dönüşümsüz inhibisyon modeli ile açıklanabilmektedir. Anaerobik reaktöre tetrasiklin beslenmesi kesildikten sonra ise metanojenik aktivite artmıştır. Tetrasiklinin anaerobik sistemlerdeki kronik etkisi dönüşümlü inhibisyon modeli ile açıklanabilmektedir. Her üç antibiyotiğin etkisi homoasetojenler ve hidrogenotrofik metanojenler üzerinde asetoklastik türlere oranla daha fazla olmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyotik, anaerobik arıtım, metanojenik aktivite, SMA testi.

\*Yazışmaların yapılacağı yazar: Zeynep ÇETECİOĞLU. cetecioglu@itu.edu.tr; Tel: (212) 285 65 42.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Biyoteknolojisi Programı'nda tamamlanmış olan "Evaluation of anaerobic biodegradability characteristics of antibiotics and toxic/inhibitory effect on mixed microbial culture" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır.

Makale metni 04.10.2011 tarihinde dergiye ulaşmış, 16.11.2011 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 30.09.2012 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

Bu makaleye "Çetecioglu, Z., Orhon, D., İnce, O., (2012) 'Antibiyotik etken maddelerinin metanojenik aktivite üzerindeki kronik etkileri', İTÜ Dergisi/E Su Kirlenmesi Kontrolü, 22: 1, 51-59" şeklinde atıf yapabilirsiniz.

## Chronic effects of antibiotics on methanogenic activity

### Extended abstract

In last decades, pharmaceuticals production and consumption has been increased. Occurrence and fate of these compounds are one of the main issues because of their unknown potential risk and effect on the environment. Antibiotics are one of these compounds and approximately 500 tons of them are produced and consumed every year in the world-wide. Antibiotics are resistant to conventional biological treatment process and the wastewaters including these compounds are directly discharged to the receiving waterbodies with no or low elimination after being treated in conventionally operated domestic sewage plants. While the concentration of these materials in domestic wastewaters and surface waters are in  $\mu\text{g/l}$  level, in pharmaceutical wastewater they are in 100-1000 mg/L level. So pharmaceutical industries need to use physico-chemical treatment approaches to remove these compounds from their high-strength wastewater. The occurrence of the antibiotics in the ecosystem increases from day to day and also low concentration in the surface wastewaters cause important problems in the ecosystem, it necessitates the removal of high antibiotic amount that are found in the pharmaceutical wastewaters. However, because the chemical removals of these materials are costly, biological treatment is essential. Antibiotics are the most often discussed pharmaceuticals in last decades because of their potential role in the spread and maintenance of (multi)resistance of bacterial pathogens. There are lots of studies that have been done in Europe and North America on the detection and removal of antibiotics in the receiving environment and the treatment plant. Anaerobic treatment is one alternative for the high-strength wastewater including the inhibitory compounds such as pharmaceutical industry wastewater. In the literature, there are a few studies reported information about the anaerobic treatment of antibiotic containing wastewater. Also these reported studies have presented limited information about the system. A study including chronic inhibitory effects of these compounds on methanogenic pathway is a lack in the literature.

The focusing items in this study are long-term effects of the three selected antibiotics; Sulfamethoxazole-SMX, Erythromycin-ERY, Tetracycline-TET; on methanogenesis step of anaerobic systems were ex-

amined. Specific methanogenic activity (SMA) tests were performed to detect the chronic effects of the selected antibiotics on anaerobic biomass in terms of acetoclastic, hydrogenotrophic activity with homoacetogenesis. For this purpose, the anaerobic sludges were collected from different antibiotic feeding phases of laboratory scale anaerobic sequencing batch reactors (ASBRs). SMA test were set-up by using the collected sludges. Two different set SMA tests were performed. One set was only fed by acetate to detect the chronic effects of selected antibiotics on acetoclastic methanogenesis. In the second set, acetate-butyrate-propionate mixture was used as carbon source to evaluate the chronic effects of the antibiotics on methanogenesis with homoacetogenesis.

According to the results, methanogenic activity of SMX fed sludge increased with respect to SMX concentration and operation period. Even acetoclastic activity of this sludge were higher than acetoclastic activity of seed sludge at the end of operation under 45-mg/L SMX fed condition. Contrary of SMX, methanogenic activities of ERY and TET fed sludges decreased while the antibiotic concentration increased within the system and inhibition effect of these antibiotics on anaerobic systems were clear. For these two systems, the bioreactors were operated after antibiotic addition was stopped. In ERY fed system, the methanogenic activity in terms of acetoclastic and hydrogenotrophic could not be recovered. ERY inhibition profile can be explained by irreversible inhibition. However, acetoclastic and hydrogenotrophic methanogenic activity were recovered in TET fed sludge after TET addition was terminated. While acetoclastic activity increased approximately 100% compared to previous phase (3 mg/L TET feeding), all methanogenic activity increased 4-fold. Inhibition type of TET can be explained by reversible inhibition. Additionally, the results indicated that methanogenesis with homoacetogenic activity was affected much more than acetoclastic methanogenesis. Bacteriostatic effects of these selected antibiotics are known and it can be speculated that bacterial species which are responsible for degradation of volatile fatty acids (VFAs) are more sensitive than methanogenic species which are members of Archaea and can survive under extreme conditions.

**Keywords:** Antibiotic, anaerobic treatment, methanogenic activity, SMA test.

## **Giriş**

Hızla artan dünya nüfusu ve gelişen teknoloji ile birlikte tıp, hayvancılık ve tarımda tedavi ve koruma amaçlı kullanılan farmasötikler, gerek endüstriyel gerekse de evsel kaynaklı atıksular ile ekosisteme girmekte ve doğada birikerek başta insan ve hayvan sağlığı olmak üzere tüm canlılar açısından büyük bir tehlike oluşturmaktadır (Kummerer, 2004). Bu farmasötiklerden olan antibiyotiklerin yıllık kullanımı A.B.D’de 25000 ton, Avrupa’da ise 13500 tondur ve yaklaşık %70-95 kadarı dışkı ve idrar ile kısmi metabolize olarak ya da hiç metabolize edilmeden insan vücudundan atılarak kanalizasyon sistemi yoluyla evsel atıksu arıtma tesislerine ulaşmaktadır (Sedlak vd., 2005; Stockholm County Council, 2005). Canlıların enzim sistemlerine yabancı olan bu maddeler, konvansiyonel biyolojik arıtma sistemlerinde herhangi bir değişikliğe uğramadan veya düşük bir biyodegradasyon verimiyle alıcı ortama deşarj edilmektedir. Her geçen gün toprak ve su sistemlerinde biriken antibiyotikler, gerek doğada bu etken maddelere dirençli patojenlerin artışına sebep olarak gerekse de prokaryotlar üzerindeki inhibisyon etkisi sebebiyle halk sağlığı ve ekosistem açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır (Kummerer, 2004).

Literatürde bu etken maddelerin laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerdeki ve gerçek ölçekli atıksu arıtma tesislerindeki davranışları ve giderimi üzerine yapılan çalışmalar bulunmaktadır (Hartig vd., 1999; Drilla vd., 2005; Kim vd., 2005). Fakat konvansiyonel proseslerde rölatif olarak zor ayrışabilen organik kimyasalların pek çoğunun arıtılmasında alternatif bir metot olarak kullanılan anaerobik arıtma proseslerinde bu maddelerin davranışları ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır (Amin, 2006; Chelliapan vd., 2006; Gartiser vd., 2007). Özellikle bu maddelerin sürekli beslendiği atıksu arıtma sistemlerinde mikrobiyal metabolik yol izleri üzerindeki inhibisyon etkisi, özellikle anaerobik arıtmada rol alan metanojenlerin aktiviteleri ile ilgili çalışmalar henüz literatürde bulunmamaktadır. Literatürdeki çalışmalarda antibiyotik etken maddelerinin yüksek sıcaklık, yüksek amonyak konsantrasyonu varlığında asetattan dolayı olarak me-

tan üretim yol izleri üzerindeki inhibisyon etkisi gösterilmiştir (Griffin vd., 1998; Angenent vd., 2002). Fakat bu maddelerin yüksek miktarlarda bulunduğu ilaç endüstrisi ve hastane deşarjları gibi atıksuların anaerobik olarak arıtımında biyolojik sistem üzerinde nasıl bir etkiye yol açabilecekleri üstüne detaylı bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

Spesifik metanojenik aktivite testi anaerobik çamurların potansiyel metan üretim kapasitesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. SMA testi uzun süreli işletmelerde biyolojik çamurların aktivitelerindeki değişimin tespitinde kullanıldığı gibi, çamur için en uygun organik yüklemenin belirlenmesini de sağlamaktadır (Ince vd., 1995).

Önerilen bu çalışmada, insanlarda sıklıkla görülen enfeksiyonel hastalıkların tedavisinde kullanılan sülfometaksazol, eritromisin ve tetrasiklin antibiyotik etken maddelerinin aklime edilerek beslendiği laboratuvar ölçekli anaerobik ardışık kesikli reaktörlerden farklı antibiyotik rejimlerinde alınan çamur numunelerinin metanojenik aktivitelerinin değişimi yalnız asetat varlığında ve uçucu yağ asidi (UYA) karışımında incelenmiştir.

## **Materyal ve yöntem**

### **Laboratuvar ölçekli anaerobik ardışık kesikli reaktörlerin işletilmesi**

Eş zamanlı olarak 1 L aktif hacimli 3 anaerobik ardışık kesikli reaktör (AAKR) kurulmuştur ve 35°C’de 24 saatlik döngü (doldurma: 10 dk., reaksiyon: 23 s, çökme: 45 dk. ve boşaltma: 5 dk.) içerisinde işletilmişlerdir. Reaktörler 90 rpm hızla manyetik karıştırıcı ile karıştırılmışlardır. Reaktörlerde uçucu askıda katı madde (UAKM) konsantrasyonu 5000 mg/L’de tutulmuştur. Sistem 2250 mg/L KOİ eşleniğinde sentetik atıksu ile beslenmiştir. Sentetik atıksuyun kompozisyonu 1045 mg/L KOİ nişasta, 675 mg/L KOİ glikoz, 120 mg/L KOİ sodyum asetat, 165 mg/L KOİ sodyum bütirat ve 245 mg/L KOİ sodyum propiyonattır. Sentetik atıksuya iz element solüsyonu Cetecioglu ve diğerleri (2011)’de verildiği şekilde eklenmiştir. Sentetik atıksuyun pH’ı 7’ye ayarlanmış, reaktör içeri-

sinde ise pH 6.8-7.2 arasında sabitlenmiştir. Reaktörler ilk 10 gün 1.4 g/L.gün organik yükleme hızında (OYH) işletilmiş daha sonra bu hız kademeli olarak 2.25 g/L.gün'e çıkartılmış ve reaktörler kararlı hale gelene kadar işletilmiştir. 78. günden sonra her bir reaktöre 1 mg/L antibiyotik etken maddesi (sülfometaksazol-SMX, eritromisin-ERY ve tetrasiklin-TET) eklenmeye başlanmış ve işletme boyunca SMX konsantrasyonu 45 mg/L'ye, ERY ve TET konsantrasyonları ise 3 mg/L'ye kadar arttırılmışlardır. Reaktörler 50 gün çamur yaşında ve 2.8 gün hidrolik bekletme süresinde işletilmişlerdir. Reaktörlerde pH ve gaz üretimi işletme boyunca yerinde izlenmiş, kimyasal analizler ve SMA testi için temsil edici numuneler toplanmıştır.

### **Spesifik Metanojenik Aktivite (SMA) testi**

Metanojenik aktivite testi basınç dönüştürücü tekniği uygulanarak belirlenmiştir (Colleran vd., 1992). Testler basınca dayanıklı kapaklarla muhafaza edilen 120 mL'lik serum şişeleri içerisinde 100 mL'lik aktif hacimde kurulmuştur. 5-7000 mbar aralığında ölçüm yapabilen el tipi manometre (Lutron PM-9107, ABD) yardımıyla gaz üretimleri günlük takip edilmiştir. Test şişeleri laboratuvar ölçekli AAKR'lerden alınan sentetik atıksu ile birlikte farklı konsantrasyonlarda SMX, ERY ve TET'e maruz bırakılmış çamurlar ile aşılanmışlardır. Her bir test şişesine 2000 mg/L UAKM eklenmiştir. Test düzenekleri 2 farklı set olarak kurulmuştur. İlk sette yalnızca asetoklatik metanojenik aktivite ölçümü hedeflenmiş ve optimum asetat konsantrasyonunun tespiti için 1000-5000 mg/L asetat ile hiç antibiyotiğe maruz kalmamış çamur test edilmiş ve 4000 mg/L asetat konsantrasyonunda maksimum gaz üretimi tespit edilmiştir. Toplam metanojenik aktivitenin tespiti için ise asetat-propiyonat-bütirat karışımı ile 2. set kurulmuştur. Optimum UYA konsantrasyonunun bulunması için 1000-5000 mg/L her bir UYA'dan eklenen karışımlar test edilmiş ve 3000'er mg/L asetat-propiyonat-bütirat karışımında en yüksek gaz üretimi tespit edilmiştir. Test şişelerinin besiyeri OECD311 (2006) protokolüne göre hazırlanmıştır. Test şişelerin anaerobik şartlarda kurulmuş ve test süresince bu şartlar muhafaza edilmiştir. 6 günlük test süresince şişeler

35±2°C'de saklanmış ve hergün elle çalkalanmak suretiyle karıştırılmıştır.

### **Analitik metodlar**

Laboratuvar ölçekli AAKR'lerin işletilmesi sırasında KOİ, askıda katı madde (AKM) ve uçucu askıda katı madde (UAKM) parametreleri izlenmiş, analizler Standart Metodlara göre yapılmıştır (American Public Health Association, APHA, 2005). Biyogazlar kompozisyonu ise gaz kromatografi (Agilent Technologies 6890N, ABD) ile belirlenmiştir.

### **Deneysel çalışma sonuçları**

#### **Laboratuvar ölçekli anaerobik ardışık kesikli reaktörlerin performansı**

Bu çalışma kapsamında işletilen 3 biyoreaktör ilk 78 gün boyunca sadece sentetik atıksu ile beslenerek aklime edilmiş ve ardından 1 mg/L SMX, ERY ve TET eklenmeye başlanmış ve antibiyotik etken maddelerin konsantrasyonları kademeli olarak arttırılmıştır. Her üç reaktörde KOİ giderim verimi antibiyotik beslemesinden önce SMX reaktörü için %96.1, ERY ve TET reaktörleri için ise %96.5 olarak belirlenmiştir. SMX reaktöründen yapılan SMA testi örneklemeleri 10 mg/L, 40 mg/L, 45 mg/L ve yine 45 mg/L besleme rejiminin son gününde gerçekleştirilmiştir. SMX reaktörünün bu dönemlerdeki KOİ giderim verimi ise sırasıyla, %96.5, %92.9, %76.2 ve %13.3 olarak bulunmuştur. ERY ve TET reaktörlerinden ise 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L antibiyotik besleme rejimlerinde ve ardından antibiyotik beslenmeyen dönemde biyolojik çamur örneği alınarak SMA testleri kurulmuştur. ERY reaktöründe bu antibiyotik rejimlerinde KOİ giderim verimi sırasıyla %96.8, %97.3, %25.2 ve %8.6 olarak bulunurken, TET reaktöründe bu değerler %96.7, %97.4, %57.7 ve %2.3 olarak değişmiştir.

#### **Spesifik Metanojenik Aktivite (SMA) testi**

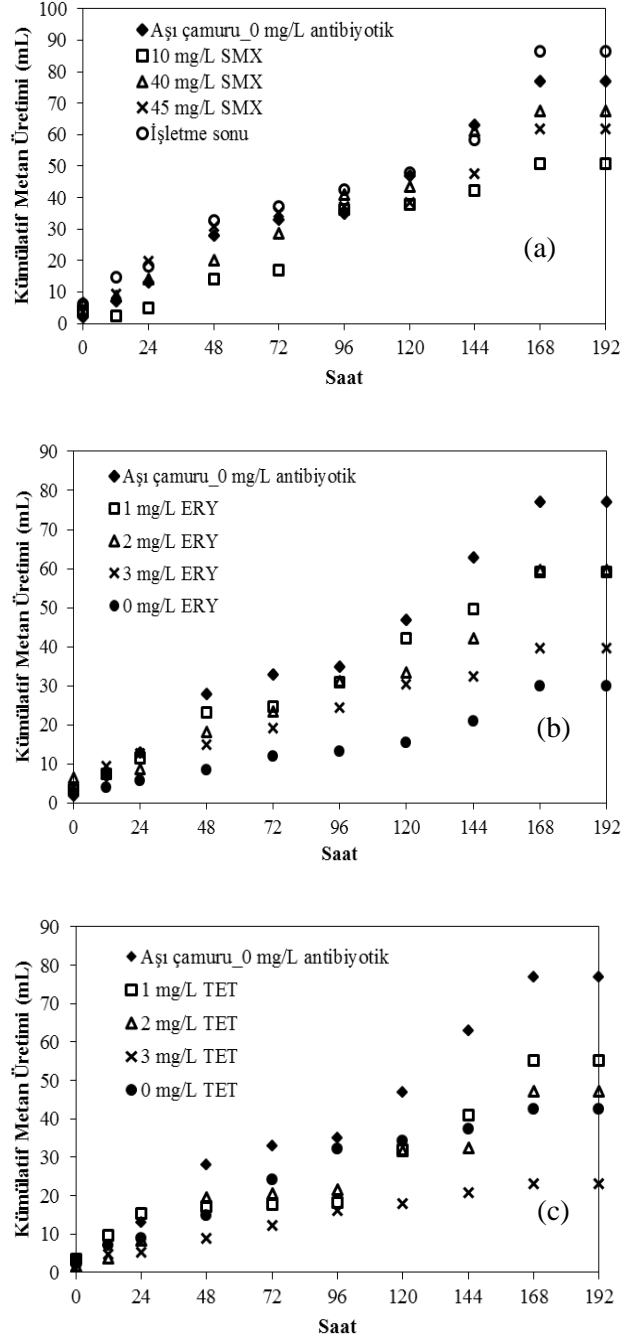
SMX, ERY ve TET ile beslenmiş reaktörlerden alınan çamur numunelerinde, bu antibiyotik etken maddelerin metanojenik aktivite üzerindeki kronik etkilerinin tespiti amacıyla SMA testleri kurulmuştur. İki farklı set olarak dizayn edilen bu testlerin ilkinde yalnızca asetoklastik aktivi-

te, ikincisinde ise asetoklastik ile hidrogenotrofik metanojenik aktivite birlikte belirlenmiştir.

**Asetat kullanımı-** Aşı çamuru ve üç reaktörden farklı antibiyotik besleme rejimlerinde alınan çamur örnekleri ile kurulan SMA testlerinden elde edilen asetoklastik kümülatif metan üretim (KMÜ) miktarları Şekil 1’de verilmiştir. Antibiyotiğe maruz kalmamış aşı çamurunun asetoklastik KMÜ değeri 6 gün sonunda 77 mL olarak bulunmuştur. SMX reaktöründe kronik testlere başlandıktan sonra ilk numune 10 mg/L SMX beslenen dönemin sonunda alınmış ve bu çamurun KMÜ değeri 51 mL olarak bulunmuştur. Reaktör içerisindeki SMX konsantrasyonu zamanla artırılırken, asetoklastik metanojenik aktivite de beklenenin tersine artmıştır. 40 mg/L SMX beslenen dönemde KMÜ değeri 68 mL iken, işletme sonunda (45 mg/L beslenen dönemin sonu) 87 mL’ye çıkmıştır. Teorik olarak tüm asetat tüketildiğinde üretilebilecek maksimum metan miktarı ise 97 mL’dir. SMX reaktöründen alınan numuneler ile kurulan test şişelerinin tümünde, deney süresinin bitiminde metan miktarı ise tüm biyogaz içerisinde %70 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre yüksek konsantrasyonlarda bile SMX’in metanojenlerin asetat tüketimi üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı ortaya çıkmıştır. Bu durumda asetoklastik metanojenlerin SMX’e karşı bir direnci söz konusu olabilir.

Şekil 1b’de görüldüğü gibi ERY beslenen reaktörden alınan çamur numunelerinin asetoklastik KMÜ profilleri SMX ile beslenen çamurdan farklıdır. Tüm KMÜ değerleri antibiyotiğe maruz kalmamış aşı çamuruna göre düşüktür. İşletme boyunca artan ERY konsantrasyonu ile ters orantılı olarak KMÜ değerleri düşmekte ve en düşük değere işletmenin son döneminde, antibiyotik beslemesinin kesildiği periyodun sonunda ulaşılmaktadır. 1 ve 2 mg/L ERY besleme rejiminde asetoklastik aktivite değişmezken, aşı çamuruna göre düşüş göstermiştir. 3 mg/L ERY besleme rejiminde KMÜ değeri 40 mL belirlenirken, antibiyotik beslemesinin kesildiği işletmenin son döneminde bu değer 30 mL’ye düşmüştür. SMX’in farklı olarak, ERY’nin kronik etkisinin anaerobik biyokütle üzerinde dü-

şük konsantrasyonlarda başladığı ve ERY beslemesi kesilmesine rağmen, çamur aktivitesinin geri kazanılmadığı gözlemlenmiştir. ERY reaktöründe alınan çamur numunelerinden kurulan tüm SMA test şişelerinde üretilen biyogazın %70’ini metan oluşturmaktadır.



Şekil 1. Asetoklastik spesifik metanojenik aktivite (SMA) testi (a) SMX reaktör çamuru, (b) ERY reaktör çamuru ve (c) TET reaktör çamuru kümülatif metan üretimi

Bu çalışmada, ERY reaktöründen işletme sonunda alınan çamur numunesinde %40 oranında asetoklastik metanojenik aktivitede düşüş gözlemlenmiştir. Fakat literatürdeki bir başka çalışmada 200-500 mg/L ERY konsantrasyonu ile beslenen anaerobik sistemlerde bile SMA testlerinde asetik asit tüketiminin etkilenmediği rapor edilmiştir. (Amin vd., 2006).

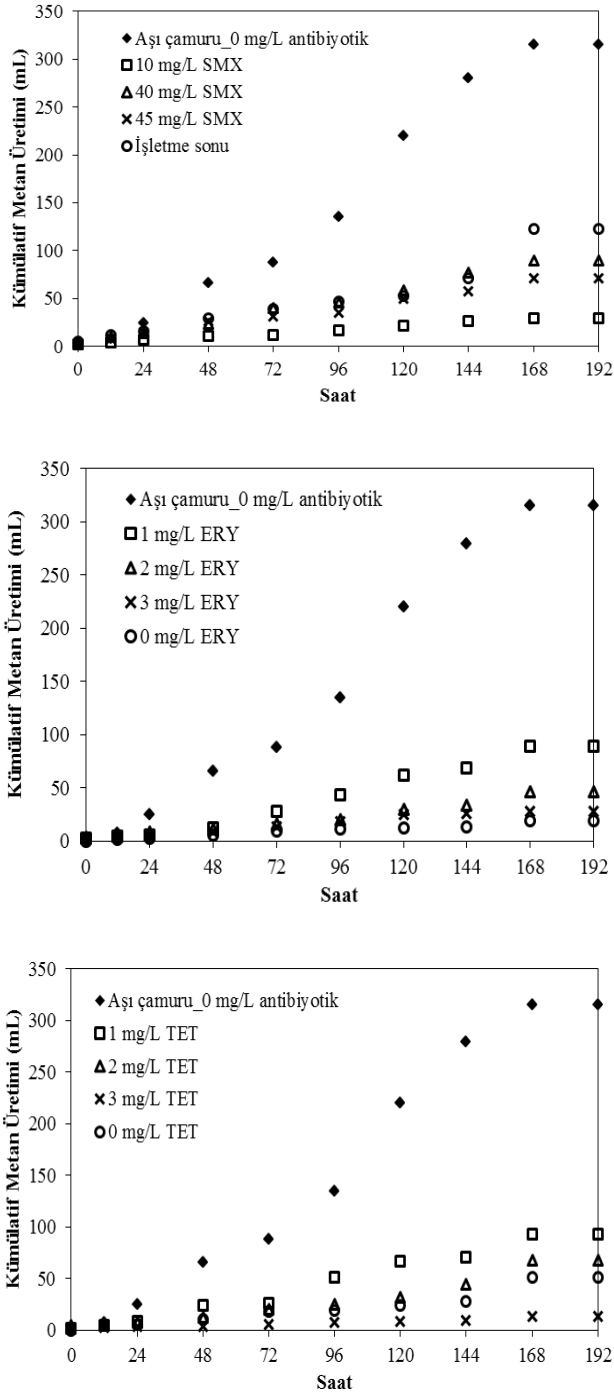
Şekil 1c’de TET reaktöründen farklı TET besleme rejimlerinde alınmış çamur numunelerinin asetoklastik KMÜ profilleri verilmiştir. 1 mg/L TET beslenen periyodun sonunda asetoklastik KMÜ değeri 55 mL olarak bulunmuştur. SMX ve ERY ile kıyaslandığında TET’in inhibisyon etkisi 1 mg/L çok daha yüksektir (%30 gaz üretimden düşüş). TET reaktörünün işletmesi boyunca alınan çamur numunelerinin asetoklastik aktivitenin kademeli olarak düştüğü gözlemlenmiştir. 3 mg/L beslemenin yapıldığı dönemin sonunda alınan çamurun KMÜ değerinde aşı çamuruna göre %58 düşüş tespit edilmiştir (23 mL). İşletmenin son döneminde laboratuvar ölçekli AAKR’ye TET beslemesi kesilmiş ve bir süre sadece sentetik atıksu ile beslenmiştir. İşletmenin sonunda alınan çamur numunesinde asetoklastik aktivitenin tekrar arttığı ve 2 mg/L TET beslenen dönemdeki aktiviteye yaklaştığı görülmüştür (43 mL). Farklı zamanlarda alınan çamur numunelerinin SMA test şişelerinde ürettikleri biyogazların metan içerikleri SMX ve ERY numunelerinin aksine TET’e maruz kalmış çamur numunelerinde değişim göstermiştir. Aşı çamurunda %70 olan metan içeriği, 1 mg/L TET konsantrasyonunda %65’e, 2 mg/L TET konsantrasyonunda %60’a ve 3 mg/L TET konsantrasyonunda ise %58’e düşmüştür. TET beslemesinin kesildiği işletmenin son döneminde alınan numunede ise metan miktarı tüm biyogaz içerisinde %63 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, TET’in asetoklastik metanojenler üzerindeki inhibisyon etkisinin dönüşümlü (reversible) olduğunu göstermiştir. Literatürde bulunan tetrasiklin grubuna ait diğer antibiyotiklerle yapılmış çalışmalarda, bu antibiyotiklerin asetoklastik metanojenler üzerindeki inhibisyon etkisi gösterilmiştir (Sanz vd., 1996; Stone vd., 2009).

*Uçucu yağ asidi (UYA) kullanımı-* Seçilmiş 3 farklı antibiyotik etken maddesinin laboratuvar ölçekli AAKR’lerin biyolojik çamurunun üzerindeki kronik inhibisyonu metanojenik (asetoklastik ve hidrogenotrofik) aktiviteleri üzerindeki etkileri ile de tespit edilmiştir. Sisteme asetatin yanı sıra propiyonat ve bütirat beslemesi yapılmış ve gaz üretimleri izlenmiştir. Elde edilen KMÜ profilleri her üç reaktörün farklı antibiyotik besleme rejimlerinde alınmış numuneler için Şekil 2’de verilmiştir.

Antibiyotik etken maddelerinden hiçbirine maruz kalmamış olan aşı çamurundan elde edilen metan üretimi 315 mL olarak bulunmuştur. Her 3 antibiyotiğin de aşı çamuru ile kıyaslandığında inhibisyon etkisi asetoklastik aktiviteye oranla çok daha fazladır. SMX ile beslenen reaktörden alınan ilk dönem çamurunun toplam metanojenik aktivitesi aşı çamuruna kıyasla %91 düşerken, asetoklastik aktivitede yalnızca %36’lık bir inhibisyon gözlemlenmiştir. SMX reaktör çamurlarının KMÜ profilleri asetoklastik KMÜ profilleri ile paralellik göstermektedir. 10 mg/L SMX beslenen dönemdeki çamurun metanojenik aktivitesi en düşük değeri verirken, işletme sonunda (45 mg/L SMX besleme rejiminin sonunda) en yüksek aktiviteye ulaşılmıştır (123 mL) ve aşı çamurunun %40’ı oranında KMÜ gözlemlenmiştir.

Sponza ve Demirden (2007) sülfonamid grubu bir başka antibiyotik olan sülfamerazin ile yaptıkları çalışmada metanojenik aktivitenin 65 mg/L sülfamerazin beslenen çamurda 2.5 kat arttığını göstermişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada 65 mg/L’den daha yüksek sülfamerazin konsantrasyonunda metanojenik aktivitede düşüş rapor edilmiştir.

Farklı zamanlarda SMX reaktöründe alınan çamur numuneleri ile kurulmuş SMA testlerinden elde edilen biyogaz kompozisyonu farklılık göstermektedir. 10 mg/L SMX ile beslenmiş çamurdan %60 metan içeren biyogaz elde edilirken, bu oran işletme sonunda %65 yükselmiştir. Asetoklastik aktivite ile kıyaslandığında elde edilen sonuçlar hidrogenotrofik metanojenlerin ve/veya homoasetojenik bakterilerin SMX’e karşı



Şekil 2. Spesifik metanojenik aktivite (SMA) testi (a) SMX reaktör çamuru, (b) ERY reaktör çamuru ve (c) TET reaktör çamuru kümülatif metan üretimi

daha duyarlı olduklarını göstermektedir. Bütirat ve propiyonat anaerobik sistemlerde metanojenler tarafından doğrudan kullanılamamaktadır. Homoasetojenik bakteriler tarafından önce asetat ve H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>'ye dönüştürülmekte ve metanojenlerin kullanımına hazır hale getirilmektedir-

ler (Speece, 1996). SMX'in bakterilerin folik asit üretimi üzerindeki bakteriyostatik inhibisyon etkisi (Sweetman, 2009) gözönünde bulundurulursa, bu çalışmadaki metanojenik aktivitenin düşüşü sadece hidrogenotrofik metanojenleri SMX'e karşı duyarlılığı ile açıklamak yeterli olmayacaktır. Fakat sistem uzun süreli işletmelerde kendini toparlamakta ve SMX konsantrasyonu artsa bile metanojenik aktivite hem asetik metanojenler hem de hidrogenotrofikler açısından yükselmektedir.

ERY reaktöründe farklı antibiyotik besleme rejimlerinde alınan çamur numunelerinin KMÜ profilleri Şekil 2b'de verilmiştir. 1 mg/L ERY beslenen çamurun KMÜ değeri 89 mL iken işletme boyunca bu değer düşmeye devam etmiş ve işletme sonunda, antibiyotik etken maddesi beslemesi kesilmesi rağmen 19 mL'ye düşmüştür. Bu değer aşı çamurunun KMÜ'sü ile kıyaslandığında metanojenik aktivitede %94'lük bir kayıp söz konusudur. Ayrıca SMA test şişelerinde ERY konsantrasyonu ile ters orantılı olarak metan içeriğinde bir düşüş gözlemlenmiştir. 1 mg/L ERY beslenmiş çamurun SMA test şişesinde ürettiği biyogazın metan içeriği %56 iken, 2 mg/L ERY beslenmiş çamurda %50, 3 mg/L ERY beslenmiş çamurda %49 ve ERY beslenmesinin kesildiği işletmenin son döneminde %48 olarak bulunmuştur. Asetoklastik aktivite ile kıyaslandığında elde edilen sonuçlar ERY'nin hidrogenotrofik metanojenler ve/veya bütirat ve propiyonat kullanan bakteriler üzerindeki inhibisyon etkisinin daha fazla olduğunu göstermektedir.

TET ile beslenmiş sistemin çamur numunelerinin KMÜ profilleri ise Şekil 2c'de verilmiştir. Aşı çamuru ile mukayese edildiğinde 1 mg/L TET ilave edilerek işletilmiş sistemin çamurun metanojenik aktivitesinde %70'lik bir düşüş gözlemlenerek 93 mL KMÜ elde edilmiştir. KMÜ değeri 2 mg/L TET beslendiği dönemde 29 mL'ye, 3 mg/L TET beslendiği dönemde ise 14 mL'ye düşmüştür. Fakat işletmenin son döneminde TET beslemesi kesilmiş ve asetik aktivitede gözlemlendiği gibi metanojenik aktivite artmış, 52 mL KMÜ elde edilmiştir. SMA test şişelerindeki metan miktarı tüm çamur numunelerinde %50 olarak tespit edilmiştir.

## Sonuçlar

Elde edilen sonuçlar her üç antibiyotik etken maddesinin anaerobik sistemler üzerindeki kronik inhibisyon etkisinin birbirinden farklı olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- SMX beslenen sistemde düşük konsantrasyonlarda inhibisyon etkisi, SMX konsantrasyonu ve işletme süresi arttıkça azalmış ve metanojenik aktivite uzun süreli işletmede artmıştır. Asetoklastik aktivitede aşı çamurundan elde edilen değerden daha fazlası işletme sonunda gözlemlenirken, metanojenik aktivitede ise işletme sonunda yaklaşık %30'luk bir artış tespit edilmiştir.
- ERY ile beslenen laboratuvar ölçekli AAKR'de alınan çamur numunelerinde ERY konsantrasyonu ile ters orantılı inhibisyon etkisi hem asetoklastik aktivitede hem de metanojenik aktivitede tespit edilmiştir. İşletmenin sonunda sisteme ERY beslemesi kesilerek bir dönem daha işletilmiş ve bu periyodun sonunda alınan çamur numunesinin KMÜ değerinin ERY ile beslenen dönemdeki daha düşük olduğu görülmüştür. ERY'nin metanojenik aktivite üzerindeki etkisi dönüşümsüz (irreversible) inhibisyon ile açıklanabilir.
- TET beslenen anaerobik sistemin metanojenik aktivitesi ise tıpkı ERY beslenen sistemde olduğu gibi antibiyotik konsantrasyonu ve işletme süresi ile ters orantılı olarak düşmüş, fakat antibiyotik beslemesi kesildiğinde metanojenik aktivite tekrar artmıştır. TET'in metanojenik aktivite üzerindeki kronik etkisi ise dönüşümlü (reversible) inhibisyon ile açıklanabilir.
- Her üç antibiyotiğin homoasetojenik ve hidrogenotrofik metanojenik aktivite üzerindeki etkisinin asetoklastik metanojenik aktiviteden fazla olduğu tespit edilmiştir.

## Kaynaklar

American Public Health Association (APHA), (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater, 21<sup>st</sup> ed., Washington, DC.

- Amin, M.M., Zilles, J. L., Greiner, J., Charbonneau, S., Raskin, L. and Morgenroth, E., (2006). Influence of the antibiotic erythromycin on anaerobic treatment of a pharmaceutical wastewater, *Environmental Science & Technology*, **40**, 3971-3977.
- Angenent, L.T., Sung, S.W. and Raskin, L., (2002). Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste, *Water Research*, **36**, 18, 4648-4654.
- Chelliapan, S., Wilby, T. and Sallis, P.J., (2006). Performance of an upflow anaerobic stage reactor (UASR) in the treatment of pharmaceutical wastewater containing macrolide antibiotics, *Water Research*, **40**, 3, 507-516.
- Colleran, E., Concannon, F., Goldem, T., Geoghegan, F., Crumlish, B., Killilea, E., Henry, M. and Coates, J., (1992). Use of methanogenic activity tests to characterize anaerobic sludges, screen for anaerobic biodegradability and determine toxicity thresholds against individual anaerobic trophic groups and species, *Water Science and Technology*, **25**, 31-40.
- Drillia, P., Dokianakis, S.N., Fountoulakis, M.S., Kornaros, M., Stamatelatos, K. and Lyberatos, K.G., (2005). On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: The example of the antibiotic sulfamethoxazole, *Journal of Hazardous Materials*, **122**, 259-265.
- Gartiser, S., Urich, E., Alexy, R. and Kummerer, K., (2007). Anaerobic inhibition and biodegradation of antibiotics in ISO test schemes, *Chemosphere*, **66**, 1839-1848.
- Griffin, M.E., McMahon, K.D., Mackie, R.I. and Raskin, L., (1998). Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. *Biotechnology and Bioengineering*, **57**, 342-355.
- Hartig, C., Storm, T. and Jekel, M., (1999). Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal wastewater by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **854**, 163-173.
- Ince, O., Anderson, G.K., Kasapgil, B., (1995). Control of organic loading rate using the specific methanogenic activity test during start-up of an anaerobic digestion system, *Water Resources*, **29**, 349-355.
- Kim, S., Eichhorn, P., Jensen, J.N., Weber, A.S. and Aga, D.S., (2005). Removal of antibiotics in wastewater: Effect of hydraulic and solid retention times on the fate of tetracycline in the acti-



- vated sludge process, *Environmental Science & Technology*, **39**, 5816-5823.
- Kummerer, K., (2004). *Pharmaceuticals in the Environment*, eds. Kummerer, K., 2<sup>nd</sup> Ed. Springer, Verlag.
- Sanz, J.L., Rodriguez, N. and Amils, R., (1996). The action of antibiotics on the anaerobic digestion process, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **46**, 587-592.
- Sedlak, D.L., Pinkston, K. and Huang, C.H., (2005). *Occurrence survey and of pharmaceutically active compounds*, Denver, CO: Awwa Research Foundation.
- Speece, R.E., (1996). *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*, Archae Press, Tennessee, USA.
- Sponza, D.T. and Demirden, P., (2007). Treatability of sulfamerazine in sequential upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB)/completely stirred tank reactor (CSTR) processes, *Separation and Purification Technology*, **56**, 108-117.
- Stockholm County Council, (2005). Environmentally classified pharmaceuticals, Miljöavdelningen (Department of the environment, [www. Janusinfo.se/miljoklassificering](http://www.Janusinfo.se/miljoklassificering)), Stockholm, Sweden.
- Stone, J.J., Clay, S.A. Zhu, Z., Wong, K.L., Porath, L.R., Spellman, G.M., (2009). Effect of antimicrobial compounds tylosin and chlortetracycline during batch anaerobic swine manure digestion, *Water Research*, **43**, 4740-4750.
- Sweetman, S.C. (eds.), (2009). *Martindale: The complete drug reference*, 36<sup>th</sup> Edition, Pharmaceutical Press, London, UK.