

# Bir zeytinyağı karasuyunun koagülasyon ve elektrokoagülasyon prosesleriyle kimyasal arıtılabilirliğinin incelenmesi

Zeynep KARTAL, Tuğba ÖLMEZ HANCI ve İdil ARSLAN ALATON\*

İTÜ İnşaat Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 34469, Ayazağa, İstanbul

## Özet

Zeytinyağı üretiminde ortaya çıkan karasuyun arıtımı yüksek biyokimyasal oksijen ihtiyacı ( $BOI_5 = 15-135$  g/L), kimyasal oksijen ihtiyacı ( $KOI = 37-318$  g/L), askıda katı madde ( $AKM = 6-69$  g/L) ve toplam fenol ( $TF = 2-5$  g/L) içeriği nedeniyle önem taşımaktadır. Zeytinyağı endüstrisi atıksuları aynı zamanda 10 g/L'yi aşan fenolik ve tannik asit içerikleri nedeniyle biyolojik olarak zor ayrışan bir yapıya sahip olup antimikrobiyal aktiviteye, başka bir deyişle toksisiteye sebep olmaktadır. Bu çalışmada, zeytinyağı karasuyundan koagülasyon ve elektrokoagülasyon yöntemleriyle organik madde giderimi hedeflenmiştir. Sönmüş kireç ( $Ca(OH)_2$ ), demir(III) klorür ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ), alum ( $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ ) ve demir bazlı ticari koagülan ve pıhtılaştırma yardımcısı kullanılarak gerçekleştirilen koagülasyon deneylerinde elde edilen en yüksek  $KOI$  ve TOK giderim verimleri, kireç ile çöktürme için pH 11'de % 49 ve % 38, demir(III) klorür ile çöktürme için pH 7.0'de 1000 mg/L  $FeCl_3$  dozajında % 44 ve % 53, alum ile çöktürme için pH 6.5'da 1500 mg/L dozajda % 40 ve % 36 ve demir bazlı ticari bir koagülan ve pıhtılaştırma yardımcısı ile çöktürme için ise % 46 ve % 43 olarak belirlenmiştir. Uygulanan kimyasal arıtma prosesleri arasında en yüksek organik madde giderimi, çelik elektrodlar kullanılarak gerçekleştirilen elektrokoagülasyonda  $KOI$  ve TOK bazında sırasıyla % 60 ve % 65 oranlarında elde edilmiştir. Elde edilen deneysel sonuçlar değerlendirildiğinde, koagülasyon ve elektrokoagülasyon arıtma proseslerinin organik karbon ve fenolik madde gideriminde yaklaşık olarak aynı düzeyde giderim sağladığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışma çerçevesinde incelenen kimyasal arıtma proseslerinin karasu ön arıtımı için uygun ve uygulanabilir yöntemler olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan aktivitesi, elektrokoagülasyon, koagülasyon, organik karbon giderimi, toplam fenol, zeytinyağı karasuyu.

\*Yazışmaların yapılacağı yazar: İdil ARSLAN-ALATON. arslanid@itu.edu.tr; Tel: (212) 285 37 86.

Bu makale, 11-13 Haziran 2008 tarihleri arasında İstanbul'da düzenlenen 11. Endüstriyel Kirlenme Kontrolü Sempozyumunda sunulan bildirilen arasından, İTÜ Su Kirlenmesi Kontrolü Dergisi'nde basılmak üzere seçilmiştir. Makale ile ilgili tartışmalar 21.08.2009 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

## Assessment of chemical treatability of olive mill wastewaters by coagulation and electrocoagulation

### Extended abstract

Olive oil industry is of vital economic importance for many Mediterranean countries, accounting for approximately 95% of the olive oil production worldwide. Generation and disposal of around 30 million m<sup>3</sup> of olive mill wastewater per year constitute a serious environmental problem for the Mediterranean Region, due to the unique features associated with this type of agro-wastewater, namely seasonal (typically between November and February) and localized production and the high organic carbon content quite resistant to biodegradation. The characteristics of olive mill wastewater generated in the small-to-medium scale companies largely depend on the type of extraction process employed -the traditional press method or the continuous, three-phase centrifugation process. Accordingly, the high and refractory organic content of olive mill wastewater varies in the range of 37 – 318 g/L chemical oxygen demand (COD), 15 – 135 g/L biochemical oxygen demand (BOD<sub>5</sub>), 6-69 g/L suspended solids and 2.5 g/L total phenolic content (TPh).

Different physical, chemical and biological processes have so far been proposed for olive mill wastewater treatment. Recently, olive mill wastewater was subjected to sequential coagulation/flocculation/sedimentation /filtration processes as well as lime treatment, resulting in 62–73% phenolics removal depending upon the process applied for olive oil extraction. More than 40% COD and about 95% oil and grease removals were obtained in these studies. Olive mill wastewater could also be partially treated via coagulation using different polyelectrolyte materials; nearly complete reduction in suspended solids was accomplished accompanied with partial reductions in COD and BOD<sub>5</sub> up to 55% and 23%, respectively. The use of conventional coagulants such as alum and ferric chloride was also reported, resulting in 90-91% total phenols and 94-95% COD removals after preliminary acid cracking. Biological treatment methods such as the activated sludge process and anaerobic digestion were also investigated, all reporting different operating problems due to the high toxicity and bio-inhibitory effect of the olive mill wastewater on heterotrophic biomass. Therefore, the elimination of polyphenolic

compounds from olive mill wastewater via appropriate chemical pretreatment methods was considered as an important criterion for toxicity reduction.

As briefly summarized above, results of previous experimental work on the treatability of olive mill wastewater, although extensive, are too diverse and conclusive, mainly because they only focus on collective parameters describing the organic carbon content of wastewater, such as COD, BOD<sub>5</sub>, etc.

Within the scope of the present experimental study, organic carbon removal from olive mill wastewater via different chemical treatment processes (coagulation and electrocoagulation) was investigated. For this purpose, hydrated lime (Ca(OH)<sub>2</sub>), ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O), alum (Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.18H<sub>2</sub>O) and commercial grade iron base coagulant and coagulant aid were employed as coagulants. Highest COD and TOC removals were obtained with lime precipitation at pH 11 as 49% and 38%, with 1000 mg/L ferric chloride at pH 7.0 as 44% and 53%, with 1500 mg/L alum at pH 6.5 as 40% and 36%, and with commercial grade iron base coagulant and coagulant aid as 46% and 43%, respectively. Highest organic carbon removal was achieved with electrocoagulation using stainless steel electrodes resulting in 60% and 65% COD and TOC abatement respectively, accompanied with 55% antioxidant activity and 52% total phenolics removals. It could be concluded that applying electrocoagulation (with stainless steel electrodes) that has recently received great interest because of its enigmatic treatment performance, resulted in considerably higher treatment performance as compared to the other chemical treatment processes due to its combinative abatement modes featuring redox reactions as well as coagulation, adsorption, precipitation and flotation.

Considering the obtained experimental results, it can be concluded that coagulation and electrocoagulation are suitable treatment options for organic carbon and phenolic matter removal from olive mill wastewater. In the light of the experimental findings, it can be inferred that all investigated chemical processes are suitable for chemical pretreatment of olive mill wastewater.

**Keywords:** Antioxidant activity, coagulation, electrocoagulation, olive mill wastewater, organic carbon removal, total phenol.

## **Giriş**

İspanya, İtalya, Yunanistan ve Türkiye, dünya zeytinyağı üretiminde ağırlıklı paya sahip olan ülkeler olarak zeytinyağı üretiminin % 95'ini gerçekleştirmektedirler. Türkiye, 2006 yılında dünya zeytinyağı üretiminin % 25'ini gerçekleştirmiştir (Ergüder vd., 2000). Zeytinyağı üretiminde kullanılan yöntemler; geleneksel presleme prosesi ve sürekli üretim prosesleri olarak sıralanmaktadır. Her iki yöntemde de üretim sonucunda pirina ve karasu gibi iki yan ürün oluşmaktadır (Oktav vd., 2001). Presleme prosesinde zeytinler, proses suyu ilavesi sonrasında yıkanmakta, ezilmekte ve yoğrulmaktadır. Elde edilen hamur daha sonra preslenerek yağ ve suya ayrılmaktadır. Son olarak, düşey santrifüj veya dekantörlerle yağ ve su kısmı ayrılmaktadır (Demichelli ve Bontoux, 1996). Sürekli üretim prosesinde presin yerini santrifüj (dekantör) almaktadır. Kullanılan dekantörün türüne bağlı olarak sürekli üretim prosesleri: a) proses suyu gerektiren ve üretim sonucunda üç faz (yağ, karasu ve pirina) oluşturan 3-fazlı proses b) proses suyu gerektirmeyen ve üretim sonucunda sadece iki faz (yağ ve pirina) oluşturan 2-fazlı proses olmak üzere iki sınıfta ele alınmaktadır. Zeytinyağı üretiminde en çok kullanılan 3-fazlı üretim prosesinde önemli miktarlarda proses suyu eklenmekte ve bu sebeple, büyük hacimlerde yağ içeriği oldukça düşük karasu oluşmaktadır. Karasuyun arıtımı, bu atığın yüksek biyokimyasal oksijen ihtiyacı ( $BOI_5 = 15-135$  g/L), kimyasal oksijen ihtiyacı ( $KOI = 37-318$  g/L), askıda katı madde ( $AKM = 6-69$  g/L) ve toplam fenol ( $TF = 2-5$  g/L) içeriği nedeniyle, çevresel ve ekotoksikolojik olarak önem taşımaktadır (Oktav vd., 2003). Zeytinyağı endüstrisi atıksuları, özellikle 10 g/L'yi aşan fenolik ve tannik asit içerikleri nedeniyle biyolojik olarak zor ayrışan bir yapıya sahiptirler (Mulinacci vd., 2001). Bununla birlikte atıksu yapısında bulunan tanninler, polifenoller ve polialkoller, antimikrobiyal aktiviteye, başka bir deyişle toksisiteye sebep olmaktadır (D'Annibale vd., 1998; Bisignano vd., 1999). Zeytinyağı atıksularının arıtımı için koagülasyon, çöktürme, filtrasyon, ultrafiltrasyon/ters osmoz, ozonlama, ve elektrokimyasal arıtma prosesleri gibi çeşitli konvansiyonel fizikokimyasal yöntemler uygulanmak-

tadır. Alum ve demir (III) klorür gibi konvansiyonel koagülanların kullanımı % 90-91 toplam fenol, % 94-95  $KOI$  giderimi ile sonuçlanabilmektedir (Sarika vd., 2005; Kestioglu vd., 2005; Paraskeva ve Diamadopoulos, 2006). Literatürde yer alan bu çalışmalarda % 95'in üzerinde yağ-gres giderimi ve aynı zamanda % 40'ın üzerinde  $KOI$  giderimleri elde edilmiştir (Aktas vd., 2001; Adhoum ve Monser, 2004). Son yıllarda ise elektrokoagülasyon prosesinin endüstriyel atıksuların arıtımında etkin (başarılı) kullanımı yüksek organik madde giderim performansı nedeniyle giderek daha fazla ilgi çekmektedir. Alüminyum ve demir elektrodların kullanıldığı elektrokoagülasyon prosesi ile karasuyun arıtılabilirliğiyle ilgili yapılan çalışmalarda kısa işletme zamanlarında yüksek toplam fenol ve  $KOI$  giderim verimlerinin elde edilmesinin mümkün olduğu belirtilmiştir (Longhi vd., 2001; İnan vd., 2004; Gotsi vd., 2005).

Bu araştırma kapsamında zeytinyağı atıksularının karakterizasyonu ve kimyasal arıtılabilirlikleri konularındaki eksiklikleri gidermeyi hedefleyen deneysel bir çalışma planlanmıştır. Bu bağlamda, zeytinyağı karasularının karakterizasyonu, kolektif çevre parametreleri ( $KOI$ , TOK gibi), toplam fenol (TF) ve polifenollerin bir göstergesi olan Antioksidan Aktivitesinin (AA) ölçümü yapılarak belirlenmiştir. Bununla birlikte sönmüş kireç ( $Ca(OH)_2$ ) çeşitli koagülanlar kullanılarak ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ,  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$  ve demir bazlı ticari bir koagülan ve pıhtılaştırma yardımcısı) koagülasyon ve farklı elektrod malzemeleri kullanılarak (paslanmaz çelik ve alüminyum) elektrokoagülasyon prosesleri ile zeytinyağı karasularının arıtılabilirliği incelenmiştir. Proses verimleri  $KOI$ , TOK, AA ve TF parametrelerindeki giderimler hesaplanarak belirlenmiştir.

## **Materyal ve metot**

### **Koagülasyon deneyleri**

Koagülasyon deneyleri 100 mL hacimli cam beherlerde sönmüş kireç ( $Ca(OH)_2$ ),  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ,  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$  ve demir bazlı ticari bir koagülan ve pıhtılaştırma yardımcısı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kireç kullanılarak yürütülen koagülasyon deneyleri pH 5-11

(kireç dozajı=150-3250 mg/L) aralığında gerçekleştirilmiştir. FeCl<sub>3</sub> ve alum kullanılarak gerçekleştirilen koagülasyon deneyleri literatürde bu koagülanların optimum pH'larında (FeCl<sub>3</sub> için pH=7 ve Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> için pH=6.5) yürütülmüştür. Demir bazlı ticari koagülan ve pıhtılaştırma yardımcısı kullanılarak gerçekleştirilen koagülasyon deneyleri ise pH 7.5'te gerçekleştirilmiştir. Koagülasyon deneylerinde sırasıyla, kireç ile pH ayarlamasının ardından 100 rpm'de 5 dak. hızlı karıştırma, 30 rpm'de 30 dak. flokülasyon ve 30 dak. çöktürme sırasıyla yürütülmüştür.

### **Elektrokoagülasyon deneyleri**

Elektrokoagülasyon deneyleri için korozyona dayanıklı cam ve polietilen (P.E. 100) malzemedan yapılmış dikdörtgen kesitli elektrokoagülasyon reaktörü (uzunluk: 34.3 cm, genişlik: 12.5 cm, yükseklik: 28.3 cm) kullanılmıştır. Reaktörde, altı adet paralel bağlı monopolar elektrod, reaktör tabanına yatay olarak 2 mm aralıklarla tamamen çözeltiye batmış durumda yerleştirilmiştir. Elektrokoagülasyon deneylerinde her biri 11.9 cm uzunluğunda, 1.02 cm çapında 38.5 cm<sup>2</sup> aktif yüzey alanına sahip 316 SS paslanmaz çelik ve alüminyum elektrodlar kullanılmıştır. Elektrokoagülatörde akım ve voltaj kontrolü dijital doğru akım güç kaynağı ile sağlanmıştır. Elektrokoagülasyon deneylerinde çalışılacak elektrolit ilave edildikten sonra numuneler reaktöre konulmuştur. Reaktörden 15'er dakikalık aralıklarla toplam 60 dak. boyunca numune alınmıştır. Elektrokoagülasyon deneylerinde elektrolit olarak NaCl (1000 ve 2500 mg/L) kullanılmıştır. Deneysel çalışmalar karasuyun orijinal pH'sında (pH<sub>o</sub>=4.6) yürütülmüştür.

### **Antioksidan Aktivitesi (AA) ölçümleri**

Arıtmaya tabi tutulmamış ve tutulmuş zeytinyağı karasuyu numunelerinde gerçekleştirilen AA analizleri, 2.45 mM potasyum persülfat ile 7 mM ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin 6-sülfonat)) reaktifinin reaksiyonu sonucu oluşan ABTS<sup>•+</sup> radikalinin maksimum absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan bu radikal pH 7.34 değerinde ve 734 nm dalga boyunda 0.700 + 0.02 cm<sup>-1</sup> absorbans vermektedir. Polifenolik bileşiklerin ABTS<sup>•+</sup> radikali ile ver-

dikleri reaksiyon sonucu absorbans değerinde meydana gelen azalma, bir referans antioksidan standardı (0-15 mM Trolox (6- hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) ile kalibre edilerek tayin edilmekte ve Trolox eşdeğeri (mg/L Trolox) olarak ifade edilmektedir (Re vd., 1999). Kimyasal arıtma öncesi ve sonrası zeytinyağı karasuyu numunelerinde gerçekleştirilen AA ölçümleri 1/10 seyreltilmiş numuneler üzerinde Novaspec II/Pharmacia LKB model spektrofotometrede ışık yolu 10 mm olan küvet kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### **Diğ er analitik yöntemler**

İncelenen karasuyun karakterizasyonunda kullanılan tüm analiz yöntemleri, KOİ hariç, Standart Yöntemlere uygun olarak yapılmıştır (APHA, 1998). KOİ ölçümlerinde ISO 6060 (1986) yöntemi kullanılmıştır. BOİ<sub>5</sub> ölçümleri modifiye edilmiş Winkler yöntemine göre yapılmıştır (APHA, 1998). BOİ<sub>5</sub> deneyleri için aşı kaynağı olarak zeytinyağı karasuyuna aklime olmuş aktif çamur kullanılmıştır. TOK ölçümleri Shimadzu marka V<sub>CPN</sub> model karbon analizörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. TF ölçümlerinde ise Folin-Ciocalteau kullanılmıştır (Box, 1983). Deneyler sırasında pH ölçümleri Orion 720A+ marka pH-metre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneylerde kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflıktadır.

### **Deneysel sonuçlar**

#### **Zeytinyağı karasuyu karakterizasyonu**

Deneysel çalışmalarda kullanılan karasu numunesi üç fazlı ekstraksiyon işlemi ile zeytinyağı üreten bir işletmeden sağlanmıştır. Bu numune bekletilmeden kullanılmıştır. Tablo 1'de karakterizasyonu verilen karasu numunesinin yağ ve gres parametre değerinin ölçüm limitlerinin altında olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum, zeytinyağı üretim prosesinin üç fazlı olmasına ve yüksek verimde zeytinyağının karasudan ayrımının sağlanmasına bağlanmaktadır.

#### **Koagülasyon deneysel çalışma sonuçları**

Şekil 1'de, sönmüş kireç (a), FeCl<sub>3</sub> (b) ve alum (c) koagülanlarının kullanımı ile elde edilen deneysel sonuçlar KOİ ve TOK giderim verimleri bazında sunulmuştur. Çalışılan her üç koagülan için, genel

Tablo 1. Karasu karakterizasyonu

Parametre	Numune
KOİ-toplam (mg/L)	39240
KOİ-450 nm filtreden süzölmüş (mg/L)	28360
TOK-toplam (mg/L)	13430
TOK-450 nm filtreden süzölmüş (mg/L)	10210
BOİ <sub>5</sub> (mg/L)	15030
Antioksidan Aktivitesi (mg/L Trolox)	29780
Toplam Fenol (mg/L)	1640
AKM (mg/L)	5310
UAKM (mg/L)	5050
pH	4.6
Yağ ve Gres (mg/L)	*
TKN (mg N/L)	6.7
NH <sub>3</sub> (mg N/L)	*
TP (mg P/L)	1.6
PO <sub>4</sub> (mg P/L)	0.8

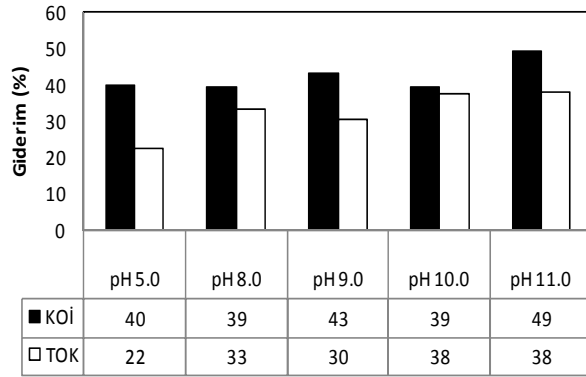
\*Analiz yöntemi ölçüm limiti altındadır.

olarak artan dozaja paralel olarak organik karbon gideriminde bir iyileşme gözlenmiştir. Öte yandan, FeCl<sub>3</sub> kullanılması durumunda elde edilen giderim verimleri 1000 mg/L'den yüksek dozlarda

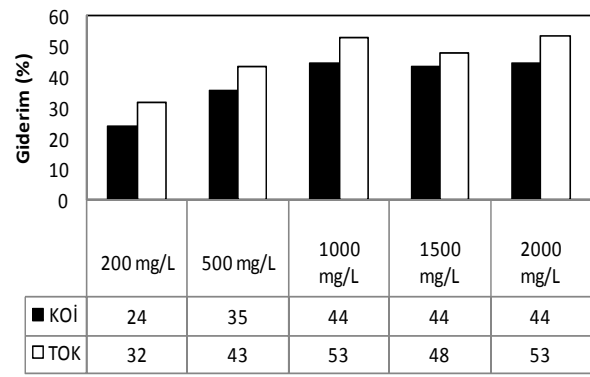
daha fazla iyileşmezken, kireç ve alum koagülanları için artan dozla birlikte gerek KOİ gerekse TOK giderimi artmaya devam etmiştir. Şekil 1'den de görüldüğü gibi KOİ ve TOK giderim verimleri paralellik göstermektedir. Bunların dışında, demir bazlı ticari formülasyona sahip koagülan ve pıhtılaştırma yardımcısı ile de arıtılabilirlik denemeleri yürütülmüştür. Demir bazlı ticari koagülan için pH 7.5'de 200, 500 ve 1500 mg/L dozlarında, pıhtılaştırma yardımcısı için ise 5 mg/L dozunda deneysel çalışma uygun görülmüştür. Organik karbon giderimi açısından ticari koagülan ile yapılan çalışmalarda en iyi sonuç, 1500 mg/L koagülan + 5 mg/L pıhtılaştırma yardımcısı karışımı için % 46 KOİ ve % 43 TOK olarak elde edilmiştir.

### Elektrokoagülasyon deneysel çalışma sonuçları

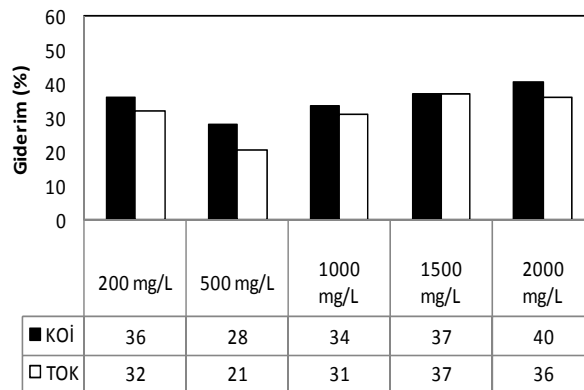
Elektrokoagülasyon, özellikle geçiş metallerin (bakır, demir) elektrod olarak kullanıldığı du-



(a)



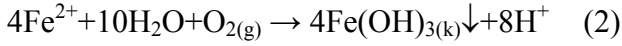
(b)



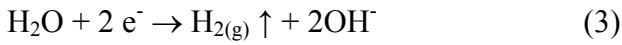
(c)

Şekil 1. Sönmüş kireç (a), demir(III) klorür (b) ve alum (c) ile yürütölen koagölasyon deneylerinde elde edilen KOİ ve TOK giderim verimleri

rumlarda, redoks reaksiyonlarını, koagülasyon-flokülasyonu ve adsorpsiyonu kapsayan, dolayısıyla oldukça karmaşık bir arıtım mekanizmasına sahip, geliştirilmekte olan bir arıtma prosesidir (Mollah vd., 2001; Chen, 2004). Koagulan, elektroliz sırasında anotta oluşturulmaktadır. Demir elektrod malzemesi kullanılan elektrokoagülasyon prosesi için anot reaksiyonu;



katot reaksiyonu;



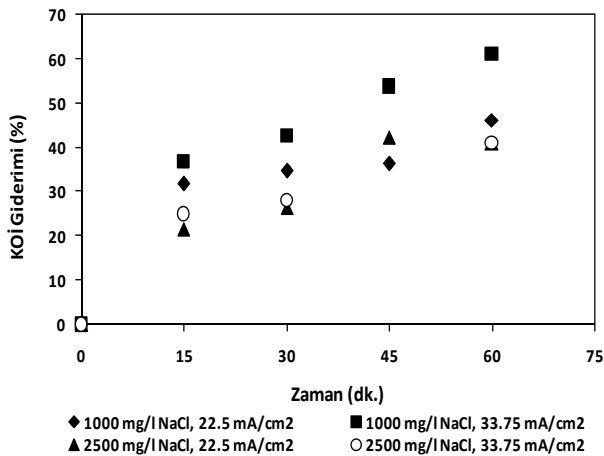
olarak verilmektedir. Oluş an OH<sup>-</sup> iyonları nedeniyle elektrokoagülasyon prosesi boyunca pH değerinde artış gözlenmektedir.

Elektrokoagülasyon üzerinde etkili olan proses parametreleri (değişkenleri), iletkenlik (reaksiyon çözeltisinin elektrolit konsantrasyonu), atık-suyun (veya reaksiyon çözeltisinin) başlangıç pH'sı ve özellikle de akım yoğunluğu olarak belirtilmektedir (Chen vd., 2000).

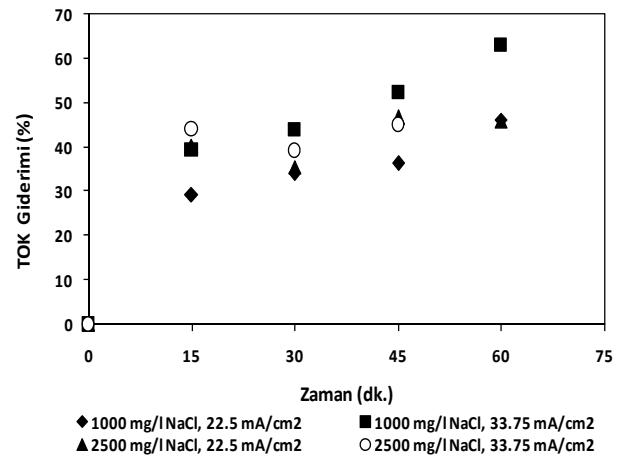
Bu proses parametreleri göz önünde tutularak, gerçekleştirilen elektrokoagülasyon deneysel çalışma sonuçları aşağıda ayrıntılarıyla verilmektedir.

*Çelik elektrodlarla elektrokoagülasyon çalışmaları* – Çelik elektrodlar kullanılarak iki farklı akım yoğunluğunda (22.50 ve 33.75 mA/cm<sup>2</sup>) ve elektrolit konsantrasyonunda (1000 ve 2500 mg/L NaCl) yürütülen elektrokoagülasyon uygulamalarından elde edilen KOİ (a) ve TOK (b) giderimleri karşılaştırmalı olarak Şekil 2'de verilmiştir. Bu çalışma kapsamında kullanılan elektrokoagülasyon işletme koşulları daha önce gerçekleştirilen ve zeytinyağı karasuyunun elektrokoagülasyon prosesi ile arıtılabilirliğinin incelendiği bir başka çalışmadan elde edilen sonuçlar dikkate alınarak seçilmiştir (Ölmez-Hancı vd., 2008). Elde edilen sonuçlar, KOİ ve TOK giderim verimlerinin akım yoğunluğundaki artışa paralel olarak artış gösterdiğini ve elektrolit konsantrasyonunun artırılması ile azaldığını göstermektedir. Bu bulgular Chen (2004) tarafından elde edilen sonuçlar ile de desteklenmektedir. Bu deneysel çalışmada en iyi organik karbon giderim verimi, 1000 mg/L NaCl ve 33.75 mA/cm<sup>2</sup> işletim koşulları için 60 dak. sonunda, % 61 KOİ ve % 63 TOK giderimi olarak elde edilmiştir. Elektrokoagülasyonun sonunda pH, reaksiyon mekanizması gereği 11 değerine yükselmiştir.

*Alüminyum elektrodlarla elektrokoagülasyon çalışmaları* – Kullanılan elektrot malzemesine bağlı olarak elektrokimyasal arıtma uygulamasının gerçekleştirildiği başlangıç pH değeri önem taşımaktadır. Giderim verimleri başlangıç



(a)



(b)

Şekil 2. Çelik elektrodlarla yürütülen elektrokoagülasyon deneyleri için farklı işletim koşullarında zamana karşı KOİ (a) ve TOK (b) giderimleri

pH'ına bağlı olduğu kadar son durumdaki pH değerlerine de bağlıdır (Casillas vd., 2007; İlhan vd., 2007). Literatürde alüminyum elektrodların kullanılması durumunda zayıf asidik (4.5-6.0) başlangıç pH değerlerinde organik madde giderme verimlerinin arttığı belirtilmiştir (Sposito, 1995). Zeytinyağı atıksu-yunun elektrokoagülasyonla arıtıldığı bir çalışmada gerek demir ve gerekse alüminyum anotlar için farklı başlangıç pH değerlerinde çalışılıp optimum pH değerlerine ulaşılmıştır. Yapılan incelemelerde başlangıç pH'ları 4.6, 6.0, 7.0 ve 9.0 olan numunelerde demir anotlar için en yüksek verimi pH 9.0 sağlarken bu değer alüminyum anotlar için pH 6.0 seviyelerindedir (İnan vd., 2004). Bu çalışma kapsamında alüminyum elektrodlar kullanılarak yürütülen elektrokoagülasyon çalışmaları literatür bilgileri göz önünde tutularak karasuyun başlangıç pH'sında (pH<sub>o</sub>=4.6) yürütülmüştür. Deneysel çalışmalarda akım yoğunluğunun ve elektrolit konsantrasyonunun proses verimi üzerine etkileri KOİ ve TOK giderimleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Alüminyum elektrodlarla yürütülen elektrokoagülasyon deneylerinde, karasuyun 1000 mg/L NaCl (elektrolit) içermesi durumunda yüksek akım yoğunluğunda akım üretilememiştir. Bununla birlikte reaktörde meydana gelen ısınma nedeniyle 2500 mg/L NaCl konsantrasyonu ve 33.75 mA/cm<sup>2</sup> akım yoğunluğunda 60 dak. arıtma süresinde çalıştırılmamış, deneysel çalışma 45 dak.'da sonlandırılmıştır. Deneysel çalışmalar sonucunda düşük elektrolit konsantrasyonunun (1000 mg/L) ve akım yoğunluğunun (22.50 mA/cm<sup>2</sup>) organik karbon giderim verimi açısından daha iyi sonuç verdiği görülmüştür (45 dak.'nın sonunda % 34 KOİ ve % 34 TOK giderimi). Elektrokoagülasyon uygulamalarının sonunda pH 10 değerine kadar çıkmıştır.

#### **Antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde giderimi**

Karasuların yüksek antioksidan aktiviteleri ve toplam fenolik madde içerikleri, bunların polifenolik yapılarından kaynaklanmaktadır. Bu aromatik yapı, zeytinyağı atıksularının biyolojik arıtmaya direnç gösteren, biyotoksik davranışlarına neden olmaktadır (Mulinacci vd., 2001). Tablo 2'de bu çalışma kapsamında incelenen arıtma proseslerinin karasuyun antioksidan akti-

vitesi (AA) ve toplam fenolik madde (TF) giderimlerini nasıl etkilediği gösterilmektedir. Tablo 2'den AA ve TF giderimlerinin her koşulda organik karbon gideriminden daha düşük olduğu görülmektedir. Aktaş ve diğerleri (2001) karasu bünyesindeki fenolik bileşiklerin kireç ile giderimi üzerine yaptıkları çalışmada, katekhin gibi iki fenolik grup içeren bileşiklerin tamamen, hem fenolik hem karboksilik grup içeren bileşikler (vanilik ve siringik asit gibi) ise kısmen giderildiklerini rapor etmişlerdir. Bununla birlikte tayrosol ve veratrik asit tekil fenolik veya karboksilik grup içeren bileşikler ise kireç kullanımı ile giderilememektedir (Aktaş vd., 2001). Tablo 2'den de görüldüğü üzere 6500 mg/L kireç dozajında AA ve TF için % 44 ve % 39 olarak elde edilen verimler katekhin, vanilik ve siringik asit gibi fenolik bileşiklerin giderimine bağlanmaktadır. FeCl<sub>3</sub> ve alum kullanılarak gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda ise AA için % 14-25, TF için ise % 18-26 aralıklarında verimler bulunmuştur. Elektrokoagülasyon prosesi ile karasuyun arıtımı çalışmalarında ise en iyi AA (% 55) ve TF (% 52) giderim verimleri çelik elektrodlarla yürütülen elektrokoagülasyon deneyinde (işletim koşulları: 1000 mg/L NaCl; 33.75 mA/cm<sup>2</sup> akım yoğunluğu; pH<sub>o</sub>=4.6) elde edilmiştir. Literatürde çelik elektrodların kullanıldığı elektrokoagülasyon uygulaması ile polifenollerin ve orto-difenollerin büyük bir kısmı giderildiği belirtilmektedir (Kyriacou vd., 2005). Bu çalışma kapsamında yürütülen deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar, Kyriacou ve diğerleri (2005) tarafından gerçekleştirilen ve yemeklik yeşil zeytin üretim atıksularının demir elektrodlar kullanılarak elektrokoagülasyon prosesi ile arıtımının incelendiği araştırma bulgularına uyum göstermektedir.

#### **En uygun arıtma koşullarında organik madde giderimi**

Tablo 3'de ham zeytinyağı karasuyunun ve arıtıma tabi tutulmuş karasu numunelerinin BOİ<sub>5</sub>, KOİ, TOK konsantrasyonları ve BOİ<sub>5</sub>/KOİ oranları verilmektedir. Arıtıma tabi tutulmuş karasu numunelerinde biyolojik arıtılabilirlik değişimleri BOİ<sub>5</sub>/KOİ oranlarının hesaplanması ile takip edilmiştir (Rozzi vd., 1998; Madoni vd., 1999). Literatürde BOİ<sub>5</sub>/KOİ oranı 0.4 değerini

Tablo 2. Karasuyun farklı koş ullarda koagülasyonu ve elektrokoagülasyonu sırasında elde edilen antioksidan aktivitesi (AA) ve toplam fenolik madde (TF) giderim verimleri

Koagülasyon	AA Giderimi (%)	TF Giderimi (%)
6500 mg/L Ca(OH) <sub>2</sub> pH 11.0	44	39
1000 mg/L FeCl <sub>3</sub> pH 7.0	14	18
1500 mg/L Alum pH 6.5	20	26
1500 mg/L polielektrolit+5 mg/L pıhtılaştırma yardımcısı-pH 7.0	25	26
Elektrokoagülasyon	AA Giderimi (%)	TF Giderimi (%)
1000 mg/L NaCl, 33.75 mA/cm <sup>2</sup> , pH <sub>0</sub> 4.6, Çelik elektrod lar	55	52
1000 mg/L NaCl, 22.5mA/cm <sup>2</sup> , pH <sub>0</sub> 4.6, Alüminyum elektrod lar	31	17

geç en atıksuların biyolojik olarak arıtılabildikleri kabul edilmektedir (Chamarro vd., 2001; Sarria vd., 2003). Koagülasyona tabi tutulmuş karasu numunelerinde BOİ<sub>5</sub>/KOİ oranları 0.45 değerinin üzerine çıkmıştır. Elektrokoagülasyon deneysel çalış malarında ise bu oranlar çelik ve alüminyum elektrod lar kullanılması durumları için sırası ile 0.63 ve 0.43 olarak bulunmuştur. Sonuç lar zeytinyağı karasuyunun biyolojik olarak arıtılabilirliğinin geliştirilmesi için çelik elektrod lar kullanılarak gerçekleştirilen elektrokoagülasyonun etkili bir kimyasal ön arıtım yöntemi olduğunu göstermektedir.

### Değerlendirme ve öneriler

Bu çalış mada bir zeytinyağı karasuyundan koagülasyon ve elektrokoagülasyon prosesleri uygulanarak organik karbon ve toplam fenol giderimleri incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda her proses için farklı işletim koş ullarında KOİ, TOK, ayrıca atıksuyun polifenolik yapısını temsil eden antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde miktarlarında meydana gelen de-

ğişiklikler ölçülmüştür. Elde edilen deneysel çalış ma sonuç ları aşağıda sıralanmıştır:

- Zeytinyağı karasuyu üzerinde farklı dozaj ve pH'larda uygulanan kireç ile çöktürme uygulamalarında en yüksek verim pH 11.0'da ( kireç dozajı = 6500 mg/L) gerçekleştirilen çöktürme sonucunda %49 KOİ, % 38 TOK, % 44 AA ve % 39 TF giderimi olarak elde edilmiştir.
- Zeytinyağı karasuyu ile farklı dozaj ve pH'larda uygulanan koagülasyon deneysel çalış malarında FeCl<sub>3</sub> kullanılması durumunda elde edilen KOİ ve TOK giderim verimleri 1000 mg/L'den yüksek dozlarda daha fazla iyileş memiş (% 44 ve % 53), alum kullanılması durumunda ise artan dozla birlikte gerek KOİ gerekse TOK giderimi artmaya devam etmiştir.
- Elektrokoagülasyon deneyleri, zeytinyağı karasuyunun kendi pH'sında farklı akım yoğunlukları, elektrolit konsantrasyonları ve elektrod malzemeleri kullanılarak yürü-

Tablo 3. Karasuyun farklı koş ullarda koagülasyonu ve elektrokoagülasyonu sırasında elde edilen BOİ<sub>5</sub>, KOİ, TOK konsantrasyonları ve BOİ<sub>5</sub>/KOİ oranları

	BOİ <sub>5</sub> (mg/L)	KOİ (mg/L)	BOİ <sub>5</sub> /KOİ Oranı	TOK (mg/L)
Ham Atıksu	15030	39240	0.38	13430
Koagülasyon				
1000 mg/L FeCl <sub>3</sub> pH 7.0	10570	21970	0.48	6310
1500 mg/L Alum pH 6.5	11600	24720	0.46	8460
Elektrokoagülasyon				
Çelik elektrod lar kullanarak 1000 mg/L NaCl; 33.75 mA/cm <sup>2</sup> pH <sub>0</sub> 4.6	9600	15300	0.63	4970
Alüminyum elektrod lar kullanarak 1000 mg/L NaCl; 22.5 mA/cm <sup>2</sup> pH <sub>0</sub> 4.6	11140	25610	0.43	8870



tülmüştür. Karasuyun kendi pH'sında, paslanmaz çelik elektrodlar kullanılarak gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda en iyi organik karbon giderim verimi, 1000 mg/L elektrolit konsantrasyonu (NaCl) ve 33.75 mA/cm<sup>2</sup> akım yoğunluğu işletim koşulları için 60 dak. sonunda, % 61 KOİ ve % 63 TOK giderimi olarak elde edilmiştir. Bu işletim koşullarında gerçekleştirilen elektrokoagülasyon uygulaması ile polifenollerin ve orto-difenollerin büyük bir kısmı ile %55 AA ve %52 TF giderimi sağlanmıştır.

Elde edilen deneysel verilerden, gerek koagülasyon gerekse elektrokoagülasyon yöntemleriyle, karasuyun organik karbon içeriğinin etkin bir şekilde, atıksuda çözülmüş olarak bulunan polifenollerin ise daha az oranda giderilebildiği sonucuna varılmıştır. Seçilen kimyasal arıtma yöntemlerinin atıksuda bulunan askıda, kolloidal ve çözülmüş organik karbon fraksiyonlarının kısmen gideriminde (ön arıtımında) önemli rol oynayabileceği açıktır.

## Teşekkür

Yazarlar, İTÜ Araştırma Fonu'na ve Türkiye Bilimler Akademisi'ne (TÜBA-GEBİP Programı) maddi destekleri için teşekkür ederler.

## Kaynaklar

Adhoum, N. ve Monser, L., (2004). Decolourisation and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater by electrocoagulation, *Chemical Engineering and Processing*, **43**, 1281-1287.

Aktas, E.S., Imre, S. ve Ersoy, L., (2001). Characterization and lime treatment of olive mill wastewater, *Water Research*, **35**, 2336-2340.

APHA., (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater, 21<sup>st</sup> Ed., Washington D.C.

Olmez-Hancı, T., Dulekgurgen, E., Arslan-Alaton, I. ve Orhon, D. (2008). Effect of chemical treatment on the aromatic carbon content and particle size distribution-based organic matter profile of olive mill wastewaters, *Fresenius Environmental Bulletin*, **17**, 11, 1790-1795.

Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N. ve Saija, A., (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol, *Journal Pharmacy and Pharmacology*, **51**, 971-974.

Box, J.D., (1983). Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters, *Water Research*, **17**, 511-525.

Casillas H.A.M., Cocke D.L. ve Gomes J.A.G., (2007) Electrocoagulation mechanism for COD removal, *Separation and Purification Technology*, **56**, 204-211.

Chamarro, E., Marco, A. ve Esplugas, S., (2001). Use of Fenton reagent to improve organic chemical biodegradability, *Water Research*, **35**, 1047-1051.

Chen, X., Chen, G. ve Yue, L. P., (2000). Separation of pollutants from restaurant wastewater by electrocoagulation, *Separation and Purification Technology*, **19**, 65-76.

Chen, G., (2004). Electrochemical technologies in wastewater treatment, *Separation and Purification Technology*, **38**, 11-41.

D'Annibale, A., Crestini, C., Vinciguerra, V. ve Giovannozzi, S.G., (1998). The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus, *Journal of Biotechnology*, **61**, 209-218.

Demichelli, M. ve Bontoux, L., (1996). Studies survey on current activity on the valorization of by-products from olive oil industry, European Commission Joint Research Center, Final Report.

Ergüder, T.H., Güven, E. ve Demirer, G.N., (2000). Anaerobic treatment of olive mill wastes in batch reactors, *Process Biochemistry*, **36**, 243-248.

Gotsi, M., Kalogerakis, N., Psillakis, E., Samaras, P. ve Mantzavinos, D., (2005). Electrochemical oxidation of olive oil mill wastewaters, *Water Research*, **39**, 4177-4187.

İlhan, F., Kurt, U., Apaydın, Ö., Arslankaya, E. ve Gönüllü, M.T., (2007). Elektrokimyasal arıtım ve uygulamaları: Katı atık sızıntı suyu çalışması, *AB Sürecinde Türkiye'de Katı Atık Yönetimi ve Çevre Sorunları Sempozyumu, TÜRKAY 2007*.

İnan, H., Dimoglo, A., Şimşek, H. ve Karpuzcu, M., (2004). Olive oil mill wastewater treatment by means of electro-coagulation, *Separation and Purification Technology*, **36**, 1, 23-31.

ISO 6060, (1986). Determination of the Chemical Oxygen Demand, International Standards Organization, Geneva, İsviçre.

Kestioglu, K., Yonar, T. ve Azbar, N., (2005). Feasibility of physicochemical treatment and advanced oxidation processes (AOPs) as a means of pretreatment of olive mill effluent (OME), *Process Biochemistry*, **40**, 2409-2416.

Kyriacou, A., Lasaridi, K.E., Kotsou, M., Balis, C. ve Pilidis, G., (2005). Combined bioremediation and advanced oxidation of green table olive proc-

- essing wastewater, *Process Biochemistry*, **40**, 1401-1408.
- Longhi, P., Vodopivec, B. ve Fiori, G., (2001). Electrochemical treatment of olive oil mill wastewater, *Annali di Chimica*, **91**, 3-4, 169-174.
- Madoni, P., Davoli, D. ve Guglielmi, L., (1999). Response of SOUR and AUR to heavy metal contamination in activated sludge, *Water Research*, **33**, 10, 2459-2464.
- Mollah, M.Y., Schennach, R., Parga, J.R. ve Cocke, D.L., (2001). Electrocoagulation (EC) - science and applications, *Journal of Hazardous Materials*, **B84**, 29-41.
- Mulinacci, N., Romani, A., Galardi, C., Pinelli, P., Giaccherini, C. ve Vincieri, F. F., (2001). Polyphenolic content in olive oil wastewaters and related olive samples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 3509-3514.
- Oktav, E., Ş engül, F. ve Ö zer, A., (2001). Zeytinyağı endüstrisi atıksularının fizikokimyasal ve kimyasal yöntemlerle arıtımı, *Ulusal Sanayi ve Çevre Sempozyumu*, Bildiriler Kitabı, 19, 25-27 Nisan 2001, Mersin.
- Oktav, E., Ç atalkaya, E.Ç. ve Ş engül, F., (2003). Zeytinyağı endüstrisi atıksularının kimyasal yöntemlerle arıtımı, *DEÜ Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, **5**, 11-21.
- Paraskeva, P. ve Diamadopoulos, E., (2006). Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **81**, 1475-1485.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., ve Rice-Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231-1237.
- Rozzi, A., Ficara, E., Cellmara, C.M. ve Bortone, G., (1998). Characterization of textile and other industrial wastewater by respirometric and titration biosensors, *The 4<sup>th</sup> International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries*, September 23-25, Istanbul, Turkey.
- Sarika, R., Kalogerakis, N. ve Mantzavinos, D., (2005). Treatment of olive mill effluents. Part II. Complete removal of solids by direct flocculation with polyelectrolytes, *Environment International*, **31**, 297-304.
- Sarria, V., Deront, M., Péringer, P. ve Pulgarin, C., (2003). Degradation of biorecalcitrant dye precursor present in industrial wastewater by a new integrated iron(III) photoassisted-biological treatment, *Applied Catalysis B:Environmental*, **40**, 231-246.
- Sposito, G., (1995). The environmental chemistry of Aluminum, 2<sup>nd</sup>. ed., Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.

## Azo boyar madde üretimi atıksuların Foto-Fenton-benzeri ileri oksidasyon prosesi ile arıtımı

Gökçe TÜRELİ\*, İdil ARSLAN ALATON, Tuğba ÖLMEZ HANCI

*İstanbul Teknik Üniversitesi, İnşaat Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 34469, Ayazağa, İstanbul*

### Özet

*Boya üretimi atıksuları içerdikleri ham maddeler, ara ürünler, yardımcı kimyasallar ve kalıntı boyalar nedeniyle yoğun renk ve yüksek kimyasal oksijen ihtiyacına sahip biyolojik olarak zor ayrışabilir nitelikte atıksulardır. Bu atıksuların çevresel özellikleri dikkate alındığında, demir bazlı fotokatalitik ileri oksidasyon prosesleri ile arıtımın iyi bir alternatif oluşturduğu görülmektedir. Bu çalışmada azo boyar madde sentez atıksularının Foto-Fenton-benzeri ileri oksidasyon prosesiyle ( $Fe^{3+}/H_2O_2/UV-A$ ) arıtılabilirliği incelenmiştir. Seçilen proses parametrelerinin (başlangıç  $Fe^{3+}$ ,  $H_2O_2$  konsantrasyonları, KOİ içeriği ve reaksiyon süresi) renk, KOİ ve TOK giderimleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, modellenmesi ve proses optimizasyonu amacıyla cevap yüzey metodu kullanılmıştır. 200 mg/L KOİ'ye sahip Asit Mavi 193 içeren sentetik asit boyar madde sentez atıksuyu için optimum işletme parametreleri; 1.5 mM  $Fe^{3+}$ , 35 mM  $H_2O_2$  ve 45 dakika reaksiyon süresi olarak bulunmuştur. Bu koşullar altında deneysel olarak elde edilen toplam renk, KOİ ve TOK giderimleri sırasıyla % 98, % 78 ve % 59'dur. Elde edilen deneysel sonuçların cevap yüzey yönteminin oluşturduğu polinomal regresyon modelinin tahminleri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Aynı model, sentetik Reaktif Siyah 39 üretimi atıksuyunun foto-Fenton benzeri oksidasyonla arıtımını da başarılı bir şekilde tanımlamıştır. Reaktif Siyah 39 ters osmoz çıkış atıksuyunun arıtımında elde edilen giderim verimleri ise model tahminlerinin oldukça altında kalmıştır. Arıtma performansındaki bu düşüşün nedeni gerçek atıksuyun yüksek Cl içeriğine bağlanmıştır. Cl iyonlarının  $\bullet OH$  radikali ile reaksiyonu sonucu ortamdaki aktif oksidan miktarı azalmakta, bu da organik madde gideriminin gerek hızını gerekse verimini düşürmektedir.*

**Anahtar Kelimeler:** *İleri oksidasyon prosesleri (İOP), azo boyar madde sentez atıksuları, Foto-Fenton-benzeri proses, cevap yüzey metodu, proses modelleme ve optimizasyon,  $\bullet OH$  radikali tutucu.*

\*Yazışmaların yapılacağı yazar: Gökçe TÜRELİ. gokceturli@gmail.com; Tel: (534) 720 05 90.

Bu makale, 11-13 Haziran 2008 tarihleri arasında İstanbul'da düzenlenen 11. Endüstriyel Kirlenme Kontrolü Sempozyumunda sunulan bildirilen arasından, İTÜ Su Kirlenmesi Kontrolü Dergisi'nde basılmak üzere seçilmiştir. Makale ile ilgili tartışmalar 21.08.2009 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

## Treatment of azo dye production effluents with Photo-Fenton-like advanced oxidation process

### Extended abstract

Dye manufacturing wastewater generally includes residual dyestuffs, dye intermediates as well as unreacted raw materials such as aromatic amines with alkyl-, halogen-, nitro-, hydroxyl-, sulfonic acid-substituents, and inorganic sodium salts. The effluent is normally characterized by a high chemical oxygen demand and intense color. The volume of the dye manufacturing wastewater is about 100-200 m<sup>3</sup>/day which is considerably low as compared with textile dye bath effluents. Several waste streams being variable in composition and strength are generated during dye synthesis activities. The COD content of the combined dye manufacturing effluent is around 2000-3000 mg/L. The BOD<sub>5</sub>/COD ratio of the wastewater is quite low, implying that it bears a considerable amount of non-biodegradable organic matter. Another risk hazard is that the dyes and dye intermediates can be reduced in the aquatic environment to produce carcinogenic compounds (i.e. naphthylamines, substituted phenylamines, benzidine analogues) under anoxic conditions. Dye manufacturing effluent may also contain free and complexed, toxic heavy metals (i.e. cobalt, chromium, copper) that result from the production of metal-complex azo dyes.

Various combinations of conventional treatment processes, including physical chemical and biochemical methods have been used for the treatment of dye manufacturing wastewater. Recent studies indicated that advanced oxidation processes (AOPs) might be a good alternative for treating recalcitrant and/or toxic pollutants. AOPs involve the production of strongly oxidizing agents, mainly hydroxyl radicals ( $\bullet\text{OH}$ ) that react rapidly and almost non-selectively with most inorganic and organic compounds including biologically-difficult-to-degrade azo dyes and dye intermediates. The advanced oxidation of dye containing wastewaters with Fenton and Photo-Fenton processes is a promising alternative because of their high efficiency in decolorization, ease of operation and relatively low treatment costs. Specially, the low volume and high recalcitrance of dye manufacturing effluent streams make them ideal candidates for Fe-based AOPs.

In the current study, the treatability of acid and reactive azo dye synthesis effluents by Photo-Fenton-like advanced oxidation process was investigated. The effect of several operating parameters ( $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations, initial effluent COD, reaction

time) on treatment efficiency for acid dye synthesis effluent bearing Acid Blue 193 was evaluated. Improvement in the color, COD and TOC abatements were observed with the increase in initial  $\text{Fe}^{3+}$  concentration, while increasing the initial  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration only enhanced the removal of TOC. Increasing the initial COD of the wastewater promoted color and COD removals whereas TOC removal efficiency obviously decreased. Hence, the proper selection of the correct reagent concentrations considering the initial organic carbon content was found to be important to achieve high treatment efficiencies. Response surface methodology was employed for optimization of the process in order to maximize percent color, COD and TOC removal efficiencies. For an initial effluent COD of 200 mg/L, optimum working conditions were established as 1.5 mM  $\text{Fe}^{3+}$ , 35 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 45 min treatment time. Under these reaction conditions, experimentally achieved color, COD and TOC removal efficiencies were found as 98%, 78% and 59%, respectively. These actual results fitted well to the model predictions. In the Photo-Fenton-like treatment of synthetic Reactive Black 39 production wastewater, experimentally obtained percent removals were slightly higher than the model predictions in terms of color and COD. On the other hand, experimentally achieved TOC abatement was lower than the predicted value, denoting that complete mineralization of Reactive Black 39 production wastewater is more difficult than that of Acid Blue 193 production wastewater. For the real dye manufacturing effluent experimentally obtained COD and TOC abatements established for optimum treatment conditions were considerably lower than the model predictions, and an appreciable retardation was observed in terms of color abatement rates. The significant decrease in the organic carbon removal efficiency was mainly attributed to the high chloride concentration ( $\text{Cl}^- = 3500 \text{ mg/L}$ ) of the real Reactive Black 39 production effluent, which caused  $\bullet\text{OH}$  scavenging reactions. The main conclusion drawn from the present study is that the Photo-Fenton-like oxidation process was found to be effective in the treatment of dye production effluents. However, it is highly recommended to determine the chloride content of the wastewater prior to application of such a photochemical process, since high chloride concentrations could have a significant adverse effect on the oxidation performance.

**Keywords:** Advanced oxidation processes (AOPs), azo dye production wastewater, Photo-Fenton-like process, response surface methodology, process modeling and optimization;  $\bullet\text{OH}$  radical scavenger.

## Giriş

Azo ve metal kompleks azo boyar maddelerin üretildiği ve tüketildiği endüstriyel atıksular, özellikle son yıllarda çevresel deşarj standartlarının Avrupa Birliği'ne uyum sürecinde yeniden ele alınması ve sıkılaştırılması kapsamında gerek biyolojik olarak inert (ayrışamaz) yapıda olmaları, gerekse anaerobik koşullarda ekotoksikolojik olarak istenmeyen birtakım metabolitlere dönüşüm potansiyeline sahip olmaları açısından dikkat çekmektedir (Chung ve Cerniglia, 1992; Kornaros vd., 2006). Azo boyar madde üretiminden kaynaklanan atıksular boya moleküllerinin yanı sıra sodyum tuzları, aromatik aminler, alkil-, halojen-, nitro-, hidroksil- tipi fonksiyonel grupları içeren aril (örneğin: benzen, naftalen) sülfonatlar gibi ara ürünleri ve üretim hammaddelerini içerir (Sarasa vd., 1998; Anonymous, 2008) Boya sentez atıksularının, asit veya reaktif boya banyo atıksularından en önemli farkı, hacimlerinin çok daha düşük (100-200 m<sup>3</sup>/gün) ve renklerinin çok daha yoğun olmasıdır.

Biyotoksik ve inert endüstriyel kirleticilerin etkin gideriminde ve detoksifikasyonunda, organik maddelerin hidroksil radikali ( $\bullet$ OH) ile oksidatif arıtımına dayanan İleri Oksidasyon Prosesleri (İOP) giderek önem kazanmaktadır (Carneiro vd., 2007). Boya sentez atıksularının çevresel özellikleri dikkate alındığında, fotokimyasal ve demir bazlı ileri oksidasyon prosesleri, bu tür atıksuların arıtımında sıkça kullanılan kimyasal koagülasyon-flokülasyon yöntemine ciddi bir alternatif oluşturmaktadır.

Bu deneysel çalışmada farklı proses aşamalarından temin edilen asit ve reaktif azo boyar madde sentez atıksularının Foto-Fenton-benzeri İOP ile arıtılabilirliği incelenmiştir.

## Materyal ve yöntemler

### Azo boyar madde sentez atıksuları

Bu çalışmada sentetik asit boyar madde (Asit Mavi 193; AB 193) ve reaktif boyar madde (Reaktif Siyah 39; RB 39) sentez atıksuları (reaktör yıkama suları) ve reaktif boyar madde (RB 39) sentezi ters osmoz çıkış suyu ile çalışılmıştır. Seçilen oksidan, katalizör gibi kritik proses

parametrelerinin optimizasyonunda cevap yüzey yöntemi kullanılmıştır.

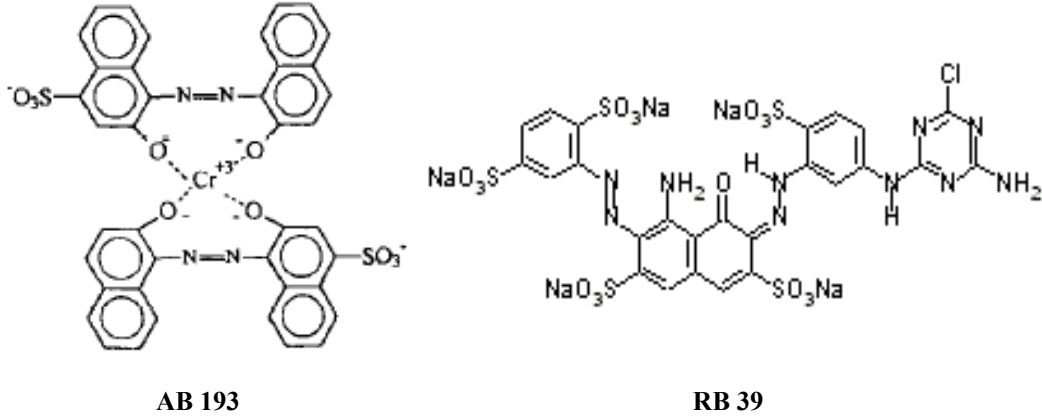
Krom kompleks disazo boyar madde AB 193 ile disazo boyar madde RB 39'un molekül yapıları Şekil 1'de gösterilmektedir. Çalışmada asit boyar madde sentez atıksuyu, 100, 150, 200, 250 ve 300 mg/L KOİ eşdeğerinde sulu çözeltileri halinde hazırlanmıştır. Reaktif boyar madde atıksuyu ise 200 mg/L KOİ eşdeğerinde olacak şekilde hazırlanmıştır. Asit boyar madde atıksuyunun incelenecek KOİ aralığı, bu konuda yapılmış bilimsel literatüre ve ham boyar madde numunesinin temin edildiği fabrikadaki proses koşullarına göre seçilmiş olup, Cevap Yüzey Metodu ise söz konusu KOİ aralığı değerlerini belirlemiştir. Reaktif boyar madde (RB 39) sentezi ters osmoz çıkış suyu ise atıksu KOİ değerinin bu aralıkta yer alması için 1:3 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Tablo 1'de boya sentez atıksularının karakterizasyonu verilmektedir.

Foto-Fenton-benzeri reaktanını oluşturmak amacıyla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ağırlıkça % 35) ve Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O (stok çözeltisi hazırlanarak) kullanılmış, reaksiyona girmeyerek ortamda kalan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ise katalaz enzimi (kaynağı: *Micrococcus lysedicticus*, 100181 AU/mL) ile parçalanmıştır. Reaksiyona girmeden kalan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in yaklaşık konsantrasyonu Quant (Merck) test stripleri ile tespit edilmiştir. Oluşan Fe(OH)<sub>3</sub> çökeltisi, çözeltiden por çapı 0.45 µm olan Sartorius filtre kâğıtları ile ayrılmıştır.

### Foto-Fenton deneylerinin yürütülmesi

Foto-Fenton-benzeri oksidasyonu deneyleri, 100 mL'lik reaksiyon çözeltileri ile pH = 2.8 (Fenton ve Fenton-benzeri oksidasyon için en uygun pH değeri), T=20°C'de, farklı Fe<sup>3+</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarında ve farklı KOİ eşdeğerindeki atıksularla yürütülmüştür.

Foto-Fenton-benzeri deneylerinde  $2.6 \times 10^{-5}$  Einstein/dak. ışık akısına sahip 150 W gücünde (maks. emisyon bandı = 360 nm) bir UV-A siyah ışık lamba kullanılmış ve deney düzeneği iç yüzeylerinden üçü ayna ile kaplı bir kutu içerisine yerleştirilmiştir. Deney süresince, magnetik karıştırıcılar ile yeterli karışım sağlanmıştır. Oksidasyon reaksiyonunda istenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve



Şekil 1. AB 193 ve RB 39 boyar maddelerinin molekül yapıları

Tablo 1. Azo boyar madde sentez atıksularının karakterizasyonu

Parametre	Sentetik AB 193 sentez atıksuyu (KOİ = 200 mg/L)	Sentetik RB 39 sentez atıksuyu (KOİ = 195 mg/L)	RB 39 sentezi ters osmoz çıkış suyu (KOİ = 165 mg/L)
Absorbans, $\lambda_{maks}$ (cm <sup>-1</sup> )	576 nm'de 3.512	611 nm'de 9.310	611 nm'de 4.792
TOK (mg/L)	65	72	66
Cl <sup>-</sup> (mg/L)	130	190	3500
pH	6.0	6.0	5.8

Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O konsantrasyonları H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stok çözeltisinden (10.29 M) ve %10'luk Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O stok çözeltisinden elde edilmiştir. Reaksiyon süresince 0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45 ve 60. dakikalarda 25 mL'lik numuneler alınmıştır. Reaksiyonu durdurmak için her bir numuneye konsantre NaOH çözeltisi (pH = 9-10 olacak şekilde) eklenmiştir. İkinci pH ayarı oluşan Fe(OH)<sub>3</sub>'in çökmesi için pH = 7-8 olacak şekilde 0.01-0.50 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile yapılmıştır. Çöken Fe(OH)<sub>3</sub>, 0.45 µm por çaplı Sartorius filtre kâğıtlarıyla süzölmüş; reaksiyona girmeden kalan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KOİ ölçümlerinde pozitif hata oluşturmaması için katalaz enzimi ile parçalanmıştır. Ayrıca katalaz enzimi ilavesinden kaynaklanabilecek KOİ ve TOK hatalarını engellemek için aynı miktarda katalaz distile suya eklenmiş ve "katalaz kontrol numunesi" olarak analiz sonuçlarında değerlendirilmiştir. Alman numunelerin renk, KOİ ve TOK parametreleri ölçülmüştür.

#### Analitik yöntemler

Renk (absorbans) ölçümleri asit boyar madde (AB 193) sentezi atıksularında 576 nm, reaktif

boyar madde sentezi atıksularında ise 611 nm dalga boyunda, Novespec II/Pharmacia LKB model kolorimetre ile 1 cm cam küvetler kullanılarak yapılmıştır. Sentetik asit ve reaktif boyar madde sentez atıksularında numunelerin KOİ değerleri ISO 6060 kapalı reflaks titrimetrik yöntemine göre ölçülmüştür (ISO 6060 1986). Reaktif boyar madde sentezi ters osmoz çıkış suyunda KOİ ölçümü, yüksek klorür içeriği (3500 mg/L) nedeniyle, DIN 38 409 H 41-2 açık reflaks titrimetrik yöntemine göre yapılmıştır (Deutsche Normen 1980). TOK ölçümleri Shimadzu marka V<sub>PCN</sub> model organik karbon cihazı ile yapılmış, pH ölçümünde ise Thermo Orion 520 model pH-metre kullanılmıştır.

#### Bulgular ve tartışma

##### Sentetik AB 193 sentez atıksuyunun Foto-Fenton-benzeri proses ile arıtımı

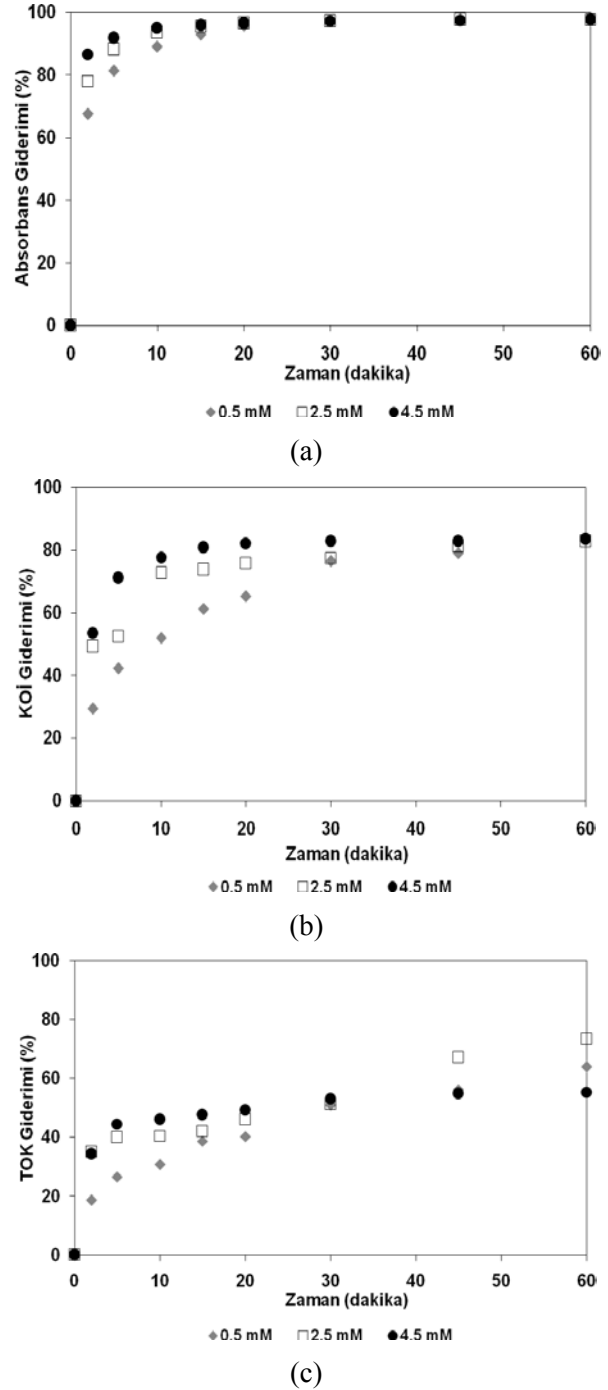
- Fe<sup>3+</sup> konsantrasyonunun etkisi: Fe<sup>3+</sup> konsantrasyonunun Foto-Fenton prosesi üzerindeki katalitik, hızlandırıcı etkisi bilinmektedir (Arslan Alaton ve Teksoy 2007). Şekil 2'de, sentetik AB193 sentez atıksuyu için üç farklı Fe<sup>3+</sup> kon-

santrasyonunda (0.5, 2.5 ve 4.5 mM) Foto-Fenton-benzeri proses ile arıtımında zamana karşı renk (a), KOİ (b) ve TOK (c) giderimleri sunulmuştur. Renk için her üç  $Fe^{3+}$  konsantrasyonunda birkaç dakikalık süre içerisinde % 90'lara varan hızlı bir giderim gözlenirken, KOİ ve özellikle mineralizasyonu temsil eden TOK parametreleri için giderim daha yavaş ve az olarak bulunmuştur. Ayrıca  $Fe^{3+}$  konsantrasyon etkisi de KOİ ve TOK parametreleri için daha belirgin görülmektedir. Bu da atıksuyun kromofor içeriğinin daha kolay parçalanırken, oksidasyon ve özellikle mineralizasyonun daha zor olarak gerçekleştiğinin açık bir göstergesidir. Yaklaşık 30 dak. sonra renk ve KOİ giderimleri neredeyse durma noktasına gelirken, TOK giderimi, özellikle 2.5 mM  $Fe^{3+}$  konsantrasyonu için devam etmektedir. Örneğin, 2.5 mM  $Fe^{3+}$  konsantrasyonunda KOİ = 200 mg/L,  $H_2O_2$  = 45 mM, pH = 2.8 için 1 saatlik reaksiyonun sonunda renk, KOİ ve TOK parametreleri için sırasıyla % 98, % 83 ve % 74 giderim verimleri elde edilmiştir.

-  $H_2O_2$  konsantrasyonunun etkisi: Foto-Fenton ve Fenton-benzeri proseslerde oksidan olarak kullanılan  $H_2O_2$ 'in artırılmasının, ileri oksidasyon hızından ziyade oksidasyonun verimini olumlu yönde etkilediği bilimsel çalışmalarda ispatlanmıştır (Arslan Alaton ve Teksoy 2007). Şekil 3'te, Sentetik AB 193 sentez atıksuyunun Foto-Fenton-benzeri proses ile arıtımında  $H_2O_2$  konsantrasyonunun (25, 45 ve 65 mM) renk (a), KOİ (b) ve TOK (c) giderimleri üzerindeki etkileri sunulmuştur.

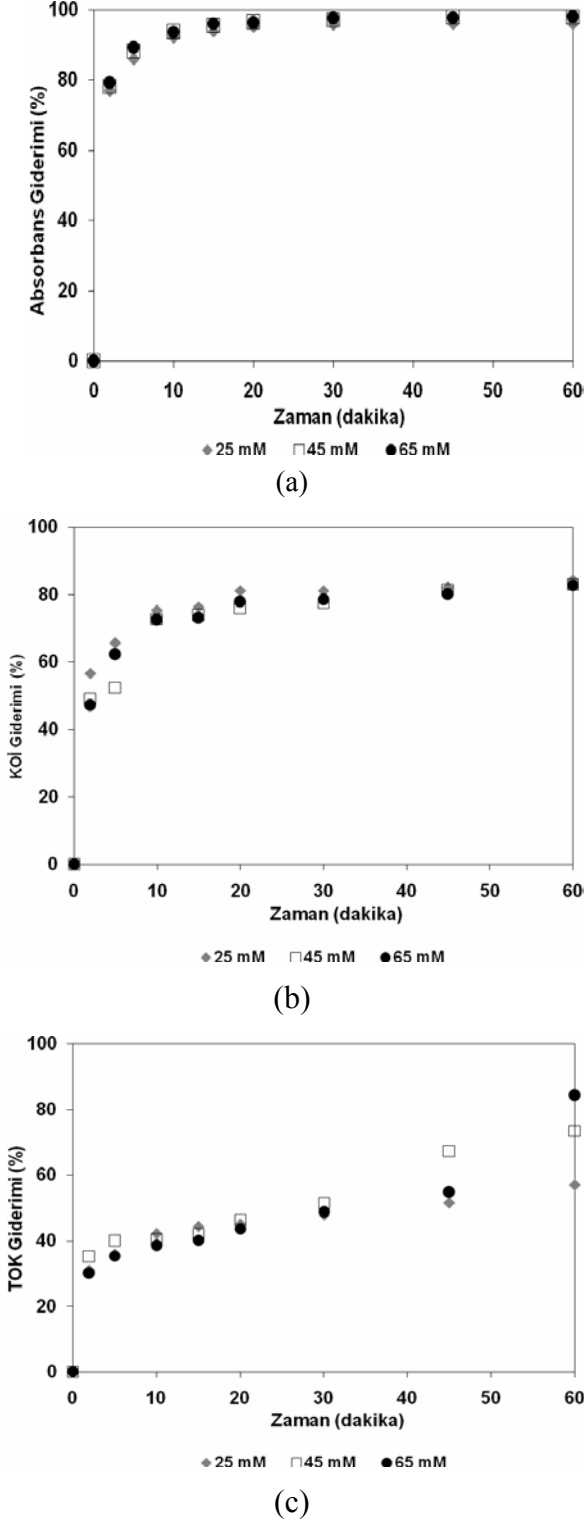
Şekil 3'ten, artırılan  $H_2O_2$  başlangıç konsantrasyonunun renk ve KOİ parametreleri üzerinde etkili olmadığı, fakat giderilmesi daha zor olan ve ileri oksidasyon prosesinin daha geç evrelerinde hızlanan TOK parametresi üzerinde olumlu bir etkisi bulunduğu anlaşılmaktadır. Deneysel sonuçlardan, çalışılan en düşük  $H_2O_2$  konsantrasyonunun dahi renk ve KOİ gideriminde yeterli olduğu (sınırlayıcı olmadığı) açıktır. TOK giderim profilleri incelendiğinde ise özellikle 30 dakikadan sonra artan  $H_2O_2$  konsantrasyonunu ile mineralizasyonun tekrar hızlandığı, oluşan organik ara ürünlerinin mineralizasyon ürünlerine ayrışması için daha fazla oksidana ihtiyaç duyulduğu görülmektedir. Örneğin, 60

dakikanın sonunda 25, 45 ve 65 mM  $H_2O_2$  konsantrasyonu için (KOİ = 200 mg/L,  $Fe^{3+}$  = 2.5 mM, pH = 2.8) sırasıyla % 57, % 74 ve % 84 TOK giderimi elde edilmiştir.



Şekil 2. Sentetik AB 193 sentez atıksuyunun Foto-Fenton-benzeri proses ile arıtımında  $Fe^{3+}$  konsantrasyonunun % renk (a), KOİ (b) ve TOK (c) giderimleri üzerindeki etkisi

Deneysel koşullar: KOİ = 200 mg/L,  $H_2O_2$  = 45 mM, pH = 2.8



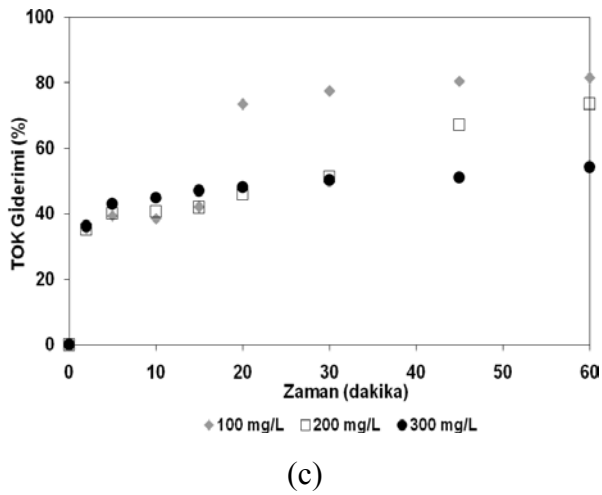
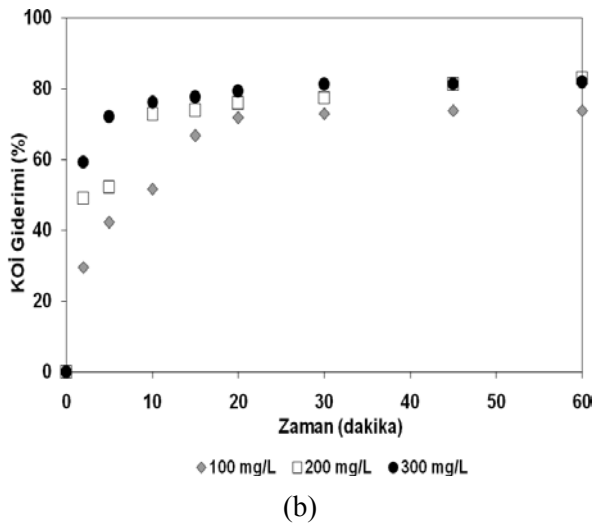
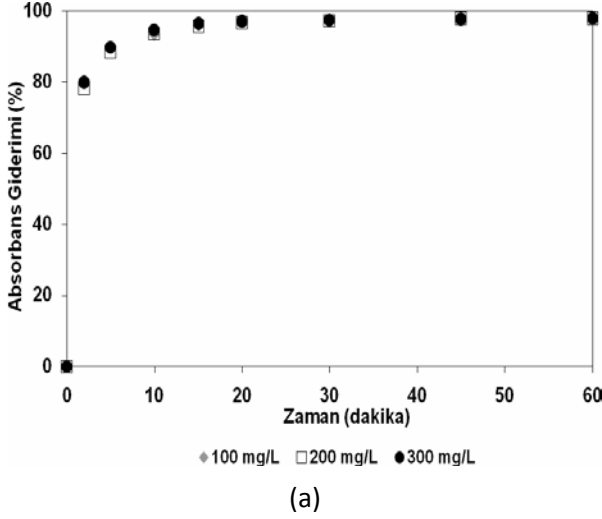
Şekil 3. Sentetik AB 193 sentez atıksuyunun Foto-Fenton-benzeri proses ile arıtımında  $H_2O_2$  konsantrasyonunun % renk (a), KOİ (b) ve TOK (c) giderimleri üzerindeki etkisi  
DeneySEL koşullar: KOİ = 200 mg/L,  $Fe^{3+}$  = 2.5 mM, pH = 2.8

- *KOİ içeriğinin etkisi*: İleri oksidasyon proseslerinde, kullanılan oksidan ve katalizörlerin reaksiyon ortamında yeterli derecede bulunmaları koşulunda “yalancı birinci dereceden kinetik model” uygulanabilmektedir. Bu durumda, artan KOİ, TOK veya kirletici konsantrasyonu ile oksidasyon hızının artış göstermesi beklenmektedir. Yapılan deneysel çalışmalar, artan kirletici yüküyle, ileri oksidasyon hızının yavaşladığı (Balcıoğlu ve Arslan, 2001), giderim verimlerinin olumsuz etkilendiğini göstermiştir ki bu sonuç, oksidanın bu çalışmalarda hız sınırlayıcı olduğu, başlangıçta belirlenen koşulların geçerli olmadığı, dolayısıyla yalancı birinci dereceden kinetik yaklaşımının uygulanamayacağı anlamına gelmektedir. Şekil 4’te, seçilen  $Fe^{3+}$  ve  $H_2O_2$  konsantrasyonlarının renk ve KOİ giderimleri açısından her üç başlangıç KOİ değeri için yeterli olduğu, artan KOİ değeri ile renk ve KOİ giderim hızlarının artış gösterdiği görülmektedir. Şekil 4 (c)’den, giderimi daha güç olan TOK parametresi için ise çalışılan  $Fe^{3+}$  ve  $H_2O_2$  konsantrasyonlarının 200 mg/L ve özellikle de 300 mg/L KOİ için artık hız sınırlayıcı olduğu, başka bir deyişle 100 mg/L KOİ için elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında yetersiz kaldığı anlaşılmaktadır.

### Cevap yüzey metodu ile Foto-Fenton-benzeri proses optimizasyonu çalışmaları

Azo boyar madde sentez atıksuyunun Foto-Fenton-benzeri proses ile arıtımında optimum işletme parametrelerinin belirlenmesi için cevap yüzey metodu (response surface methodology) kullanılmıştır. Yüzey cevap metodu bir işletim sisteminde problemlerin analiz edilmesi ve modellenmesi için, deneysel faktörler ile bağımlı değişkenler arasında bağıntılar kuran matematiksel ve istatistik tekniklerden oluşur (Myers ve Montgomery, 2002). Söz konusu yöntem, çok sayıda giriş değişkeninin (bağımsız değişken) bir ya da birkaç ölçülen yanıtı (bağımlı değişken) etkilediği durumlarda, elde edilecek yanıtları öngörebilecek uygun yaklaşım fonksiyonlarını bulmak ve optimum işletme koşullarını oluşturmak amacıyla kullanılır. Bu yöntem ile optimum işletme koşulların belirlenmesinde en az sayıda deney yapılmakta, böylece zaman ve kimyasal madde tasarrufu sağlanmaktadır (Alima vd., 2008).





Şekil 4. Sentetik AB 193 sentez atıksuyunun Foto-Fenton-benzeri proses ile arıtımında numunenin başlangıç KOİ değerinin renk (a), KOİ (b) ve TOK (c) giderimleri üzerindeki etkisi Deneysel koşullar:  $Fe^{3+} = 2.5 \text{ mM}$ ,  $H_2O_2 = 45 \text{ mM}$ ,  $pH = 2.8$

Bu çalışmada sentetik AB 193 sentez atıksuyunun Foto-Fenton-benzeri proses ile arıtımında işletme parametrelerinin arıtma verimi üzerindeki etkisi cevap yüzey metodu ile tespit edilmiştir. İncelenen parametreler (bağımsız değişkenler); başlangıç  $Fe^{3+}$  ve  $H_2O_2$  konsantrasyonları, numunenin başlangıç KOİ değeri ve reaksiyon süresi olmak üzere dört adettir. Yanıtlar (bağımlı değişkenler) ise renk, KOİ ve TOK giderim verimleri olarak belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle bağımsız değişkenlerin deneysel aralıkları ön denemelere ve bilimsel çalışmalara dayanarak belirlenmiş ve bu aralıkları baz alan bir deney planı oluşturulmuştur. Daha sonra elde edilen deneysel sonuçlar kullanılarak yanıt değişkenlerini (renk, KOİ ve TOK giderim verimleri) bağımsız değişkenler cinsinden ifade eden 2. dereceden polinom denklemleri çıkarılmıştır.

Foto-Fenton-benzeri prosesin optimizasyonunda renk, KOİ ve TOK giderimlerini maksimize etmek hedeflenmiştir. Buna göre 200 mg/L KOİ eşdeğerindeki sentetik AB 193 sentez atıksuyu için optimum işletme parametreleri; 1.5 mM  $Fe^{3+}$ , 35 mM  $H_2O_2$  ve 45 dakika reaksiyon süresi olarak elde edilmiştir. Modelin prosesi tanımlamadaki başarısını görmek amacıyla belirlenen optimum koşullarda bir deney yürütülmüştür. Elde edilen deneysel sonuçlar, model tarafından öngörülen giderim verimleri ile birlikte Tablo 2'de sunulmaktadır.

Tablo 2. Sentetik AB 193 sentez atıksuyunun optimum koşullarda Foto-Fenton-benzeri proses ile arıtımında model tarafından öngörülen ve deneysel olarak elde edilen arıtma verimleri

Yanıtlar (%)	Model Tahminleri	Deneysel Sonuçlar
Renk giderimi	99	98
KOİ giderimi	81	78
TOK giderimi	60	59

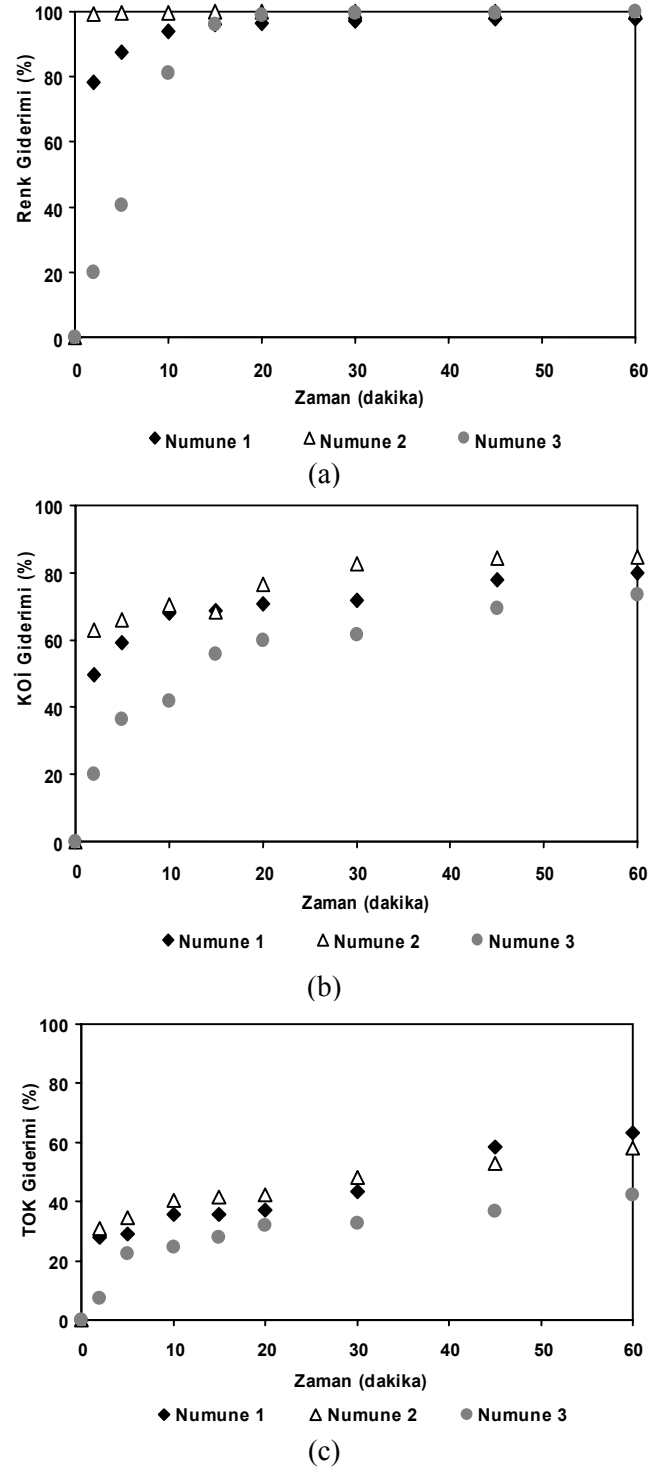
Yukarıdaki tablodan anlaşılacağı üzere optimum koşullarda deneysel olarak elde edilen renk, KOİ ve TOK giderimleri, model yaklaşım fonksiyonları kullanılarak hesaplanan değerlere oldukça yakındır. Bu sonuçlar yüzey cevap metodunun sistem performansını tahmin etme konusunda etkili bir araç olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma kapsamında, sentetik RB 39 sentez atıksuyu ile RB 39 sentezi ters osmoz çıkış suyunun da Foto-Fenton-benzeri oksidasyon ile arıtımı incelenmiştir. Oksidasyon deneylerinde asit boyar madde sentez atıksuyu için belirlenen optimum reaktan konsantrasyonları (1.5 mM  $Fe^{3+}$  ve 35 mM  $H_2O_2$ ) kullanılmıştır. Bu koşullarda üç adet atıksu numunesi için deneysel olarak elde edilen zamana karşı renk, KOİ ve TOK giderimleri Şekil 5(a-c)'de verilmektedir. Şekillerde Numune 1, sentetik AB 193 sentez atıksuyunu; Numune 2, sentetik RB 39 sentez atıksuyunu; Numune 3 ise RB 39 sentezi ters osmoz çıkış suyunu temsil etmektedir. Ayrıca en uygun işletme koşullarında (1.5 mM  $Fe^{3+}$ , 35 mM  $H_2O_2$  ve 45 dakika reaksiyon süresi) reaktif boyar madde sentez atıksuları için elde edilen giderim verimleri model tarafından öngörülen giderim verimleri ile karşılaştırılmalı olarak Tablo 3'te sunulmaktadır.

Şekil 5(a)'da görüldüğü gibi en hızlı renk giderimi sentetik RB 39 sentez atıksuyunda en yavaş giderim ise aynı boyar maddenin sentezi sırasında oluşan ters osmoz çıkış suyuna aittir. KOİ ve TOK giderim grafiklerine bakıldığında en düşük giderim verimlerinin yine ters osmoz çıkış suyunda elde edildiği görülür. Tablo 3'te görüldüğü üzere sentetik RB 39 sentez atıksuyu için optimum koşullarda deneysel olarak elde edilen renk ve KOİ giderimleri model tahminlerinden hafifçe yüksektir. TOK giderimi ise model tarafından öngörülen değer altındadır. Daha önce de bahsedildiği üzere giderim verimlerini tahmin etmede kullanılan model yaklaşım fonksiyonları sentetik AB 193 sentez atıksuyu için çıkartılmıştır. Dolayısıyla reaktif boyar madde atıksuyunda tahmin edilen TOK giderim verimine ulaşamamasının sebebi, RB 39 boyar maddesinin mineralizasyonunun AB 193'e göre daha zor olması olabilir.

RB 39 sentezi ters osmoz çıkış suyunun arıtma verimleri incelendiğinde deneysel olarak elde edilen KOİ ve TOK giderimlerinin model tahminlerinin oldukça altında kaldığı görülmektedir. 45 dakikalık optimum reaksiyon süresi sonunda model tarafından öngörülen renk giderimi elde edilmesine rağmen giderim hızındaki yavaşlama Şekil 4a'da açıkça görülmektedir. Proses performansındaki bu düşüşün gerçek atık-

suyun yüksek klorür içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Tablo 1).

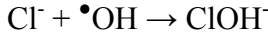


Şekil 5. Azo boyar madde sentez atıksularının optimum işletme koşullarında Foto-Fenton-benzeri proses ile arıtımında zamana karşı % renk (a), KOİ (b) ve TOK (c) giderimleri Deneysel koşullar:  $Fe^{3+} = 1.5$  mM,  $H_2O_2 = 35$  mM,  $pH = 2.8$

Tablo 3. Reaktif boyar madde sentezi atıksularının optimum koşullarda Foto-Fenton-benzeri proses ile arıtımında model tarafından tahmin edilen ve deneysel olarak elde edilen giderim verimleri

Yanıtlar (%)	Sentetik RB 39 sentez atıksuyu (KOİ <sub>0</sub> = 195 mg/L)		RB 39 sentezi ters osmoz çıkış suyu (KOİ <sub>0</sub> = 165 mg/L)	
	Model tahminleri	Deneysel sonuçlar	Model tahminleri	Deneysel sonuçlar
Renk giderimi	99	100	100	100
KOİ giderimi	82	84	84	69
TOK giderimi	61	53	70	37

Sudaki klorür iyonları asidik pH'ta •OH radikalleri ile aşağıda gösterilen şekilde reaksiyona girmektedir (Kiwi vd., 2000; Evgenidoua vd., 2007).



$$\text{pH} = 2-3 \text{ 'te } k_{\bullet\text{OH},\text{Cl}^-} = 3.0 \times 10^9 (\text{L mol}^{-1} \text{ s}^{-1})$$

Bu reaksiyon sonucu ortamda bulunan •OH radikal miktarı azalmakta, dolayısıyla organik madde oksidasyon verimi düşmektedir (Kiwi vd., 2000; Evgenidoua vd., 2007).

Foto-Fenton-benzeri oksidasyon deneylerine ek olarak sadece UV-A fotolizi, sadece H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV-A ve Fe<sup>3+</sup>/UV-A kullanılarak kontrol deneyleri yürütülmüş ve bu prosesler ile takip edilen kollektif çevre parametrelerinde çok önemsiz azalmalar kaydedilmiştir. Doğrudan (karanlık) Fenton-benzeri proses ile elde edilen renk ve KOİ giderim verimleri ise Foto-Fenton-benzeri proses yakın olmakla birlikte, karanlık prosesteki TOK giderim verimi daha düşüktür. Fenton-benzeri proseste 60 dakika sonunda elde edilen TOK giderimi % 44 olup Foto-Fenton-benzeri proses aynı süre sonunda % 63'lük bir TOK giderimi sağlamıştır.

### Değerlendirme ve öneriler

Bu çalışmada, sentetik asit boyar madde ve reaktif boyar madde sentez atıksuları ile reaktif boyar madde sentezi ters osmoz çıkış atıksuyunun Foto-Fenton-benzeri proses ile arıtılabilirliği incelenmiştir. Seçilen proses parametreleri (başlangıç Fe<sup>3+</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonları, numunenin başlangıç KOİ değeri ve reaksiyon süresi) sentetik asit boyar madde (AB 193) sentez atıksuyu için cevap yüzey metodu kullanıla-

rak optimize edilmiştir. Deneysel çalışmadan elde edilen sonuçlar şunlardır:

- Yapılan deneysel çalışmalar, artan Fe<sup>3+</sup> konsantrasyonu ile renk, KOİ ve TOK parametre giderimlerinde genel olarak bir iyileşme, artan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu ile sadece TOK gideriminde iyileşme, artan atıksu başlangıç KOİ değeri ile renk ve KOİ giderimlerinde hız artışı, TOK giderimi için ise ciddi bir yavaşlama gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan, oksidan ve katalizör konsantrasyonlarının atıksuyun başlangıç organik karbon içeriğine bağlı olarak dikkatle optimize edilerek seçilmesi gerektiği anlaşılmıştır.
- Cevap yüzey metoduna göre 200 mg/L KOİ'ye sahip sentetik AB 193 sentez atıksuyu için optimum işletme parametreleri; 1.5 mM Fe<sup>3+</sup>, 35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 45 dakika reaksiyon süresi olarak belirlenmiştir.
- Optimum koşullarda model tarafından öngörülen giderim verimleri % 99 renk, % 81 KOİ ve % 60 TOK giderimi şeklindedir. Optimum koşullar altında yürütülen deney sonucunda elde edilen giderimler (% 98 renk, % 78 KOİ ve % 59 TOK), model tahminlerine oldukça yakındır. Deneysel sonuçlar ile model tahminleri arasındaki bu uyum, modelin proses performansını tahmin etmekteki başarısını göstermektedir.
- Sentetik reaktif boyar madde sentez atıksuyu ve reaktif boyar madde ters osmoz çıkış suyu da optimum proses koşullarında Foto-Fenton-benzeri oksidasyona tabi tutulmuştur. Sentetik RB 39 sentez atıksuyu ile yürütülen deney sonucunda elde edilen renk ve KOİ giderimleri model tahminle-

rinin biraz üstünde olup, TOK giderimi ise altında kalmıştır. Buradan RB 39'un tam mineralizasyonunun boyanın kimyasal yapısına bağlı olarak AB 193'e göre daha zor olduğu sonucu çıkarılabilir.

- RB 39 sentez atıksuyunun Foto-Fenton-benzeri oksidasyon ile arıtımında optimum işletme koşullarında elde edilen KOİ ve TOK giderimleri model tahminlerinden düşük olup, renk giderimi hızında da belirgin bir azalma görülmüştür. Proses performansındaki azalmanın sebebi numunenin yüksek klorür içeriği nedeniyle meydana gelen ileri oksidasyon inhibisyonudur.
- Deneysel sonuçlar, Foto-Fenton-benzeri prosesinin, asit ve reaktif boyar madde sentez atıksularından renk, KOİ ve TOK gideriminde etkin bir arıtma performansı sergilediğini göstermektedir. Ancak söz konusu fotokimyasal arıtımın uygulanmasından önce, boya sentez atıksuyunun klorür içeriğinin belirlenmesi önerilir.

## Teşekkür

Yazarlar, atıksu numunelerini temin eden ve bize numuneler hakkında bilgi veren Dr. Rezzan Karaaslan'a (SETAŞ Kimya) teşekkür ederler. Bu proje, İTÜ Araştırma Fonu Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

## Kaynaklar

Alima, M.A., Leeb, J.H., Akohb, C.C., Choic, M.S., Jeona, M.S., Shina, J.A., Lee, K.T., (2008). Enzymatic transesterification of fractionated rice bran oil with conjugated linoleic acid: Optimization by response surface methodology, *LWT-Food Science and Technology*, **41**, 764-770.

Anonymous, (2008). <http://www.answers.com/topic/diazotization>. Sci-Tech Encyclopedia, Diazotization.

- Arslan-Alaton, İ., Teksoy, S., (2007). Acid dye bath effluent pretreatment using Fenton's reagent: Process optimization, reaction kinetics and effects on acute toxicity, *Dyes and Pigments*, **73**, 31-39.
- Balcıoğlu, I.A., Arslan, İ., (2001). Partial oxidation of reactive dyestuffs and synthetic textile dye bath by the O<sub>3</sub> and O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes, *Water Science and Technology*, **43**, 221-228.
- Carneiro, P.A., Nogueira, R.F.P., Zanoni, M.V.B., (2007). Homogeneous photodegradation of C.I. Reactive Blue 4 using a photo-Fenton process under artificial and solar irradiation, *Dyes and Pigments*, **74**, 127-132.
- Chung, K.T., Cerniglia, C.E., (1992). Mutagenicity of azo dyes: structure-activity relationship, *Mutation Research*, **77**, 201-220.
- Deutsche Normen, (1980). Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H), Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) im Bereich über 15 mg/L (H41), DIN 38 409 H 41-2, Almanya.
- Evgenidoua, E., Konstantinou, I., Fytianos, K., Poulou, I., (2007). Oxidation of two organophosphorous insecticides by the photo-assisted Fenton reaction, *Water Research*, **41**, 2015-2027.
- ISO 6060 (1986). Determination of the Chemical Oxygen Demand (COD). International Standards Organization, Geneva, İsviçre.
- Kiwi, J., Lopez, A., Nadochenko, V., (2000). Mechanism and kinetics of the OH<sup>-</sup> radical intervention during Fenton oxidation in the presence of a significant amount of radical scavenger (Cl<sup>-</sup>), *Environmental Science and Technology*, **34**, 2162-2168.
- Kornaros, M., Lyberatos, G., (2006). Biological treatment of wastewaters from a dye manufacturing company using a trickling filter, *Journal of Hazardous Materials*, **136**, 95-102.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., (2002). Response Surface Methodology: Process and Product Optimization using Designed Experiments. 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, USA.
- Sarasa, J., Roche, M.P., Ormad, M.P., Gimeno, E., Puig, A., Ovelheiro, J.L., (1998). Treatment of a wastewater resulting from dyes manufacturing with ozone and chemical coagulation, *Water Research*, **32**, 2721-2727.

## Kâğıt endüstrisi atıksularında anaerobik mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi

Şükriye ÇELİKKOL<sup>1\*</sup>, Bahar KASAPGİL İNCE<sup>2</sup>, Mustafa KOLUKIRIK<sup>1,3</sup>, Zeynep ÇETECİOĞLU<sup>1</sup>, Orhan İNCE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> İTÜ İnşaat Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 34469, Ayazağa, İstanbul

<sup>2</sup> Boğaziçi Üniversitesi, Çevre Bilimleri Enstitüsü, 34342, Bebek, İstanbul

<sup>3</sup> İTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 34469, Ayazağa, İstanbul

### Özet

*Bu çalışmada, kâğıt endüstrisi atıksularını arıtan gerçek ölçekli bir anaerobik kontak reaktörün 3 farklı yüksekliğinden 2 farklı zamanda alınan çamur numunelerinin mikrobiyal komünite yapıları Denatüran Gradyan Jel Elektroferez (DGGE) yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. 2 aylık izleme dönemi içinde sistem 2 hafta süreyle bakıma alınmıştır. Kontak reaktörün 1.6-1.8 kg KOİ/m<sup>3</sup>.gün organik yükleme hızında, KOİ giderim verimi % 47-55, metan üretim verimi 0.18-0.20 m<sup>3</sup>CH<sub>4</sub>/kgKOİ<sub>giderilen</sub> aralığında değişmiştir. DGGE analizleri sonucu, arkeyal popülasyona ait 31, bakteriyel popülasyona ait 57 farklı tür tespit edilmiştir. Arkeyal popülasyona ait 3 farklı tür Ağustos 2005'te tespit edilememiş, buna karşın 6 yeni tür gözlenmiştir. Bakteriyel popülasyonda ise Temmuz 2005 numunesine ait 10 farklı tür Ağustos 2005 numunesinde tespit edilemezken Ağustos 2005'te 10 yeni türün varlığı gözlenmiştir. Bu çalışmada incelenen reaktöre ait asetoklastik metan üretim kapasitesi önceki bir çalışmada Spesifik Metan Aktivite (SMA) test düzeneği kullanılarak ölçülmüş ve potansiyel metan üretiminin yaklaşık % 45 azaldığı tespit edilmiştir. Sistemde bulunan metanojenlerin ve Sülfat İndirgeyici Bakterilerin (SRB) tür ve sayıları Floresanlı Yerde Hibritleme (FISH) yöntemi ile belirlenmiştir. SMA testi ve FISH tekniği ile tespit edilen mikrobiyal komünite değişimi DGGE yöntemi ile de doğrulanmıştır. DGGE yöntemi, iki farklı zamanda alınan numunelere ait komünite değişimini açıkça yansıtmakla birlikte sayısal değerlendirmede yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, anaerobik reaktörlerin mikrobiyal komünite yapılarının gerek DGGE gibi detaylı kalitatif sonuç veren gerekse FISH gibi mikroskopik sayıma dayalı, kültürden bağımsız yöntemlerle çalışılması gerektiği sonucuna varılmıştır.*

**Anahtar Kelimeler:** Denatüran gradyan jel elektroforezi, arkeyal popülasyon, bakteriyel popülasyon, anaerobik kontak reaktör, kâğıt endüstrisi atıksuları.

\*Yazışmaların yapılacağı yazar: Şükriye ÇELİKKOL. celikkolsu@itu.edu.tr; Tel: (212) 285 72 55.

Bu makale, 11-13 Haziran 2008 tarihleri arasında İstanbul'da düzenlenen 11. Endüstriyel Kirlenme Kontrolü Sempozyumunda sunulan bildirilen arasından, İTÜ Su Kirlenmesi Kontrolü Dergisi'nde basılmak üzere seçilmiştir. Makale ile ilgili tartışmalar 21.08.2009 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

## Determination of the microbial community in pulp and paper mills effluents

### Extended abstract

*The use of anaerobic technologies in the fields of wastewater treatment, sludge stabilization, bioremediation and management of hazardous and solid wastes has grown in importance during the last few decades. Although the general processes occurring in anaerobic biological wastewater treatment plants, such as hydrolysis, fermentation, acetogenesis, methanogenesis and sulfidogenesis are well understood, the microbial community responsible for these conversions is often considered as a black box. Physical and chemical parameters only give rough estimations about the operational conditions of the system. Therefore, understanding the biodiversity and the dominant species of the microbial community is of great importance in studying contaminant degradation pathways, optimizing treatment processes, and improving removal efficiencies of engineer-designed systems.*

*The culture dependent methods used for the investigation of the biomass are not sufficient for the identification of the complex microbial diversity in wastewater treatment systems. The use of the culture-independent methods in microbial ecology allowed the determination of the complex microbial populations and community contents more representatively. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) is a Polymerase Chain Reaction (PCR) dependent method used for the electrophoretic separation of the 16S rDNA genes due to the difference in the nucleotide sequences. The separation is observed as an individual band on the DGGE gel. Every DGGE band represents a single species and the DGGE pattern gives the fingerprint of that community. Since DGGE technique allows the analysis of many samples simultaneously and gives rapid results, the use of DGGE is getting extensive in the investigation of bioreactors and natural ecosystems which inhabit rich microbial diversity.*

*In the context of this study, a full-scale anaerobic contact reactor treating pulp and paper mills effluents was investigated. Samples were taken from*

*3 different levels at 2 different times. There was a 2-week off-period of the reactor between sampling times. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) was used for the fingerprinting of the microbial community in the sludge samples. Performance of the reactor in terms of COD removal efficiency and methane yield varied between 47% and 55% and 0.18 and 0.20 m<sup>3</sup>CH<sub>4</sub>/kgCOD<sub>removed</sub> at Organic Loading Rates (OLRs) in a range of 1.6-1.8 kg COD/m<sup>3</sup>day, respectively. DGGE analysis revealed that 31 species from archaeal population and 57 species from bacterial population were present in the anaerobic reactor. 3 species from the archaeal population were not detected in August 2005 whereas 6 species were newly observed. In bacterial population, 10 species belonging to July 2005 samples were not detected where 10 other species were found in August 2005.*

*Acetoclastic methanogenic activity of the reactor had previously been investigated by specific Methanogenic Activity (SMA) test. A decrease of 45% in the potential methane production was observed during the monitoring period of 2 months. The quantities and species of methanogens and Sulfate Reducing Bacteria (SRB) in the reactor were determined by Fluorescent In Situ Hybridization (FISH). Parallel to SMA results, the quantities of SRB and methanogens were decreased in August 2005. The shift in the microbial community observed by SMA test and FISH quantifications were supported by DGGE analysis. During the monitoring of 2 months, 2 weeks shut-down of the anaerobic reactor might have caused activity loss and microbial community change. DGGE allows the comparison of microbial communities taken from the anaerobic reactor at two different sampling times and FISH informs quantities of present microbial species in the reactor. However, DGGE does not give numerical information but clearly depicts the community shift. Therefore, it is concluded that, the microbial community structures of anaerobic reactors should be determined by culture independent methods of both qualitative and quantitative techniques such as DGGE and FISH respectively.*

**Keywords:** *Denaturing gradient gel electrophoresis, archaeal population, bacterial population, anaerobic contact reactor, pulp and paper mills effluents.*

## Giriş

Endüstriyel atıksuların anaerobik arıtımı son yıllarda giderek yaygınlaşmaktadır (Lettinga vd., 1980). Gerçek ölçekli arıtma tesislerinde, anaerobik reaktörün fiziksel ve kimyasal işletme koşulları optimum değerler arasında tutulmasına rağmen sistem performansının ve stabilitesinin sürekliliğinin sağlanmasında zorluklar yaşanabilmektedir. Sistem performansında ve stabilitesinde gözlenen değişimler, fiziksel ve kimyasal işletme parametrelerinin yanı sıra mikrobiyal komünite yapısının ve aktivitesinin de takip edilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır (Gilbride vd., 2006). Anaerobik arıtma, fermentatif, asetojen ve metanojen mikroorganizmaların sintrofik ilişkilerine dayalı olarak gerçekleşen bir prosestir (Roest vd., 2005). Ayrıca, sülfat varlığında, sülfat indirgeyici bakteri (SRB) popülasyonları anaerobik sistemlerde asetojenlerle organik asitler ve etanol, metanojenlerle ise H<sub>2</sub>, asetat ve metanol gibi karbon ve elektron kaynakları için yarış halindedirler (Stams vd., 2003). Farklı metabolik kapasitelere sahip mikrobiyal gruplar arasındaki etkileşimin belirlenmesi ve dengede tutulması, anaerobik sistem performansının sürekliliğinin sağlanmasında büyük önem arz etmektedir.

Biyokütlenin incelenmesinde kullanılan kültüre dayalı yöntemler, atıksu arıtma sistemlerinde mevcut zengin mikrobiyal çeşitlilik sebebiyle yaygın olarak kullanılamamaktadır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'na dayalı, kültürden bağımsız bir moleküler yöntem olan Denatüran Gradyan Jel Elektrofrezisi (DGGE), mikrobiyal ekolojide, farklı nükleotid dizilimlerine sahip 16S rDNA genlerinin elektroforetik olarak ayrılması amacıyla kullanılmaktadır. DGGE sonucu oluşan her bant, numunede bulunan bir türü temsil etmekte ve o numuneye özgü parmak izini vermektedir. DGGE ile birçok numunenin aynı anda analiz edilebilmesi ve hızlı sonuç alınabilmesi sebebiyle özellikle biyoreaktör ve ekosistem gibi zengin biyoçeşitliliğe sahip ortamların incelenmesinde yaygınlaşan bir yöntemdir (Muyzer ve Smalla, 1998).

Bu çalışmada, kâğıt endüstrisi atıksularını arıtan gerçek ölçekli bir anaerobik kontak reaktörün 3

farklı kademesinden (aşağıdan yukarı doğru 4 m, 8 m ve 12 m) 2 farklı zamanda alınan çamur numunelerinin arkeyal ve bakteriyel komünite yapıları DGGE yöntemi ile karşılaştırılmıştır. DGGE sonuçları, daha önceki bir çalışmada, SRB ve metanojenik *Arke* popülasyonlarının kompozisyonlarının, miktarlarının, ve aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla uygulanan FISH ve Spesifik Metan Aktivite (SMA) testi sonuçları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

## Materyal ve yöntem

### Anaerobik kontak reaktörün özellikleri

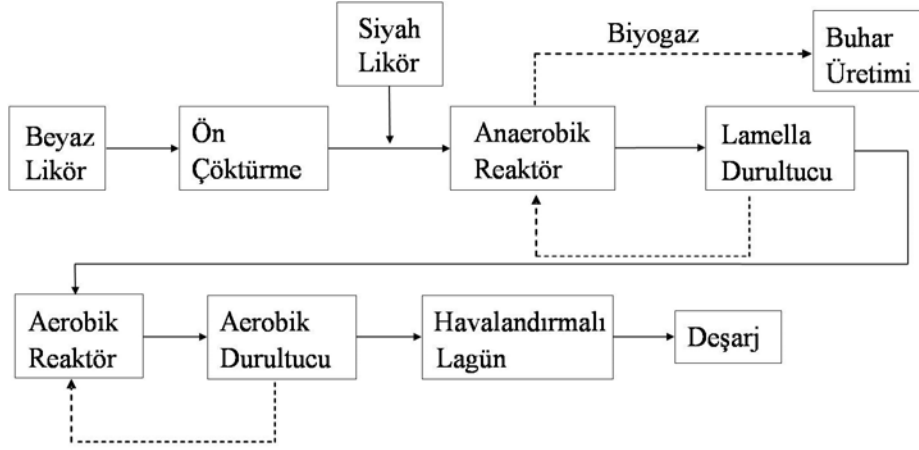
Şekil 1'de Kâğıt endüstrisine ait iki kademeli anaerobik-aerobik biyolojik atıksu arıtma tesisinin akım şeması verilmiştir. Tesis, iki kademeli anaerobik-aerobik biyolojik arıtma sistemine sahiptir. Anaerobik kontak reaktörün toplam hacmi 10000 m<sup>3</sup> ve toplam yüksekliği 16 m'dir. Atıksu girişi anaerobik kontak reaktöre alttan besleme ile yapılmaktadır. Reaktördeki sıcaklık ve pH sırasıyla 34–37°C ve 6.4–7.5 değerlerinde tutulmaktadır. Alkalinite, 1300-1500 mg/L CaCO<sub>3</sub>, COD:N:P oranı 176:5:1, hidrolik bekleme süresi (HBS) 4 gündür.

### Atıksu özellikleri

Kâğıt endüstrisi atıksu arıtma tesisine beyaz ve siyah likör olmak üzere iki farklı içerikte atıksu gelmektedir. Kâğıt makinelerinden kaynaklanan beyaz likör, 7300–7900 mg/L aralığında KOİ değerine sahiptir. Tesisten 2000 m<sup>3</sup>/gün debiyle çıkan beyaz likör ön çöktürmeye maruz bırakılmaktadır. Saman kaynaklı siyah likörün KOİ değeri 11700–13300 mg/L aralığında değişmektedir. Siyah likör, 500 m<sup>3</sup>/gün debi ile çıkmakta ve ön çöktürmeye tabi tutulmamaktadır. Dengeleme tankında karıştırılan beyaz ve siyah likörler, 2500 m<sup>3</sup>/gün debi, 8200–9000 mg/L KOİ, 850–950 mg/L SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ve pH 5.6-6.6 ile anaerobik reaktöre verilmektedir.

### Genomik DNA ekstraksiyonu ve 16S rRNA genlerinin PCR ile çoğaltılması

DNA ekstraksiyonu için reaktörün 4 m, 8 m and 12 m yüksekliklerinden 2 farklı zamanda (3 Temmuz 2005 ve 21 Ağustos 2005) üç paralel numune alınmış ve -20°C'de saklanmıştır. Nu-



Şekil 1. Kâğıt endüstrisi atıksu arıtma tesisi akış diyagramı

mune alma tarihleri arasında iki hafta boyunca reaktör bakım amacıyla çalıştırılmamıştır.

Fast DNA Spin Kit for Soil (Qbiogene Inc., İngiltere) ekstraksiyon kitinin önerdiği protokole uygun olarak 0.2 mL çamur numunesinden genomik DNA çıkartılmıştır. Çıkartılan genomik DNA'dan *Arke* ve *Bakterilere* özgü 16S rDNAlar PCR ile çoğaltılmıştır.

PCR'da kullanılan primerler ve bağlanma sıcaklıkları Tablo 1'de verilmiştir. Duyarlılığı ve özgüllüğü arttırmak amacıyla, arkeyal ürünlerin çoğaltılmasında yuvalanmış PCR uygulanmıştır. Arkeyal 16S rDNA ilk olarak Arch46f ve Arch1017r primerleri ile çoğaltılmıştır. Çoğaltma, 50 µL reaksiyon hacminde 200 ng DNA, 10 pmol primer çifti, 10 mM deoksiniükleozit trifosfat, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µL 10× *Taq* tampon çözeltisi ve 2U *Taq* DNA polimeraz (Fermentas, Letonya) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Yuvalanmış PCR'ın ikinci aşamasında, ilk turda elde edilen PCR ürünleri kalıp olarak kullanmış ve arkeyal 16S rDNA'nın V3 bölgesini hedefleyen Arch344f-Univ522r primer çifti ile çoğaltılmıştır. Diğer PCR bileşenlerinde herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. PCR amplifikasyonu, Techne TC-412 (Barloworld Scientific Ltd., İngiltere) marka PCR makinesinde, ilk denatürasyon 94°C'de 5 dak. olmak üzere 30 döngü denatürasyon 94°C'de 1 dak., bağlanma 1 dak., uzama 72°C'de 1 dak. ve son uzama 72°C'de 10 dak. olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PCR

ürünleri, %1 (w/v) agaroz jelin 1× Tris–asetat–EDTA tampon çözeltisinde (40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA; pH 8.0), 7 V cm<sup>-1</sup> de elektroforez (Thermo-Scientific Ltd., İngiltere) sisteminde yürütülmüştür. Etidyum bromür ile boyanmış agaroz jel görüntüleri Chemi-Smart 3000 jel dökümantasyon sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) kullanılarak kaydedilmiştir.

### Denatüran gradyan jel elektroforezi (DGGE)

*Arke* ve *Bakterilere* ait komünite profilleri, Arch344f\_GC-Univ522r ve Bact341f\_GC-Bact534r primerleri (Muyzer vd.,1993) kullanılarak çoğaltılan PCR ürünlerinin DGGE analizleri yapılarak elde edilmiştir. 10 µl PCR ürünü, yükleme boyası (distile suda %0.25 bromofenol mavisi, %0.25 ksilen siyanol FF, %15 Ficoll) ile karıştırılarak %10 poliakrilamid jelde (akrilamid–*N,N'*-metilenbisakrilamid oranı 37.5:1) 1x TAE tampon çözeltisi içinde (40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA; pH 8.0) yürütülmüştür. Akrilamid jelde üre ve formamid kullanılarak %30-60 denatüran eşdeğeri kimyasal gradyan oluşturulmuştur (100% denatüran 7 M üre ve %40 (v/v) formamid içermektedir). Jellerin normalizasyonunu sağlamak amacıyla arkeyal ve bakteriyel klon kütüphanelerinden elde edilmiş 16S rDNA karışımından oluşan bir işaretleyici, jelin başına ve sonuna yüklenmiştir. Elektroforez, D-Code sistemi kullanılarak (Bio-Rad Laboratories Ltd., İngiltere) 200 V sabit akımda 60°C'de 4.5 saat boyunca devam etmiştir. Akrilamid jeller SybrGold (1:10000 seyrelti;



Tablo 1. PCR amplifikasyonunda kullanılan primerler

Primer	Hedef	Deney aşaması	Bağlanma sıcaklığı (°C)	Konum <sup>1</sup>	Kaynak
Bact341f_GC <sup>2</sup> Bact534r	Bakteriyel 16S rDNA	DGGE	55	341–357 534–518	Muyzer ve diğerleri, 1993
Arch46f Arch1017r	Arkeyal 16S rDNA	Yuvalanmış PCR'ın ilk aşaması	40	46–61 1017–999	Øvreas ve diğerleri, 1997 Barns ve diğerleri, 1994
Arch344f_GC <sup>2</sup> Univ522r		DGGE	53	344–358 522–504	Raskin ve diğerleri, 1994 Amann ve diğerleri, 1995

<sup>1</sup>*Escherichia coli* numaralama sistemi.

<sup>2</sup>Arch344f ve Bact341f'e ait 5'-GC kuyrukları:

(GCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGACGGGG).

Molecular Probes Inc., İngiltere) ile boyandıktan sonra Chemi-Smart 3000 jel dökümantasyon sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) kullanılarak görüntülenmiştir.

Jel görüntüleri, Bionumerics 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belçika) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Bantlar arasındaki benzerlikler (varlık - yokluk ve bant şiddeti) Dice katsayısı ( $S_D$ ) kullanılarak hesaplanmıştır. Dice katsayısı kullanılarak yapılan analizlerde bant konum toleransı % 0.7 olarak uygulanmıştır.

## Sonuçlar ve değerlendirme

### Anaerobik kontak reaktörün performansı

Anaerobik kontak reaktörünün 1.6 - 1.8 kg KOİ/m<sup>3</sup>.gün aralığında değişen Organik Yükleme Hızında (OYH) 5 aylık izleme periyodundaki performansından % 47 - % 55 aralığında değişen KOİ giderim veriminin ve 0.18 - 0.20 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/kg KOİ<sub>giderilen</sub> aralığındaki metan üretim veriminin sağlandığı görülmektedir. KOİ giderim verimi, literatürde kâğıt endüstrisi atıksularını arıtan anaerobik kontak reaktörler için verilen değer aralığının (% 40-80) alt sınırı içinde kalmakla birlikte (Savant vd., 2005; Rintala vd., 1999) metan verimi, kâğıt endüstrisi atıksularını arıtan anaerobik reaktörler için literatürde verilen değerlerin (0.08-0.16 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/kg KOİ<sub>giderilen</sub>) üstündedir (Savant vd., 2005; Rintala vd., 1999). Anaerobik reaktöre uygula-

nan OYH aralığı, literatürde kâğıt endüstrisi atıksularını arıtan anaerobik kontak reaktörler için verilen değer aralığının (0.5-5 kg KOİ/m<sup>3</sup>.gün) alt sınırı içinde kalmaktadır (Savant vd., 2005; Rintala vd., 1999). HBS, literatürdeki uygulamalarda 0.5-5 gün aralığında tanımlanmıştır (Savant vd., 2005; Rintala vd., 1999). Kontak reaktörün çalıştırıldığı 4 günlük HBS literatürdeki başarılı uygulamalar için verilen değer aralığındadır. Reaktörde sıcaklık, pH ve KOİ/N/P oranı sırasıyla 34–37°C, 6.4–7.5 ve 176:5:1, optimum değer aralıklarında tutulmaktadır. 0.15–0.17 g KOİ/g UAKM. gün olarak uygulanan F/M oranı, anaerobik reaktörlere uygulanan 0.5–1 g KOİ/g UAKM. gün aralığındaki tipik F/M oranlarının oldukça altındadır (Speece, 1996). Anaerobik reaktörlerde, F/M oranının artırılmasının metan aktivitesi (Sponza vd., 2002) ve KOİ giderim verimi üzerinde olumlu etkileri olduğu daha önce rapor edilmiştir (Sponza vd., 2002; Ince vd., 1995; Ince vd., 2004; Baier ve Delavy, 2005).

### Denatüran gradyan jel elektroforezi (DGGE) sonuçları

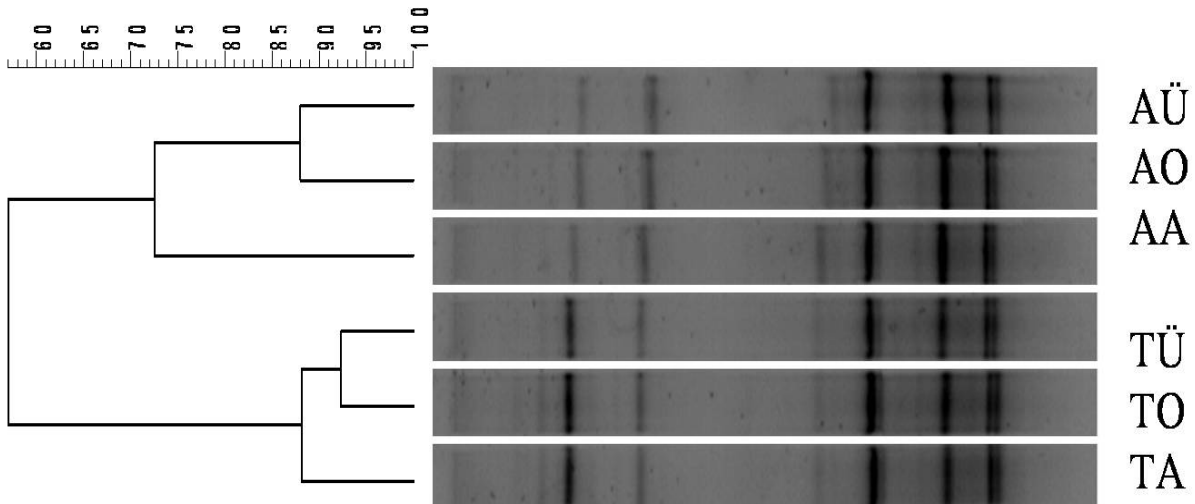
Anaerobik kontak reaktörün 3 farklı yüksekliğinden iki farklı zamanda alınan numunelere ait genomik DNAlardan *Arke* ve *Bakterilere* özgü 16S rDNA'lar PCR ile çoğaltılmış ve denatüran jelde yürütülmüştür. *Arke* ve *Bakterilere* ait jel görüntüleri Şekil 2 ve Şekil 3'te verilmektedir. Elde edilen görüntüler Bionumerics 5.0 yazılımı

(Applied Maths, Kortrijk, Belçika) ile normalize edilmiş, *Arke* ve *Bakteri* popülasyonlarına ait soy ağaçları çizilmiştir.

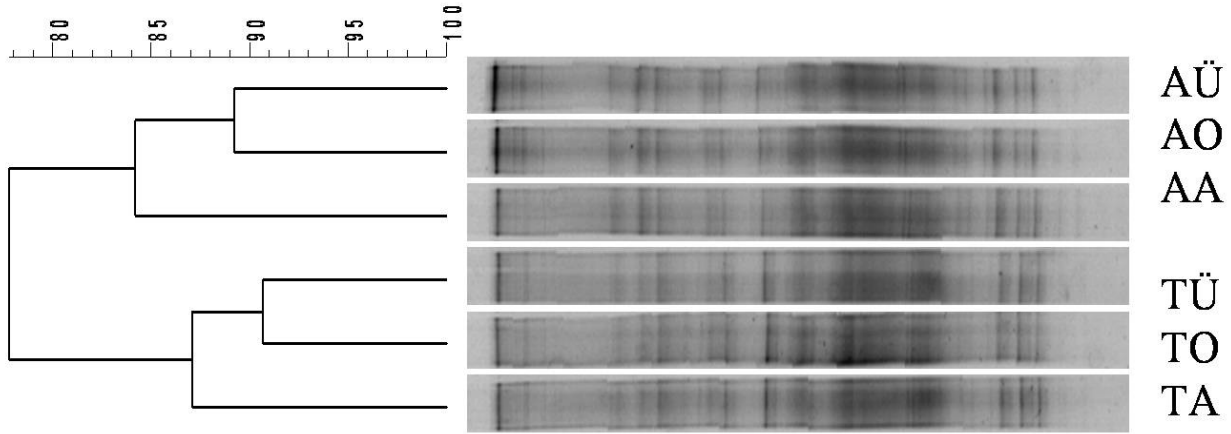
Şekil 2’de verilen *Arke* popülasyonuna ait soy ağacı, Temmuz ve Ağustos ayında alınan numunelerin % 50 benzerlikte olduğunu yani iki dönem arasında komünitede önemli bir değişiklik olduğunu göstermektedir. AÜ ve AO numuneleri % 88 benzerlikte kümelenirken AA numunesi AÜ ve AO’ya % 85.7 benzerlikte kümelmiştir. Temmuz ayında da TÛ ve TO numuneleri % 92.3 benzerlik göstermekte, TA numunesi TO ve TÛ’ye % 91.7 benzerlikte kümelmektedir. Değişen benzerlik oranları, hem reaktör yüksekliği boyunca hem de numune alma dönemleri arasında mikrobiyal komünitede farklılaşmalar olduğunu göstermektedir. Arkeyal DGGE jelinde tespit edilen 31 farklı bandın varlığı, reaktörden alınan numunelerde 31 farklı türün olduğunu göstermektedir. Bionumerics analizi sonucunda, Temmuz ayında rastlanan 3 farklı türe Ağustos ayında rastlanmadığı, buna karşılık, Temmuz ayında tespit edilemeyen 6 farklı türün Ağustos ayında tespit edilebildiği görülmüştür.

Şekil 3’te *Bakteri* popülasyonuna ait soy ağacı, Temmuz ve Ağustos 2005’te alınan numunelerin % 78.3 benzerlikte olduğunu göstermektedir.

Bu değişim *Arke* popülasyonuna oranla daha az olmakla birlikte iki dönem arasında bakteriyel komünitede önemli bir değişiklik olduğunu göstermektedir. Ağustos ayında, reaktörün üst ve orta kısımlarından alınan AÜ ve AO numuneleri % 89.2 benzerlik gösterirken alt kısımdan alınan AA numunesi AÜ ve AO’ya %81.8 benzerlikte kümelmiştir. Temmuz ayı örneklerinde ise alt ve üst seviyelerden alınan TA ve TÛ numuneleri % 90.7 benzerlik göstermekte, orta seviyeden alınan TO numunesi TA ve TÛ ile % 86.5 benzerlikte kümelmektedir. Arkeyal komünitede olduğu gibi bakteriyel komünite yapısında da reaktör boyunca ve numune alma zamanları arasında farklılıklar gözlenmiştir. Bakteriyel DGGE jelinde toplam 57 farklı türü temsil eden 57 farklı bant tespit edilmiştir. Temmuz ayında rastlanan 10 farklı türe Ağustos ayında rastlanmamış, buna karşılık, Ağustos ayında 10 farklı tür tespit edilmiştir. Bant sayıları karşılaştırıldığında, *Bakteri* popülasyonundaki çeşitliliğin *Arke* popülasyonundaki çeşitlilikten daha fazla olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, Ağustos 2005’te *Bakteri* popülasyonunda tespit edilemeyen tür sayısının *Arke* popülasyonunda tespit edilemeyen tür sayısından fazla olması, bakteriyel türlerin değişen işletme koşullarına daha duyarlı olduğu sonucuna varılabilir. Benzer sonuçlar daha önceki çalışmalarda da elde edilmiştir (Buzzini vd., 2006).



Şekil 2. Arkeyal soy ağacı ve DGGE jel görüntüsü (Örnekler: AA: Ağustos, 4 m; AO: Ağustos, 8 m; AÜ, Ağustos 12 m; TA: Temmuz, 4m; TO Temmuz 8 m; TÛ: Temmuz, 12 m)



Şekil 3. Bakteriyel soy ağacı ve DGGE jel görüntüsü (Örnekler: AA: Ağustos, 4 m; AO: Ağustos, 8 m; AÜ, Ağustos 12 m; TA: Temmuz, 4m; TO, Temmuz 8 m; TÜ: Temmuz, 12 m)

İnce ve diğerleri (2007)'ne ait önceki bir çalışmada, anaerobik kontak reaktöre ait numunelerde potansiyel metan üretim (PMÜ) hızları Temmuz numuneleri için 280 mL CH<sub>4</sub>/g UAKM.gün, Ağustos numuneleri için ortalama 160 mL CH<sub>4</sub>/g UAKM.gün olarak bulunmuştur. Aynı örneklerde, FISH uygulanarak elde edilen hücre sayımları, numune alma yüksekliği arttıkça çamurun PMÜ hızının ve asetoklastik metanojenlerin toplam komünite içerisindeki miktarının paralel olarak azaldığını göstermektedir (İnce vd., 2007). Buna bağlı olarak, Temmuz ayında reaktörde bulunup Ağustos ayında kaybolan türlerin yüksek metan üretim potansiyeline sahip olduğu söylenebilir. Benzer şekilde, Temmuz ayında reaktörde olmayıp Ağustos ayında gözlenen türler düşük aktiviteyle ilgili türler olabilir.

Bu çalışmada, SMA testi ve FISH tekniği ile tespit edilen mikrobiyal komünite değişimi DGGE yöntemi kullanılarak doğrulanmıştır. DGGE yöntemi, yüksek ve düşük aktiviteye sahip mikrobiyal komünitelerin karşılaştırılmasına olanak sağlamıştır. FISH yöntemi reaktörde mevcut aktif mikrobiyal türlerin miktarları hakkında bilgi vermesine rağmen, kompozisyondaki değişimi tespit etmede yeterli değildir. Bununla birlikte, DGGE yöntemi komünite bileşenlerinin sayısal değişimini yansıtmakta yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle anaerobik reaktörlerin mikrobiyal komünite yapılarının gerek DGGE gibi detaylı kalitatif sonuç veren gerekse FISH gibi mikroskopik sayıma dayalı sonuç ve-

ren kültürden bağımsız yöntemlerle birlikte çalışılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmanın devamında, arkeyal ve bakteriyel DGGE jellerindeki baskın bantların kesilerek dizi analizlerinin yapılması, yüksek ve düşük aktiviteye sahip mikrobiyal komüniteye özgü türlerin tespit edilmesine olanak sağlayacaktır. Ayrıca, anaerobik kontak reaktördeki baskın türlerin ortaya çıkarılması, bu türlerin metabolizmaları hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlayacaktır. Böylece, reaktörün işleyiş mekanizması kısmen çözümlenmiş olacak ve aktivite ile ilgili türlerin belirlenmesine olanak tanınacaktır.

### Teşekkür

Orhan İnce ve Bahar Kasapgil İnce sırasıyla İTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen 11\_04\_241 ve 844 ve BÜ Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen 04Y105 ve 02Y103D kodlu projelere teşekkür ederler. Ayrıca Modern Karton A.Ş. ve Arbiogaz Çevre Teknolojileri A.Ş.'ye gösterdikleri işbirliği için teşekkür ederiz.

### Kaynaklar

- Amann, R.I., Ludwig, W. ve Schleifer, K.H., (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiological Reviews*, **59**, 143-169.
- Baier, U. ve Delavy, P., (2005). UASB treatment of liquid residues from grass bioraffination, *Water Science and Technology*, **52**, 405-411.

- Barns, S.M., Fundyga R.E. ve Jefferies M.W., (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone-national-park hot-spring environment, *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 5, 1609-1613.
- Buzzini, A.P., Sakamoto, I.K., Varesche, M.B. ve Pires, E.C., (2006). Evaluation of the microbial diversity in an UASB reactor treating wastewater from an unbleached pulp plant, *Process Biochemistry*, **41**, 168-176.
- Gilbride, K.A., Lee, D.Y. ve Beaudette, L.A., (2006). Review: Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control, *Journal of Microbiological Methods*, **66**, 1-20.
- Ince, O., Andersen G.K. ve Kasapgil, B., (1995). Control of organic loading rate using the specific methanogenic activity test during start-up of an anaerobic digestion system, *Water Research*, **29**, 1, 345-355.
- Ince, O., Kolukirik, M., Ayman Oz, N. ve Kasapgil Ince, B., (2004). Comparative evaluation of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters in terms of performance and methanogenic activity, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **80**, 2, 138-144.
- Ince, O., Kolukirik, M., Cetecioglu, Z., Eyice, O., Tamerler, C. ve Kasapgil Ince, B., (2007). Methanogenic and sulphate reducing bacterial population levels in a full-scale anaerobic reactor treating pulp and paper industry wastewater using fluorescence in situ hybridization, *Water Science and Technology*, **55**, 10, 183-191.
- Muyzer, G. ve Smalla, K., (1998). Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 127-141.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. ve Uitterlinden, A.G., (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 3, 695-700.
- Øvreås, L., Forney, L., Daae, F.L. ve Torsvik, V., (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 9, 3367-3373.
- Raskin L., Stromley J.M., Rittmann B.E. ve Stahl D.A., (1994). Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens, *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 4, 1232-1240.
- Rincón B., Raposo, F., Borja, R., Gonzalez, J.M., Portillo, M.C. ve Saiz-Jimenez, C., (2006). Performance and microbial communities of a continuous stirred tank anaerobic reactor treating two-phases olive mill solid wastes at low organic loading rates, *Journal of Biotechnology*, **121**, 4, 534-543.
- Rintala, J.A., Jain, V.K. ve Kettunen, R.H., (1999). Comparative status of the world-wide commercially available anaerobic technologies adopted for biomethanation of pulp and paper mills effluents, *Proceedings, 4<sup>th</sup> International Exhibition and Conference on Pulp and Paper Industry*, 519-540, New Delhi, India.
- Roest, K., Heilig, H.G.H.J., Smidt, H., de Vos, W.M., Stams, A.J.M. ve Akkermans, A.D.L., (2005). Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater, *Systematic and Applied Microbiology*, **28**, 175-185.
- Savant, D.V., Abdul-Rahman, R. ve Ranade, D.R., (2006). Anaerobic degradation of Adsorbable Organic Halides (AOX) from pulp and paper industry wastewater, *Bioresource Technology*, **97**, 9, 1092-1104.
- Speece, R.E., (1996). *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Archae Press, Nashville, TN.
- Sponza, D.T., (2002). Tetrachloroethylene (TCE) removal during anaerobic granulation in an Up-flow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor, *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, **37**, 213-236
- Stams, A.J.M., Elferink, S.J.W.H.O. ve Westerman, P., (2003). Metabolic interactions between methanogenic consortia and anaerobic respiring bacteria, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **81**, ed, Scheper, T., Springer-Verlag, 31-56, Heidelberg, Berlin.

# Poliaromatik hidrokarbonların aerobik giderimlerine biyosürfaktanın etkisi

Oğuzhan GÖK\*, Delya SPONZA

Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü Kaynaklar Yerleşkesi 35160 Buca, İzmir

## Özet

*Biyolojik olarak parçalanması oldukça güç olan poliaromatik hidrokarbon (PAH) gibi toksik ve kirlenici maddeler birçok endüstri kuruluşlarının atıksuları ile doğaya bırakılmaktadır. Petrokimya endüstrisi bu endüstri kuruluşları içerisinde büyük ve önemli bir yere sahiptir. PAH'lar ham petrolün işlenmesi sırasında ortaya çıkan, toksik, mutajenik ve karsinojenik bileşiklerdir. Bu çalışma, EPA tarafından petrokimya endüstrilerinde öncelikli olarak belirtilen 15 adet PAH üzerine odaklanmıştır. Laboratuvar koşullarında Sürekli Tam Karışımli Aerobik Tank Reaktör'de (SKTR) beslemesi için atıksu İzmir'deki bir petrokimya endüstrisi atıksu arıtma tesisinin havalandırma ünitesi girişinden alınmıştır. 20 günlük çamur yaşında ve 5 günlük hidrolik bekleme sürelerinde toplam 15 PAH'ın sistem içerisinde giderim verimleri incelenmiştir. Kontrol reaktöründe (biyosürfaktansız) 15 adet PAH içerisinde üç benzen halkalı %35–60 arıtma verimi ile giderilirken yüksek benzen halkalı PAH'ların giderimi %25–50 olarak gerçekleşmiştir. Yüksek benzen halkalı PAH'lar biyolojik olarak çok düşük verimlerle giderilen PAH'ların sürekli karıştırmalı aerobik tank reaktör sisteminde rhamnolipid biyosürfaktanı (15–30–50–150 mg/L) aerobik biyolojik giderim verimine etkileri değerlendirilmiştir. Optimum biyosürfaktan dozu 15 mg/L olarak belirlenmiştir. Bu dozda 15 mg/L rhamnolipid içeren Sürekli Karışımli Tank Reaktörde (SKTR)'de petrokimya endüstrisi atıksularının aerobik arıtılabilirliği ile yapılan çalışmada 30 günlük işletme süresi sonunda maksimum KOİ giderme verimi %78 olmuştur. Kalıcı, zor ayrışabilen PAH'lardan 2 ve 3 benzen halkalı yapılar; %68–94, moleküler ağırlıkları daha büyük olan 4, 5 ve 6 benzen halkalı yapılar %50–74 arıtma verimi ile giderilmiştir.*

**Anahtar Kelimeler:** Aerobik, aktif çamur sistemi, biyosürfaktan, petrokimya, poliaromatik hidrokarbonlar (PAH).

\*Yazışmaların yapılacağı yazar: Oğuzhan GÖK. oguzhan.gok@deu.edu.tr; Tel: (232) 412 71 43.

Bu makale, 11-13 Haziran 2008 tarihleri arasında İstanbul'da düzenlenen 11. Endüstriyel Kirlenme Kontrolü Sempozyumunda sunulan bildirilen arasından, Su Kirlenmesi Kontrolü Dergisi'nde basılmak üzere seçilmiştir. Makale ile ilgili tartışmalar 21.08.2009 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

## Influence of Biosurfactant on aerobic biodegradation of polyaromatic hydrocarbons

### Extended abstract

Some toxic pollutants such as PAHs which are persistent are releasing to the environment with industrial wastewater flows. These organics are degraded with difficulty and accumulated in the environmental ecosystem. They are toxic and carcinogenic to the humans and to the viable microorganisms resulting in significant irreversible hazardous effects. Petrochemical industry wastewaters are the most important source of the persistent PAHs which are toxic, mutagenic and carcinogenic substances. PAHs are producing during petroleum production. In this study, the aerobic treatability of 15 PAHs was studied since they are named as priority pollutants by EPA. In the laboratory studies, an aerobic stirred reactor was used for the biodegradation of PAHs in the wastewater taken from the influent of aerobic activated tank of the petrochemical industry wastewater treatment plant in Izmir.

The removal efficiencies of acenaphthene (ACT), fluorene (FLN), phenanthrene (PHE), anthracene (ANT), carbazole (CRB), fluoranthene (FL), pyrene (PY), benz[a]anthracene (BaA), chrysene (CHR), benz[b]fluoranthene (BbF), benzo[k]fluoranthene (BkF), benzo[a]pyrene (BaP), indeno[1,2,3-cd]pyrene (IcdP), dibenz[a,h]anthracene (DahA), benzo[g,h,i]perylene (BghiP) were determined in wastewater. The removal efficiencies of 15 PAHs was investigated in the surfactant added aerobic completely stirred tank reactor and in the control reactor without biosurfactant at a sludge retention time of 20 days and at a hydraulic retention time of 5 days in the reactor systems. The COD removal efficiencies in control, in 15 mg/L, 30 mg/L, 50 mg/L and 150 mg/L rhamnolipid containing reactors were 70–77%, 74–79%, 70–78%, 66–72% and 56–65%. The PAHs with 3 benzene rings was degraded with a removal efficiency of 35-60% while the PAHs with 5 benzene ring were removed with a removal efficiency of 25-50% in control reactor. It was observed that the degradation of PAHs with high molecular weights are very difficult. The effect of increasing biosurfactant (15-30-50-150 mg/L) concentrations on the removal of PAHs was investigated in PAHs with high and low benzene rings. For maximum PAH removal the optimum biosurfactant dose was 15 mg/L.

In this dose, the PAHs with 3 benzene ring was removed with a removal efficiency of 68-94%, while the PAHs with 4-5 benzene ring was removed between 50% and 70% under biologic degradation conditions. In 15 mg/L rhamnolipid containing reactor the dissolved COD removal efficiency is high compared to the control reactor. It was found that the increasing of rhamnolipid concentrations did not affect positively the soluble COD removal efficiency while to the highest soluble COD removal efficiency was reached at a rhamnolipid concentration of 15 mg/L. Low dissolved COD removal efficiencies in reactors containing 50 and 150 mg/L rhamnolipid administered reactors compared to control could be attributed to the presence of a possible toxicity for the aforementioned rhamnolipid doses. Since the maximum dissolved COD removal efficiencies was obtained at a rhamnolipid dose of 15 mg/L, this level of a surfactant was obtained as the optimum rhamnolipid dose for a raw Petrochemical Industry wastewaters. The main dissolved COD removal way with simultaneous rhamnolipid uptake pathway and degradation of PAHs could be explained as follows: Since 15 mg/L rhamnolipid is readily biodegradable could be uptaken by the microorganisms to the cells and could be used as feed together with dissolved COD. In the declaration of Ministry of Environment and Forestry on dated 26/11/2005 and numbered 26005 in the Official news paper it was mentioned that “the hydrocarbons namely ANT ve BaP, BbF, BghiP, BkF, FLN, In123cdP ve NaP” are listed in the Regulation Water Pollution Control for Hazardous Compounds (76/464/AB) attachment while there is no a limitation to the receiving water discharge Standard for the aforementioned PAHs. The PAHs namely BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP and In123cdP have potential cancer risks. The aforementioned PAHs were removed with treatment efficiencies of 65%, 73%, 65%, 63%, 67%, 70%, 60% and 50% in the aerobic completely stirred tank reactor containing 15 mg/L rhamnolipid dose. For this reason it should be added some discharge limitation to the Water and Wastewater Pollution Regulation for PAHs in the petrochemical, dye and chemical industries. Furthermore, the PAH concentrations in the effluent of the aerobic reactors should be assessed with toxicity tests.

**Keywords:** Aerobic activated sludge system, biosurfactant, petrochemical, polyaromatic hydrocarbons (PAHs) .

## Giriş

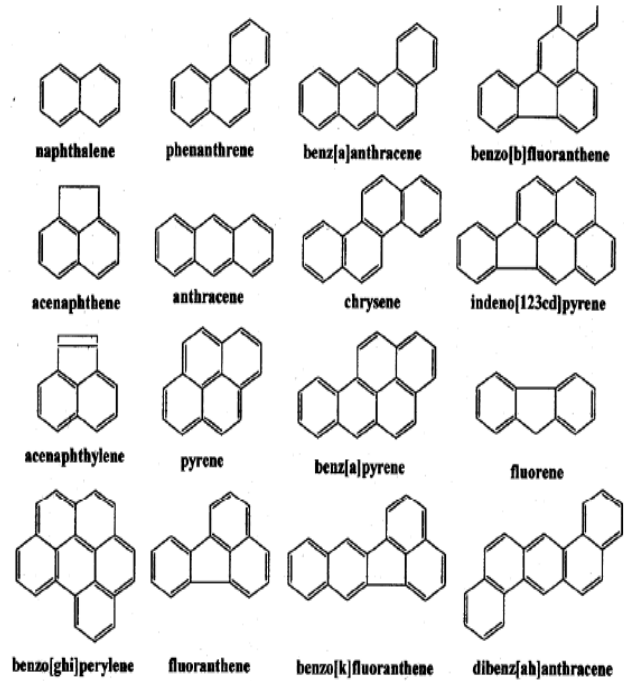
Poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) doğal ve antropojenik kaynaklardan ve petrol kökenli kirleticilerin bilinçli veya kaza sonucunda çevreye bırakılmaları, kentsel/endüstriyel tesislerin üretim sonucu atık çıktıları ve taşıt faaliyetleri sonucunda ortaya çıkan tehlikeli organik maddelerdir. (Restrepo vd., 2008). PAH'lar toksik, mutajenik ve kanserojen maddelerdir. Çevreye bırakıldıklarında organik olarak ayrışabilirlikleri çok güç olduklarından biyolojik olarak parçalanması güçtür (Randhir vd., 2003). Zamanla birikimlere yol açarak insan ve canlı ekosistem üzerinde önlemez sonuçlara yol açarlar.

Endüstriyel faaliyetler içerisinde ağır sanayi olarak tanımlanan sektörlerden biri de Petrokimya sanayi tesisleridir. Petrokimya sanayi, nafta, LPG, gaz-yağ gibi petrol ürünleri veya doğal gaza dayalı temel girdileri kullanarak plastikler, lastik ve elyaf hammaddeleri ve diğer organik ara malları üreten ve ambalaj, elektronik, otomotiv, inşaat, tekstil ve tarım gibi birçok sektöre girdi sağlayan bir sanayi koludur (Petkim, 2008). Bünyesinde çok sayıda tesis içeren bu tür endüstriler oldukça yüksek miktarlarda su kullanmaktadır. Atıksu özelliği ise üretim sürecine bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. Biyolojik arıtma sistemlerinin yeterli olmadığı durumlarda sisteme bir takım yardımcı maddeler ilave edilerek kirleticilerin giderilmesi sağlanmıştır. Fakat bu tür çalışmaların atıksu ortamında kullanımları hakkında literatür taramasında çok veriye rastlanmamıştır. Daha çok toprak biyoremediasyonu üzerinde çalışmalar yer almakta ve yüksek verimde PAH'ların giderimlerinin sağlandığı belirtilmektedir (Kosaric, 2001). Kullanılan bu yardımcı maddelerin başında biosürfaktanlar gelmektedir. Biosürfaktanlar, karbonhidratları, hidrokarbonları, yağları veya bunların kompozisyonunu karbon kaynağı olarak kullanan aerobik mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir ve kullanımda birçok avantajı beraberinde getirmektedir. Bu avantajlardan bazıları, sıcaklık, pH ve tuzluluk değişimlerinden etkilenmemeleri ve biyolojik olarak ayrışabilmeleridir (Bognolo, 1999).

İzmir petrokimya endüstrisi atıksularında düşük karbon halkalı PAH'ların uçuş mekanizması ile giderildiği, 3-6 karbon halkalı PAH'ların ise çok düşük arıtma verimi ile giderildiği veya hiç giderilmediği gözlenmiştir. Bu nedenle bu çalışmada bir petrokimya endüstrisi atıksularında bulunan çözünmüş KOİ ve zor ayrışan PAH'ların giderilmesi için 15-30-50-150 mg/L rhamnolipid konsantrasyonlarında arıtma verimine etkileri incelenmiştir.

## Poliaromatik hidrokarbonlar ve biosürfaktanların çevresel uygulamaları

PAH'lar iki ve daha fazla benzen halkası ile oluşmuş düz, küme veya açısız olarak birbirine eklenmiş polar olmayan kimyasal yapılardır. İki ve üç halkalı yapılar düşük moleküllü, üçten fazla halkalı ise yüksek moleküllü PAH olarak sınıflandırılmıştır. Çevre Koruma Ajansı (U.S. EPA)'ya göre insan ve çevre sağlığı açısından öncelikli 16 PAH belirlenmiştir (EPA, 2002; Pierra vd., 2006). Bu kirleticiler mutajenik, toksik ve kanserojen özelliklere sahiptir (Santos vd., 2008). Bu yapıların fiziksel ve kimyasal özellikleri ile beraber sağlık üzerine etkileri Şekil 1 ve Tablo 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Öncelikli olarak belirlenmiş PAH'ların kimyasal yapıları

Tablo 1 PAH'ların fiziksel, kimyasal ve sağlık üzerine etkisi (Randhir vd., 2003)

PAH	Halka Sayısı	Molekül Ağırlık	Çözünürlük ( $\mu\text{g/l}$ )	Log $K_{ow}$	Kanser Sınıflandırması	
					U.S. EPA	IARC
Naphthalene	2	128	31000	3.4	D	3
Acenaphthylene	3	152	16500	4.0	D	3
Acenaphthene	3	153	3800	4.2	D	3
Fluorene	3	166	1900	4.3	D	3
Phenanthrene	3	178	1100	4.4	D	3
Anthracene	3	178	45	4.5	D	3
Flouranthene	4	202	130	5.2	D	3
Pyrene	4	202	260	5.3	D	3
Benzo(a) anthracene	4	228	11	5.9	B2	2A
Chrysene	4	228	6	5.6	B2	3
Benzo (b) flouranthene	5	252	1.5	5.7	B2	2B
Benzo (k) flouranthene	5	252	0.8	6.2	B2	2B
Benzo (a) pyrene	5	252	3.8	6.3	B2	2B
Dibenz(a,h) anthracene	5	278	0.6	6.5	B2	--
Benzo[g,h,i]perylene	6	276	0.3	6.7	B2	--
Indeno[1,2,3-c,d]pyrene	6	276	0.2	6.9	B2	--

D, 3: sınıflandırılmamış

2A-B2-2B: kanser riski yüksek

Poliaromatik hidrokarbonlar biyolojik olarak güç ayrışabilen organik maddeler olduklarından konvansiyonel arıtma sistemleri içerisinde giderimlerinde yetersiz kalılabilmektedir. Bir takım yardımcı maddeler kullanılarak bu kirleticilerin çözünürlüklerini arttırmak suretiyle arıtmaları sağlanabilir.

Biyosümfaktanlar yüzeysel ve yüzeyler arasındaki gerilimi düşürür, hidrofilik ve hidrofobik faaliyet gösterir (Bognolo, 1999). Bu özellikleri nedeni ile Şekil 2'de belirtilen mekanizmalar sayesinde PAH'ların giderilmesi gerçekleştirilmektedir (Randhir vd., 2003). Bu mekanizma A'da biyosümfaktan misellerinin PAH'ları doğrudan alımları ve bakteri hücrelerine sunması şeklinde olmaktadır. B mekanizmasında misellerin PAH'ı su fazında bırakarak bakteri hücrelerine sunması şeklinde gerçekleşmektedir. C mekanizmasında ise bakteri hücrelerinin alımı kolaylaştırmak için biyosümfaktan misellerin yardımı ile PAH'ın alımı ve son mekanizma D'de miselsiz olan biyosümfaktan PAH'ın parçalanması ile biyosümfaktanın da bakteri hücrelerine alımı şeklinde gerçekleşmektedir.

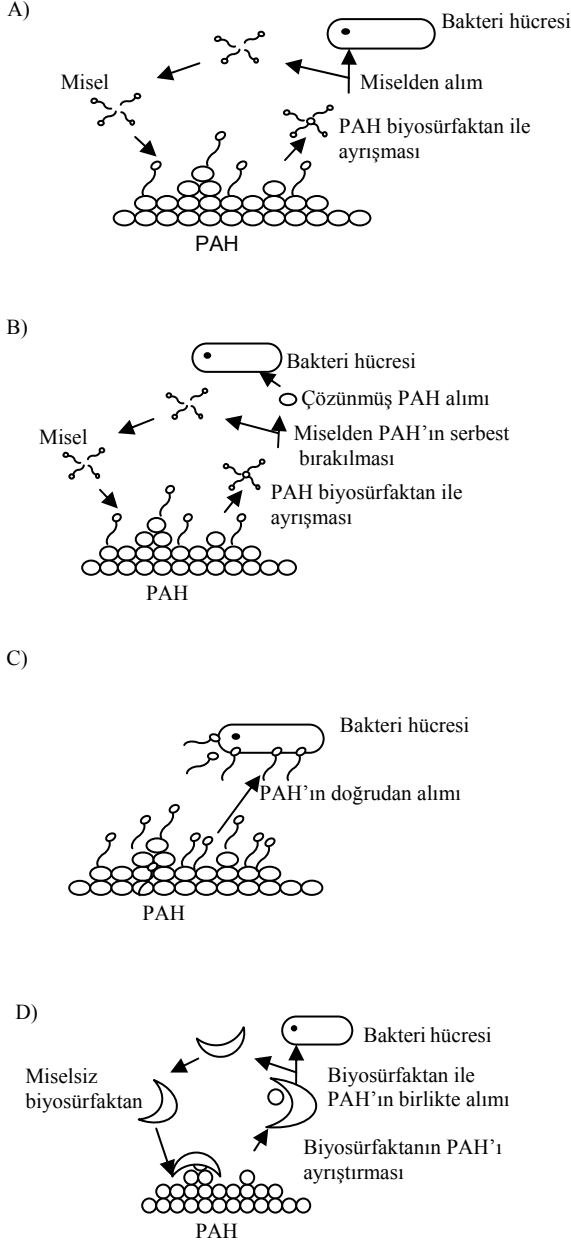
Yuan ve diğerleri (2000) PAH'ların aerobik karışık kültür kullanarak ayrışabilirliğini incele-

mişlerdir. Karışık kültürde aerobik koşullarda 5 adet PAH'dan (penantren, asenaften, antrasen, floren ve piren) 28 saat, 10 ve 12 işletme süresi sonunda penantren, asenaften ve antrasenin tamamen ayrıştığı rapor edilmiştir. 28 saat sonunda penantrenin saatte 0.18 mg/L, asenaftenin günlük 0.5 mg/L ve pirenin günlük 0.42 mg/L konsantrasyonunun tamamen ayrıştığı gözlemlenmiş, ancak antrasen ve florenin aerobik olarak ayrışmadığı belirtilmiştir. Zhang (1997) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise mono-rhamnolipid ve di-rhamnolipid biosümfaktanları kullanılarak phenanthrene'nin çözünürlüğünün artırılması amaçlanmıştır. Mono-rhamnolipid'in di-rhamnolipida göre daha verimli olduğu ve çözünürlüğün 3.63–34.8  $\mu\text{g/mL}$  değerleri arasında olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Barkay (1999) tarafından yapılan çalışmada biosümfaktan olarak kullanılan ve *Acinetobacter radioresistens* KA53 den üretilen Alasa'nın 50-500  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarının su ortamında penantren, floranten ve pirenin çözünürlüklerini 6.6-25.7 ve 19.8 kat arttırdığını belirtilmiştir.

Petrokimya rafinerisi atıksu özellikleri belirleme konusunda yapılmış olan bir diğer çalışmada biyokimyasal oksijen ihtiyacı ( $\text{BOI}_5$ ) 150-350 mg/L, kimyasal oksijen ihtiyacı ( $\text{KOI}$ ) 300-800



mg/L, fenol seviyesi 20-200 mg/L, yağ 3000 mg/L, askıda katı madde 100 mg/L civarında, benzen 1-100 mg/L ve ağır metal konsantrasyonu 0.1-100 mg/L olduğu belirtilmiştir (Zarooni vd., 2006).



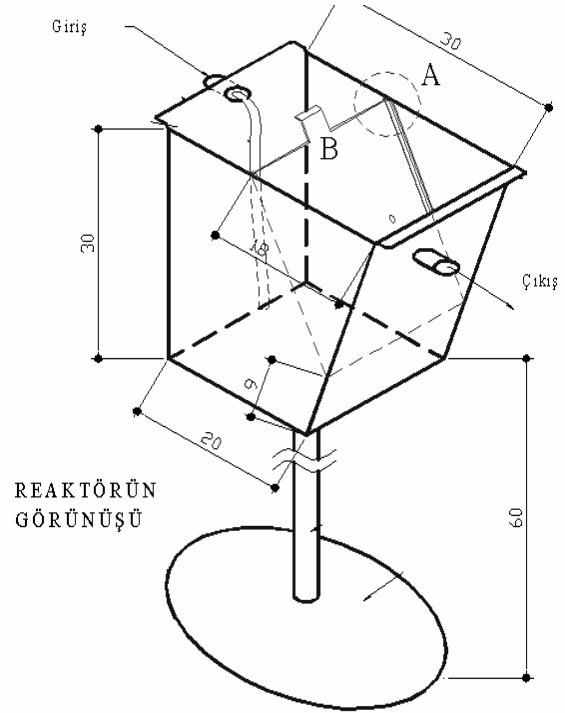
Şekil 2. Biosurfaktanın PAH'leri ayrıştırma mekanizması

## Materyal ve metod

### Deneyel set

Sürekli Karışım Tank Reaktör (SKTR) 8.75 litre havalandırma ünitesi ile 1.15 litre çökeltim tankından oluşmakta olup paslanmaz çelikten

yapılmıştır. İki ünite arası 45 derecelik bir açı yapacak şekilde bir plaka ile ayrılmıştır. Bu plaka üzerinde çamurun geri dönüşümü için delikler mevcuttur. Petrokimya endüstrisi atıksu beslemesi tabandan olup havalandırma pompası ve ona bağlı difüzörler yardımı ile havalandırma da tabandan yapılmıştır. Bekleme süresi boyunca reaktörden çıkış suları ise üstten alınmıştır. Sistem yapılandırması Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. Sürekli Tam Karışım Tank Reaktörünün (SKTR) detayları

### Örnek alımı

Çalışma boyunca atıksu İzmir'deki bir petrokimya endüstrisi atıksu arıtma tesisi havalandırma ünitesi girişinden alınmıştır. Aşı mikroorganizma ise petrokimya endüstrisi biyolojik arıtma sistemi içerisinde son çökeltim ünitesinin geri devir hattı üzerinden alınmıştır.

### İşletme parametreleri

SKTR çalışmasında kontrol reaktörüne ve diğer test reaktörlerine günlük 2 l gerçek petrokimya tesisi havalandırma havuzu girişinden alınan atıksu ile besleme yapılmıştır. Havalandırma havuzu aktif çamur sistemi olarak düşünülmüş, hidrolik bekleme süresi 5 gün, organik yükleme 0.3-0.4 g KOİ/L.gün, F/M oranı 0.13-0.14 g

KOI/g MLVSS gün ve çamur yaşı 20 gün olarak belirlenmiştir. Reaktörün işletme süresince pH'ı  $7\pm 0.5$ 'e, sıcaklık  $25\pm 2$ 'ye çözülmüş oksijende  $4\pm 1$ 'e göre ayarlanmıştır.

### Analitik yöntemler

Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) ölçümlerinde Standart Metotlara uygun olarak refluks kolorimetrik metot kullanılmıştır. Bu metotta  $K_2Cr_2O_7$  ( $HgSO_4$  içerikli),  $H_2SO_4$  ( $Ag_2SO_4$  içerikli) çözeltileri kullanılmış olup, ön hazırlık işlemi sırasında 20 dakika 4000 devirde santrifüj edilmiş numunedan 2.5 mL alınarak, 1.5 mL  $K_2Cr_2O_7$ , 3.5 mL  $H_2SO_4$  çözeltileri kullanılarak,  $148^\circ C$ 'de 2 saat bekleme süresinden sonra 600 nm'de AquaMed model spektrofotometrede ölçülmüştür. Tüm parametre analizleri 2 seri halinde yapılmış olup ortalama değerleri veya standart sapmalı değerleri verilmiştir.

Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı ( $BOI_5$ ) ölçümlerinde WTW Oxi Top 12'lik dijital şişeler kullanılmış olup 5 günlük inkübasyon sonuçları temel alınmıştır. pH, çözülmüş oksijen ve sıcaklık ölçümleri WTW MultiLine P3 pH / Oxi-SET cihazı kullanılarak günlük olarak yapılmıştır. Diğer taraftan TN, TP,  $NH_4$ ,  $NO_2$ ,  $NO_3$  ölçümleri sırası ile 14537, 14729, 14752, 14776, 14773 kodlu merck marka kitlerle Nova Pec.II fotometrede okuma yapılmıştır. Yağ-gres, askıda katı madde (AKM) standart metotlara göre yapılmıştır (APHA., 2005). Ağır metal; krom, kurşun, nikel, kadmiyum ve çinko (Cr, Pb, Ni, Cd, Zn) analizleri için ICP-OES kullanılmıştır.

PAH tayininde, GC-MS (Agilent 6890N-Agilent 5973, taşıyıcı kolan olarak HP5-MS, 30 m, 0.25 mm, 0.25  $\mu m$ ) kullanılmıştır. Başlangıç fırın sıcaklığı  $50^\circ C$ 'de 1 dakika bekletilmiş, dakikada  $25^\circ C$  artırılarak  $200^\circ C$ 'ye yükseltilmiştir.  $200^\circ C$ 'den  $300^\circ C$ 'ye dakikada  $8^\circ C$  ve 5.5 dakika bekleme süreleri seçilmiştir. Enjektör, iyon kaynağı ve guadrapol sıcaklıkları sırası ile 295, 300 ve  $180^\circ C$  olarak belirlenmiştir. Yüksek saflıkta He taşıyıcı gaz olarak dakikada 1.5 ml.dak.<sup>-1</sup>, 45 cm.s<sup>-1</sup> akış hızında kullanılmıştır. PAH ölçümleri için önce numune hazırlama işlemine tabi tutulmuştur. Numuneler 47 mm çapında ve içerisinde XAD-2 amberlit reçine bu-

lunan kolondan geçirilmiş ve reçine kısmı aseton/hekzan karışımı ile çıkartıldıktan sonra üzerine 30 mL aseton/hekzan ilave edilerek 60 dakika sonikatör cihazında bekletilmiştir. Vial içerisinde oluşan faz ayırımı yapılarak azot gazı ile numune miktarı 2 mL'ye kadar azaltılmıştır. Azaltılmış numune clean-up (alumina, silika ve sodyum sülfat kolonunda tutulan PAH, petrolyum eterle alımın)'dan sonra 1 ml'ye kadar düşürülmüştür. Örneklerde asenaftalen (ACT), fluoren (FLN), penantren (PHE), antrasen (ANT), karbazole (CRB), fluoranten (FL), piren (PY), benzo[a]antrasen (BaA), şirisen (CHR), benzo[b]fluoranten (BbF), benz[k]fluoranten (BkF), benzo[a]piren (BaP), indeno[1,2,3-cd]piren (IcdP), dibenz[a,h]antrasen (DahA) ve benzo[g,h,i]piren (BghiP) analizleri yapılmıştır.

### Sonuçlar ve değerlendirme

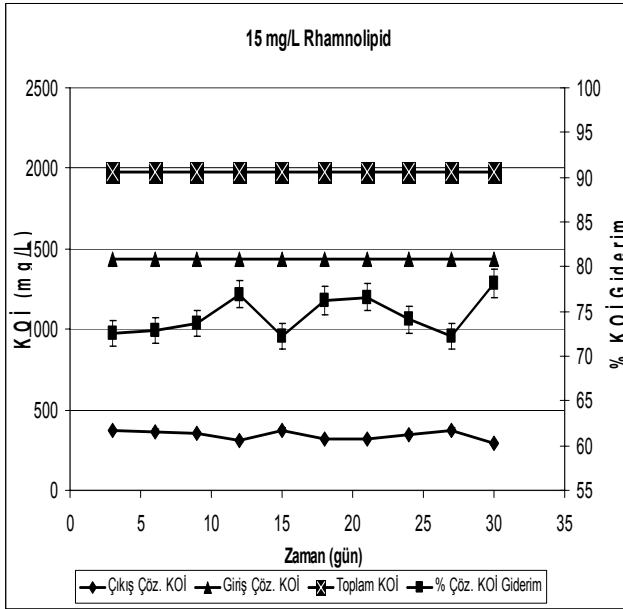
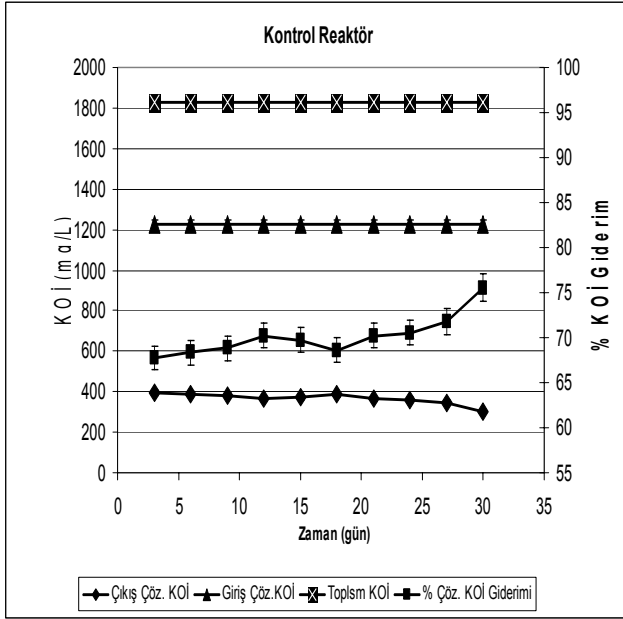
Petrokimya endüstrisine ait artıma tesisi havalandırma havuzundan alınan atıksuyun karakterizasyonu Tablo 2'de verilmektedir.

Tablo 2. Petrokimya tesisi havalandırma ünitesi giriş atıksu özeliği

pH	7.53	Nitrat (mg/L)	1.9
Sıcaklık ( $^\circ C$ )	22.5	Nitrit (mg /l)	0.046
Çöz. Oksijen (mg/L)	3.35	Yağ-gres (mg/L)	506.5
Toplam KOİ (mg/L)	1107	AKM (mg/L)	980
Çöz. KOİ (mg/L)	728	Cd ( $\mu g/L$ )	3.17
$BOI_5$ (mg/L)	384	Cr ( $\mu g/L$ )	4.55
Toplam N (mg/L)	21.0	Ni ( $\mu g/L$ )	25.0
Toplam P (mg/L)	12.0	Pb ( $\mu g/L$ )	12.76
<b>Amonyum (mg/L)</b>	<b>3.26</b>	<b>Zn (<math>\mu g/L</math>)</b>	<b>225.9</b>

Reaktörlerden biri kontrol reaktörü olup diğerleri ise 15, 30, 50, 150 mg/L konsantrasyonlarda rhamnolipid içeren gerçek atıksu ile beslenmiştir. Bir aylık çalışma süresi sonunda reaktörlerin giriş ve çıkış atıksularında Toplam KOİ, Çözülmüş KOİ ve Toplam 15 adet PAH'ın analizi yapılmış ve giderim oranları belirlenmiştir. Kontrol ve rhamnolipid içeren reaktörlerde KOİ konsantrasyon değişimler ve giderim verimleri Şekil 4, 5, 6'da verilmiştir.

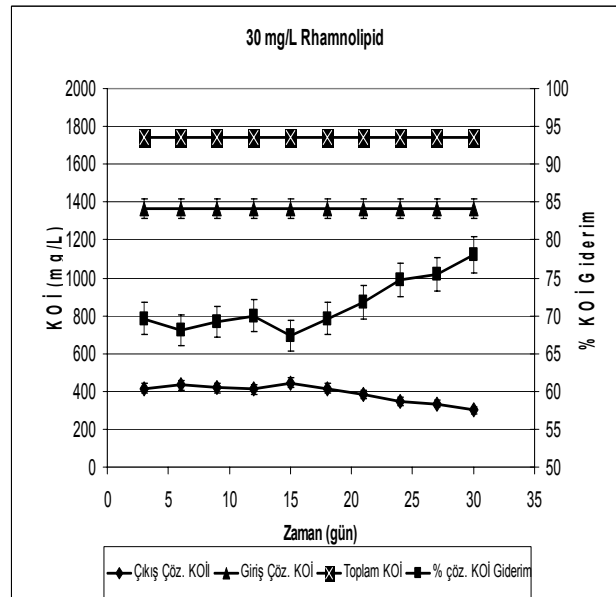
Zamana ve giderim yüzdesine bağlı olarak çizilen grafiklerde toplam KOİ giderim değerlendir-



Şekil 4. Kontrol ve 15 mg/L rhamnolipid ilaveli reaktörde KOİ değerleri ve giderim yüzdesi

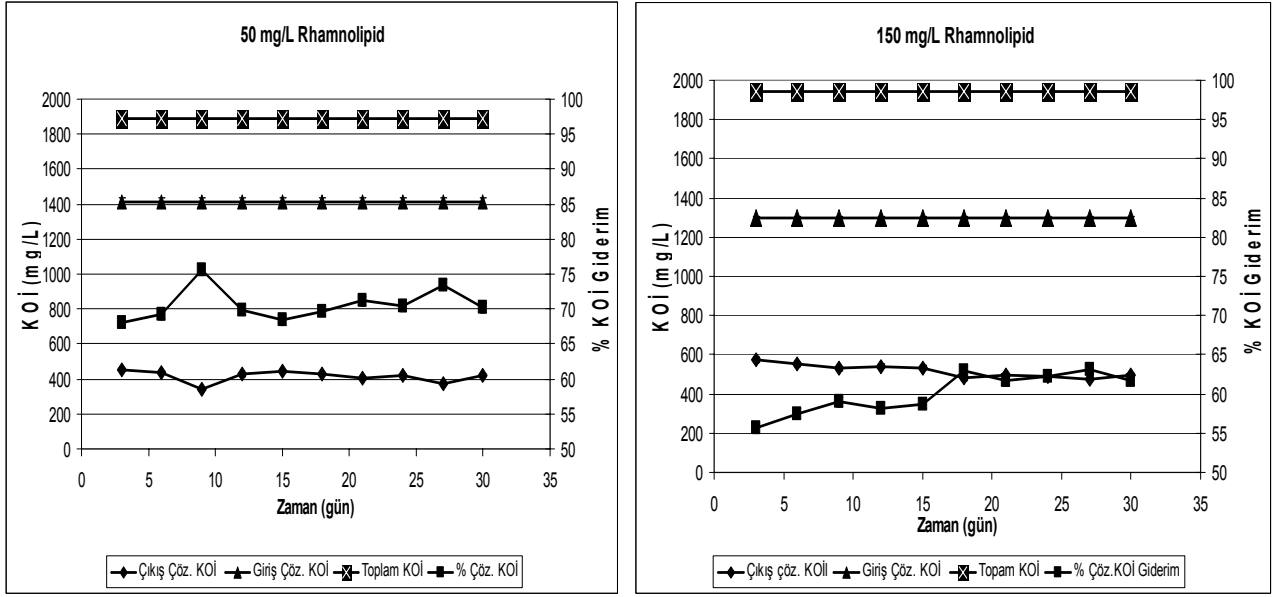
mesinde giriş atıksuda KOİ değerinin 1740–1950 mg/L arasında değişim gösterdiği saptanmıştır. Kontrol reaktörde KOİ giderim yüzdesi 70–77, 15 mg/L rhamnolipid ilaveli reaktörde % 74–79, 30 mg/L rhamnolipid ilaveli reaktörde % 70–78, 50 mg/L rhamnolipid ilaveli reaktörde % 66–72, 150 mg/L rhamnolipid ilaveli reaktörde % 56–65 olarak gerçekleşmiştir. Reaktörlere ilave edilen rhamnolipidin KOİ katkısı sırası ile 30, 100, 300 mg/L olarak belirlenmiştir. Şekillerde gösterilen toplam KOİ rhamnolipidten

kaynaklanan KOİ'leri de içermektedir. 15 mg/L rhamnolipid sürfaktanı içeren reaktörde kontrole göre daha yüksek bir çözünmüş KOİ giderimi elde edilmiştir. Artan rhamnolipid dozlarının KOİ giderimine etkisi olmamış sadece 15 mg/L rhamnolipid içeren reaktörde en yüksek çözünmüş KOİ giderim verimleri elde edilmiştir. 50 ve 150 mg/L rhamnolipid ilave edilmiş reaktörlerde yüksek rhamnolipid konsantrasyonda çözünmüş KOİ'nin kontrole kıyasla azalması bir toksisitenin olması ile açıklanabilir. Bunu belirlemek için tüm rhamnolipid dozları ile *Daphnia magna*'nın kullanıldığı akut toksisite testleri çalışmaları yapılacaktır. Petrokimya endüstrisi atıksularında maksimum çözünmüş KOİ giderimi 15 mg/L'lik rhamnolipid dozu ile elde edildiğinden optimum rhamnolipid dozu 15 mg/L olarak saptanmıştır. Rhamnolipid'in PAH'ı da bünyesinde bulunduran çözünmüş KOİ'yi giderim mekanizması şöyle açıklanabilir: Belli dozlara kadar rhamnolipid biosürfaktanı kolay ayırılabilir bir madde olduğundan mikroorganizmalar tarafından kolaylıkla bünyeye alınabilir (Randhır vd., 2003).



Şekil 5. 30 mg/L Rhamnolipid reaktöründe KOİ değerleri ve giderim yüzdesi

Reaktörlerin PAH giderimi açısından incelenmesi amacıyla reaktörlerin beslenmesi için alınan gerçek petrokimya endüstrisi atıksularının PAH değerlerinin ölçümleri yapılmıştır. 30 günlük



Şekil 6. 50 ve 150 mg/L Rhamnolipid reaktöründe KOİ değerleri ve giderim yüzdesi

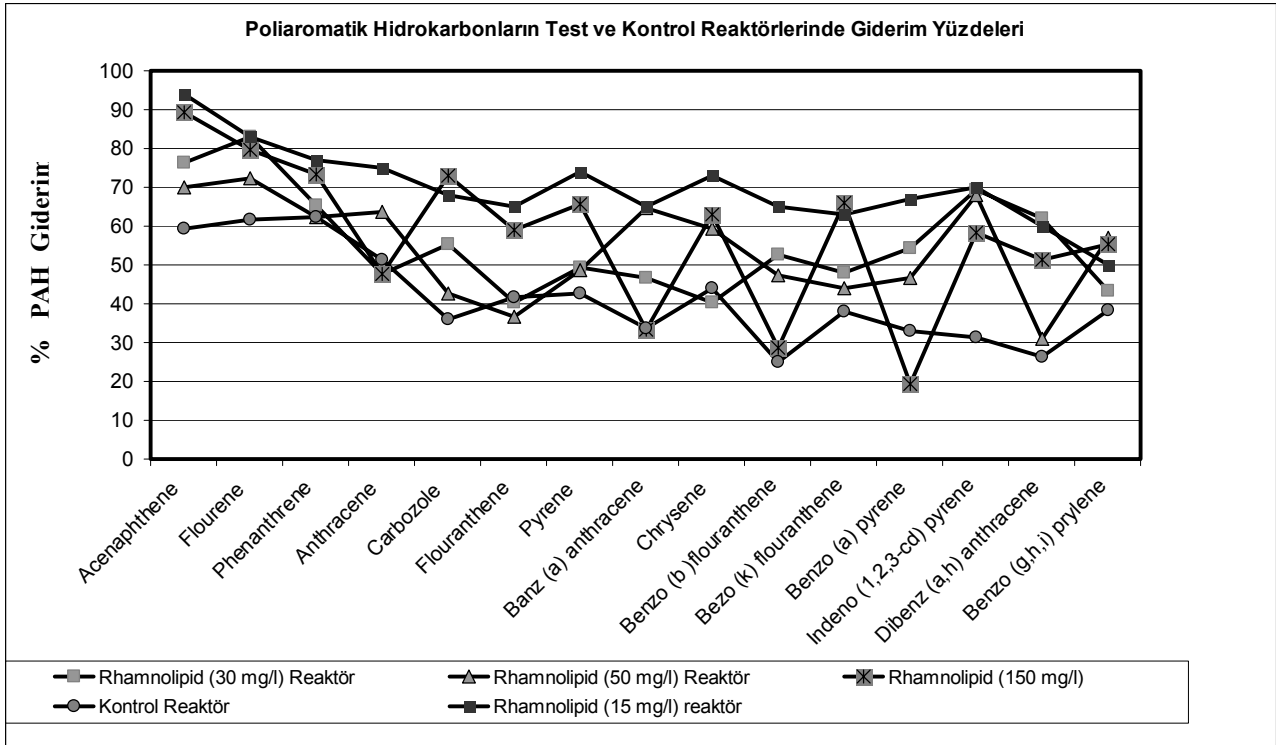
işletme periyotlarında reaktörlerin giriş ve çıkışlarından alınan örneklerde iki tekrarlı ölçümler yapılmış olup, 15 adet PAH'ın arıtma verimleri Şekil 7'de verilmiştir. Petrokimya endüstrisi arıtma sisteminin biyolojik havalandırma ünitesi girişinden alınan atıksuda 15 adet PAH analizi yapılmıştır. Üç ve daha yüksek benzen halkalarına sahip PAH'ların giderim verimleri incelenmiştir. Reaktöre giriş suyunda 3 benzen halkalı ACT, FLN, PHE, ANT ve CRB PAH'larının konsantrasyonları 0.19-16.36 ng/ml. 4 benzen halkalı FL, PY, BaP ve CHR, 0.29-1.68 ng/ml olarak bulunmuştur. Beş benzen halkalı PAH'lardan BbF, BkF ve BaP 0.15-0.2 ng/ml arasındaki konsantrasyonlarda ve 6 benzen halkalı PAH'lar IcdP, DahA BghiP ise 0.31-0.50 ng/ml arasında değişen konsantrasyonlarda bulunmaktadır.

Reaktörlerin 30 günlük işletim süresi sonunda 15 mg/L rhamnolipid ilaveli reaktörlerdeki giderim yüzdeleri, 3 benzen halkalılarda % 68-94, 4 benzen halkalılarda % 65-73.5 benzen halkalılarda % 63-67 ve 6 benzen halkalı PAH'larda % 50-70 arasında bulunmuştur. 30 mg/L rhamnolipid ilaveli ikinci reaktörde benzen halka sayısına göre sırası ile giderim verimleri % 48-76, % 40-49, % 48-54 ve % 43-69 olarak bulunmuştur. 50 mg/L rhamnolipid ilaveli reaktörde % 43-70, % 37-65, % 44-47 ve

% 31-68 150 mg/L rhamnolipid ilaveli reaktörde % 48-80, % 33-63, % 19-66 ve % 51-58 gerçekleşmiş olup kontrol reaktördeki PAH giderim değişimleri % 36-62, % 34-44, % 25-38 ve % 38-57'dir. Manoli ve Samara (2008) yapmış oldukları çalışmalarında, 16 adet PAH'ların konvansiyonel aktif çamur sistemde arıtmaları sonucu 2 ve 3 benzen halkalı PAH'ların (ACT, FLN, PHE ve ANT) evsel atıksu arıtma tesisi ön arıtım ünitelerinde % 28-67 arasında giderildiğini rapor etmişlerdir. Fakat aktif çamur sistemi içerisinde ise 4, 5 ve 6 benzen halkalı poliaromatik hidrokarbonların giderim yüzdelerinin düşük olduğu belirtilmiştir (% 15-25). Yüksek molekül ağırlığı olan PAH'ların parçalan-masının oldukça zor olduğu anlaşılmaktadır.

## Tartışma

Molekül ağırlığı ve halka sayısı arttıkça çözünürlüğü düşen PAH'ların giderimleri de azalmaktadır. Biyosüfaktan ilavesi ile PAH çözünürlüğünü arttırmak için rhamnolipidin kullanılması ile PAH'ların ayrışabilirliği artmaktadır. 15 mg/L rhamnolipid içeren reaktörde kontrol reaktörüne kıyasla 3 benzen halkalılarda ortalama % 7-32, 4 halkalı PAH'larda % 3-30.5 halkalılarda % 4-29 ve 6 halkalı PAH'larda ise % 5-23 daha iyi verim elde edilmiştir. Fakat halka



Şekil 7. 15 adet PAH'ın çalışma süresince elde edilen giderim verimleri

sayısı ve rhamnolipid doz miktarı attıkça bu artışların azaldığı görülmektedir. En yüksek PAH giderimlerine 15 mg/L rhamnolipid içeren reaktörde ulaşılmıştır. En düşük PAH giderim verimlerine rhamnolipid içermeyen kontrol reaktöründe rastlanmıştır. Burada arıtma veriminin artışı ilave edilen rhamnolipid etkisinin kaynaklandığı belirlenmiştir. Bu artış ACT, FLN, PHE (% 70–94) gibi düşük sayıda benzen halkası içeren PAH'ların gideriminde yüksek arıtma verimi elde edilmesine yardımcı olmuştur. Moleküler ağırlıkları ve halka sayısının az olması ile beraber sudaki çözünürlüklerinin diğer poliaromatik hidrokarbonlara göre yüksek olduğu ve rhamnolipid tarafından ayrışabilmelerine olanak sağlandığı belirtilebilir. Bu bağların koparılması ile elde edilen karbonun bakteriyel hücrenin büyümesi ve enerji kaynağı için kullanıldığını belirtilmiştir (Thiem vd., 1995). 15 mg/L optimum biyosürfaktan konsantrasyonu dışındaki dozlarda PAH arıtma veriminde artış olmamıştır. Molekül ağırlığı yüksek olan PAH'larda giderim verimi azalmıştır. Bu durum, PAH'ın alımının ve bakteri hücresine taşınımına atıksu ortamı içerisindeki optimum biosürfaktan dozu ile sınırlı olduğunu göstermektedir.

## Sonuçlar

Bu çalışmada bir petrokimya endüstrisine ait atıksu arıtma tesisi havalandırma havuzu girişinden alınan örneklerin KOİ ve PAH cinsinden karakterizasyonu yapılmıştır. Laboratuvarında kurulan 15 mg/L rhamnolipid içeren SKTR'de petrokimya endüstrisi atıksularının aerobik arıtılabilirliği ile yapılan çalışmada 30 günlük işletme süresi sonunda maksimum KOİ giderme verimi % 78 olmuştur. Kalıcı, zor ayrışabilen PAH'lardan ACT, FLN, PHE, ANT, CRB; % 94-83-77-75-68, moleküler ağırlıkları daha büyük olan 4, 5 ve 6 benzen halkalı olanlar (FL, PY, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, IcdP, DahA ve BghiP) % 65-74-65-73-65-63-67-70-60-50 arıtma verimi ile giderilmiştir. Maksimum KOİ ve PAH giderimi için optimum rhamnolipid dozu 15 mg/L olarak belirlenmiştir.

Çevre ve Orman Bakanlığınının 26/11/2005 tarihli ve 26005 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan "Tehlikeli maddelerin su ve çevresinde neden olduğu kirliliğin kontrolü yönetmeliği (76/464/AB)"nin Ek-2'de yer alan poliaromatik hidrokarbon bileşiklerinden ANT ve BaP, BbF, BghiP, BkF, FLN, In123cdP ve NaP bulunmak-

ta fakat deşarj standartları için herhangi bir alıcı ortam konsantrasyon değeri bulunmamaktadır. Tablo1’de belirtilen BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP ve In123cdP’nin kanser yapma riskleri bulunmaktadır. 15 mg/L dozda rhamnolipid biosürfaktanı ilave edilmiş konvansiyonel aerobik sürekli tam karışimli tank (SKTR) reaktörde sırası ile % 65–73–65–63–67–70–60 ve 50 oranlarında arıtılmaktadır. Bu nedenle belirtilen yönetmelik çerçevesinde petrokimya endüstrisi ve diğer endüstriler için PAH’ları içine alan deşarj limitlerinin en kısa zamanda belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca bu PAH’lara ait toksisite testleri ile ilişkilendirilmesi uygun olacaktır.

### Teşekkür

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi 2007. KB.FEN.057 no’lu BAP projesine ayrıca, PAH analizleri için yöntemi oluşturmada yardımcı olan sayın Doç. Dr. Mustafa ODABAŞI ile ekstraksiyon işlemlerinde yardımcı olan Araş. Gör. Yetkin DUMANOĞLU’na teşekkürlerimizi sunarız.

### Kaynaklar

Albert, L.J., Ravendra, N., (2003). Bioremediation of high molecular weight, polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene, *International Biodeterioration and Biodegradation*, **45**, 57-88.

APHA, (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st Edition. APHA. Washington, D.C.

Barkay, T.S., Navon-Venezia, S., Ron E.Z., Rosenberg, E., (1999). Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan, *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 2697-2702.

Bognolo, G., (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons, *Physicochemical and Engineering Aspects*, **152**, 41-42.

Kosaric, N., (2001). Biosurfactants and their application fir soil bioremediation, *Food Technology Biotechnology*, **39**, 4, 295-304.

Manoli, E., Samara, C., (2008). The removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in the wastewater treatment process: experimental calculations and model predictions, *Environmental Pollution*, **151**, 3, 477-485.

Pierre, B., Sabahudin, H., Keith, B.M., John, H.T.L., (2006). Analysis of the 16 environmental protection agency priority polycyclic aromatic hydrocarbons by high performance liquid chromatography-oxidized diamond film electrodes, *Journal of Chromatography A*, **1103**, 248-256.

Randhir, S.M., Rockne, K.J., (2003). Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**, 10, 2280-2292.

Restrepo, B., Verbel, J.O., Lu, S., Fernandez, J.G., Avila, R.B., Hoyos, I.O., Aldous, K.M., Addink, R., Kannan, K., (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in fish bile and sediments from coastal waters of colombia, *Environmental Pollution*, **151**, 3, 452-459.

Santos, E.C., Jacques, R.J.S., Bento, M.F., Maria do Carmo R. Peralba, Selbach P.A. Enilson L.S. Sa’ a, Fla’vio A.O. Camargo, (2008). Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas sp.*, *Bioresource Technology*, **99**, 7, 2644-2649.

Thiem, A., Fritzsche, C., (1995). Utilization of solubilized and crystalline mixtures of polyaromatic hydrocarbons by *Mycobacterium sp.*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **42**, 964-968.

U.S. Environmental Protection Agency, (2002). Integrated risk information system (IRIS). Office of Research and Development, National Center for Environmental Assessment, Washington, DC.

Yuan S.Y., Wei S.H., Chang, B.V., (2000). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture, *Chemosphere*, **41**, 1463-1468.

Zarooni, M.A., Elshorbagy, W., (2006). Characterization and assessment of al ruwais refinery wastewater, *Journal of Hazardous Materials A*, **136**, 398-405.

Zhang, Y., Mailer, W.J., Miller, R., (1997). Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene, *Environmental Science Technology*, **31**, 2211-2217.

---

<http://www.petkim.com.tr/Petkim/index.jsp?git=petrokimya&go=23> (2007)

## Amoksisilin anaerobik arıtılabilirliği

Hakan ÇELEBİ\*, Delya SPONZA

DEÜ Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 35160, Buca, İzmir

### Özet

Kanalizasyon, tıbbi atıklar, ilaç endüstrisi, gıda üretimi, çiftlik hayvanlarının üretimi gibi faaliyetler antibiyotiklerin kaynaklarını oluşturmaktadır. Antibiyotiklerden  $\beta$ -Laktam grubu olanlar insan sağlığında ve veterinerlikte çok geniş bir kullanım aralığına sahiptir. Özellikle Amoksisilin geniş spektrumlu bir etkiye sahiptir. Genellikle çiftlik hayvanlarının gelişimi ve sağlığı için (*Helicobacter pylori* ile *Actinobacillus pleuropneumoniae*'nin öldürülmesi) veterinerlikte ve özellikle insan sağlığında kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin anaerobik koşullarda arıtılabilirliği ile yapılmış çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Antibiyotiklerin  $BOI_5/KOI$  oranları düşük olduğundan bu oranın Anaerobik Çok Kademeli Yatak Reaktör (AÇKYR) kullanarak yüksek değerlere çıkarılması düşünülmektedir. Genelde antibiyotik içeren atık suların inert  $KOI$  oranları ve zor ayrışan organik madde düzeyleri yüksektir. Bu nedenle zor ayrışan organik maddenin anaerobik koşullarda aklımasyon ile mikroorganizmalar tarafından alınmasını sağlamak önemlidir. Bu çalışmada serum şişelerinde anaerobik granül çamur kullanılarak Amoksisilin için  $IC_{50}$  değeri 195 mg/L bulunmuştur. Anaerobik kesikli çalışmalarda Amoksisilin konsantrasyonu 5 mg/L'den 350 mg/L'ye artırıldığında SMA'nın 1.2 g $CH_4$ - $KOI$ /gUAKM.gün'den 0.18 g $CH_4$ - $KOI$ /gUAKM.gün'e düştüğü gözlenmiştir. Aklımasyon safhası olmadan işletme periyodunun 9 ve 10. gününde  $KOI$  giderim veriminin % 70'e çıktığı ve sabit kaldığı, metan üretiminin 9000 ml, metan yüzdesinin de % 50 olduğu gözlenmiştir. TUYA miktarlarının 1.Hazneden 3.Hazneye geçişte azaldığı ve TUYA konsantrasyonlarının 500 mg/L'den 120–140 mg/L'ye düştüğü gözlenmiştir. 1.Haznede pH'ın 6.98 olduğu çıkışta ise pH değerlerinin arttığı (7.55) gözlenmiştir.  $HCO_3$  alkalinitesinin 569–874 mg/L arasında olduğu ve TUYA/  $HCO_3$  oranının 0.15-0.38 arasında olduğu gözlenmiştir. Amoksisilin konsantrasyonu reaktör işletilmesinin 9 ve 19. günlerinde 150 mg/L'den 70 mg/L'ye düştüğü yani % 53 oranlarında arıtma verimi ile giderildiği gözlenmiştir. Amoksisilin içeren atıksuyun  $BOI_5/KOI$  oranının anaerobik arıtma sonrası 0.05'ten 0.25'e yükseldiği gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Anaerobik çok kademeli yatak reaktör, amoksisilin, anaerobik arıtım,  $KOI$ , TUYA/ $HCO_3$ .

\*Yazışmaların yapılacağı yazar Hakan ÇELEBİ. hakan.celebi@deu.edu.tr; Tel: (232) 412 70 91.

Bu makale, 11-13 Haziran 2008 tarihleri arasında İstanbul'da düzenlenen 11. Endüstriyel Kirlenme Kontrolü Sempozyumunda sunulan bildirilen arasından, İTÜ Su Kirlenmesi Kontrolü Dergisi'nde basılmak üzere seçilmiştir. Makale ile ilgili tartışmalar 21.08.2009 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

## Anaerobic treatment of amoxicillin

### Extended abstract

The pharmaceutical wastewaters contain a variety of organic and inorganic constituents including spent solvents, catalysts, additives, reactants and small amounts of intermediates and products, and may therefore be high in chemical oxygen demand (COD). It is estimated that approximately half of the pharmaceutical wastewaters produced worldwide are discarded without specific treatment. Recently there are specific studies reporting the application of anaerobic technology for the treatment of drug pharmaceutical wastewaters. However, the high COD concentration in such pharmaceutical wastewaters makes them potential candidates for anaerobic technology. The anaerobic process is very much favorable for toxic wastewater, where aerobic oxidation of organic matter would result in high-energy consumption and production of huge quantities of sludge. The most important merits of anaerobic treatment are the ability to treat toxic wastes, low energy input, low sludge yield, low nutrient requirement, low operating cost, low space requirement and net benefit of energy generation in the form of biogas. Modern anaerobic processes used for high rate reactors such as the UASB have been applied to the treatment of a wide variety of industrial wastewaters, increased disinfection of pathogenic organisms and eliminating the need of cooling for effluent of high temperature. The occurrences of several kinds of antibiotics like macrolides have been reported in many environmental samples such as municipal wastewater, surface water, groundwater, sludge and sediments. Antibiotics are often not metabolised completely in the human body after administration and are consequently excreted into the sewage system, which becomes the main route of emission of these compounds. The activities such as sewage, medical wastes, medicine production, food production and livestock production have created the sources of antibiotics.  $\beta$ -Lactam groups of antibiotics have a wide area of usage in human healthy and veterinary medicine and they have inhibitory effects on bacteria in the biological treatment systems. One of the most frequently used antibiotics in the world is amoxicillin. The effect of amoxicillin in human excrement on the biodegradation process of feces has been reported and it was found that

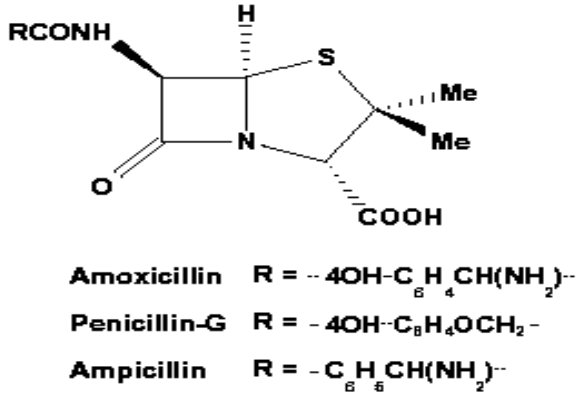
although the concentration of amoxicillin in toilet matrix declined quickly, it seemed to be basically difficult to treat antibiotics in a bioreactor due to their inhibitory effect on bacteria. Since the delaying effect on the feces decomposition process was strong. Specially, Amoxicillin is a broad spectrum antibiotic. Generally, it is used for growing of livestock and their health (for *Helicobacter pylori* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* to be killed) in veterinary and human healthy. Since the wastewater containing antibiotics have low  $BOD_5/COD$  ratios, it is thought that this ratio could be increased by using anaerobic multi-chamber bed reactor (AMCBR). Since the wastewater containing antibiotics have high inert COD ratios and recalcitrant organic matters, it is important to remove the slowly organic matters via acclimation of anaerobic microorganisms under anaerobic conditions in an AMCBR reactor system. In this study, the  $IC_{50}$  value for Amoxicillin is ascertained as 195 mg/L by using anaerobic granular sludge in anaerobic batch reactors. When Amoxicillin concentration is increased from 5 mg/L to 350 mg/L in batch operation, it is observed that SMA decreased from 1.2 g $CH_4$ -COD/gVSS.day to 0.18 g $CH_4$ -COD/gVSS.day. In ninth and tenth days of the operation period, without acclimation step, it is observed that COD removal efficiency reached to 70% the daily methane production was 9000 ml, while the percent of methane gas produced was 50% of the total gas. It is observed that total volatile fatty acid (TVFA) concentrations decreased from the third chamber of the AMCBR to the first chamber of the AMCBR. The TVFA concentrations decreased from 500 mg/L to 120–140 mg/L in the third chamber of the anaerobic reactor. It was showed that the  $HCO_3$  alkalinity ranged 569–874 mg/L and TVFA/  $HCO_3$  ratios ranged between 0.15 and 0.38. The amoxicillin concentrations decreased from 150 mg/L to 70 mg/L, after one week of operation period without acclimation. The Amoxicillin removal efficiency was recorded as 53% after 9 and 19 days of operation period. Also, it is observed that The  $BOD_5/COD$  ratio of wastewater containing Amoxicillin antibiotic increased from 0.05 to 0.25 after 10–20 days of anaerobic treatment in AMCBR reactor system.

**Keywords:** Anaerobic multi-chamber bed reactor, amoxicillin, anaerobic treatment, COD,  $BOD_5/COD$  ratio, TVFA/ $HCO_3$ .



## Giriş

Antibiyotikler, etkilerine ve kimyasal yapılarına göre  $\beta$ -Laktamlar, Tetrasiklinler, Makrolidler, Aminoglikozidler, Quinolonlar, Linkosamidler, Oksazolidler olarak sınıflandırılırlar (Demirden, 2005).  $\beta$ -Laktam antibiyotikler geniş spektrumlu olup, gram pozitif ve negatif organizmalardan kaynaklanan enfeksiyonların tedavisinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Şekil 1) (Baere vd., 2005; Cass vd., 2003).



Şekil 1. Amoksisilinin kimyasal yapısı

Antibiyotikler biyolojik parçalanmaya dayanıklı olmaları nedeniyle değişik ortamlarda birikirler. Yüksek organik yüke sahip olan antibiyotik atıksularının bu nedenle çevreye boşaltılmadan önce kesinlikle arıtılması gerekmektedir. İlaç endüstrisinin anaerobik koşullarda arıtılabilirliği ile yapılmış çok az sayıda çalışma yer almaktadır (Arıkan vd., 2006; Kim vd., 2007; Lallai vd., 2002; Nandy vd., 2001).

Anaerobik çok kademeli yatak reaktörler ile ilgili literatür araştırmalarında pek fazla çalışmaya rastlanmamıştır. Özellikle asidik petrokimya endüstrisi atıksularının arıtımı için bu tip reaktör tercih edilmiştir (Patel ve Madamvar, 2001). Anaerobik arıtmada sistemde ilk aşamada oluşan organik asitlerin parçalanıp metan ve karbondioksit dönüşmesi gerekmektedir, Hazne-1'de hidroliz ve asitleşme diğer haznelerde ise metanlaşma metanojenler tarafından gerçekleştirilmektedir. Aynı zamanda antibiyotiklerin anaerobik arıtılabilirliği ile ilgili çalışmalarda çok kademeli anaerobik yatak reaktör ile ilgili bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Bu tip reaktörde

uygun şartlar altında oldukça yüksek yükleme oranları uygulanabilmektedir.

Bu çalışmada veterinerlikte ve insan tedavisinde yoğun bir şekilde kullanılan  $\beta$ -Laktam grubu antibiyotiklerden biri olan Amoksisilinin anaerobik çok kademeli yatak reaktörde anaerobik arıtılabilirliği incelenmiştir. Bu çalışmada bir aklımasyon süresi (start-up) olmadan 150 mg/L Amoksisilin antibiyotığının anaerobik reaktör verim özelliklerine (KOİ giderimi, toplam ve metan gaz üretimleri, spesifik metanojenik aktivite değerleri, HCO<sub>3</sub> alkalinitesi ile TUYA konsantrasyonlarının değişimleri) incelenmiştir.

## Materyal ve yöntem

*Anaerobik çok kademeli yatak reaktör ve deney düzeneği-* 150 mg/L Amoksisilin, 3500 mg/L KOİ'yi veren melas, Vanderbilt mineral ortamı, NaHCO<sub>3</sub> ve 0.5 mg/L Sodyum tiyoglukolat içeren sentetik atıksu ile reaktör 10 gün boyunca işletilmiştir. 150 mg/L Amoksisilin'in KOİ eşdeğeri 100 mg/L olduğundan giriş atıksuyunun toplam KOİ konsantrasyonu 3500 mg/L civarında olmuştur. Anaerobik çok kademeli yatak reaktör için işletme koşulları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Anaerobik çok kademeli yatak reaktör için işletme koşulları

İşletme Parametre-leri	Birim	AÇKYR
HRT	Gün	1.15
Debi	L/gün	4.00
Org.Yük. Hızı (OLR)	g.KOİ/L.gün	2.70
Amoksisilin Kons.	mg/L	150
F/M Oranı	g.KOİ/g.UAKM.gün	0.046
Sıcaklık	°C	37 ±1
Giriş KOİ	mg/L	3500

Asidojenik ve metanojenik mikroorganizmaların dengeli büyümesi ve faz ayrımı için iki farklı türde destek materyali haznelerde kullanılmıştır. Hazne-1'de 300 g. pomza taşı, Hazne-2'de 315 gram olacak şekilde pomza taşı+kömürleşmiş kemik ve Hazne-3'te ise 330 gram kömürleşmiş kemik sisteme yerleştirilmiştir. AÇKYR reaktörü beslemek için reaktörün % 20'sini dolduracak kadar, İzmir Pakmaya işletmesinden asidojenik ve metanojenik nitelikte kısmi granülleşmiş

anaerobik çamur alınmıştır. Çalışmada kullanılan reaktör sistemin Şekil 2’de verilmiştir. Reaktörün tüm hacmi 4.5 L olup haznelerin hacimleri 1.5 L’dir. Sentetik atıksu 150 mg/L Amoksisilin, melas, Vanderbilt mineral ortamı, 5000 mg/L  $\text{NaHCO}_3$  ve 0.5 mg/L Sodyum tiyoglukat içermektedir.

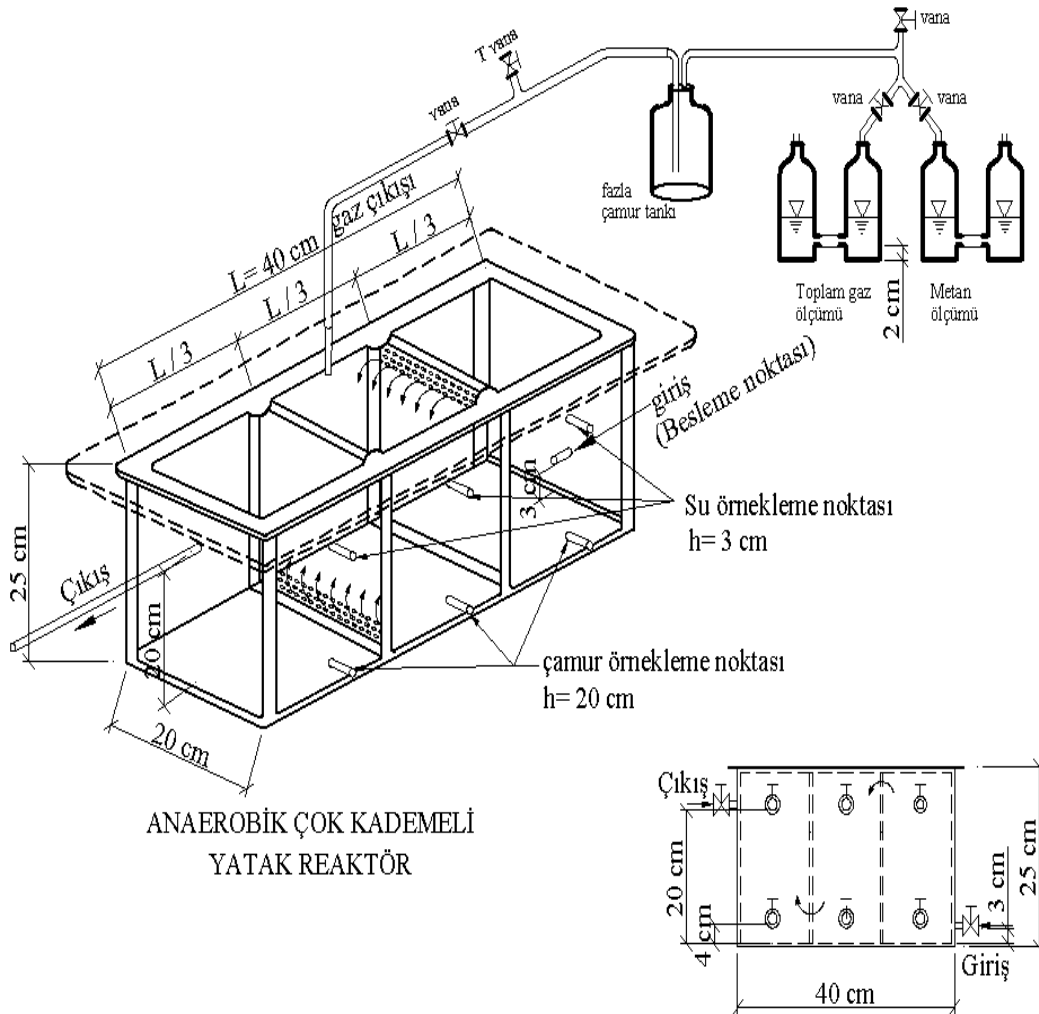
## Analitik yöntemler

### Gaz ölçümleri

Gaz üretimleri sıvıların yer değiştirmesi yöntemi ile ölçülmüştür. Toplam gaz % 2 (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ve % 10 (w/v) NaCl içeren sıvıdan geçirilerek ölçülmüştür. Metan gazı; oluşan gazın % 3’lük NaOH içeren sıvıdan geçirilmesi ile bulunmuştur (Beydilli vd., 1998; Razo-Flores vd., 1997). Metan gaz yüzdesi ise; Dräger Pac®Ex methane gaz analiz cihazı ile ölçülmüştür.

### Anaerobik toksisite ve Spesifik Metanojenik Aktivite (SMA) deneyleri

3.5 mL anaerobik çamur içeren 0.35 mL Vanderbilt mineral ortamı serum şişelerine karbon kaynağı olarak 3500 mg/L KOI’yi verecek melas, pH için  $\text{NaHCO}_3$ , ideal ortam koşulları için Sodyumtiyoglukat konulmuş ve 10-350 mg/L’lik Amoksisilin dozları ilave edilmiştir. 37.5 °C bir gün süreli inkübasyon sonucu oluşan metan gazının antibiyotik içermeyen numunelerde oluşan metan gazına kıyaslanması sonucu % aktivite; (Owen vd., 1979; Donlon vd., 1995)’e göre hesaplanmış ve çizilen grafikten de  $\text{IC}_{50}$  (% 50’sini inhibe eden antibiyotik konsantrasyonu) değeri bulunmuştur. SMA testi anaerobik koşullarda ATA testinde olduğu gibi 35 °C’de yapılmıştır. 1 g KOI’nin giderimine 35 °C’de 3.96 mL  $\text{CH}_4$  üretimi eşdeğerdir (Speece, 1996). Belirtilen formül ile SMA hesaplanmıştır.



Şekil 2. Anaerobik çok kademeli yatak reaktör

SMA= g CH<sub>4</sub> KOİ/V\*UAKM  
 SMA: g CH<sub>4</sub> KOİ/g-UAKM.gün  
 V: numune hacmi (75 mL)  
 UAKM: biyokütle konsantrasyonu: g.UAKM/L

### KOİ ve BOİ<sub>5</sub> ölçümü

WTW Oxi Top IS 12 sistem kullanılarak BOİ<sub>5</sub> ölçülmüştür. KOİ ise kapalı reflux kolorimetrik yöntemi ile hesaplanmıştır (APHA-AWWA, 1992).

### UAKM ile TUYA ve HCO<sub>3</sub> alkalinitesi ölçümleri

APHA-AWWA (1992)'ye göre UAKM miktarı hesaplanmıştır. Anderson ve Yang (1992), tarafından titrimetrik metot kullanılarak UYA ve HCO<sub>3</sub> alkalinitesi ölçülmüştür. İlk olarak numunenin pH değeri belirlenip 5.1 ve 3.5 pH seviyelerine ulaşıncaya kadar titrasyon yapılır ve sonuçlar bilgisayar programı ile hesaplanır.

### pH ve sıcaklık ölçümleri

WWT pH 330 tipi pH metre ile sistemdeki pH ve sıcaklık değerleri ölçülmüştür.

### Amoksisilin ölçümü

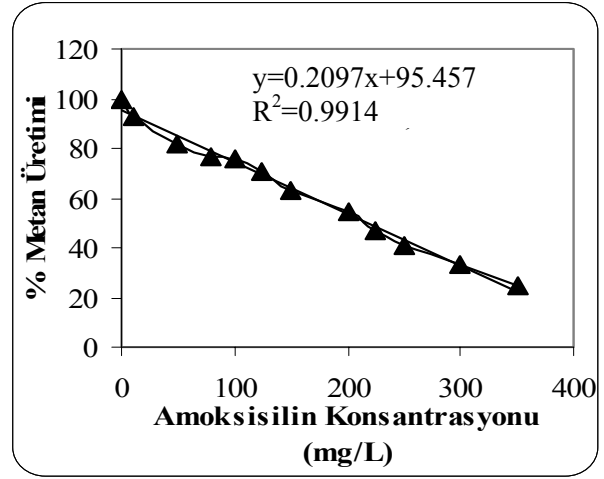
Agilent-1100 Series marka HPLC kullanılarak Amoksisilinin analizleri; C<sub>18</sub> ters kolon, (150 mm x 4.5 mm, 5µm) kullanılarak yapılmıştır. Mobil Faz (75:25/25:75) (v/v) metanol/su+ fosfattan oluşmuş olup, akış hızı 1 mL/dakika ve enjeksiyon hacmi 12 µL'dir. 287 nm'de UV dedektör kullanılarak yapılmıştır (Hsu vd., 1992).

## Sonuçlar

### ATA ve SMA testi sonuçları

Şekil 3'te Amoksisilinin artan derişimleri ile % aktivite azalma değerleri arasındaki grafik verilmektedir. Şekil 3'ten Amoksisilin için IC<sub>50</sub>=195 mg/L olduğu görülmektedir. IC<sub>50</sub> değerinin yüksek olması anaerobik çamurun antibiyotiğın toksisitesine daha dirençli olduğunu göstermektedir.

Gartiser ve diğerleri (2007) tarafından yapılan inhibisyon testleri sonucunda Amoksisilin ile ilgili etkin bakterilerin % 10'unu, % 20'sini ve % 50'sini etkileyen etkin antibiyotik dozları EC<sub>10</sub>=12.3 mg/L, EC<sub>20</sub>=95.9 mg/L ve EC<sub>50</sub>=2721

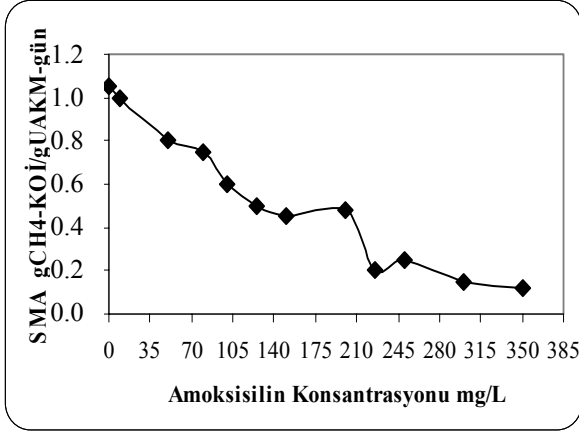


Şekil 3. ATA testi (IC<sub>50</sub> = 195 mg/L)

mg/L olarak saptanmıştır. *Synechococcus leopoliensis* ve *Selenastrum capricornutum* kültürlerinin büyümesini engelleyici bir çalışmada Lindberg ve diğerleri (2007), 96 saatte siyanobakteri ve alg türlerinin % 50'sini etkileyen Amoksisilin ve Eritromisin EC<sub>50</sub> değerinin 0.78 µg/L ve 10.3 µg/L olduğunu bulmuşlardır. Lalumera ve diğerleri (2004), su kültürlerinde antibiyotiklerin etkileri üzerine yaptıkları çalışmada Amoksisilin, Okisitetrasiklin, Flumeguvin ve Tiyamfenicol gibi önemli antibiyotik gruplarının EC<sub>50</sub> değerlerini 121–139 mg/L olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada kullanılan kısmi granüleleşmiş çamur için Amoksisilinin IC<sub>50</sub> değerinin yukarıda verilen çalışmalarda saptanan değerlerden çok daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu durum bu çalışmada aşı olarak kullanılan kısmi granüleleşmiş çamurun Amoksisiline dirençli olduğunu göstermektedir.

SMA testi, anaerobik çamurun metanojenik aktivitesinin bir göstergesidir. Şekil 4'te SMA değeri Amoksisilin için 0.12-1.05 g CH<sub>4</sub>-KOİ/g-UAKM.gün aralığında olup antibiyotik konsantrasyonu arttıkça azalmaktadır. Anaerobik çamurun metan kapasitesini ölçmek için kullanılan SMA testi, reaktörün işletme dönemlerinde sistemde tutulması gereken UAKM'nin belirlenmesini ve sisteme uygulanabilecek optimum organik yüklemenin ve arıtılacak antibiyotik dozlarının hesaplanmasını sağlayarak, sistemlerin işletmeye alma sürecini kısaltmaktadır. Yapılan SMA analizleri daha sonraki çalışmalarda anae-

robik reaktörlerde arıtılacak antibiyotik konsantrasyonunu da tayin etmeye yarar.



Şekil 4. Amoksisilin'in SMA değişimleri

Literatürde yapılan çalışmalarda doğrudan Amoksisilin antibiyotiğinin anaerobik arıtılması ile ilgili çalışmalardan SMA değerini içeren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bazı antibiyotikleri içeren atıksulardaki SMA değerleri derlenmiştir. Öktem ve diğerleri (2007) ilaç sanayi atıksularının arıtımı için alternatif hibrid yukarı akışlı yatak reaktör kullanmışlar ve antibiyotik içeren ilaç sanayi atıksularının SMA değerini 0.5 gCH<sub>4</sub>-KOİ/gUAKM.gün olarak saptamışlardır. Ayrıca 8 kg COD/m<sup>3</sup>.gün'lük organik yüklemde KOİ giderim verimini % 72 olarak bulmuşlardır. Yukarı akışlı yatak reaktörde antibiyotik arıtımı ile ilgili bir çalışmada Wollenberger ve diğerleri (2000) oksitetrasiklin için SMA değerini 0.425 g CH<sub>4</sub>-KOİ/gUAKM.gün olarak bulmuşlardır.

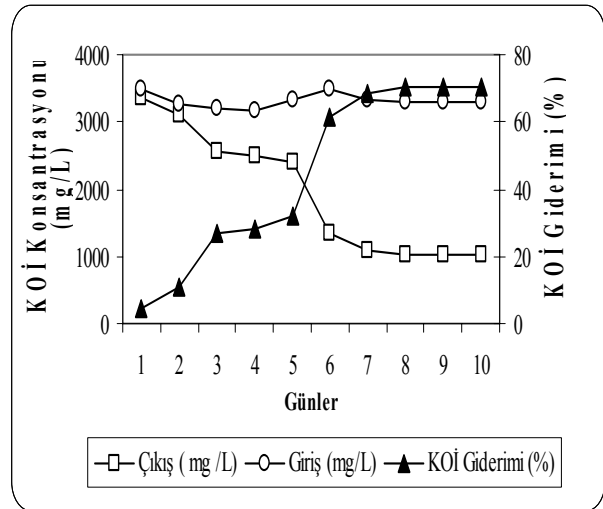
#### Arıtılabilirlik çalışmaları

AÇKYR'nin anaerobik koşullarda beslemesi ve bakteri popülasyonun dengelenmesi için adaptasyon süreci çok önemli olmaktadır. Bu nedenle sistemin kararlı hal koşullarına gelmesi için belli bir süreçte işletilmesi gerekmektedir (anaerobik kararlı hal koşulları yaklaşık 15 günlük bir periyotta çıkış suyu KOİ giderimi ile oluşan gazın metan yüzdesinde % 10'luk bir değişiklik olmalıdır). Ancak bu çalışmada aklimasyon safhası olmadan doğrudan 150 mg/L Amoksisilin antibiyotiği ile beraber reaktör beslenerek anaerobik AÇKYR reaktörün verim özellikleri ince-

lenmiştir. ATA testinde elde edilen IC<sub>50</sub> değeri (195 mg/L) dikkate alınarak bu değer altında Amoksisilin konsantrasyonu (150 mg/L) seçilmiştir.

#### AÇKYR reaktörde KOİ giderimleri

Şekil 5'te AÇKYR'nin ilk işletim aşamasında KOİ giderimi ve KOİ konsantrasyonundaki değişimler gösterilmiştir. İşletmeye alındıktan sonra anaerobik çok kademeli yatak reaktörde 7. ve 10. günler için KOİ giderim verimleri % 70 olarak bulunmuştur. Literatürde Amoksisilin'in anaerobik arıtılabilirliği ile ilgili çalışmalara pek rastlanmamıştır. Chelliapan ve diğerleri (2006); makrolid antibiyotikleri içeren atıksuların anaerobik şartlarda organik yüklemenin 0.43 kg/m<sup>3</sup>.gün'den 3.73 kg/m<sup>3</sup>.gün'e çıkarılmasında KOİ giderim veriminin % 70'e düştüğünü, % 85 KOİ giderim verimi için 4 günlük alıkonma süresinde ideal organik yüklemenin 1.86 kg/m<sup>3</sup>.gün olduğunu belirtmişlerdir.



Şekil 5. AÇYR'de KOİ değişimleri

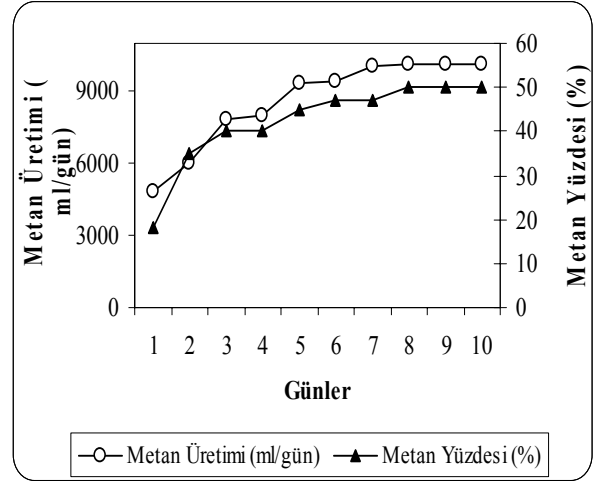
Mohan ve diğerleri (2001) tarafından yapılan bir çalışmada antibiyotik içeren ilaç endüstrisi atıksularının anaerobik koşullarda organik yüklemenin 0.25 kg/m<sup>3</sup>.gün'den 2.5 kg/m<sup>3</sup>.gün'e çıkarılmasının KOİ giderim verimini % 60'a düşürdüğünü, % 80 KOİ giderme verimi için uygun organik yüklem değerinin 1.25 kgKOİ/m<sup>3</sup>.gün olduğu saptanmıştır. Öktem ve diğerleri (2006) tam karışimli anaerobik asidojenik reaktörde optimum işletme koşullarında antibiyotik içeren atıksu-

ların alıkonma süresi, pH, organik yükleme değerleri kriter alınarak bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda pH 5-6.3 organik yükleme 13 kg KOİ/m<sup>3</sup>.gün ve KOİ giderimi maksimum % 44 bulunmuştur. Ayrıca reaktörde baskın uçucu asitlerin asetik, probiyonik ve n-bütrik asitler olduğunu belirlemişlerdir. Buitron ve diğerleri (2002) ardışık kesikli biyofiltrede anaerobik/aerobik koşullarda 8-24 saatlik antibiyotik içeren atıksuların arıtımı ile ilgili çalışmalarında % 95-97 KOİ giderimi elde etmişlerdir. Sridhar ve diğerleri (2001) kesikli tip anaerobik reaktörde ilaç sanayi atıksularının artırımını yapmışlardır. Çalışma sonucunda 1.9 kg KOİ/m<sup>3</sup>.gün organik yüklemde % 83 ve 5.8 kg /m<sup>3</sup> organik yüklemde ise % 45 KOİ giderimleri bulunmuştur. Sponza ve diğerleri (2006) yaptıkları çalışmada anaerobik sürekli yukarı akışlı çamur yatak reaktör ile sürekli tam karışimli tank reaktör sisteminde sülfamerazinin arıtımını gerçekleştirmişlerdir. Farklı sülfamerazin konsantrasyonunda % 76, % 97 KOİ giderimi ölçülmüştür. Farklı işletme koşullarında antibiyotik içeren atıksular yukarı akışlı anaerobik filtrede artılmıştır. Öktem ve diğerleri (2007) ilaç sanayi atıksularının arıtımı için alternatif hibrid yukarı akışlı yatak reaktör kullanmışlar ve antibiyotik içeren ilaç sanayi atıksularının 3 kg COD/m<sup>3</sup>.gün organik yükleme ve 2 günlük alıkonma süresinde KOİ giderim verimleri %96, %91, %85 olarak bulmuşlardır.

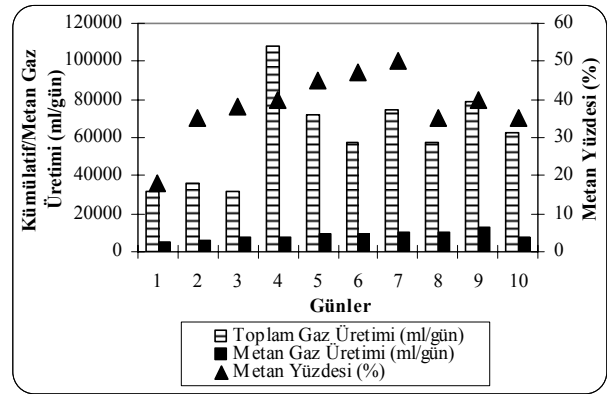
#### AÇKYR reaktörde toplam ve metan gazı üretimleri

Şekil 6'da AÇKYR reaktörün 10 günlük çalıştırılması sonucunda günlük metan üretimleri ve metan yüzdesi verilmiştir. 10. gün sonunda metan üretimi 9000 mL/gün ve metan yüzdesi % 50 olarak bulunmuştur.

Amoksisilin derişimi 150 mg/L ve melas eşdeğeri KOİ konsantrasyonu 3500 mg/L olduğunda anaerobik çamurda kümülatif gaz üretimleri ve metan gazı yüzdesi Şekil 7'de verilmiştir. Kümülatif günlük toplam ve metan gazları ile metan yüzdesi ilk gün sırasıyla 31680 mL/gün, 4800 mL/gün ve % 18 olarak kaydedilmiştir. Maksimum toplam gaz, metan gazı üretimleri ve metan yüzdesi 108000 mL/gün, 10145 mL/gün ve % 50 olarak belirlenmiştir.



Şekil 6. AÇKYR'de metan gazı değişimleri

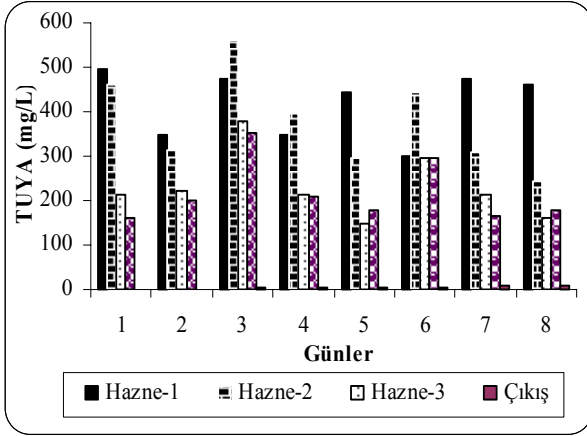


Şekil 7. AÇKYR'de toplam, metan üretimleri ve metan yüzdesi değişimleri

#### AÇKYR'de TUYA değişimleri

150 mg/L Amoksisilin içeren AÇKYR'de 10 günlük işletme süreci için TUYA üretimleri sistemdeki her bölmede gözlenmiştir (Şekil 8). TUYA konsantrasyonları 5, 7 ve 10. günlerde 1. haznede 300-500 mg/L civarında ölçülmüştür. Çünkü 1. hazne anaerobik arıtmada asitleşme kademesi olarak kullanılmaktadır. AÇKYR reaktörün 3. haznesinde ve çıkışta TUYA konsantrasyonlarının salınım gösterdiği gözlenmiştir. Ancak KOİ'nin % 70'e yaklaşan bir verimle ve oluşan gazın metan yüzdesinin yüksek olduğu 6 ve 10. günlerde çıkış örneklerindeki TUYA konsantrasyonlarının düştüğü gözlenmiştir.

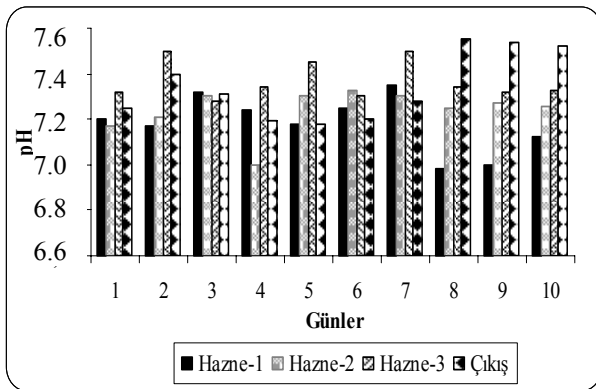
TUYA konsantrasyonları Hazne 1'de 490-500 mg/L Hazne 2 ve 3'te ise 180-400 mg/L arasında ölçülmüştür. Çıkışta ise 120-170 mg/L civarında ölçülmüştür.



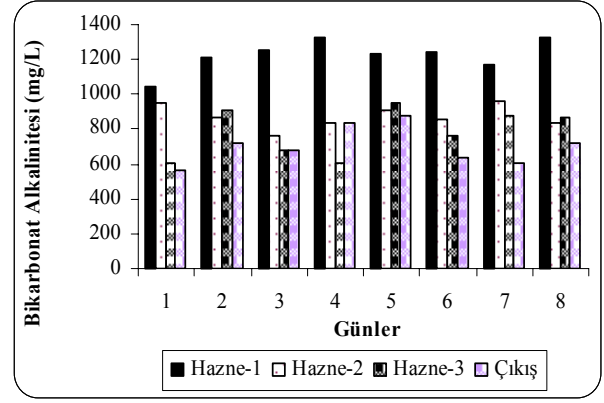
Şekil 8. AÇKYR'de TUYA değişim miktarları

### AÇKYR'de pH, HCO<sub>3</sub> alkalinitesi, TUYA/HCO<sub>3</sub> oranlarındaki değişimler

Metanojenlerin verimli arıtımı için optimum pH aralığı yaklaşık olarak 7–8 olmaktadır. Şekil 9'da AÇKYR'de uygun işletme zamanında pH değişim miktarları verilmiştir. Genellikle 1. haznede pH'nın daha düşük olduğunu (6.98), çıkış numunelerinde ise pH'nın daha yüksek (7.55) olduğu gözlenmiştir. Anaerobik sistemlerde diğer zayıf asitlerle, CO<sub>2</sub> artışı yeterli HCO<sub>3</sub> alkalinitesine bağlı olmaktadır. Yüksek asit konsantrasyonlarında (HCO<sub>3</sub> ve TUYA) alkalinitenin artması reaktörde bozunmalara, bazı mikrobiyal aktivitelerin özellikle metanojenlerin inhibe olmasına yol açmaktadır (Speece, 1996). Anaerobik çok kademeli yatak reaktörün çıkışında HCO<sub>3</sub> alkalinitesi konsantrasyonları 569–874 mg/L arasında hesaplanmıştır (Şekil 10). Bikarbonat alkalinitesi konsantrasyonu ilk hazne-

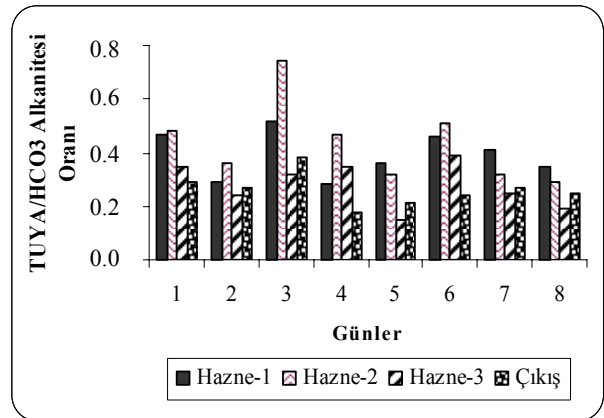


Şekil 9. AÇKYR'de pH değişimleri



Şekil 10. AÇKYR'de HCO<sub>3</sub> alkalinitesi

de diğer haznelere göre yüksek derecededir. TUYA/HCO<sub>3</sub> Alkalinitesi oranı 0.8'den düşük ise reaktör bir dereceye kadar kararlı ya da kararsız durumdadır (Behling vd., 1997). Şekil 11'de TUYA/HCO<sub>3</sub> oranı 1. ve 2. haznelerde 0.3-0.5 arasında ölçülmüştür. 3. haznede ve çıkışta ölçülen 0.15 ve 0.38 değerleri ışığında AÇKYR'de sistem kararlı denilebilir çünkü; TUYA/HCO<sub>3</sub> Alkalinitesi oranları çıkış ve diğer bölmelerde 0.4'ten düşüktür (Behling vd., 1997).

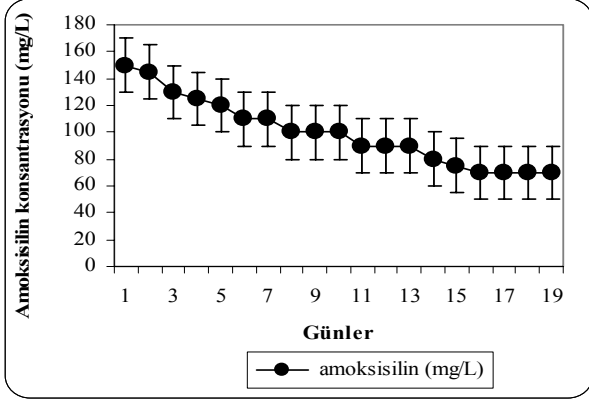


Şekil 11. AÇKYR'de TUYA/HCO<sub>3</sub> değişim miktarları

### Anaerobik çok kademeli yatak reaktörde Amoksisilin giderimleri

İlk 7-8 günlük işletme sürecinden sonra sisteme yapılan antibiyotik dozlaması 150 mg/L Amoksisilin konsantrasyonu olacak şekilde yapılmıştır. Amoksisilin günlük anaerobik işletme sonunda 150 mg/L'den 70 mg/L'ye düşerek % 65 oranında giderilmiştir (Şekil 12). Kim ve diğerleri (2002) yaptıkları çalışmada fosfat ve sod-

yum azid içeren bir ortamda anaerobik koşullarda Amoksisilin antibiyotiğinin 2 gün içinde 140 mg/L'den 43 mg/L'ye düşerek % 52 oranında azaldığını gözlemişlerdir. Söz konusu çalışmada farklı besiyeri bileşimleri kullanılmasına rağmen mevcut çalışmamız ile aynı oranda Amoksisilin giderimi vermektedir.



Şekil 12. AÇKYR' de Amoksisilin giderimi

150 mg/L Amoksisilin içeren atık suyun başlangıç ve 20 günlük anaerobik arıtma sonrası ayrışabilirlikleri incelenmiştir. Buna göre Amoksisilin içeren anaerobik reaktörün başlangıç  $BOI_5/KOI$  oranı 0.05 olup (zor ayrışabilir) 20 gün sonunda 0.25'e (kolay ayrışabilir)(veriler verilmemiştir) ulaşmıştır. Uzun işletme sürelerinde sürekli anaerobik reaktörlerde biyolojik ayrışabilirliğin daha da artacağı düşünülmektedir.

## Tartışma

Beta laktam gurubu bir antibiyotik olan Amoksisilinin  $BOI_5/KOI$  oranları düşük olduğundan, 10-20 günlük aklımasyonsuz olarak AÇKYR reaktörde artırılarak biyolojik ayrışabilirliği artırılmıştır. Amoksisilin içeren anaerobik reaktörde  $BOI_5/KOI$  oranı 0.05'den 0.25'e çıkarılmıştır. Bu çalışmada Amoksisilinin  $IC_{50}$  değeri 195 mg/L olmasına rağmen AÇKYR reaktöre kararlı hal koşullarına ulaşmadan doğrudan ilave edilen 150 mg/L Amoksisilin 20 günlük işletme sonunda % 65 arıtma verimi ile giderilmiştir. Melas-KOI'si ve 150 mg/L Amoksisilin içeren atık suyun 10 gün sonunda KOİ giderimi % 70, toplam gazın metan yüzdesi % 50 olmuştur. Kısa sürede elde edilen yüksek KOİ, antibiyotik giderimleri ile yüksek metan

içeriğine sahip biogaz oluşumu AÇKYR 'ün üç kademeli 3 ayrı hazneden oluşması ve kısmi granülleşmiş çamurun aşu olarak kullanılması ile açıklanabilir. AÇKYR' de 1. haznenin asidojenik olarak çalışması KOİ'nin kolaylıkla hidrolizine ve asitleşmesine neden olmaktadır. Kolay ayrışan KOİ ile birlikte Amoksisilin de besin kaynağı olarak alınmakta ve son haznede metanlaşma olmaktadır. Böylelikle anaerobik arıtmanın farklı kademelerde olması ile asit ve metan bakterilerinin aktivitelerinde olumsuz etkilerin olmadığı sonucuna varılabilir.

Amoksisilin dozları 10 mg/L'den 350 mg/L'ye doğru kademeli artmasına rağmen SMA değerlerinin Amoksisilin için 1.05 gCH<sub>4</sub>-KOİ/gUAKM.gün değerinden 0.12 gCH<sub>4</sub>-KOİ/gUAKM.gün değerine düştüğü gözlenmiştir. Yani doz kademeli olarak 20, 30 kez artmasına rağmen SMA değeri 1/3 oranında azalmıştır. Bu durum da ayrıca Amoksisilinin kesikli beslemeli düzende anaerobik arıtılabilirliğini göstermektedir. AÇKYR'de UYA/HCO<sub>3</sub> alkalinitesi oranlarının çıkış ve diğer bölmelerde 0.4'den düşük olması sistemin kararlı olduğunu göstermektedir. Bu çalışmanın sonucunda anaerobik kademeli AÇKYR reaktörün  $\beta$ -Laktam grubu antibiyotiklerin yüksek verimle arıtılmasında kullanılabileceği gözlenmiştir.

## Teşekkür

106 Y 306 numaralı proje ile bu araştırmayı kısmen destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

- Anderson, G.K., Yang, G. (1992). Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration, *Water Environment Research*, **64**, 53-59.
- APHA-AWWA, (1992). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th edition. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
- Arıkan, O.A., J.Sikora, L., Mulbry, W., Khan, S.U., Rice, C., Foster G.D. (2006). The fate and effect of oxytetracycline during the anaerobic digestion of manure from therapeutically treated calves, *Process Biochemistry*, **41**, 1637-1643.

- Behling, E., Diaz, A., Colina, G., Herrera, M., Gutierrez, E., Chacin, E., (1997). Domestic wastewater treatment using a UASB reactor. *Bioresource Technology*, **61**, 239-245.
- Beydilli, M.I., Pavlosathis, S.G., Tincher, W.C. (1998). Decolorization and toxicity screening of selected reactive azo dyes under methanogenic conditions, *Water Science and Technology*, **38**, 4-5, 225-232.
- Buitron, G., Melgoza, R.M, Jimenez, L. (2002). Pharmaceuticals wastewater treatment using an anaerobic/aerobic sequencing batch biofilter, *5th specialized conference on small water and wastewater treatment systems*, 24-26 September 2002, İstanbul, Türkiye.
- Cass, Q.B., Gomes, R.F., Calafatti, S.A., Pedrazolli Jr. J. (2003). Determination of amoxicillin in human plasma by direct injection and coupled-column high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **987**, 235-241.
- Chelliapan, S., Wilby, T., Sallis, P.J. (2006). Performance of an up-flow anaerobic stage reactor (UASR) in the treatment of pharmaceutical wastewater containing macrolide antibiotics, *Water Research*, **40**, 507-516.
- Donlon, B.A., Razo-Flores, E., Field, J.A., Lettinga G. (1995). Toxicity of N-substrated aromatics to acetolastic methanogenic activity in granular sludge, *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 3889-3893.
- Gartiser, S., Urich, E., Alexy, R., Kümmerer, K. (2007). Anaerobic inhibition and biodegradation of antibiotics in ISO test schemes, *Chemosphere*, **66**, 1839-1848.
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S. Kim, P.G., Park, J. (2007). Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea, *Environment International*, **33**, 370-375.
- Kim, H., Burgess, D.J. (2002). Effect of drug stability on the analysis of release data from controlled release microspheres, *Journal Microencapsulation*, **19**, 631-640.
- Lallai, A., Mura, G., Onnis, N. (2002). The effects of certain antibiotics on biogas production in the anaerobic digestion of pig waste slurry, *Bioresource Technology*, **82**, 205-208.
- Lalumera, G.M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G., Fanelli, R., (2004). Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy, *Chemosphere*, **54**, 661-668.
- Lindberg, R.H., Bjorklund, K., Johansson, P.R., Tysklinda, M., Andersson, M.B.A.V. (2007). Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants, *Water Research*, **41**, 613-619.
- Mohan, S.V., Prakasham, R.S., Satyavathi, B., Annapurna, S.V., Ramakrishna, S. (2001) Biotreatability studies of pharmaceuticals wastewater using an anaerobic suspended film contact reactor, *Water Science and Technology*, **43**, 2, 271-276.
- Nandy, T., Kaul, S.N. (2001). Anaerobic pretreatment of herbal-based pharmaceutical wastewater using fixed-film reactor with recourse to energy recovery, *Water Research*, **35**, 351-362.
- Owen, W.F., Stuckey, D.C., Healy, J.B., Young, JR. L.Y., McCarty, P.L. (1979). Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity, *Water Research*, **13**, 485-492.
- Öktem, Y.A., İnce, O., Sallis, P., Donnelly, T., İnce, B.K. (2007). Anaerobic treatment of a chemical synthesis-based pharmaceutical wastewater in a hybrid upflow anaerobic sludge blanket reactor, *Bioresource Technology*, **99**, 1089-1096.
- Öktem, Y.A., İnce, O., Sallis, P., Donnelly, T., İnce B.K. (2006). Determination of optimum operating conditions of an acidification reactor treating a chemical synthesis-based pharmaceutical wastewater, *Process Biochemistry*, **41**, 2258-2263.
- Patel, H., Madamvar, D. (2001). Single and multichamber fixed film anaerobic reactors for biomethanation of acidic petrochemical wastewater-systems performance, *Process Biochemistry*, **36**, 613-619.
- Razo-Flores, E., Luitjen, M., Donlon, B.A., Lettinga, G., Field, J.A. (1997). Complete biodegradation azo dye Azodisalicylate under anaerobic conditions, *Environmental Science and Technology*, **31**, 7, 2098-2103.
- Speece, R.E., (1996). *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*, 114-115, Archæ Press, USA.
- Sponza, D.T., Demirden, P. (2006). Treatability of sulfamerazine in sequential upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB)/completely stirred tank reactor (CSTR) processes, *Separation and Purification Technology*, **56**, 10.
- Srithar, S., Khan, S.T., Akella, V.R., & Anjaneyulu, Y. (2001). Batch studies to evaluate the treatability of pharmaceutical wastes by anaerobic digestion.
- Wollenberger, L., Halling-Sorensen, B., Kus, K.O. (2000). Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*, *Chemosphere*, **40**, 723-730.



## Oksitetrasiklinin ileri oksidasyon ile arıtımına su bileşenlerinin etkisi

Keziban SEVEN YALAP\*, Işıl AKMEHMET BALCIOĞLU

Boğaziçi Üniversitesi, Çevre Bilimleri Enstitüsü, 34342, Bebek, İstanbul

### Özet

*Antibiyotikler insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde ve hayvanlarda büyüme destekleyici olarak yaygın bir şekilde kullanılırlar. Organizmaya uygulanan antibiyotiklerin %90'a varan oranları metabolize olmadan vücuttan atılırlar. Bu nedenle, çevredeki antibiyotik kirliliğinin ana kaynağını teşkil eden insan ve hayvan dışkı yüksek miktarda antibiyotik içerebilir. Yapılan çeşitli çalışmalarla antibiyotiklerin çevrenin çeşitli kompartımanlarının yanı sıra hayvan dışkı ve evsel atıksu arıtma çamurunda bulunduğu tespit edilmiştir. Antibiyotikler, fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak toprağa, sedimentlere, ve yeraltı sularına ulaşabilmektedirler. Sularda bulunan düşük derişimlerdeki antibiyotiklerin gideriminde konvansiyonel arıtma yöntemlerinin yetersiz kaldığı bilinmektedir. Bu maddelerin yüksek konsantrasyonlarının çevrede bulunması, mikroorganizmalar üzerinde toksik etkiye neden olarak ekolojik dengenin bozulmasına, düşük konsantrasyonları ise patojen ve patojen olmayan bakterilerin antibiyotik direnci kazanmasına neden olabildiğinden antibiyotik kirliliğinin kontrolünde alternatif arıtım metotları gerekmektedir. Bu çalışmada, sulu çözeltide bulunan bir tetrasiklin (TC) grubu antibiyotiğin fotokatalitik ve ozon oksidasyon prosesleri ile arıtımı incelenmiştir. 0.1 mM antibiyotik, ozon oksidasyonu ile birkaç dakikada tamamen giderilirken, aynı sonucun fotokatalitik oksidasyon prosesi ile elde edilmesi için 60 dakikalık bir süre gerekmiştir. Her iki oksidasyon prosesinde pH 7 değerinde daha yüksek antibiyotik oksidasyonu elde edilmiştir. Su bileşenlerinin antibiyotik arıtım verimi etkilerini incelemek amacıyla fotokatalitik ve ozon oksidasyon prosesleri  $Ca^{2+}$ ,  $HCO_3^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $Cl^-$  iyonları, ve hümik asidin, varlığında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada seçilen katyon ve anyonların fotokatalitik ve ozon oksidasyon verimlerini düşürdükleri saptanmıştır. Antibiyotiğin fotokatalitik oksidasyon hızı, su bileşeni olarak çözültiye eklenen anyonların hidroksil radikali tutma reaksiyon hız sabitlerine bağlı olarak azalmış, ancak ozon oksidasyon prosesinde bu ilişki gözlenmemiştir.*

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyotik, fotokatalitik oksidasyon, ozon oksidasyon, oksitetrasiklin, titanyum dioksit.

\*Yazışmaların yapılacağı yazar: Keziban SEVEN YALAP. kezban.seven@gmail.com: Tel: (505) 240 95 60. Bu makale, 11-13 Haziran 2008 tarihleri arasında İstanbul'da düzenlenen 11. Endüstriyel Kirlenme Kontrolü Sempozyumunda sunulan bildirilen arasından, İTÜ Su Kirlenmesi Kontrolü Dergisi'nde basılmak üzere seçilmiştir. Makale ile ilgili tartışmalar 21.08.2009 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

## Effects of water components on the advanced oxidation of a veterinary antibiotic, oxytetracycline

### Extended abstract

Antibiotics are an important group of pharmaceuticals in today's medicine. They are used for the treatment of human and animal infections and they are used as growth promoter in animal feeding operations. Human and veterinary antibiotics are continually being released into the environment mainly as a result of manufacturing processes, disposal of unused or expired products, and excreta. Veterinary drugs may enter into the environment more directly than does human drugs. The existence of antibiotics in the environment and their possible effects on living organisms are giving rise to growing concern. Depending upon their physical and chemical properties, many of antibiotic substances or their bioactive metabolites end up in soils and sediments. Surface runoff and leaching cause the transport of the antibiotics from soil to surface and groundwater. In addition, effluent of sewage treatment plant can constitute a source for antibiotic pollution in the surface water. Bacterial resistance is a significant problem related with the presence of antibiotics in the environment. These compounds have also an important exerting toxic effect to aquatic organisms even in the  $\mu\text{g L}^{-1}$ – $\text{mg L}^{-1}$  concentration range that change the ecological balance negatively.

Conventional treatment processes are unable to eliminate pharmaceuticals in water and wastewater, thus it is necessary to investigate advanced treatment technologies for antibiotic pollution control. Different advanced treatment technologies have been recently evaluated for this purpose, including chemical oxidation using ozone and ozone/hydrogen peroxide, membrane filtration such as nano-filtration and reverse osmosis, and activated carbon adsorption. Among these ozone oxidation and heterogenous photocatalysis can be a promising process for degradation of pharmaceuticals. However, in these studies the effects of water components on the oxidation of antibiotics were not investigated.

The tetracyclines (TCs) are broad-spectrum antibacterials widely used in human and animal medicine. Tetracycline, oxytetracycline (OTC), and chlortetracyclines (CTC) are widely used in animal feeds to maintain health and improve growth efficiency in many countries. These chemicals are characterized by a partially conjugated four-ring structure with a

carboxamide functional group. The molecule of tetracycline has several ionizable functional groups of a rather unusual type, and the charge of the molecule depends on the solution pH.

The present investigation was aimed to study the treatment of water synthetically contaminated with a tetracycline group antibiotic by  $\text{TiO}_2$  mediated photocatalytic oxidation and ozone oxidation. While the effects of initial antibiotic concentration, pH, and  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration on the performance of photocatalytic degradation were investigated in ozone oxidation experiments, the effects of pH and applied ozone dose on the degradation of antibiotic were studied. The antibiotic treatment performances of both oxidation processes were also investigated in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  ions, and humic acid to observe the effect of water components on the degradation of antibiotic. All investigated anions decreased the photocatalytic degradation rate of OTC depending on the reaction rate constants of them with the hydroxyl radicals.

The effect of initial OTC concentration in the photocatalytic process was analyzed using the linear form of the Langmuir–Hinshelwood (L-H) model and  $k$  and  $K$  values calculated from the slope of straight line and from the intercept with the  $1/r_0$  axis as  $6.99 \times 10^{-6} \text{ M min}^{-1}$  ( $3.47 \text{ mg/L min}^{-1}$ ) and  $1.613 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  ( $0.032 \text{ mg}^{-1} \text{ L}$ ), respectively.

In the ozonation process, degradation rate of OTC was increased by increasing the applied ozone dose. The pseudo first-order degradation rate constant of OTC was  $1.67 \text{ min}^{-1}$  with an applied ozone dose of  $606 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and it was increased to  $4.18 \text{ min}^{-1}$  by raising the ozone dose to  $1,086 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . However, further increase in the applied ozone dose led to only a slight enhancement in the OTC degradation rate. The results of the experiments performed at three different pH values (pH 4, 7 and 9) showed that the highest degradation rate of OTC was obtained at pH 7.

The assessment of the results showed that, in case of ozone oxidation of OTC, water components significantly decreased the degradation rate and in contrary to the results obtained by photocatalytic oxidation, the effects of ions were not depended on the reaction rates of them with hydroxyl radicals.

**Keywords:** Antibiotic, photocatalytic oxidation, ozone oxidation, oksitetrasiklin, titanium dioksit.

## Giriş

Antibiyotikler günümüz ilaç sektöründe önemli bir grup olarak yer almaktadırlar. İnsanların tedavi edilmesinin yanı sıra hayvan sağlığının korunması ve üretim veriminin artırılması amacıyla da yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Organizmaya uygulanan antibiyotikler %90'a varan oranlarda metabolize edilmeden vücuttan atılırlar (Kemper, 2008). Bu nedenle insan ve hayvan dışkıları yüksek miktarda antibiyotik içerebilir. Yapılan çalışmalarla, antibiyotiklerin çevrenin çeşitli birimlerinin yanı sıra hayvan dışkısı ve evsel atıksu arıtma çamurunda bulunduğu tespit edilmiştir. İnsan ve hayvan antibiyotikleri üretim proseslerinden kaynaklanan atıkların, evsel atıksuyun ve hayvan yetiştiriciliğinden kaynaklanan atıkların arıtımında uygulanan konvansiyonel yöntemlerinin antibiyotik gideriminde yetersiz olması çevrede antibiyotik kirliliğine neden olmaktadır (Heberer, 2002; Balcıoğlu Akmehtem, 2007). Bu maddeler fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak su kaynaklarına ve sedimentlere ulaşabilmektedirler. Antibakteriyel maddelerin yüksek derişimlerinin çevrede bulunması, mikroorganizmalar üzerinde toksik etkiye neden olarak ekolojik dengenin bozulmasına, düşük derişimlerinin çevrede bulunması ise patojen ve patojen olmayan bakterilerin antibiyotik direnci kazanmasına neden olabilmektedir.

Literatürde yeralan bazı araştırmalarla antibiyotiklerin atıksu arıtma sistemlerinde ve çevrede biyolojik olarak giderilemediği saptanmıştır (Ternes, 1998; Kümmerer, vd., 2000 ve Heberer, 2002). Bu nedenle çevrede önemli problemlere yol açan antibiyotik kirliliğinin giderimi için alternatif arıtım yöntemlerinin geliştirilmesi son yıllarda önem kazanmıştır. İleri oksidasyon proseslerinin antibiyotiklerin arıtımında etkili olduğu bulunmuştur (Dantas, vd., 2008; Ötger ve Akmehtem-Balcıoğlu, 2005, Alaton, vd., 2004, Balcıoğlu Akmehtem ve Ötger, 2003; Balcıoğlu Akmehtem ve Ötger, 2002, Andrezzi, vd., 2003; Zwiener ve Frimmel, 2000).

Bu çalışmada bir tetrasiklin antibiyotiği olan oksitetrasiklinin (OTC) fotokatalitik oksidasyon

prosesi ile arıtılması farklı reaksiyon koşullarında araştırılmış ve antibiyotik derişiminin, pH'ın ve hidrojen peroksit derişiminin oksidasyon verimine etkileri incelenmiştir. Fotokatalitik ve ozon oksidasyon prosesleri, biyolojik yöntemlerle arıtılmayan kirleticilerin gideriminde kullanılan bir ileri oksidasyon prosesleridir. Literatür araştırmalarında bazı antibiyotiklerin fotokatalitik ve ozon oksidasyon prosesleri ile giderimleri araştırılmış olmasına rağmen, suda bulunması muhtemel iyonların arıtma verimine etkileri belirlenmemiş olmasından yola çıkılarak, bu çalışmada ayrıca suda bulunan kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ), bikarbonat ( $HCO_3^-$ ), nitrat ( $NO_3^-$ ), fosfat ( $PO_4^{3-}$ ), sülfat ( $SO_4^{2-}$ ) ve klorür ( $Cl^-$ ) iyonlarının arıtma verimine etkileri incelenmiştir. Doğal sularda bulunan organik madde derişiminin de etkisi bu çalışma kapsamında araştırılmıştır.

## Materyal ve metot

Fotokatalizör olarak %70 anataz ve %30 rutil kristal yapısına sahip olan ~30 nm partikül boyutunda 49.4 m<sup>2</sup>/g spesifik yüzey alanına sahip Degussa P25 TiO<sub>2</sub> kullanılmıştır. Tetrasiklin grubu antibiyotiklerine model olarak suda yüksek çözünürlüğünden dolayı oksitetrasiklinin hidroklorür tuzu (C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>.HCl, % 95 saflıkta Sigma Aldrich) seçilmiştir. Analitik saflıktaki disodyum hidrojen fosfat, potasyum nitrat, sodyum sülfat ve sodyum hidrojen karbonat, fosfat, nitrat, sülfat ve bikarbonat anyonlarının, kalsiyum klorür ise kalsiyum iyonlarının OTC'nin giderilmesine etkilerinin incelenmesi için kullanılmışlardır. Hümkik asit (Aldrich) sudaki organik bileşikleri temsil etmesi amacıyla sentetik olarak kirletilen suya katılmıştır.

Tüm çözeltiler deionize Milli-Q (Gradient Milli-Q) su ile hazırlanmıştır. OTC'nin gün ışığı ile fotolizini önlemek amacı ile hazırlanan çözeltiler alüminyum folyo ile korunmuştur.

## Deneyel yaklaşım

Deneyel çalışmalar, fotokatalitik oksidasyon ve ozon oksidasyon deneyleri olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir.

Fotokatalitik deneylerde, 1 L'lik OTC çözeltisi hazırlandıktan sonra 1 g/L derişimindeki TiO<sub>2</sub>

(P25 Degussa) fotokatalizörü eklenmiş ve homojen bir karışım elde etmek amacı ile sonikatör kullanılmıştır. OTC'nin  $TiO_2$  yüzeyine adsorpsiyon dengesine ulaşması için çözelti 1 saat karanlıkta karıştırılarak bekletilmesini takiben, fotokatalitik periyot, ışık kaynağının açılması ile başlatılmıştır. Fotokatalitik reaktörün (42 cm yükseklik ve 2 cm ışık yolu kalınlığı) ortasına yerleştirilen 20 W BLB floresans lamba (General elektrik F20T12 BLB) ışık kaynağı olarak kullanılmıştır. Reaktör içindeki çözelti bir peristaltik pompa ile devrettirilerek (153 mL/dak) ve reaktör tabanında bulunan sinterlenmiş cam diffüzörlerden basınçlı hava geçirilerek fotokatalizörün reaksiyon esnasında çökmesi engellenmiştir. Reaktörden 10 dakika aralıklarla alınan örnekler 30 dakika süresinde 3000 rpm hızda santrifüj edilmiş ve ardından 0.45  $\mu$ m membran filtre ile süzülerek çözeltilerde OTC analizi yapılmıştır.

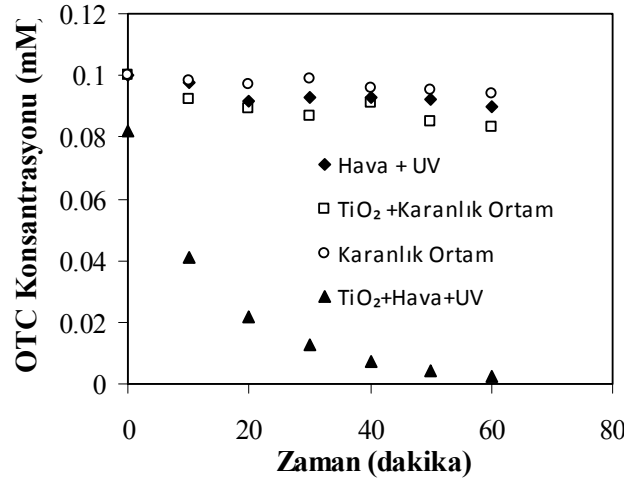
Ozon oksidasyonu deneyleri borosilikat camdan yapılmış bir reaktörde (78 cm yükseklik ve 6 cm çapında) gerçekleştirilmiştir. Ozon saf oksijenden korona deşarj yöntemi ile üretilmiş (Fischer OZ500) ve reaktör tabanında bulunan bir diffüzör yardımı ile çözeltilere dağıtılması sağlanmıştır. Ayrıca bir peristaltik pompa ile reaktörde bulunan çözelti 133 mL/dak hız ile devrettirilmiştir. Reaktörün giriş ve çıkışında gaz fazı ozon derişimi saptanmıştır (Fischer Ozotron 23). Belirli zaman aralıklarında reaktörden alınan örneklerde HPLC (Agillent Technol. 1100) ve spektrofotometre (Schimatzu Model 1208) ile OTC analizi yapılmıştır. OTC analizleri için kullanılan HPLC sistemi tersiyer bir pompa, fotodiyot düzenli ve enjeksiyonlu bir otomatik örnek alıcıdan meydana gelmiştir. Kademeli elüsyon asetonitril ve % 0.1 formik asit içeren su ile gerçekleştirilmiştir. OTC'nin kantitatif olarak saptanması 360 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Toksisite deneylerinde *Bacillus subtilis*'in dehidrojenaz aktivitesinin inhibisyonu saptanmıştır. Bu amaçla resazurinin resofurine indirgenmesi spektrofotometrik olarak 600 nm dalga boyunda ölçülmüş ve sonuçlar yüzde inhibisyon değerleri olarak hesaplanmıştır.

## Deneysel sonuçlar

### OTC'nin fotokatalitik oksidasyonu

Şekil 1'de 49.6 mg/L derişimindeki OTC ile sentetik olarak kirletilen çözeltilerde pH 7'de ve 1 g/L  $TiO_2$  fotokatalizör ile antibiyotik giderimini gösterilmektedir. Bu şekilde aynı zamanda kontrol deneylerinin de sonuçları sunulmaktadır. Bu deneyler karanlık ortamda OTC varlığında, karanlık ortamda OTC ve  $TiO_2$  varlığında ve UV ve havanın OTC'ye uygulanması suretiyle gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1. Oksitetrasiklinin fotokatalitik oksidasyon süreci ile giderimi

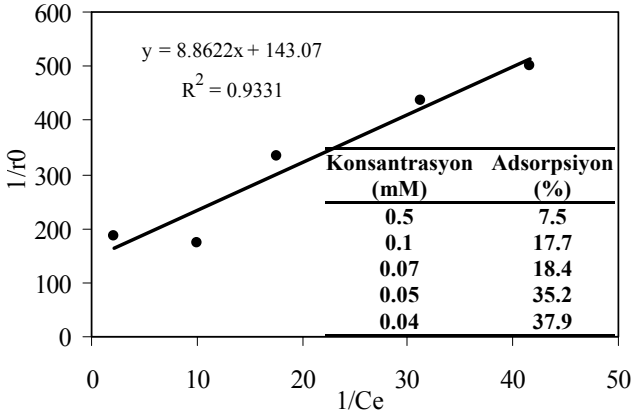
Yapılan deneyler sonucunda 1 saatlik fotokatalitik oksidasyon sürecinin uygulanması ile antibiyotiklerin % 95 oranında giderildiği saptanmıştır. Diğer taraftan  $TiO_2$  ile karanlıkta gerçekleştirilen 1 saatlik deney ile OTC'nin % 17 'sinin fotokatalizör yüzeyine adsorbe olduğunu ve hava + UV uygulanan deney ile ise reaksiyon süresinde OTC'nin ihmal edilebilecek düzeyde fotolize uğradığını tespit edilmiştir. Fotokatalitik oksidasyon sonucunda oluşan reaksiyon ürünlerinin toksisitesi *Bacillus subtilis* ile saptanmıştır ve reaksiyonun ilk 15 dakikasında çözeltilerin toksisitesinin %30 oranında arttığı ve reaksiyon süresinin 60 dakikaya uzatılması ile %7'ye azaldığı bulunmuştur.

### Antibiyotik derişiminin fotokatalitik oksidasyon verimine etkisi

0.01 ile 0.5 mM aralığında OTC'nin beş farklı derişimi ile fotokatalitik oksidasyon deneyleri

pH 7'de gerçekleştirilmiştir. Seçilen antibiyotik derişim aralığı, bu kirleticinin doğal su kaynaklarında saptanan miktarlarından oldukça yüksektir (Hirsch, vd.1999). Ancak fotokatalitik oksidasyon prosesinde çeşitli parametrelerin etkisini inceleyebilmek amacıyla yüksek OTC derişiminde deneyler yapılmıştır.

Sudaki OTC derişiminin değişimi TiO<sub>2</sub> yüzeyinde adsorbe olan antibiyotik miktarının değişimine neden olmuştur (Şekil 2). Adsorpsiyon periyodu sonundaki sudaki OTC derişimi C<sub>e</sub> olarak belirtilmiştir. Şekil 2'de OTC'nin denge derişiminin başlangıç giderim hız sabitine (r<sub>0</sub>) etkisi gösterilmiştir.



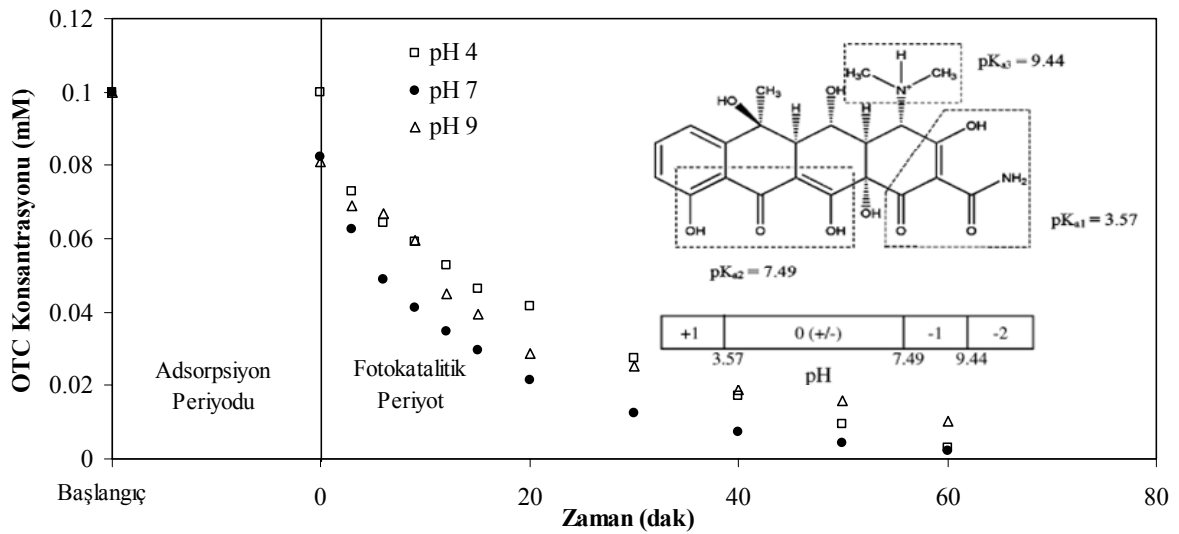
Şekil 2. OTC derişiminin fotokatalitik oksidasyon hız sabitine ve adsorpsiyona etkisi

OTC derişiminin 0.04 mM'dan 0.5mM'a artırılması ile fotokatalizör yüzeyinde bir saatlik sürede adsorbe olan antibiyotik miktarının % 38 den % 7.5'e azaldığı ve fotokatalitik oksidasyon giderim hızının da derişimin artması ile azaldığı saptanmıştır. 0.5 mM OTC 'nin 60 dakikalık fotokatalitik oksidasyonu sonucu % 35 oranında giderim elde edilirken derişimin 20 kat azaltılması ile ise 10 dakikalık sürede yaklaşık giderim verimi % 90 'a ulaşmıştır.

Çalışmada kullanılan OTC derişimlerinin su kaynaklarında saptanan derişimlerden oldukça yüksek olduğu göz önüne alındığında fotokatalitik oksidasyon prosesinin bu mikrokirletici ile kirlenmiş suların arıtımında etkili olacağı sonucu çıkarılabilmektedir.

### pH'nın fotokatalitik oksidasyon verimine etkisi

Fotokatalitik reaksiyonlarda çözeltinin pH değeri TiO<sub>2</sub> yüzeyinin elektrostatik yükünü etkileyebilmektedir. Bu nedenle pH, fotokatalizör yüzey yük yoğunluğunu ve dolayısı ile fotokatalitik oksidasyon verimini belirleyici bir faktördür. Özellikle iyonik organik maddelerin TiO<sub>2</sub> yüzeyinde adsorpsiyonunda pH'ın önemli bir parametre olması nedeniyle OTC'nin fotokatalitik oksidasyonuna etkisi 3 farklı pH değeriinde incelenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. pH'nın OTC'nin fotokatalitik oksidasyonuna etkisi

OTC bir zwitteriyon olup üç farklı  $pK_a$  değerine sahiptir ( $pK_1 = 3.57$ ,  $pK_2 = 7.49$  ve  $pK_3 = 9.44$ ).  $TiO_2$  yüzeyi ise pH 6.3'te (Nano ve Strathmann, 2006 ) yüksüz olduğundan asidik ve bazik pH değerlerinde sırası ile pozitif ve negatif yüklüdür. Deneyler sonucu elde edilen veriler OTC'nin pozitif ve negatif yüklü fotokatalizör yüzeyindeki adsorpsiyonun ve fotokatalitik oksidasyonun nötral pH'da elde edilenden daha düşük olduğunu göstermektedir.

### **Hidrojen peroksidin fotokatalitik oksidasyon verimine etkisi**

Fotokatalitik oksidasyon prosesinde  $H_2O_2$  ilavesi ortamdaki hidroksil radikali derişimini artırarak kirleticilerin giderim hızını artırdığı bilinmektedir (Naman, vd., 2002; Malato, vd. 2000). Bu çalışmada  $H_2O_2$ 'in 25-100 mg/L derişim aralığında OTC'nin fotokatalitik oksidasyon prosesine etkisi araştırılmıştır. Sadece  $H_2O_2$ 'in kullanıldığı kontrol deneylerinde bir saatlik reaksiyon süresince OTC'nin oksidasyonu gözlemlenmemiştir. 50 mg/L  $H_2O_2$ 'in fotokatalitik oksidasyon hızını sadece % 8 oranında artırmıştır.  $H_2O_2$  derişiminin 100 mg/L'e artırılması ise yüksek derişimlerde  $H_2O_2$  hidroksil radikalleri ile reaksiyona girmesi nedeniyle OTC giderim hızının azalmasına neden olmuştur.

### **Su bileşenlerinin OTC'nin fotokatalitik oksidasyonuna etkisi**

Fotokatalitik oksidasyon çalışmalarında suda bulunan iyonların organik madde oksidasyonunda olumsuz etkileri (Hu, vd., 2004; Liao, vd., 2001; Abdullah, vd., 1990) bilindiğinden bu çalışmada kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ), bikarbonat ( $HCO_3^-$ ), nitrat ( $NO_3^-$ ), fosfat ( $PO_4^{3-}$ ), sülfat ( $SO_4^{2-}$ ) ve klorür ( $Cl^-$ ) iyonlarının OTC'nin fotokatalitik oksidasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Her bir deney setinde hazırlanan  $TiO_2$  yüzeyinde adsorpsiyon dengesinin oluşması için 60 dakika boyunca karanlıkta (adsorpsiyon periyodu) karıştırılarak bekletme işlemi uygulanmıştır. İlave edilen iyonların derişimlerinin derişimine bağlı olarak çözelti pH'ında derişiklikler meydana gelmiştir ve her bir deney setinde başlangıç pH değerleri 7'ye ayarlanmıştır. Her bir iyonun farklı derişimleri için 60 dakikalık denge periyodu sonundaki OTC'nin adsorpsiyonu ve 60

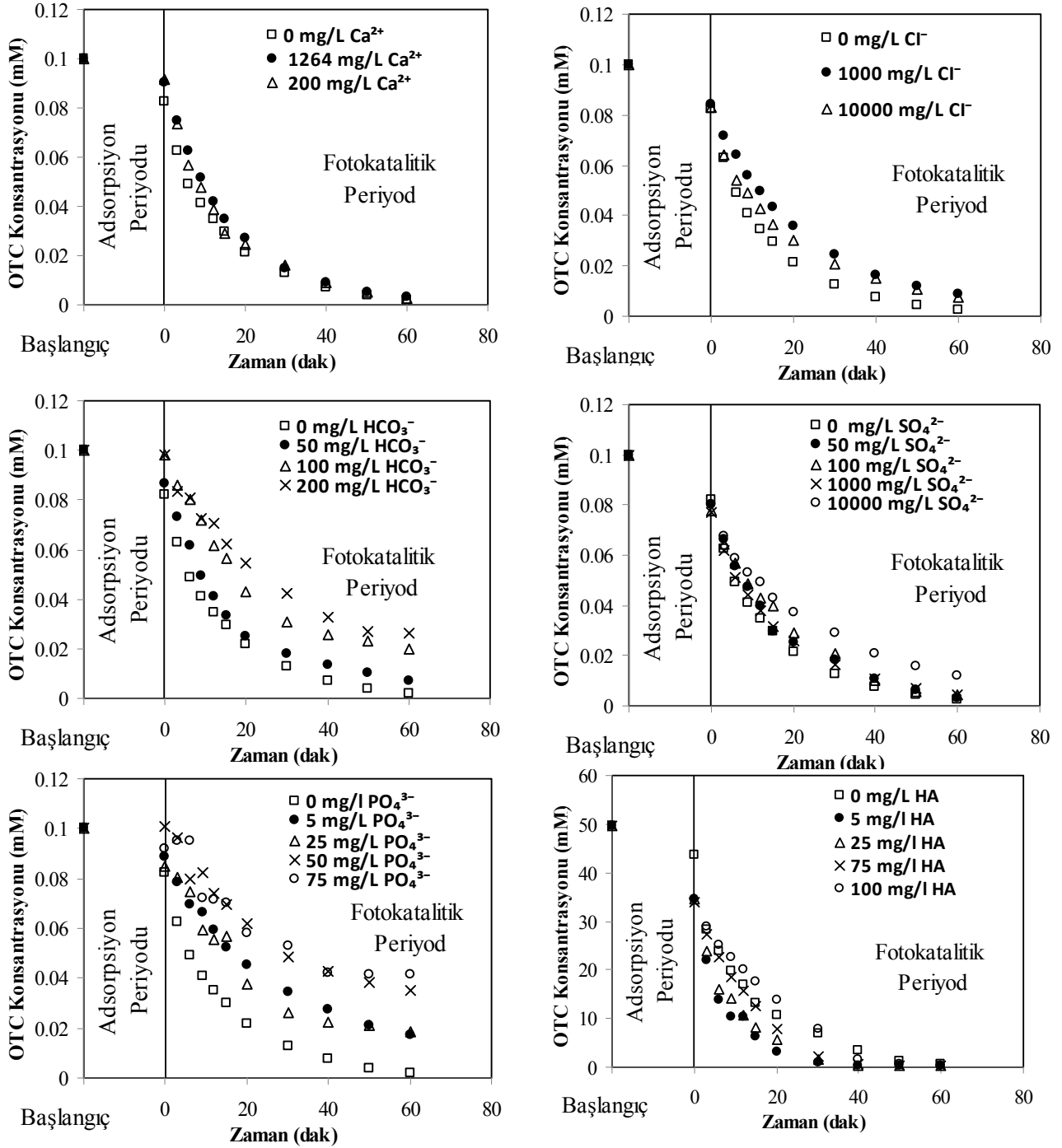
dakikalık fotokatalitik oksidasyon ile OTC derişiminin derişimi için elde edilen sonuçlar Şekil 4'te sunulmuştur.

Şekilde görüldüğü gibi ilave edilen iyonların derişimine bağlı olarak OTC'nin  $TiO_2$  yüzeyinde adsorpsiyonunda derişiklikler meydana gelmiştir. Doğal su kaynaklarında bol miktarda bulunan kalsiyum iyonları OTC ile kuvvetli kompleksler oluşturduklarından (Balcıoğlu ve Şalcıoğlu, 2008) yüksek  $Ca^{2+}$  derişiminde adsorbe olan OTC miktarında azalma saptanmıştır. Fotokatalitik oksidasyon periyodunda OTC giderim hızında adsorpsiyon periyodunda elde edilen sonuçlara paralel olarak bir azalma saptanmıştır.

Doğal ve kirlenmiş sularda bulunan bikarbonat iyonu hidroksil radikalleri ile hızlı bir reaksiyon vermesi nedeniyle ( $k=3.9 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) organik maddelerin oksidasyon verimini önemli ölçüde azaltabilmektedir (Abdullah, vd., 1990). 200 mg/L bikarbonat iyonunun ilavesi ile fotokatalizör yüzeyinde OTC adsorpsiyonun % 17'den % 1.5'e azalmasına neden olmuştur. Birkarbonat iyonunun (200 mg/L) fotokatalizörün yüzeyinde adsorpsiyonu OTC adsorpsiyonunu azaltmasının yanısıra katalizör yüzeyinde ve çözeltide bulunan hidroksil radikalleri ile reaksiyonu sonucu bir saatte elde edilen OTC gideriminin % 98'den % 78'e azalmasına neden olmuştur.

Doğal sulardaki antibiyotik kirlilik kaynağının esas olarak hayvan gübresi ile gübrelenmiş tarım arazileri olduğunu göz önüne alarak bu çalışmada fosfat ve nitrat iyonlarının etkisi de incelenmiştir. pH 7'de  $H_2PO_4^-$  olarak bulunan fosfat iyonları karbonat iyonlarında olduğu gibi OTC adsorpsiyonunu önemli ölçüde azaltmıştır. Fosfat iyonunun OTC arıtma verimini azaltması bu iyonun  $TiO_2$  yüzeyinde adsorpsiyonu ve  $h^+/OH\cdot$  ile reaksiyonu sonucu daha az reaktif ürünlerin oluşması ( $H_2PO_4^-$ ) ile açıklanabilmektedir.

OTC'nin fotokatalizör yüzeyinde adsorpsiyonunun nitrat derişiminden etkilenmesi nedeniyle nitrat iyonlarının  $TiO_2$



Şekil 4. Su bileşenlerinin OTC'nin fotokatalitik oksidasyonuna etkisi

adsorbe olmadığı sonucu çıkarılabilir. Nitrat iyonlarının UV ışığı ile nitrat radikallerini oluşturması nedeniyle (Zhang vd., 2004) organik madde giderimini arttırabileceği öne sürülmesine karşılık bu çalışmada nitrat iyonlarının varlığı OTC gideriminin azalmasına neden olmuştur. Ancak nitrat'ın olumsuz etkisi karbonat ve fosfat iyonların oluşturduğu etkiden daha azdır.

Antibiyotiklerin balık yetiştiriciliğinde de kullanıldığını göz önüne alarak bu faaliyetten kaynaklan atıksularda sülfat ve klorür iyonları bulunacağından söz konusu iyonların fotokatalitik oksidasyona etkileri yüksek derişimlerinde araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar OTC adsorpsiyonunun  $SO_4^{2-}$  ve  $Cl^-$ 'ün derişimlerine bağlı olmadığını ve OTC fotokatalitik oksidasyonunun ise bu anyonların varlığından düşük bir oranda etkilediği saptanmıştır.

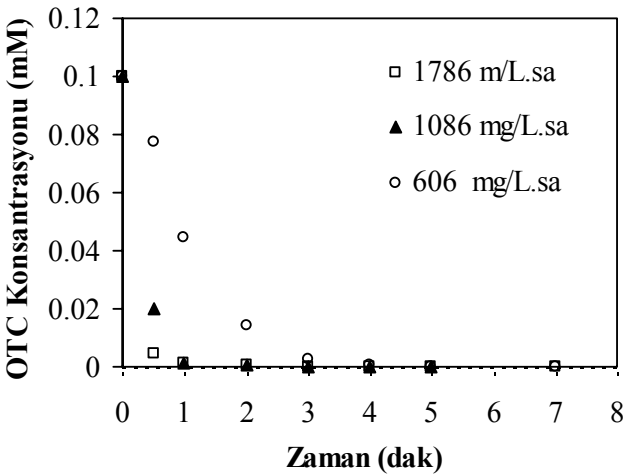
Doğal suların önemli bir organik bileşeni olan hümik asidin OTC oksidasyonundaki etkisi 5-100 mg/L derişim aralığında araştırılmış ve hümik asit derişiminin 5 mg/L'den 100 mg/L'ye artırılması ile OTC bozunma hız sabitinin 0.1'den 0.07 dak<sup>-1</sup> değerine azaldığı saptanmıştır.

## Oksitetrasiklinin ozon oksidasyonu

### Uygulanan ozon dozunun etkisi

OTC'nin ozon oksidasyonu ile gideriminde uygulanan ozon dozunun etkisinin incelenmesi amacıyla 1786, 1086 ve 606 mg/L.sa olmak üzere üç farklı ozon dozunda deneyler gerçekleştirilmiştir (Şekil 5).

Sentetik olarak kirletilen suya ozonun uygulanması ile OTC derişimi eksponansiyel olarak azalmakta ve giderim kinetiği görünür birinci dereceye uymaktadır. Ozon dozunun 606 mg/L.sa'dan 1086 mg/L.sa'e yükseltilmesi ile görünür birinci derece hız sabitinin 1.67 dak<sup>-1</sup> den 4.18 dak<sup>-1</sup>'e yükseldiği saptanmıştır. Ancak, ozon dozunun daha yüksek değere (1786 mg/L.sa) artırılması çözeltideki çözünmüş ozon derişiminin artırmaması nedeniyle giderim hız sabitinde önemli bir ilave artış elde edilememiştir.



Şekil 5. Uygulanan ozon dozunun OTC'nin ozon oksidasyonuna etkisi

### OTC'nin ozon oksidasyonu ile giderimine pH'nın etkisi

Ozonlama prosesinde pH'nın oksidasyon mekanizmasını etkilemesi nedeni ile bu parametre proses değişkeni olarak seçilmiştir. Ozon dozu-

nun 606 mg/L.sa olarak uygulandığı deneyler 4, 7 ve 9 olmak üzere üç farklı pH değerinde gerçekleştirilmiş ve en yüksek antibiyotik giderim verimi pH 7'de edilmiştir. pH değerinin 4'ten 7'ye yükseltilmesi ile OTC giderim hız sabiti 1.31 dak<sup>-1</sup>'den 1.67 dak<sup>-1</sup>'e yükselmiş ancak pH değerinin 9'a ayarlanması ile hız sabitinin 1.45 dak<sup>-1</sup>'e azaldığı saptanmıştır.

Genel olarak, ozonlama prosesinde hidroksil iyonları, reaktif oksidanlar olan radikallerin oluşumunda katalizör olarak etki etmektedir. Bu nedenle artan pH ile ozon oksidasyon veriminde artış beklenmektedir. Birçok çalışmada (Li, vd., 2008; Esplugas, vd., 2002; Vogna, vd., 2004; Dantas, vd., 2008), yüksek kirletici gideriminin pH'nın 7'den yüksek değerlerinde elde edildiği saptanmasına rağmen, bu çalışmada, en yüksek antibiyotik gideriminin nötr pH değerinde elde edilmiştir (Tablo1).

Tablo 1. Ozonlama prosesinde pH'nın etkisi

	pH 4	pH 7	pH 9
k (dak <sup>-1</sup> )	1.31	1.67	1.45
r <sup>2</sup>	0.99	0.99	0.93

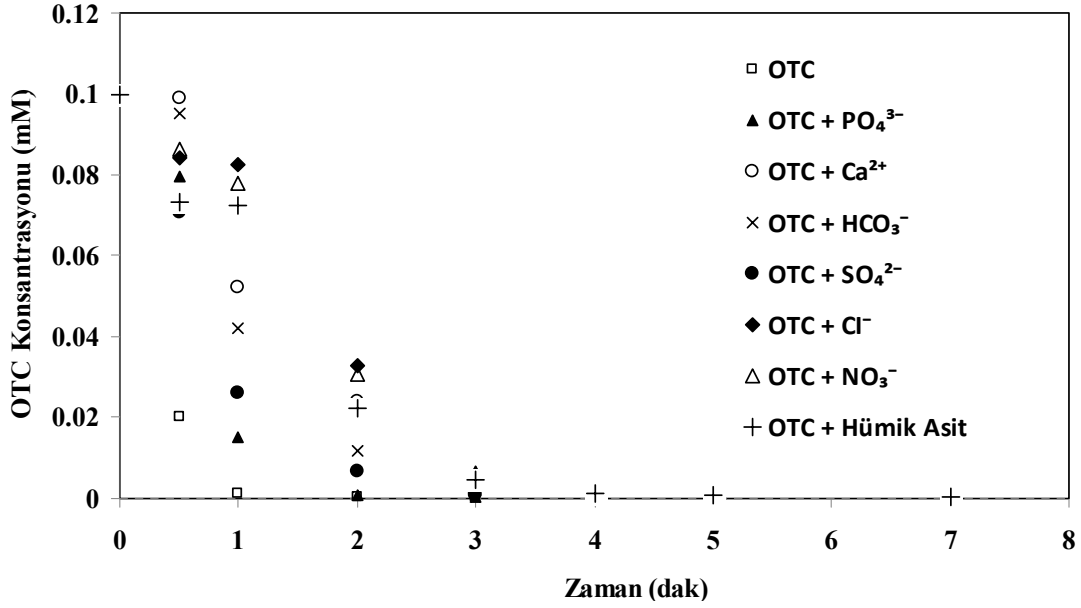
Benzer sonuçlar, farklı antibiyotiklerin ozon oksidasyonu ile giderimini inceleyen araştırmacılar tarafından da bulunmuştur (Balcıoğlu ve Ötker, 2003; Li, vd., 2008).

### Su bileşenlerinin OTC'nin ozon oksidasyonu üzerine etkisi

OTC'nin ozon ile oksidasyonuna su bileşenlerinin etkisi pH 7 değerinde ve 1.086 mg/L.sa ozon dozunda incelenmiştir. Şekil 6'da OTC'nin ozon oksidasyonu ile giderimine her bir iyon (kalsiyum, bikarbonat, fosfat, sülfat, nitrat, ve klorür) ve hümik asitin 100 mg/L derişimindeki etkileri gösterilmektedir ve giderim hız sabitleri ise Tablo 2'de sunulmuştur.

Şekil 6 ve Tablo 2'den de görüldüğü üzere su bileşenlerinin mevcudiyetinde OTC'nin ozon oksidasyon ile giderim hızı azalmaktadır. Hümik asidin radikal oluşumunu artırarak kirleticilerin oksidasyonunu kolaylaştırdığı bilinmesine rağmen





Şekil 6. OTC'nin ozon oksidasyonu ile gideriminde su bileşenlerinin etkisi

men bu çalışmada 100 mg/L hümik asit OTC giderim hız sabitinin önemli ölçüde azalmasına neden olmuştur.

Tablo 2. Su bileşenlerinin ozon oksidasyonunda OTC'nin görünür birinci derece giderim hız sabitlerine etkisi

Su bileşenleri	OTC giderim hız sabitleri
	$k_{\text{tüm}}(\text{dak}^{-1})$
OTC	4.18
OTC + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	2.05
OTC + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.67
OTC + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.54
OTC + Cl <sup>-</sup>	1.53
OTC + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.36
OTC + Ca <sup>2+</sup>	1.32
OTC + Hümik Asit	1.13

## Sonuçlar

Fotokatalitik oksidasyon deneylerinde, etkisi araştırılan katyon ve anyonlar hidroksil radikali reaksiyon hız sabitlerine bağlı olarak antibiyotik giderim hızını azaltmışlardır. Fotokatalizör yüzeyinde reaktif radikallerin oluşabilmesi için gerekli olan ışığın hümik asit tarafından adsorplaması antibiyotik giderimini yavaşlattığı düşünülmektedir.

OTC'nin ozon oksidasyonu ile gideriminde ise su bileşenleri giderim hızını önemli oranda düşürmüş ve fotokatalitik oksidasyon prosesi ile elde edilen sonuçların aksine iyonların etkisi hidroksil radikalleri ile hız sabitleriyle paralellik göstermemiştir.

OTC derişiminin fotokatalitik oksidasyona etkisi Langmuir- Hinshelwood modeline uymuş olup, limitlendirilmiş hız sabiti ve denge sabiti 0.05-0.5 mM derişim aralığında, 1 g/L TiO<sub>2</sub> derişimi ve pH 7 de sırası ile  $6.99 \times 10^{-6} \text{ M dak}^{-1}$  ve  $1.61 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. OTC giderim hız sabiti 0.05-0.1 mM antibiyotik derişimi aralığında artış göstermekte ve daha yüksek OTC derişimleri fotokatalizörün yüzeyinde aktif bölgeleri kaplaması nedeniyle •OH radikallerinin oluşumunun azalmasına neden olmaktadır.

Sonuç olarak ozon oksidasyonu OTC'nin kısa sürede tamamen giderimi sağlayabilen etkili bir arıtım yöntemi olarak önerilebilmektedir. Diğer taraftan, fotokatalitik oksidasyon prosesinde güneş ışığının enerji kaynağı olarak kullanılabilmesi nedeniyle yöntemin araştırılmasının gerektiği düşünülebilmektedir.

## Teşekkür

Sunulan çalışma TÜBİTAK 106Y073 projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. Yazarlar

TÜBİTAK'a destekleri dolayısıyla teşekkür ederler.

## Kaynaklar

- Abdullah, M., Low, G.K.C., Matthews, R.W., (1990). Effects of common inorganic anions on rates of photocatalytic oxidation of organic carbon over illuminated titanium dioxide, *Journal of Physical Chemistry*, **94**, 6820-6825.
- Alaton, A., Dogruel, S., Baykal, E., Geron, G., (2004). Combined chemical and biological oxidation of penicillin formulation effluent, *Journal of Environmental Management*, **73**, 155-163.
- Andreozzi, R., Caprio, V., Marotta, R., Radovnikovic, A., (2003). Ozonation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV treatment of clofibrac acid in water: a kinetic investigation, *Journal of Hazardous Materials*, **103**, 233-246.
- Balcioğlu Akmehmet, I., Ötker, M., (2002). Oxidative treatment of antibiotics in pharmaceutical effluents, *Proceedings of the 5th Specialised Conference on Small Water and Wastewater Treatment Systems*, 24-26 September, 2002, İstanbul, Türkiye.
- Balcioğlu Akmehmet, I. ve Ötker, M., (2003). Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by O<sub>3</sub> and O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes, *Chemosphere*, **50**, 85-95.
- Balcioğlu Akmehmet I., (2007). Fate of veterinary drugs in the environment, TÜBİTAK-Julich Project report.
- Balcioğlu Akmehmet I., Şalcioğlu, A.Ş., (2008). Adsorption of a tetracycline antibiotic onto natural zeolite in the presence of inorganic ions, yayına sunulmuştur.
- Dantas, R.F., Contreras, S., Sans, C., Esplugas, S., (2008). Sulfamethoxazole abatement by means of ozonation, *Journal of Hazardous Materials*, **150**, 790-794.
- Esplugas, S., Gimenez, J., Contreras, S., Pascual, E., Rodriguez, M., (2002). Comparison of different advanced oxidation processes for phenol degradation, *Water Resources*, **36**, 1034-1042.
- Heberer, T., (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data, *Toxicology Letters*, **131**, 5-17.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.L., (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *Science of the Total Environment*, **225**, 109-118.
- Hu, C., Yuchao, T., Lanyu, L., Zhengping, H., Yizhong, W., Hongxiao, Tang, (2004). Effects of inorganic anions on photoactivity of various photocatalysts under different conditions, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **79**, 247-252.
- Kemper, N., (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment, *Ecological Indicators*, **8**, 1-13.
- Kümmerer, K., Al-Ahmad, A., Mersch-Sundermann, V., (2000). Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test, *Chemosphere*, **40**, 701-710.
- Li, K., Yediler, A., Yang, M., Schulte-Hostede, S., Wong, M.H., (2008). Ozonation of oxytetracycline and toxicological assessment of its oxidation by-products, *Chemosphere*, **72**, 473-478.
- Liao, C.H., Kang, S.F., Wu, F.A., (2001). Hydroxyl radical scavenging role of chloride and bicarbonate ions in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV process, *Chemosphere*, **44**, 1193-1200.
- Malato, S., Blanco, J., Maldonado, M.I., Fernandez-Ibanez, P., Campos, A., (2000). Optimising solar photocatalytic mineralisation of pesticides by adding inorganic oxidising species; application to the recycling of pesticide containers, *Applied Catalysis B: Environment*, **28**, 163-174.
- Naman, S.A., Khammas, Z.A.A., Hussein, F.M., (2002). Photo-oxidative degradation of insecticide dichlorovos by a combined semiconductors and organic sensitizers in aqueous media, *Journal of Photochemical Photobiology A: Chemistry*, **153**, 229.
- Nano, G.V., Strathmann, T.J., (2006). Ferrous iron sorption by hydrous metal oxides, *Journal of Colloid Interface Science*, **297**, 443-454.
- Ötker H.M, Akmehmet-Balcioğlu I., (2005). Adsorption and degradation of enrofloxacin, a veterinary antibiotic on natural zeolit, *Journal of Hazardous Materials*, **122**, 3, 251-258.
- Ternes, T.A., (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Resources*, **32**, 3245-3260.
- Vogna, D., Marotta, R., Napolitano, A., Andreozzi, R., Dischia, M., (2004). Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenac with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ozone, *Water Resources*, **38**, 414-422.
- Zhang, W., An, T., Cui, M., Sheng, G., Fu, J., (2005). Effects of anions on the photocatalytic and photoelectrocatalytic degradation of reactive dye in a packed-bed reactor, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **80**, 223-229.
- Zwiener, C., Frimmel, F. H. (2000). Oxidative treatment of pharmaceuticals in water, *Water Research*, **34**, 1881-1885.

## Çamur bekletme süresinin nitrifikasyon sistemlerindeki bakteriyel çeşitliliğe ve sistem stabilitesine etkisi

Orhan İNCE<sup>1\*</sup>, Özge EYİCE<sup>1,2</sup>, Bahar KASAPGİL İNCE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Teknik Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 34469, Maslak-İstanbul

<sup>2</sup>İstanbul Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 34469, Maslak-İstanbul

<sup>3</sup>Boğaziçi Üniversitesi, Çevre Bilimleri Enstitüsü, 34342, Bebek-İstanbul

### Özet

*Bir arıtma tesisinin başarısı büyük ölçüde arıtma işini yapacak mikrobiyal komünitenin oluşumuna bağlıdır. Fonksiyonel öneme sahip populasyonların kaybolması veya aktivitesini yitirmesi arıtma sisteminde verim kaybına yol açar. Kısaca, bir sistemin kararlı halde çalışması sahip olduğu mikroorganizma türlerinin sistemde kararlı halde tutulabilmesine bağlıdır. Yeterli miktarda ve çeşitlilikte mikroorganizmanın sistemde tutulabilmesi, optimum çamur yaşının belirlenebilmesi ile mümkündür. Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalarla, çevre veya işletme koşullarında bir farklılık olmadığı durumlarda dahi arıtma sistemlerinin bir süre sonra stabilitesini kaybettiği gösterilmiştir; ancak stabil (kararlı) arıtma verimi elde etmek için, kararlı bir komünite yapısına sahip olmak gerektiği hala kesinlik kazanmamıştır. Bu durum, düşük büyüme hızına sahip nitrifikasyon bakterileri için daha fazla önem arz etmektedir. Bu çalışmada nitrifikasyon prosesi model olarak seçilmiş ve bu sistemlerin kararlı yapısı üzerine araştırma yapılmıştır. Büyüme hızı ile doğrudan ilişkilendirilmesi nedeniyle çamur yaşı bifürkasyon parametresi olarak seçilmiş ve laboratuvar ölçekli atıksu arıtma reaktörleri farklı iki çamur yaşında işletilmiştir. Kimyasal analizler yanında moleküler analizler kullanılarak reaktörlerdeki nitrifikasyon bakterilerinin sayısı ve yapısındaki değişimler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, replika reaktörlerde toplam Amonyak Oksitleyici Bakteri (AOB) sayısı açısından anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir. Bunun yanında; bütün 3 gün çamur yaşına sahip reaktörlerde, 10 gün çamur yaşına sahip reaktörlere göre AOB çeşitliliğinin daha fazla olduğu, ancak zamana bağlı olarak çeşitliliğin azaldığı görülmüştür. Çeşitlilikteki bu azalma, yüksek çamur yaşında işletilen reaktörlerde daha fazla gözlenmiştir. Dizi analizi sonucu baskın olan türlerin Nitrosomonas türleri ve henüz kültüre alınmamış beta-proteobakteri olduğu bulunmuştur.*

**Anahtar Kelimeler:** Atıksu arıtma, nitrifikasyon, stabilite, FISH, DGGE.

\*Yazışmaların yapılacağı yazar: Orhan İNCE. oince@ins.itu.edu.tr; Tel: (212) 285 65 70.

Bu çalışma İTÜ Rektörlüğü, Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin, 11\_06\_244 numaralı “Çamur yaşının nitrifikasyon sistemlerindeki bakteriyel çeşitliliğe ve sistem stabilitesine etkisi” isimli projesi kapsamında Prof. Dr. Orhan İnce'nin yürütücülüğünde gerçekleştirilmiştir. Makale ile ilgili tartışmalar 21.08.2009 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

## Effect of sludge age on the diversity of nitrification bacteria and reactor stability

### Extended abstract

Variations in the relative abundance of microbial species are proved responsible of problems in biological treatment reactors. Quantitative ecology of wastewater treatment processes is the way of understanding these variations in community composition. In this point of view, many studies have been performed not only to understand the microbial structure of a wastewater treatment plants, but also to link microbial community dynamics to process stability. There are studies which investigated the instability caused by environmental conditions using lab- and full-scale treatment reactors. However, it is still unclear that functional stability implies a persistent community. Purkhold et al. (2000) found, for example, that few of the nitrifying bacteria classically studied in the laboratory were present in full-scale nitrification systems. and functionally stable ecosystem. Saikaly et al. (2005) studied the stability of the treatment performance of laboratory scale sequencing batch reactors operated under different sludge ages. Results of the work by Fernandez et al. (1999) revealed that an extremely dynamic community sustains a more reliable treatment performance in terms of stable efficiency. However, similar studies revealed differences in the community structure of any changes in AOB community structure. However, it is not clear whether persistent community composition secures to get stable treatment performance. This is especially important for the microorganisms which have lower growth rate (e.g. nitrifiers) as they would be less abundant compared to others (e.g. heterotrophs). Loss or alteration of key functional groups might cause unstable treatment performance. Therefore, nitrification process is selected as a main investigation subject in the present study. Samples were collected for chemical analysis and also for molecular analysis. FISH and DGGE were applied to reveal total AOB numbers and any changes in community composition.

To achieve this, two sets of replicate reactors were operated under identical conditions under two different sludge ages (3 and 10 days) with the same external conditions.

During the whole investigation period, reactor 1 and 2 (3 days sludge age) achieved more than 88% COD removal whilst reactor 3 and 4 (10 days sludge age) achieved more than 96% COD removal. Results also showed that replicate reactors with high sludge age performed more stable nitrification performance than the reactors with low sludge age. Nitrification performance was assessed with ammonium, nitrite and nitrate concentrations. In reactor 1 and 2, nitrate concentrations were in a range of 0 and 28.48 mg/L; whilst it was up to 40 mg/L in reactor 3 and 4. Nitrite concentration was maximum 10 mg/L in reactor 1 and 2; whereas no higher than 2.5 mg/L in reactor 3 and 4 during the first 30 days of experiment.

FISH quantification revealed no correlation in total AOB numbers within replicate reactors. DGGE analysis also revealed decreasing similarities between replicate reactors over time. This was more obvious in reactors with higher sludge. On the day 32, the similarity values were 70.6% and 26.7% between reactor 1-2 and reactor 3-4, respectively. Beside statistical analysis, predominant bands were excised from DGGE gels and sequenced. Results showed that they match to the following sequences: *Nitrosomonas oligotropha* (97.6 % similarity; accession number: AF272422); *Nitrosomonas* sp. IS79A3 (97.4% similarity, accession number: AJ621026) and uncultured beta-proteobacteria (higher than 97.7% similarity; accession numbers: AY062126, DQ413103, DQ376558, AY064177). Sequencing results were in agreement with the literature which states that *Nitrosomonas* species are dominant in wastewater treatment reactors.

This study is of particular importance as there is still a gap in knowledge on performance stability and community composition in wastewater treatment reactors. Since, replicate reactors were run under identical conditions, our findings could be helpful to solve the link between performance and microbial diversity. Furthermore, we hope that our findings would be in use for designing treatment reactors with new strategy.

**Keywords:** Wastewater treatment, nitrification, stability, FISH, DGGE.

## **Giriş**

Arıtma sistemlerinin performansı çevresel etkilerin yanısıra sahip olduğu mikroorganizma topluluğunun çeşitliliğine ve mikrobiyal türlerin miktarına bağlıdır. Bir sistem ne kadar farklı türde mikroorganizma içerirse, gelen atıksu tipindeki farklılık ya da çevre koşullarında oluşabilecek değişikliklerle o kadar iyi mücadele edebilir (Rowan vd., 2003). Sonuç olarak, bir sistemin kararlı halde çalışması sahip olduğu mikroorganizma türlerinin sistemde kararlı halde tutulabilmesine bağlıdır. Bu nedenle, son yıllardaki çalışmalar sadece arıtma sistemlerinin sahip olduğu mikrobiyal yapının tanımlanması üzerine değil, aynı zamanda mikrobiyal komünite dinamiğinin proses stabilitesiyle ilişkilendirilmesi üzerine yoğunlaşmaya başlamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla, çevre veya işletme koşullarında bir farklılık olmadığı durumlarda dahi arıtma sistemlerinin bir süre sonra stabilitesini kaybettiği gösterilmiştir (Kargı ve Eker, 2006; Kaufman vd., 2005; Kargı ve Uygur, 2002; Pollice vd., 2002). Yapılan diğer araştırmalarda, bu durumun bakterilerin lineer olmayan çoğalma dinamiğinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Curtis vd., 1998; Fernandez, 1999; Kaewpipat ve Grady, 2002); ancak stabil (kararlı) arıtma verimi elde etmek için, kararlı bir komünite yapısına sahip olmak gerektiği hala kesinlik kazanmamıştır. Bu durum, düşük büyüme hızına sahip mikroorganizmalar (örneğin; nitrifikasyon bakterileri) için daha fazla önem arz etmektedir. Bu mikroorganizma grupları, heterotroflara göre çok daha az miktarlarda bulunacağı için, olası kayıpları ya da sayıca azalmaları arıtma veriminde stabil yapının bozulmasına neden olacaktır. Son yıllarda arıtma sistemi stabilitesine ilişkin yürütülen sınırlı sayıda çalışmada, çamur yaşının mikrobiyal komünite ve stabilize üzerine etkisine yoğunlaşmıştır. Saikaly ve diğerleri (2005) laboratuvar ölçekli ardışık kesikli bir reaktörde mikrobiyal komünite yapısının farklı çamur yaşlarında stabilitesini değerlendirmiştir. Farklı çamur yaşlarında çalıştırılan replika reaktörlerden alınan numuneler üzerinde moleküler analizler yapılmış ve bakterilerin komünite yapısının dinamik olduğu, işletme koşulları ve sistem performansı değişmese bile komünite yapısının devamlı bir değişim içinde olduğu

gösterilmiştir. Çalışma sonuçları ayrıca, replika reaktörlerdeki bakterilerin aynı şekilde sınıflandığını ve işletme başlangıcından itibaren aynı şekilde sapmalar gösterdiğini ortaya koymuştur. Ancak yapılan benzer çalışmalar, aynı şartlar altında çalıştırılan laboratuvar ölçekli replika reaktörler arasında, bakteriyel komünite bakımından zamanla farklılaşmalar olduğunu göstermiştir. Özellikle laboratuvar ölçekli reaktörlerde daha fazla rastlanan bu durum, küçük hacimlerde daha az bakteri çeşitliliğinin bulunması ve bakteri çoğalmasının lineer olmamasıyla açıklanmıştır (Forney vd., 2001; Kaewpipat ve Grady, 2002). Saikaly ve Oerther'in (2004) yaptığı bir diğer çalışmada ise farklı çamur yaşlarının 6 saf kültürün bulunduğu bir komünite yapısı üzerine etkisi çalışılmış ve bir model geliştirilmiştir. Bu modele göre, 2.28 gün çamur yaşında işletilen bir reaktör, 5.66 gün SRT değerine sahip bir reaktörden daha fazla sayıda farklı bakteri içermektedir. Bunun nedeni olarak, yüksek çamur bekletme sürelerinde, bakteriler arasındaki rekabetin ortama daha uygun olan türler tarafından kazanılması ve sistemin tür kaybına uğraması, dolayısıyla da çeşitliliğin azalması gösterilmiştir. Hallin ve diğerleri (2005) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise 2 farklı çamur yaşında işletilen gerçek ölçekli bir tesisten numune alınmış, moleküler yöntemler kullanılarak, 10 günden fazla 2 ayrı çamur yaşı değerinin Amonyacı Oksitleyici Bakteri (AOB) yapısı üzerine etkisi incelenmiştir. Farklı çamur yaşlarında, AOB sayıları arasında bir farklılık görülmezken, araştırma süresinin başından sonuna doğru gidildikçe AOB miktarında belirgin bir artış gözlenmiştir. Ancak bu çalışma gerçek ölçekli bir tesisten alınan numuneler üzerinde yapıldığı için, AOB sayısındaki bu artışın araştırma boyunca artan sıcaklıktan mı yoksa bakteri çoğalmasının kendi lineer olmayan yapısından mı kaynaklandığı belirlenmemektedir.

Bu çalışmada nitrifikasyon prosesi model olarak seçilmiş ve bu sistemlerin kararlı yapısı üzerine araştırma yapılmıştır. Büyüme hızıyla doğrudan ilişkilendirilmesi nedeniyle çamur yaşı bifürkasyon parametresi olarak seçilmiş ve laboratuvar ölçekli atıksu arıtma reaktörleri farklı iki çamur yaşında işletilmiştir. Sistem nitrifikasyon verimi

yanısıra amonyağı oksitleyici bakteri populasyonlarının sayısı ve çeşitliliği açısından da incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda son yıllarda geliştirilen moleküler yöntemler büyük avantaj sağlamaktadır. Bu yöntemlerin başında Floresanlı Yerde Hibritleşme Tekniği (FISH), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Denaturan Gradyent Jel Elektrofrezisi (DGGE) ve gerçek zamanlı PCR (qPCR) gelmektedir. FISH ve qPCR, bakterilerin sadece türlerinin değil miktarlarının da tayinine imkan tanıması bakımından son yıllarda öne çıkan yöntemler arasındadır. Bunun yanında DGGE, klonlama çalışmalarıyla birleştirildiğinde bir sistemin barındığı bütün mikroorganizma topluluklarının belirlenebilmesine olanak sağlaması nedeniyle önem arz etmektedir. Aynı şartlar altında eş zamanlı olarak işletilen replika reaktörlerin stabilitesinde meydana gelen değişimlerin nedenleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar sistem verimi ve stabilitesinin sağlıklı bir şekilde değerlendirilmesine, böylece sistem tasarımına öneriler getirilmesine ve maliyetin düşürülmesine imkan tanıyacak olması bakımından önemlidir.

## Materyal ve yöntem

### Reaktör işletilmesi

6 L toplam, 4 L dolu hacime sahip 4 adet (2 replika) laboratuvar ölçekli Ardışık Kesikli Reaktör (AKR) 3 ve 10 gün çamur yaşlarında; 2'şer ay süreyle 15 °C sabit sıcaklıkta 6 saatlik 4 döngü şeklinde işletilmiştir (Kargi ve Uygur, 2002). Reaktörler Yu ve diğeri (2004) tarafından tarif edildiği gibi, basit organik karbok kaynağı içeren sentetik atıksu ile beslenmiştir (Tablo 1). Aşı çamuru olarak, gerçek ölçekli bir ileri evsel atıksu arıtma tesisinin geri devir hattından alınan aktif çamur kullanılmıştır.

### Analitik yöntemler

Reaktörlerin işletilmesi sırasında sıcaklık ve pH sürekli olarak izlenmiş ve EnviroMon (Pico Envirotec Inc., Kanada) bilgisayar programı kullanılarak kaydedilmiştir. Askıda katı madde ve uçucu askıda katı madde miktarları Standard Metodlar'a göre (APHA, 1993); kimyasal oksijen ihtiyacı ve amonyak konsantrasyonları ise Spectroquant COD ve Spectroquant NH<sub>3</sub>-N Cell

Test kitleri kullanılarak tayin edilmiştir (Merck & Co., Inc., USA). NO<sub>3</sub>-N ve NO<sub>2</sub>-N miktarları ise iyon kromatograf ile ölçülmüştür (Dionex Ltd., UK).

Tablo 1. Sentetik atıksuyu oluşturan bileşenler ve miktarları

Kimyasal madde	Atıksudaki konsantrasyon
Glukoz	590 mg/L
Pepton	10.0 mg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	65.9 mg/L
NH <sub>4</sub> Cl	152.9 mg/L
CaCl <sub>2</sub>	13.85 mg/L
MgCl <sub>2</sub>	36.16 mg/L
ZnCl <sub>2</sub>	0.208 mg/L
CuSO <sub>4</sub>	0.251 mg/L
MnSO <sub>4</sub>	0.275 mg/L

### Floresanlı yerde hibritleşme

Çalışma boyunca alınan numuneler, laboratuvara soğuk zincirde getirilmiş ve aynı gün fikse edilmiştir. Bu amaçla, % 4'lük paraformaldehit (PFA) solüsyonu içerisinde 4 °C'de 3 saat süreyle inkübe edilmiştir. Fiksasyondan sonra hücreler fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkayıp PBS-Etanol (1:1, v/v) karışımı içerisinde -20°C'de saklanmıştır (Harmsen vd, 1996). Fikse edilmiş hücreler hibridizasyondan önce artan etanol konsantrasyonlarında (% 50, 80, 100) dehidre edilmiştir. Hücreler % 35 deiyonize formamid içeren hibritleşme tamponu (0.9 M NaCl, 2 mg/ml Ficoll, 2 mg/ml Bovine Serum Albumen, 2 mg/ml polivinil pirolidon, 5 mM EDTA, pH 8.0, 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0, % 0.1 SDS, 2.5 ng/μL hibritleşme probu) içerisinde, 46 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir (Amann vd., 1990; Manz vd., 1992). Bu çalışmada kullanılan problemler ve spesifik oldukları gruplar Tablo 2'de verilmiştir.

AOB problemleri Cy5 boyası ile işaretliken bütün bakterilere özgü problemler ise Cy3 boyası ile işaretlidir. Hibridizasyonu takiben, hücreler 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), % 0.01 SDS, 0-5 mM EDTA ve 200 mM NaCl içeren yıkama çözeltisi ile iki defa 48 °C'de yıkamışlardır (Manz vd., 1992). 10 μl numune, teflon kaplı mikroskop la-

Tablo 2. Çalışmada kullanılan probalar, spesifik bağlandıkları gruplar ve dizimleri

Prob adı	Hedef gurup	Dizilim (5'→3')
Eub338i	Çoğu bakteri grupları	GCT GCC TCC CGT AGG AGT
Eub338ii	Planctomycetales	GCA GCC ACC CGT AGG TGT
Eub338iii	Verrucomicrobiales	GCT GCC ACC CGT AGG TGT
Nonbact338	Nonsense	CGA CGG AGG GCA TCC TCA
Nso1225	β-Proteobakteriyel AOB	CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA
Neu	Halofilik <i>Nitrosomonas sp</i>	CCC CTC TGC TGC ACT CTA
CTE	Neu probu rakibi	TTC CAT CCC CCT CTG CCG
6a192	<i>N. oligotropha</i> grubu	CTT TCG ATC CCC TAC TTT CC
c6a192	6a192 probu rakibi	CTT TCG ATC CCC GAC TTT CC

mına damlatılıp, kurutulmuş ve lamelle kapatılmıştır.

Görüntüleme amacıyla Leica TSP2 konfokal lazer taramalı mikroskop (CSLM) (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) Argon-İyon ve Helyum-Neon lazerleri ile birlikte kullanılmıştır. Her iki proba da işaretli bölgeler AOB kolonisi olarak kabul edilmiş ve her numune için 10 tane 1-2 µm arası optik kesitlere sahip görüntü alınmıştır. AOB mikrokolonilerinin çapları ise DAIME görüntü analiz programı yardımıyla ölçülmüş ve analiz edilmiştir (Daims vd., 2005). Bu program yardımıyla elde edilen sonuçlar ise toplam AOB sayısı belirlenmek üzere Coşkuner ve diğerleri (2005) tarafından tanımlanan yöntemde kullanılmıştır. Bu yöntem, birim UAKM başına bulunan AOB mikrokoloni hacimine dayanır. Burada dikkat edilmesi gereken nokta; bu yöntemde, AOB kolonilerinin küresel olduğu kabul edilir ve ortalama hacim  $4/3 \pi r^3$  formülüne göre hesaplanır. Yöntemin uygulanması sırasında gerekli bütün istatistiksel analizler Minitab v11 bilgisayar programı ile yapılmıştır (Minitab Inc., State College, Pa.).

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Öncelikle numunelerde bulunan genomik DNAlar (GNA) FAST DNA Spin Kit for Soil (Q-Biogene, Belçika) kullanılarak izole edilmiştir.

GDNA'ların izolasyonunu takiben yuvalanmış PZR yöntemiyle önce bütün bakterilere özgü primerlerle hedef bölgeler çoğaltılmış, sonra bağlanma sıcaklığı 57 °C olan AOB'lere özgü primerlerle 16S rRNA bölgeleri çoğaltılmıştır.

Aşağıdaki Tablo 3'te çalışmada kullanılan primer dizileri gösterilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan primerler ve dizimleri

Primerin Adı	Dizilim (3'→5')
pA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
pH'	AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA
CTO654r	CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC
CTO189f* (A+B+C)	GAGRAAGYAGGGGATCG

Bu çalışmada, PCR reaksiyonları 0.2'şer pmol/µL primer, 0.2 mM dNTP, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02U/µL taq polimeraz enzimi ve 1X PCR tamponu içeren çözeltilerde gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonları TECHNE-TC 412 m Termal Döndürücü'de (İngiltere)1 döngü 5 dk, 94 °C, 30 döngü (45 sn, 94 °C - 45 sn spesifik bağlanma sıcaklığı - 45 sn 72 °C), 1 döngü 10 dak 72 °C olarak yapılmıştır.

### Denatüran gradyen jel elektroforezi (DGGE)

Amonyacı oksitleyici bakterilere özgü 16S rDNA'ların V3 bölgeleri DGGE ekipmanı kullanılarak (Bio-Rad DCode™, İngiltere), 200 V'da, 60 °C'lik 1XTAE (40 mM Tris, 20 mM asetat, 1 mM EDTA) içerisinde, % 35-60 denatüran konsantrasyonuna sahip (% 100 denatüran 7 M üre ve % 40 v:v formamid içerir) poliakrilamid jel kullanılarak 6 saat süreyle koşturulmuştur. Elektroforez işleminin ardından jeller 20 dakika 1xSybrGold içerisinde bekletildikten sonra, UV altında jel görüntüleme sisteminde fotoğrafları çekilmiş ve Bionumerics Vers.4.1 yazılım paketi (Applied Maths, Belçika) ile analiz edilmiştir.

İstatistiksel analizler ise Minitab v11 yazılımı (Minitab Inc., State College, Pa.) ile gerçekleştirilmiştir. DGGE jellerinde her bir numuneye ait sınırlı sayıda bant elde edildiği için klonlama yerine DGGE jelinden bant kesme ve dizileme analizine gönderme yolu tercih edilmiştir. Dizi analizi sonuçları Chromas programı ile incelenmiş (Chromas Lite 2.01, Technelysium Pty Ltd.) ve “<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/nucleotide.html>” internet sitesi kullanılarak tür tanımlamaları yapılmıştır.

## Deneysel çalışma sonuçları

### Kimyasal analiz sonuçları

Şekil 1’de görüldüğü gibi, çamur yaşı 3 gün olan reaktörlerin UAKM konsantrasyonları  $1199 \pm 803$  mg/L ve  $1218 \pm 485$  mg/L iken 10 gün olan reaktörlerin ki ise  $4671 \pm 916$  ve  $4605 \pm 1056$  mg/L değerlerini almıştır.

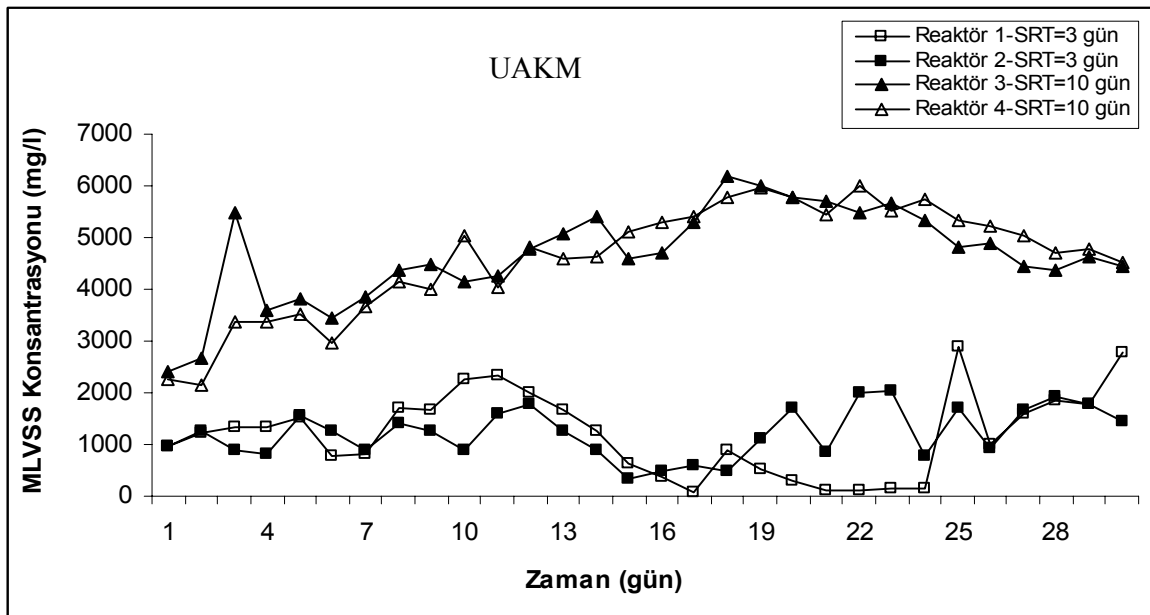
Öncelikle, aynı koşullar altında çift çalışılan reaktörlerin sahip olduğu UAKM değerleri arasında bir korelasyon olup olmadığına bakılmıştır. Yapılan istatistik analizler sonucu 10 gün çamur yaşına sahip reaktörlerde pearson korelasyon katsayısının 0.892 olduğu bulunmuştur. Bu değer istatistiksel olarak yüksek korelasyon olarak değerlendirilebilecek bir değerdir. Ancak, 3 gün çamur yaşına sahip reaktörlerde bu değer

0.598’e düşmüştür. Bu sonuç bize düşük çamur yaşlarında işletilen reaktörlerde, yüksek çamur yaşıyla işletilen reaktörlere göre, dışsal bir etki olan çamur yaşı gibi bir işletme parametresinin, içsel etki olarak değerlendirilen; bakterilerin büyüme dinamiğinden daha etkili olabileceğini göstermektedir.

Arıtma verimleri değerlendirildiğinde, reaktör 1 ve 2’de (çamur yaşı 3 gün)  $\% 88 \pm 14.5$  ve  $\% 88 \pm 14.75$  KOİ giderim verimi elde edilirken bu değer reaktör 3 ve 4’te (çamur yaşı 10 gün)  $\% 96 \pm 1.7$  ve  $\% 96 \pm 1.8$ ’e ulaşmıştır. Nitrifikasyon verimini ölçmek amacıyla  $\text{NH}_3\text{-N}$ , nitrit ve nitrat konsantrasyonları ölçülmüştür. 3 gün çamur yaşına sahip reaktör 1 ve 2’de nitrat konsantrasyonları 0 ila 28.48 mg/L ve 0 ila 25.0 mg/L arasında değişirken; 10 gün çamur yaşına sahip reaktör 3 ve 4’te ise sırasıyla 40 ve 34 mg/L’ye kadar yükselmiştir. Nitrit konsantrasyonları incelendiğinde reaktör 1 ve 2’de en fazla 10 mg/L değeri elde edilmiştir. Reaktör 3 ve 4’te ise bu değer ilk 30 gün boyunca 2.5 mg/L’nin aşağısında kalırken çalışmanın ilerleyen aşamalarında 18 mg/L ve 17 mg/L’ye kadar yükselmiştir (Şekil 2).

### FISH Sonuçları

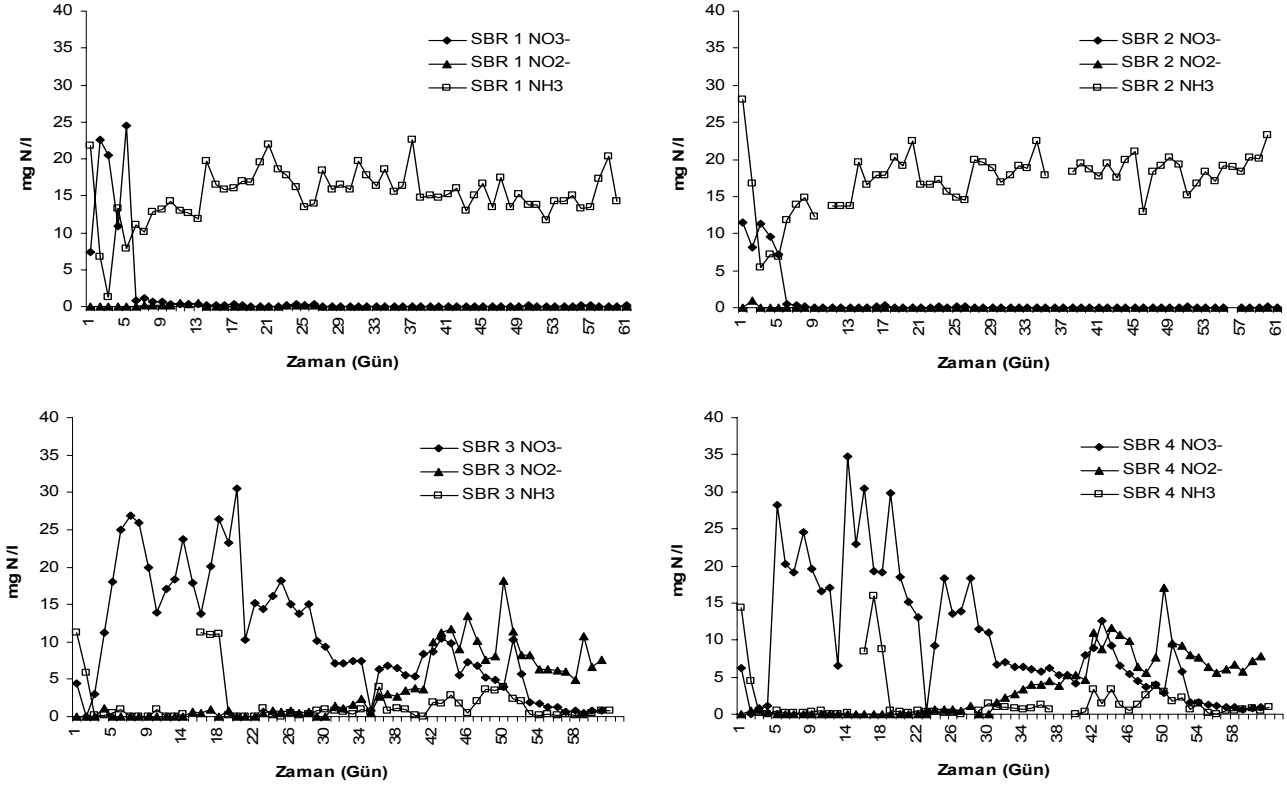
Çalışma süresince alınan 5 numunede toplam Amonyacı Oksitleyici Bakteri (AOB) sayısı FISH



Şekil 1. Çalışma süresi boyunca reaktörlerin sahip olduğu UAKM değerleri



Çamur yaşının nitrifikasyon bakterileri üzerine etkisi



Şekil 2. Reaktörlerdeki amonyak, nitrit ve nitrat konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimi (a) Reaktör 1, (b) Reaktör 2, (c) Reaktör 3, (d) Reaktör 4

yöntemi kullanılarak bulunmuştur. FISH yöntemi sonucu elde edilen mikroskop görüntüleri kullanılarak, her bir numunedeki mikrokoloni sayısı tespit edilmiş ve Coskuner ve diğerleri (2005) tarafından tanımlanan yöntemle toplam AOB sayısı bulunmuştur.

Hesaplamalar sonucunda Tablo 4'te verilen sonuçlar elde edilmiştir. Toplam AOB sayıları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, gerek 3 gün gerekse 10 gün çamur yaşıyla işletilen eş reaktörler arasında bir uyum görülmemiştir. Bu sonuçlar, reaktörlerde lineer olmayan büyüme

dinamiğinin etkili olabileceği sonucunu akla getirmiştir.

Özellikle 10 gün çamur yaşı ile işletilen reaktörlerde nitrifikasyon verimi oldukça yüksek ve stabildir. Buna rağmen, her iki reaktördeki AOB sayıları arasında bir ilişki mevcut değildir. Bu sonuç, komünite stabilitesi yanında fonksiyonel stabilite üzerinde de durulması gerektiğini göstermiştir. Toplam sayı açısından farklılık gösteren eş iki reaktör çalışma süresi boyunca fonksiyonel olarak kararlı yapısını sürdürmeyi başarmıştır.

Tablo 4. Reaktörlerdeki toplam AOB sayılarının zamana bağlı değişimi

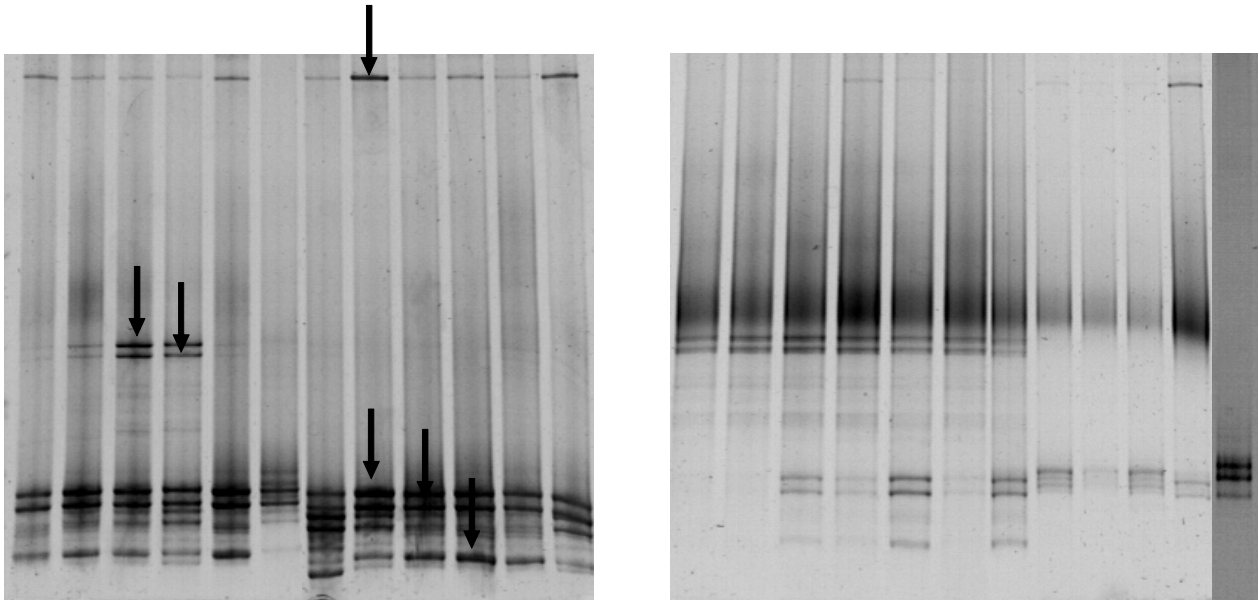
Zaman (Gün)	Reaktör 1 (hücre/mL)	Reaktör 2 (hücre/mL)	Reaktör 3 (hücre/mL)	Reaktör 4 (hücre/mL)
12	5.13E+08	9.13E+08	3.77E+08	7.13E+08
21	6.08E+07	7.87E+08	5.41E+08	5.76E+08
30	2.51E+08	6.53E+07	3.20E+08	1.77E+08
41	3.87E+08	9.75E+07	9.56E+07	9.03E+08
59	8.00E+07	1.06E+08	1.60E+08	2.86E+08

### Denatüran gradyen jel elektroforezi sonuçları

Toplam AOB sayısı yanında AOB komünitesindeki değişiklikleri ve varsa eş reaktörler arasındaki benzerliği ortaya koyabilmek için alınan numuneler üzerinde DGGE analizleri yapılmış ve jel görüntüleri bilgisayar programı yardımıyla analiz edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu % 35-60 denatüran konsantrasyonunun DGGE analizi için uygun olduğu görülmüş, PCR ürünleri bu denatüran konsantrasyonuna sahip jellerde yürütülmüş ve Şekil 3'de gösterilen görüntüler elde edilmiştir. Jel görüntülerinden de anlaşılacağı üzere, genel olarak 10 gün çamur yaşında işletilen reaktörler, 3 gün çamur yaşında işletilen reaktörlere göre daha az tür çeşitliliğine sahiptir. Benzer şekilde; Saikaly ve diğeri'nin (2005) yaptığı bir çalışmada, laboratuvar ölçekli ardışık kesikli reaktörler 2 ve 8 gün çamur yaşlarında işletilmiş ve düşük çamur yaşına sahip olan sistemde yüksek çamur yaşına göre daha yüksek bir çeşitlilik elde edilmiştir. Bunun sebebi olarak, yüksek çamur yaşına sahip sistemlerde belli türlerin baskın hale gelmesi ve diğeri'nin sistemden yikanması gösterilebilir. Burada dikkat çeken diğeri bir nokta, 10 gün çamur yaşına sahip reaktörlerden elde edilen DGGE bantlarının hepsi 3

gün çamur yaşında işletilen reaktörlerde mevcuttur. Jel görüntüleri bilgisayar programı kullanılarak incelendiğinde ve istatistiksel analizleri yapıldığında ise, her iki çamur yaşı değerinde işletilen eş reaktörlerin sahip olduğu AOB türlerinin benzerliği açısından zamana bağlı olarak bir azalma görülmüştür; ancak bu azalma 10 gün çamur yaşına sahip reaktörlerde daha fazladır. 3 gün çamur yaşına sahip eş reaktörlerde, en düşük benzerlik 33. günde alınan numunede görülürken (% 70.6), 10 gün çamur yaşında işletilen reaktörlerde ise bu değer 41. günde % 26.7'ye düşmüştür. Bu durum düşük çamur yaşına sahip reaktörlerin zamana bağlı olarak stabil yapılarını yüksek çamur yaşında işletilen reaktörlere kıyasla daha iyi koruyabildiklerini göstermektedir.

Her bir reaktörün AOB çeşitliliğindeki değişim kendi içinde incelendiğinde, yine aynı şekilde düşük çamur yaşına sahip her iki reaktörde de kendine benzerlik değeri yüksek çamur yaşında işletilen reaktörlere göre daha fazladır. 10 gün çamur yaşına sahip her iki reaktörde de özellikle 32. günden sonra başlangıç zamanında alınan ilk numuneye göre (10. gün) benzerlik % 0'a kadar düşmüştür. 3 gün çamur yaşında işletilen reaktörlerde ise bu değer en düşük % 75 olmuştur.



Şekil 3. Reaktörlerin sahip olduğu AOB komünitesininin DGGE profilleri  
Şerit 1-2: 10. gün; 3-4: 24. gün; 5-6: 33. gün; 7-8: 40. gün; 9-10: 48. gün; 11-12: 56. gün  
(a) 3 gün çamur yaşıyla işletilen Reaktör 1 ve 2; (b) 10 gün çamur yaşıyla işletilen Reaktör 3 ve 4

Bu sonuçlar, reaktörlerin nitrifikasyon performansıyla birlikte değerlendirildiğinde, daha az çeşitliliğe sahip olsa ve stabil bir AOB popülasyonunu sürdürmese bile 10 gün çamur yaşıyla işletilen sistemin nitrifikasyon veriminin daha stabil olduğu görülmüştür. Bu bulgular, Fernandez ve diğerleri (1999) tarafından elde edilen sonuçlarla uyumludur. Araştırmacılar, bir yıldan uzun süreyle laboratuvar ölçekli bir anaerobik reaktör işletmişlerdir ve stabil verim elde ettikleri halde mikrobiyal popülasyonun yüksek oranlarda dinamik olduğunu göstermişlerdir.

AOB profillerinin istatistiksel analizinin yanında, baskın olan bantlar kesilip, 16S rRNA bölgeleleri çoğaltılmış ve dizi analizine gönderilmiştir. Elde edilen diziler bilgi bankasıyla karşılaştırıldığında; bantların % 97.6 benzerlik ile *Nitrosomonas oligotropha*'ya (EBI erişim numarası: AF272422); % 97.4 benzerlik ile *Nitrosomonas sp.*'ye IS79A3 (EBI erişim numarası: AJ621026); % 97.7'nin üzerinde benzerliklerle henüz kültüre alınmamış olan beta-proteobakterilere (EBI erişim numaraları: AY062126, DQ413103, DQ376558, AY064177) ait olabileceği görülmüştür.

Daha uzun 16S rRNA dizi analizi daha fazla bilgi sağlayacaktır ancak edinilen bilgiler literatürle uyum içerisindedir. *Nitrosomonas* türleri nitrifikasyon reaktörlerinde en fazla rastlanan türlerdir ve bu çalışmada da 4 reaktörde bütün çalışma boyunca görülmüşlerdir (Purkhold vd., 2000).

## Sonuçlar

Bu çalışma farklı çamur yaşlarında işletilen eş reaktörler arasında, toplam AOB sayısı ve AOB komünitesi açısından benzerlikleri ortaya koymak; elde edilecek sonuçları nitrifikasyon verimi ve stabilitesi ile ilişkilendirmek amacıyla yürütülmüştür. Sonuçlar, düşük çamur yaşında işletilen nitrifikasyon reaktörlerinin, yüksek çamur yaşında işletilenlere oranla daha yüksek bir AOB çeşitliliğine sahip olduğunu göstermiştir. Ancak, elde edilen bulgular nitrifikasyon verimi ile ilişkilendirildiğinde, yüksek AOB çeşitliliğine sahip olsa bile 3 gün çamur yaşının stabil bir nitrifikasyon verimi elde etmeye yeterli olmadığı bir kez daha gösterilmiştir. FISH analizi ile

elde edilen toplam AOB sayıları da benzer şekilde stabil bir AOB popülasyonunun sistemde var olmadığını ortaya koymuştur. Eş reaktörler arasında toplam AOB sayısı açısından bir korelasyon görülmemiştir.

Yapılan çalışma, bu konuda literatürde mevcut olan bilgi eksikliği dikkate alındığında önem arz etmektedir. Arıtma reaktörlerinin stabilitesi ve popülasyon dinamiği ile ilişkilendirilmesi konularında henüz kesin bilgiler elde edilmemiştir. Bu çalışma, ileride yapılacak arıtma sistemi tasarımlarına yeni bir bakış açısı getirmektedir.

## Teşekkür

Yazarlar, bu çalışmanın gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı İngiltere, Newcastle Üniversitesi'nden Prof. Tom Curtis, Prof. Ian Head ve Dr. Emma Bowen'a teşekkürlerini sunar.

## Kaynaklar

- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. ve Stahl, D.A., (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 1919-1925.
- APHA, (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater, 19<sup>th</sup> Ed., Washington D.C.
- Coskuner, G., Ballinger, S.J., Davenport, R.J., Pickering, R.L., Solera, R.R., Head, I.M. ve Curtis, T.P., (2005). Agreement between theory and measurement in the quantification of ammonia oxidizing bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 10, 6325-6334.
- Curtis, T.P. ve Craine, N.G., (1998). The comparison of the diversity of activated sludge plants, *Water Science and Technology*, **37**, 71-78.
- Daims, H., Lücker, S. ve Wagner, M., (2005). A novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research, *Environmental Microbiology*, **8**, 200-213.
- Fernandez, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C. ve Tiedje, J., (1999). How stable is stable? Function versus community composition, *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 8, 3697-3704.
- Forney, L.J., Liu, W.T., Guckert, J.B., Kumagai, Y., Namkung, E., Nishihara, T. ve Larson R.J., (2001). Structure of microbial communities in ac-

- tivated sludge: Potential implications for assessing the biodegradability of chemicals, *Ecotoxicology Environmental Safety*, **49**, 40-53.
- Hallin, S., Lydmark, P., Kokalj, S., Hermansson, M., Sorensson, F., Jarvis, A. ve Lindgren P.E., (2005). Community survey of ammonia-oxidizing bacteria in full-scale activated sludge processes with different solids retention time, *Journal of Applied Microbiology*, **99**, 629-640.
- Kaewpipat, K. ve Grady, C.P.L., (2002). Microbial population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors, *Water Science and Technology*, **46**, 19-27.
- Kargi, F. ve Uygur, A., (2002). Nutrient removal performance of a sequencing batch reactors as a function of the sludge age, *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 842-847.
- Kargi, F. ve Eker, S., (2006). Effect of sludge age on performance of an activated sludge unit treating 2,4 dichlorophenol-containing synthetic wastewater, *Enzyme and Microbial Technology*, **38**, 60-64.
- Kaufman, M.K., Majcherek, H. ve Klaczynski, E., (2005). Factors affecting the biological nitrogen-removal from wastewater, *Process Biochemistry*, **41**, 5, 1015-1021.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. ve Schleifer, K.H., (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: Problems and solutions, *Systematic and Applied Microbiology*, **15**, 593-600.
- Pollice, A., Tandoi, V. ve Lestingi, C., (2002). Influence of aeration and sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate, *Water Research*, **36**, 2541-2546.
- Purkhold, U., Pommerening-Roser, A. ve Juretschko, S., (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amo* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys, *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 5368-5382.
- Rowan, A.K., Snape, J.R. ve Fearnside, D., (2003). Composition and diversity of ammonia-oxidizing bacterial communities in wastewater reactors of different design treating identical wastewater, *FEMS Microbiology Ecology*, **41**, 195-206.
- Saikaly, P.E. ve Oerther, D.B., (2004). Bacterial competition in activated sludge: Theoretical analysis of varying solids retention times on diversity, *Microbial Ecology*, **48**, 274-284
- Saikaly, P.E., Stroot, P.G., ve Oerther, D.B., (2005). Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge, *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 10, 5814-5822.