

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYODİZEL ATIKSULARININ BİYOLOJİK
ARTILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Çevre Bilim Uzm. Nursel KIRATLI YILMAZÇOBAN

Enstitü Anabilim Dalı : ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ
Tez Danışmanı : Prof. Dr. İ. Ayhan ŞENGİL

Mayıs 2012

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYODİZEL ATIKSULARININ BİYOLOJİK
ARITILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ**


DOKTORA TEZİ

Çevre Bilim Uzm. Nursel KIRATLI YILMAZÇOBAN

Enstitü Anabilim Dalı : ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 31/05/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr.
İ. Ayhan ŞENGİL
Jüri Başkanı


Yrd. Doç. Dr.
Meral YİRTSEVER
Üye


Yrd. Doç. Dr.
Kudret YILDIRIM
Üye


Prof. Dr.
Gülşen ALTUĞ
Üye


Yrd. Doç. Dr.
Nurtaç ÖĞLENİ
Üye

TEŞEKKÜR

Doktora çalıőmam boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri örnek aldığım, yanında çalıőmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Prof.Dr.İ.Ayhan ŞENGİL' e teşekkür ederim. Doktora çalıőmamda, tez izleme komitesinde bulunan hocalarım, Sayın Yrd.Doç.Dr.Meral YURTSEVER' e ve Sayın Yrd.Doç.Dr.Kudret YILDIRIM' a, tez çalıőmamdaki eksik noktaların belirlenmesi ve düzeltilmesi sürecinde göstermiş oldukları destek ve ilgiden dolayı teőekkürlerimi sunarım. Örnek aldığım ve bilimsel olarak bana desteklerini esirgemeyen değerli Hocalarım, Doç.Dr.A.Filiz GÜREL' e ve Prof.Dr.Gülşen ALTUğ' a çok teşekkür ederim. Uzun zamandır çalıőmayı çok istediğim fakat yeni başlayabildiğim Moleküler Mikrobiyel Ekolojiye adım atmamı sağlayan Uzm. Biyolog F. Elif ÇEPNİ' ye teşekkür ederim. Biyoreaktör imalatını yapan ve doktora çalıőmam süresince hafta sonu ve hafta içi yoğun çalışma tempoma hiç Őikâyet etmeden katlanan sevgili eőim, İ. Kutay YILMAZÇOBAN' a, bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme (Mustafa KIRATLI, Sabahat KIRATLI, Binnur KIRATLI) ve dostlarıma teőekkürlerimi sunarım.

Bu alıőma 108Y039 proje numarası ile TÜBİTAK ÇAYDAG ve 2010-50-02-001 No' lu SAÜ BAPK tarafından desteklenmiştir. TÜBİTAK ÇAYDAG' a ve Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu' na desteklerinden dolayı teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY.....	xvi
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
1.2. Çalışmanın Ana Hatları.....	4
BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Biyodizel Üretim Yöntemi.....	7
2.2. Biyodizel ve Atıksu Üretilmesi.....	7
2.3. Biyodizelin Rafinasyonu.....	7
2.4. Biyolojik Arıtma.....	9
2.4.1. Yağ asitlerinin parçalanması.....	9
2.4.2. Nötral yağlar ve yağ benzeri depo maddeleri.....	10
2.4.3.1. Bakteriye ait gliserol degradasyon 1. metabolik yol..	11
2.4.3.2. Maya'ya ait gliserol degradasyon 1. metabolik yol....	11
2.5. Aktif Çamur Mikrobiyolojisi.....	12
2.5.1. Bakteriler.....	13
2.5.2. Besin – mikroorganizma oranı (F:M).....	14
2.5.3. Giriş suyunun besin niteliği.....	15
2.5.4. Protozoa ve Rotiferler.....	15

2.5.5. Amibler.....	15
2.5.6. Flagellatlar.....	16
2.5.7. Siliyatlar.....	16
2.5.8. Serbest yüzücü Siliyatlar.....	16
2.5.9. Kayan Siliyatlar.....	16
2.5.10. Saplı Siliyat.....	16
2.5.11. Protozoaları etkileyen faktörler.....	17
2.5.12. Rotiferler.....	17
2.5.13. Filamentli mikroorganizmaların tanımlanması.....	17
2.5.14. Tipik Aktif Çamurda bulunan Protozoa ve Metazoalar.....	18

BÖLÜM 3.

GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Analiz Yöntemleri.....	20
3.1.1. KOİ analizi.....	20
3.1.2. BOİ analizi	20
3.1.3. Yağ-Gres analizi	20
3.1.4. TOK/TN analizi	20
3.1.5. Sabun analizi.....	20
3.1.6. Askıda Katı Madde (AKM) analizi.....	21
3.1.7. Uçucu Askıda Katı Madde (UAKM) analizi.....	21
3.1.8. pH ölçümü.....	21
3.1.9. Çözünmüş Oksijen ölçümü.....	21
3.1.10. Bakteri boyama yöntemleri.....	21
3.1.10.1. Gram boyama.....	21
3.1.10.2. Neisser boyama (Albert Metodu).....	22
3.1.10.3. PHB boyama.....	22
3.2. Biyodizel ve Atıksuyu Üretilmesi.....	22
3.3. Ekstraksiyon Çalışmaları.....	24
3.4. Elektrokoagülasyon Çalışmaları.....	25
3.5. Biyolojik Arıtma Çalışmaları.....	25
3.5.1. Aktif Çamur ile biyolojik arıtma çalışmaları.....	25
3.5.1.1. Kimyasal parametrelerin analizi.....	25

3.5.1.2. Nutrient ilaveleri.....	26
3.5.1.3. Sıcaklık ölçümleri.....	26
3.5.1.4. Çözünmüş oksijen ölçümleri.....	26
3.5.1.5. pH ölçümleri.....	26
3.5.1.6. BOİ kinetik parametreleri hesaplanması.....	26
3.5.2. EBA, FeELBA, AIELBA ile yapılan kesikli çalışmalar.....	27
3.5.2.1. EBA ve AIELBA ile yapılan ön çalışmalar.....	27
3.5.3. Tam karışimli sürekli reaktör.....	27
3.6. Aktif Çamur Fenotipik İdentifikasyon.....	29
3.7. Aktif Çamurdaki Mikroorganizmaların Moleküler Tanısına Yönelik Çalışmalar.....	32
3.7.1. Aktif Çamur örneklemeleri.....	32
3.7.2. Genomik DNA izolasyonu.....	32
3.7.3. Moleküler tanı için mikroorganizma gruplarının seçimi ve primerlerin tasarımı.....	33
3.7.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	35
3.7.5. PZR ürünlerinin analizi.....	36
3.8. Seçilen Mikroorganizmaların Aktif Çamurdan İzolasyonu.....	36
3.8.1. Minimum inhibisyon konsantrasyon testleri (MİK).....	37
3.8.1.1. Seçilen izolatların ve satın alınan suşların ham biyodizel atıksuyu (HBA)' nu parçalama eğilimi testleri.....	38

BÖLÜM 4.

SONUÇLAR.....	40
4.1. Biyodizel Atıksuyunun Karakterizasyonu.....	40
4.2. Biyolojik Arıtma Çalışmaları.....	40
4.2.1. BOİ deneyleri.....	41
4.2.1.1. BOİ kinetik sonuçları.....	44
4.2.2. EBA ile yapılan kesikli ön çalışma sonuçları.....	45
4.2.2.1. EBA' nın farklı konsantrasyonlarda kesikli sistemde biyolojik arıtılabilirliği.....	46
4.2.3. EBA, FeELBA, AIELBA ile yapılan kesikli çalışma sonuçları.....	50

4.2.4. Aktif Çamur sistemi ile sürekli işletme çalışmaları.....	53
4.2.4.1. Sürekli işletmeli aktif çamur sisteminde kinetik katsayıların tayini.....	55
4.2.4.2. Aktif Çamur fenotipik identifikasyon.....	59
4.2.4.3. Aktif Çamur' un mikrobiyolojik yapısı.....	63
4.2.5. Aktif Çamurdaki mikroorganizmaların moleküler tanıma yönelik çalışmalar	68
4.2.5.1. EBA ve AIELBA' nın arıtılmasında kullanılan aktif çamurun PZR ile genetik tanısı.....	68
4.2.5.2. EBA ve AIELBA' nın arıtılmasında kullanılan Aktif Çamurun REP-PZR sonuçları.....	78
4.2.6. Bakteri izolasyonu ve identifikasyonu.....	83
4.2.7. Minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri.....	86
4.2.7.1. Seçilen izolatların ve satın alınan suşların ham biyodizel atıksuyu (HBA)' nu parçalama eğilimi test sonuçları.....	87
BÖLÜM 5.	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	90
KAYNAKLAR.....	94
ÖZGEÇMİŞ.....	101

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Al	: Alüminyum
AlELBA	: Alüminyum elektrot ile elektrokoagüle edilen biyodizel atıksuyu
AÇ	: Aktif çamur
AKM	: Askıda katı madde
BOİ	: Biyokimyasal oksijen ihtiyacı
ÇO	: Çözünmüş oksijen
ÇHİ	: Çamur hacim indeksi
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
EBA	: Ekstrakte edilmiş biyodizel atıksuyu
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
Fe	: Demir
FeELBA	: Demir elektrot ile elektrokoagüle edilen biyodizel atıksuyu
HBA	: Ham biyodizel atıksuyu
k'	: BOİ reaksiyon hız sabiti (zaman ⁻¹)
kg	: Kilogram
KOİ	: Kimyasal oksijen ihtiyacı
L	: Litre
L ₀	: Nihai BOİ (mg/L)
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantasyon Testi
<i>P.aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Q	: Debi
q	: Çamur geri devir debisi (L/sa)
Θ _H	: Hidrolik bekleme süresi (sa)
Q ₀	: Giriş atıksu debisi (m ³ /gün)
rRNA	: Ribozomal RNA

s	: Saniye
S_0	: Giriş atıksu KOİ değeri (kg/m^3)
<i>S. natans</i>	: <i>Sphaerotilus natans</i>
t	: Zaman
TN	: Toplam azot
TOK	: Toplam organik karbon
UAKM	: Uçucu askıda katı madde
V	: Hacim
X	: Karışmış askıda katı madde (kg/m^3)
YAME	: Yağ asidi metil esteri

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Türkiye' nin kurulu biyodizel üretim kapasiteleri.....	2
Şekil 2.1.	Escherichia coli K12 substr. MG1655, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c' nin gliserol biyodegradasyonu.....	12
Şekil 2.2.	Bakteri üreme dönemleri.....	14
Şekil 2.3.	Mikroorganizmaların göreceli üstünlük diyagramı.....	19
Şekil 3.1.	Üretilen esterler ve gliserin tabakasının çökelti olarak oluşumu....	23
Şekil 3.2.	İlk yıkama sonrası ester tabakası ve beyaz renk almış su tabakasının görünümü.....	23
Şekil 3.3.	Ekstraksiyon sistemi.....	24
Şekil 3.4.	Tam karışimli sürekli reaktör.....	28
Şekil 4.1.	EBA, FeELBA, AIELBA nununelerine ait BOİ-Zaman grafiği....	41
Şekil 4.2.	Thomas Metodu ile BOİ ölçümlerinden k ve Lo değerlerinin tayini (EBA).....	43
Şekil 4.3.	Thomas Metodu ile BOİ ölçümlerinden k ve Lo değerlerinin tayini (FeELBA).....	43
Şekil 4.4.	Thomas Metodu ile BOİ ölçümlerinden k ve Lo değerlerinin tayini (AIELBA).....	44
Şekil 4.5.	%10 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinin biyolojik arıtılma ile günlere göre TOK (mg/L) değişimi.....	46
Şekil 4.6.	%15 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinin biyolojik arıtılma ile günlere göre TOK (mg/L) değişimi.....	47

Şekil 4.7.	%25 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinin biyolojik arıtılma ile günlere göre TOK (mg/l) değişimi.....	47
Şekil 4.8.	%50 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinin biyolojik arıtılma ile günlere göre TOK (mg/L) değişimi.....	48
Şekil 4.9.	%75 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinin biyolojik arıtılma ile günlere göre TOK (mg/L) değişimi.....	48
Şekil 4.10.	%100 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinin biyolojik arıtılma ile günlere göre TOK (mg/L) değişimi.....	49
Şekil 4.11.	EBA ile beslenen kesikli sistemde farklı S_0/X_0 oranlarında aktif çamur biyokütlesinin zamanla TOK giderimi.....	51
Şekil 4.12.	FeELBA ile beslenen kesikli sistemde farklı S_0/X_0 oranlarında aktif çamur biyokütlesinin zamanla TOK giderimi.....	51
Şekil 4.13.	AIELBA ile beslenen kesikli sistemde farklı S_0/X_0 oranlarında aktif çamur biyokütlesinin zamanla TOK giderimi.....	52
Şekil 4.14.	Aktif Çamurda kinetik katsayılar (EBA); k ve K_s ' in grafik ile bulunması.....	55
Şekil 4.15.	Aktif Çamurda kinetik katsayılar (EBA); k_d ve Y' nin grafik ile bulunması.....	56
Şekil 4.16.	Aktif Çamurda kinetik katsayılar (AIELBA); k ve K_s ' in grafik ile bulunması.....	56
Şekil 4.17.	Aktif Çamurda kinetik katsayılar (AIELBA); k_d ve Y' nin grafik ile bulunması.....	57
Şekil 4.18.	<i>Epystilis</i> sp. kolonisinin aktif çamur flok yapısında görünümü (faz kontrast mikroskobu, 400X), (a) normal işletme şartlarında (b) çamur kabarması meydana geldiğindeki koloniler.....	60
Şekil 4.19.	Aktif çamurda rastlanan bakteriler (gram boyama, ışık mikroskobu, 1000X), (a) Çamur kabarmasına neden olduğu bilinen filamentli bakteri <i>S.natans</i> (b) <i>Zooglea ramigera</i> ' nin amorf yapısı.....	60
Şekil 4.20.	<i>Actinomycetes</i> ' in rozet formu (a), Fungi (b) (gram boyama, ışık mikroskobu,1000X).....	60

Şekil 4.21.	Aktif çamur sisteminde (EBA' nın arıtılmasında) TOK, TN giriş ve çıkış konsantrasyonlarının zamanla değişimi.....	64
Şekil 4.22.	Aktif çamur sisteminde (EBA' nın arıtılmasında) AKM ve UAKM konsantrasyonlarının zamanla değişimi.....	65
Şekil 4.23.	Aktif çamur sisteminde (EBA' nın arıtılmasında) SVI ve UAKM' nin zamanla değişimi.....	65
Şekil 4.24.	Aktif çamur sisteminde (AIELBA' nın arıtılmasında) TOK, TN giriş ve çıkış konsantrasyonlarının zamanla değişimi.....	66
Şekil 4.25.	Aktif çamur sisteminde (EBA' nın arıtılmasında) AKM ve UAKM konsantrasyonlarının zamanla değişimi.....	67
Şekil 4.26.	Aktif çamur sisteminde (EBA' nın arıtılmasında) SVI ve UAKM' nin zamanla değişimi.....	67
Şekil 4.27.	EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun 341f, 341f-GC, 926r primerleri ile yapılan PZR analizi.....	69
Şekil 4.28.	EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun CTO189f, CTO654r primerleri ile yapılan PZR analizi.....	70
Şekil 4.29.	EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun 27f, 1492r primerleri ile yapılan PZR analizi.....	71
Şekil 4.30.	EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun Ac436f, Ac676r, primerleri ile yapılan PZR analizi.....	72
Şekil 4.31.	EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun F243, R1378, F984GC primerleri ile yapılan PZR analizi.....	73
Şekil 4.32.	EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun 530F, 1392R primerleri ile yapılan PZR analizi.....	74
Şekil 4.33.	EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun nu-SSU-0817-5', nu-SSU-1196-3' primerleri ile yapılan PZR analizi.....	75

Şekil 4.34.	EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun nu-SSU-0817-5', nu-SSU-1536-3' primerleri ile yapılan PZR analizi.....	76
Şekil 4.35.	EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun Vf, Vr primerleri ile yapılan PZR analizi.....	77
Şekil 4.36.	EBA' nın sürekli tam karışımlı geri devirli biyoreaktörde arıtılmasında 2 ay süresince haftalık alınan numunelerdemikroorganizma dağılımları.....	78
Şekil 4.37.	AIELBA' nın sürekli tam karışımlı geri devirli biyoreaktörde arıtılmasında 2 ay süresince haftalık alınan numunelerde mikroorganizma dağılımları.....	78
Şekil 4.38.	EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun repF, repR primerleri ile yapılan PZR analizi.....	79

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.	Ayçiçeği, soya ve atık kıztartma yağının iğerdiği yağ asit oranları.....	5
Tablo 2.2.	Ham biyodizeldeki safsızlıklar ve etkileri.....	7
Tablo 2.3.	Biyodizel atıksuyundaki bazı değerler.....	8
Tablo 3.1.	Filamentli bakterilerin teğhis anahtarları.....	30
Tablo 3.2.	Aktif ęamurun moleküler dőzeyde tanısı için kullanılan primerler.....	34
Tablo 3.3.	Aktif ęamurda yaygın bulunan mikroorganizmalara őzđü primerlerle yapılan PZR ve REP-PZR bileşenlerin miktarları.....	35
Tablo 3.4.	Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar.....	36
Tablo 3.5.	Koloni Doğrulama Testleri.....	37
Tablo 3.6.	Seri sulandırma sonrasında kuyucuklarda oluşan HBA miktarları.....	38
Tablo 4.1.	Biyodizel atıksularının analiz sonuçları.....	40
Tablo 4.2.	EBA, FeELBA, AIELBA numunelerine ait BOI değerleri.....	42
Tablo 4.3.	Thomas Metodu için hesaplanan EBA, FeELBA, AIELBA numunelerinin BOI değerleri.....	42
Tablo 4.4.	Thomas Metodu için hesaplanan EBA, FeELBA, AIELBA numunelerinin BOI Kinetik Sabitleri.....	44
Tablo 4.5.	Kesikli sistemde biyolojik arıtmada kullanılan EBA' nın ve EBA' nın elde edildiği HBA' nın karakteristik özellikleri.....	45
Tablo 4.6.	Farklı seyreltmelerde EBA' nın kesikli sistemde biyolojik arıtılma ile günlere göre Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ mg/L) değişimi ve %KOİ giderim verimi.....	49
Tablo 4.7.	Kesikli sistemde biyolojik arıtmada kullanılan HBA, EBA, FeELBA ve AIELBA' nın karakteristik özellikleri.....	50

Tablo 4.8.	EBA ile beslenen kesikli sistemde başlangıç KOİ ve AKM konsantrasyonları ile S_0/X_0 oranları ve KOİ giderim hızları.....	50
Tablo 4.9.	FeELBA ile beslenen kesikli sistemde başlangıç KOİ ve AKM konsantrasyonları ile S_0/X_0 oranları ve KOİ giderim hızları.....	51
Tablo 4.10.	AIELBA ile beslenen kesikli sistemde başlangıç KOİ ve AKM konsantrasyonları ile S_0/X_0 oranları ve KOİ giderim hızları.....	52
Tablo 4.11.	Sürekli reaktör işletme koşulu.....	54
Tablo 4.12.	Aktif çamur sürekli reaktörde EBA' nın, 4.35 saatlik hidrolik bekletme süresinde ve kararlı halde ortalama kirlilik parametrelerin giriş, çıkış değerleri ve arıtma verimleri.....	54
Tablo 4.13.	Aktif çamur sürekli reaktörde AIELBA' nın, 4.35 saatlik hidrolik bekletme süresinde ve kararlı halde ortalama kirlilik parametrelerin giriş, çıkış değerleri ve arıtma verimleri.....	54
Tablo 4.14.	EBA ve AIELBA' nın Sürekli İşletmeli Aktif Çamur Sisteminde Arıtılmasında Hesaplanan Kinetik Katsayılar.....	57
Tablo 4.15.	EBA' nın sürekli işletmeli aktif çamur sistemiyle arıtılmasında tespit edilen mikroorganizmalar.....	61
Tablo 4.16.	AIELBA' nın sürekli işletmeli aktif çamur sistemiyle arıtılmasında tespit edilen mikroorganizmalar.....	62
Tablo 4.17.	REP-PZR Jel Analizör Verileri.....	80
Tablo 4.18.	Ticari olarak satın alınan ve izolasyonu yapılan bakterilerin BD BBL Crystal (Bacton Dickinson) sonuçları.....	85
Tablo 4.19.	MİK Deney Sonuçları.....	86
Tablo 4.20.	Satın alınan suşların ham biyodizel atıksuyu (HBA)' nu parçalama eğilimi testleri.....	87
Tablo 4.21.	Seçilen izolatların ham biyodizel atıksuyu (HBA)' nu parçalama eğilimi testleri.....	88
Tablo 4.22.	ADASU atıksuların kanalizasyona deşarj yönetmeliği.....	93

ÖZET

Anahtar Kelimeler: Biodizel, Atıksu, Aktif Çamur, Mikrobiyel Degradasyon, PZR, Genetik Tiplendirme

Biyodizel üretim teknikleri arasında günümüzde yaygın olarak kullanılan metot, transesterifikasyon metodudur. Transesterifikasyon prosesinden çıkan atıksular, yüksek oranda organik madde (KOİ 300000-400000 mg/L, yağ-gres 17000-25000 mg/L) içermektedir. Bu kirlilik profiline sahip atıksular, konvansiyonel yöntemlerle arıtılamamaktadır.

Bu çalışmada kullanılacak biyodizel atıksuları, laboratuvar ölçeğinde biyodizelin transesterifikasyon yöntemiyle üretiminde çıkan biyodizel yıkama sularıdır. Bu atıksuların arıtılabilirliği için yapılan çalışmalar, iki ana fazda planlanmıştır; Faz 1' de: atıksu solvent ekstraksiyonu prosesi veya elektrokoagülasyon prosesinden sonra kesikli ve sürekli aktif çamur prosesi ile aerobik biyolojik arıtılabilirliği incelenmiştir. Faz 2' de ise: Aktif çamur mikrobiyel komünite, mikroskopta fenotipik olarak tanımlanmış ve PZR ile genetik tiplendirme yapılmıştır. Bu çalışmalara ilave olarak Ham Biyodizel Atıksuyu' nu (HBA) arıtılabileceği düşünülen *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* aktif çamur izolatları ve *Escherichia coli* ATCC8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 mikroorganizmaları kültürleri kullanılmıştır. Ekstrakte edilen biyodizel atıksuyu (EBA)' nun ve Alüminyum elektrot ile elektrokoagüle edilen biyodizel atıksuyu (AIELBA)' nun kesikli aerobik biyolojik arıtma çalışmalarında, %50 seyreltme ve uygun besi maddelerinin ilavesi ile KOİ giderim verimi %99 olarak elde edilmiştir. EBA' nın sürekli aktif çamur prosesi ile arıtılmasında baskın olan mikroorganizmaların, *Sphaerotilus natans*, *Actinomyces*, *Zooglea ramigera* olduğu, AIELBA' da ise baskın türlerin çeşitli funguslar olduğu tespit edilmiştir. *E.coli* aktif çamur izolatı ve *E.coli* ATCC8739' nin HBA' nın biyodegradasyonunda çok fark gözlenmezken, *P.aeruginosa* izolatının ise *P. aeruginosa* ATCC9027 göre daha etkin olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, biyodizel atıksularının, solvent ekstraksiyonu veya elektrokoagülasyon prosesinden sonra, tesisdeki yıkama suları ve evsel atıksularla birlikte kesikli aerobik sistemde yönetmelik sınır değerlerini sağlayabileceği tespit edilmiştir.

INVESTIGATION OF BIOLOGICAL TREATABILITY OF BIODIESEL WASTEWATER

SUMMARY

Keywords: Biodiesel, Wastewater, Activated Sludge, Microbial Degradation, PCR, Genotyping

Nowadays, trans-esterification method is widely used in biodiesel production. The resulting wastewaters from trans-esterification process have high ratio of organic materials (COD 300000-400000 mg/L, Oil and Grease 17000-25000 mg/L). For this kind of waste water profiles could not be treated with the conventional methods.

Biodiesel waste waters used in this study is the resulting wastewaters from trans-esterification method in laboratory scale. This study was processed in two different phases. Phase 1: After the solvent extraction or initial treatment of electro-coagulation, batch and continuous biological treatment was applied. Phase 2: DNA was isolated from the activated sludge for determination of activated sludge community and PCR conditions optimized efficiently. In addition, the HBA thought to be treated by *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* activated sludge isolates and the *Escherichia coli* ATCC8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 microorganism cultures were used. In the batch aerobic biological treatment studies of EBA and AIELBA, 50% dilution and with the addition of appropriate nutrient, 99% of COD treatment efficiency was obtained. In the continuous activated sludge treatment of the EBA, the dominance of *Sphaerotilus natans*, *Actinomycetes*, *Zooglea ramigera* microorganisms and for the AIELBA, the dominance of various funguses was determined. While not much difference was being observed for the biodegradation of HBA by *E.coli* activated sludge isolate and *E.coli* ATCC8739, *P.aeruginosa* isolate was observed to be more effective up to *P. aeruginosa* ATCC9027.

Finally, the treatability of the wastewaters of the biodiesel, after the solvent extraction or electro-coagulation process, with the washing waters in plants and domestic wastewaters provide to regulate the boundary conditions in the batch aerobic systems was determined.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Günümüz dünyasında ekonomik ve teknolojik gelişmelerin sürdürülebilir olması, güvenilir enerji kaynaklarına sahip olmakla mümkündür. Dünya üzerinde söz konusu enerjinin %90'ı bugün fosil enerji kaynaklarına bağlıdır. Ancak, fosil yakıtlar çok hızlı bir şekilde tükenmektedir. Petrol'ün 1991 yılı sonu itibariyle, tüketim oranları göz önüne alındığında, yaklaşık 40 yıllık bir dayanma süresi olduğu düşünülmektedir. Bunun sonucunda ise, önümüzdeki 10-15 yıl içerisinde ucuz petrolün sonunun gelebileceği tahmin edilmektedir (İsenberg, 1999). Petrolün bu durumu, içten yanmalı motorların yerlerini doldurabilecek başka makineler ve petrole alternatif yakıt arama çalışmalarını başlatılmıştır. Bu durum, biyodizel gibi yenilenebilir alternatif enerji kaynaklarının önem kazanmasına yol açmaktadır. Alternatif yakıtlar hakkında yapılan çalışmalar, çeşitli zamanlarda ortaya çıkan petrol krizi dönemlerinde hız kazanmış ve kriz dönemleri sonrasında önemli ölçüde yavaşlama göstermiştir (Yücesu ve ark., 2001).

Alternatif yakıtlara ilgi 1973 petrol krizi ardından artış göstermiş, 90' lı yıllarda ise uygulama ve araştırmalar yoğunluk kazanarak günümüze kadar ulaşmıştır. Biyodizel en önemli alternatif yakıtlardan biridir. Biyodizel, hayvansal ve bitkisel yağlardan elde edilen, fiziksel ve kimyasal özellikleriyle dizel yakıtına benzer özellikler gösteren, emisyon özelliklerini iyileştiren dizel motorları için önemli bir alternatif yakıttır. Amerika' da soya ve kanola, Avrupa' da kanola bitkisi biyodizel yakıtı üretiminde temel hammadde olarak kullanılmaktadır. 2002 yılında Amerika Birleşik Devletleri' nde sadece atık hayvansal yağlardan 2.4×10^4 ton ile 3.2×10^4 ton arasında biyodizel üretimi gerçekleştirildiği tahmin edilmektedir. Türkiye' nin petrolde dışa bağımlılığı dikkate alınrsa, biyodizel üretiminin önemi daha iyi anlaşılır. Avrupa Komisyonu, biyoyakıtlara şu anda %2, 2020 yılına kadar ise %12' lik bir pazar payı öngörmektedir ve biyoyakıtların çok önemli bir kısmını ise biyodizel oluşturacaktır (Çildir ve Çanakçı, 2006). Türkiye de biyodizel üretimi konusunda teşvik edilmiştir.

Bu doğrultuda birçok tesis kurulmuştur. Fakat günümüzde bu tesislerin birçoğu ya biyodizel üretimini bırakmış ya da çok üretim yapmaktadır. Bu konuda, Alternatif Enerji ve Biyodizel Üreticileri Birliği Derneği (Albiyobir)' nin yaptığı açıklamada; “Biyodizel en önemli alternatif yakıtlardan biridir. Türkiye’ de biyodizel üretimi için 1,5 milyon ton kurulu kapasite bulunmaktadır. Şu anda Türkiye, kurulu biyodizel üretim kapasitesi itibarı ile Almanya’dan sonra dünya ikincisidir.” ifadesi yer almaktadır.



Şekil 1.1. Türkiye’ nin kurulu biyodizel üretim kapasiteleri (albiyobir.org, 2012)

Türkiye, kurulu kapasitesini özellikle AB' nin kendi ihtiyacı için zorunlu kıldığı miktarları karşılayabilecek ve biyodizel üretiminde önemli bir ihracat merkezi olabilecektir.

Bu tesisler ülkemizin dört bir yanına dağılmıştır. Biyodizel Üreticileri özellikle ülkemizde gıdada kullanılmayan, bu nedenle tarımda biyodizele bağlı etkileri görülebilecek Kanola ve Aspiri seçmiş, ülkemizin dört bir yanında sözleşmeli tarıma yönelmişlerdir.

Ancak gelinen noktada anlaşılmıştır ki biyoyakıt kullanımının zorunlu olmaması ve ÖTV vergisinin yüksek olması nedeniyle biyodizel üreticileri 2008 yılında biyodizel üretimine ara vermiştir. Bu sorunlar aşmak için 27 Eylül 2011 tarihinde 28067 sayılı Resmî Gazetede Tebliği yayınlanmış ve “piyasaya akaryakıt olarak arz edilen motorin türlerinin, yerli tarım ürünlerinden üretilmiş yağ asidi metil esteri (YAME) içeriğininin 1/1/2014 tarihi itibarıyla en az %1 (V/V), 1/1/2015 tarihi itibarıyla en az

%2 (V/V), 1/1/2016 tarihi itibariyle en az %3 (V/V), olması zorunludur.” ifadesi yer almıştır.

Bu yeni gelişmeler, Türkiyede biyodizel üretiminin artarak devam edeceğini göstermektedir.

Biyodizel, bitkisel ya da hayvansal kökenli yağların bir katalizör eşliğinde kısa zincirli bir alkol ile reaksiyonu sonucunda açığa çıkan yakıt amaçlı ürünün adıdır. Biyodizel kullanımında bazı avantajlar vardır. Fiziksel özellikleri bakımından petrol kökenli dizel yakıtıyla benzer özellikler göstermekte olup, hiçbir araç ve motor modifikasyonuna gerek duyulmadan günümüzün hafif ve ağır dizel motorlu araçlarında rahatlıkla kullanılabilir. Biyodizel, petrol esaslı dizel yakıtı ile her oranda tam olarak karıştırılabilir. Bu da dizelin kalitesini büyük oranda düzeltme imkânı sağlar. Yanma sonucu oluşan çevreye zararlı gazların emisyon değerini düşürür. Yakıldığı zaman CO, partikül ve hidrokarbon emisyonu düşüktür. Bu yakıt, bitki kökenli hammaddeden elde edildiği ve bitkiler CO₂' i solunum yaparken kullandıklarından, yanma sonucu ortaya çıkan CO₂ kısmen amorti edilmekte ve böylece ‘sera etkisi’ yapıcı nedenlerin önüne geçilebilmektedir. Bunun yanında çevre ile uyumlu bir yakıt olup, 21 gün içerisinde %99.6’ ya varan oranlarda biyolojik olarak parçalanabilmektedir. Bu yakıtın en önemli avantajlarından birisi de üretimde kullanılan temel hammaddenin doğal ve yenilenebilir olmasıdır. Bitkisel veya hayvansal yağların hepsi, biyolojik olarak ayrışabilir özellikte ve toksik olmadığı bildirilmektedir (Poulton, 1994; Isenberg, 1999; Hoffmann, 2002; Antolin ve ark., 2002; Vicente ve ark., 2007).

Fakat biyodizel üretiminde yaygın olarak kullanılan transesterifikasyon prosesinden çıkan atıksular, yüksek oranda organik madde (KOİ 300000-400000 mg/L, yağ-gres 17000-25000 mg/L) içermektedir. Bu kirlilik profiline sahip atıksular, konvansiyonel yöntemlerle arıtılamamaktadır. Biyodizel atıksuların arıtılabilirliği ile ilgili literatürde az sayıda çalışma mevcuttur.

1.1. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Bu çalışmada kullanılacak biyodizel atıksuları, laboratuvar ölçeğinde biyodizelin transesterifikasyon yöntemiyle üretiminde çıkan biyodizel yıkama sularıdır. Bu

atıksuların arıtılabilirliği için yapılacak çalışmalar, iki ana fazda planlanmıştır; Faz 1’ de: atıksu solvent ekstraksiyonu prosesi veya elektrokoagülasyon prosesinden sonra kesikli ve sürekli aktif çamur prosesi ile aerobik biyolojik arıtılabilirliği incelenmiştir. Faz 2’ de ise: Aktif çamur mikrobiyel kommuniteler, mikroskopta fenotipik olarak tanımlanmış ve PZR ile genetik tiplendirme yapılmıştır. Bu çalışmalara ilave olarak Ham biyodizel atıksuyu (HBA)’ nu arıtılabileceği düşünülen *E.coli*, *P.aeruginosa* aktif çamur izolatları ve *E.coli* ATCC8739, *P. aeruginosa* ATCC9027 mikroorganizmaları kültürleri ile atıksuyun arıtılabilirliği incelenmiştir.

1.2. Çalışmanın Ana Hatları

Tez çalışması 5 ayrı bölümden oluşmaktadır. Bölüm 1’de konuya giriş yapılarak biyodizel üretiminin öneminden, Türkiyede ve Dünyadaki biyodizel üretiminden kısaca bahsedilmiş, çalışmanın amacı ve kapsamı, içeriği ve önemi anlatılmıştır.

Tezin 2. bölümünde yapılan deneysel çalışma literatürde yer alan bilgilerle birlikte anlatılmıştır.

Tezin 3. bölümünde deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar, malzemeler ve metotlar hakkında detaylı bilgi verilmiştir.

Tezin 4. bölümünde deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular yer almaktadır.

Tezin 5. bölümünde çalışmanın sonucunda varılan temel sonuçlar paylaşılmış ve tartışılmıştır.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyodizel Üretim Yöntemi

Biyodizel üretimi yöntemleri arasında yaygın olarak kullanılan metot bitkisel ve hayvansal yağların veya evsel atık yağların transesterifikasyonu ile üretimdir. Tablo 2.1’ de biyodizel üretiminde kullanılan bazı bitkisel ve evsel atık yağların içerdiği yağ asit miktarları verilmiştir.

Tablo 2.1. Ayçiçeği, soya ve atık kızartma yağının içerdiği yağ asit oranları (Dizge ve ark., 2009)

Yağ asitleri	Ayçiçek yağı	Soya yağı	Atık yemek yağları
Lurik (12:0)	-	-	0.05
Miristik (14:0)	0.06	0.07	0.19
Palmitik (16:0)	5.68	10.87	8.90
Palmitoleik (16:1)	0.14	0.10	0.22
Stearik (18:0)	3.61	3.66	3.85
Oleik (18:1)	34.27	23.59	30.71
Linoleik (18:2)	54.79	53.86	54.35
Linolenik (18:3)	0.07	6.49	0.27
Araşidik (20:0)	0.25	0.37	0.29
Gadoleik (20:1)	0.13	0.22	0.18
Behenik (22:0)	0.69	0.45	0.61
Lignoserik (24:0)	0.23	0.18	0.24

Bu yöntemde, trigliseridler alkol ile reaksiyona sokulur. Transesterifikasyonda bazik katalizörler, asidik katalizörler, iyon değiştirici reçineler, enzimler ve süperkritik sıvılar gibi farklı tipte katalizörler kullanılır (Freedman, 1984; Arzamendi ve ark., 2007; He ve ark., 2007; Lu ve ark., 2007; Vivek ve Giridhar, 2007; Imahara ve ark., 2008; Rashid ve Anwar, 2008). Ancak, endüstriyel üretimde en çok bazik

katalizörler kullanılmaktadır. Bazik katalizörler ile reaksiyon hem daha ılımlı şartlarda hem de daha süratli yürür (Royon ve ark., 2007). Bazik katalizör ile transesterifikasyon, yağ asitlerinin bazik bir katalizör eşliğinde alkol (metanol, etanol vb.) ile esterleşme reaksiyonudur. Metanol, diğer alkollere göre daha ucuz olduğu için, en çok kullanılan alkoldür. Esterleşme reaksiyonunun stokiometrisine göre 1 mol trigliseride 3 mol metanol gerekir. Reaksiyonun sonunda 3 mol yağ asidi metil esteri ve 1 mol gliserin meydana gelir. Aslında bu reaksiyon, ara ürün olarak digliseridler ve mono gliseridlerin olduğu üç adet ardışık tersinir reaksiyondan oluşmaktadır. Reaksiyonda açığa çıkan gliserin çöktürülerek veya santrifüjlenerek ayrılır. Elde edilen gliserin, eczacılık, kozmetik, hayvan yemi, polimer, yüzey aktif madde, yağlayıcı madde ve gıda endüstrisinde kullanılmak üzere, ticari kullanım için saflaştırılır. Biyodizel fazı, dizel yakıtı olarak kullanılmak üzere EN 14214 Standartına göre tam olarak saflaştırılmalıdır (Vicente, 2007).

Üretilen biyodizel tam olarak saflaştırılmadığı takdirde, motorun ömrünü azaltır. Bu yüzden saflaştırma kademesi biyodizel üretiminde en önemli kademedir. Saflaştırılmamış biyodizel bazı safsızlıklar içerir: serbest gliserin, sabun, metal iyonları, metanol, serbest yağ asitleri, katalizör, su ve gliseridler. Saflaştırılmamış biyodizelde bulunan safsızlıkların motor, motor performansı ve emisyonla olan etkileri Tablo 2.2' de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Ham biyodizeldeki safsızlıklar ve etkileri (Berrios ve Skelton, 2008)

Safsızlık	Etkisi
Serbest yağ asitleri	Korozyon
Su	Hidro liz (yağ asidi teşekkülü) Korozyon Bakteriyel büyüme (filtre blokajı)
Metanol	Yoğunluk ve viskozitenin düşmesi Alevlenme noktasının düşmesi Al ve Zn parçaların korozyonu
Gliseridler	Yüksek viskozite Enjektörlerde birikme Kristallenme
Metaller (sabun ve katalizör)	Enjektörlerde birikme Filtre blokajı (sülfatlı küller) Motorda güç kaybı
Gliserin	Çökme problemleri Emisyonda aldehit ve akrolein ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$) oluşumu

2.2. Biyodizel ve Atıksu Üretilmesi

Doktora çalışması döneminde biyodizel endüstrisinin biyodizel üretimine ara vermesi nedeniyle deneylerde kullanılacak olan biyodizel atıksuyu, laboratuvarda üretilmiştir. Deneylerde kullanılacak olan atıksularının elde edilebilmesi için önce biyodizel üretimi yapılmıştır.

2.3. Biyodizelin Rafinasyonu

Biyodizeli rafinasyonu için genel olarak kabul gören iki yöntem vardır: ıslak ve kuru temizleme. Endüstriyel üretimde genellikle ıslak temizleme yöntemi kullanılmaktadır. Ancak, prosese ilave su katılması birçok dezavantajları da beraberinde getirir. Islak yöntemde, 100 L biyodizel üretimi başına 20 L atıksu açığa çıkmaktadır. Biyodizel atıksuları çok miktarda yağ, yağ asidi, metanol, sabun ve gliserol içermektedir.

Bu atıksuların KOİ değeri 250 000- 450 000 mg/L arasında değişmektedir. Atıksudaki yağ içeriği ise 15 000 mg/L kadar yüksek olabilmektedir. Bu nedenle

biyodizel atıksuları, yağ- drenaj sistemlerin tıkanmasına, biyolojik arıtma sistemlerinde biyolojik aktivitenin azalmasına sebep olmaktadır.

Bu dezavantajlara rağmen su ile saflaştırma işleminin bazı avantajları da vardır. Gliserin ve metanol suda daha iyi çözünür. Bu yüzden su ile yıkanan biyodizel gliserin ve metanol bakımından daha saf olmaktadır. Diğer taraftan biyodizelde bulunabilen safsızlıklardan yağ asitleri, tuzlar ve sabunlar da suda daha iyi çözünür. Biyodizel saflaştırmada kullanılmış olan bir atıksuyun bileşimi Tablo 2.3' te verilmiştir. Buna rağmen, son zamanlarda su ile yıkama işleminin yerini iyon değiştirici reçine ile veya magnezyum silikat tozu ile temizleme yöntemi almaktadır. Her iki yöntem de endüstriyel tesislerde kullanılmaktadır (Cooke ve ark., 2003).

Tablo 2.3. Biyodizel atıksuyundaki bazı değerler (Suehara ve ark., 2005)

Parametre	Değer
pH	11.0
Yağ-Gres (g/L)	15.1
Karbon (g/L)	14.8
Azot (g/L)	0.0647
C/N oranı	229
Askıda katı (g/L)	2.67

Yüksek KOİ değerlerine sahip ve düşük oranda azot içeren biyodizel atıksuyunun, doğrudan biyolojik arıtmaya verilmesi aktif çamurda nutrient eksikliği ve yüksek besin şokuna sebep olarak aktif çamur sisteminin çökmesine sebep olacaktır. Ayrıca bu atıksuların doğrudan alıcı ortama verilmesi son derece ciddi çevre problemleri ortaya çıkarmasına sebep olacaktır. Bütün bu gerçekler biyodizel üretiminde açığa çıkan atıksuların arıtımının kompleksliğini göz önüne sermektedir. Bu atıksuların konvensiyonel aerobik biyolojik arıtma yöntemleri ile arıtılması mümkün olamamaktadır.

Bu amaçla yüksek kirlilik değerine sahip olan bu atıksu biyolojik arıtmadan önce hekzan ekstraksiyonu ve Fe, Al elektrot ile elektrokoagülasyon ile kirlilik karakteri belirli ölçüde düşürülmüştür.

2.4. Biyolojik Arıtma

Biyodizelin çeşitli yağlardan etanol veya metanol ile NaOH ve KOH katalizörlüğünde transesterifikasyonu sonucu biyodizel atıksuyunda yağ, reaksiyona girmemiş yağ asitleri, gliserol, metil esterleri, sabun artıkları, etanol veya metanol bulunabilmektedir. Fakat bu kirleticilerin ne oranda biyodizel atıksuyunda bulunduğu, biyodizel üretimine bağlıdır.

Schleicher ve arkadaşları, su ortamında bulunan çeşitli mikroorganizmaların mineral yağları, enerji kaynağı olarak tüketerek doğada bu maddeleri metabolize edebildiğini söylemektedir. Ko-metabolik olarak biyodizeli metabolize edebilen mikroorganizmalar, mineral yağ tüketimini de artırmaktadır. (Schleicher ve ark., 2009).

Literatürdeki bilgilerden yola çıkarak ham biyodizel atıksuyunda bulunan atıkların bakteriler ile biyodegrade edilip edilemeyeceği araştırılmış, hangi bakterinin seçileceğine ise mikroorganizmaların yağ, yağ asit ve gliserol degradasyon yollarına bakılarak karar verilmiştir. Aşağıda bu metabolik yollara kısaca değinilmiştir.

2.4.1. Yağ asitlerinin parçalanması

İster lipid, ister alkan parçalanmasıyla, ortaya çıkan yağ asitleri, CoA-SH üzerine taşınarak Asil-SCoA' ya dönüştükten sonra β -oksidasyon döngüsüne girer ve parçalanmaya devam ederler. Örneğin palmitik asitin Palmitil- CoA' ya dönüşümünde aslında iki kademeli bir reaksiyon söz konusudur. Önce ATP' in hidroliz ürünü Adenilat (AMP), yağ asidini üzerine alır ve enerjice zengin Palmitil-AMP oluşur, sonra CoA-SH' nin tiyol grubu ile Adenilat yer değiştirerek reaksiyonca aktif yağ asidi (Palmitil-SCoA) meydana gelir. β -oksidasyon döngüsüne giren Palmitil-SCoA, Asil-CoA dehidrogenaz enziminin katalize ettiği reaksiyonla dehidrogenasyona uğrar. Bir flavoprotein olan enzim, substratın hidrejenlerini FAD üzerine alırken 2,3–doymamış Palmitil-CoA oluşur. 3- Hidroksiasil-CoA hidroliz bir mol su ile yağ asidi zincirini 3.C atomunda hidroksil grubunu oluştururken enol bağı açar. 3- Hidroksiasil-CoA dehidrogenaz 2. Ve 3. C atomlarından hidrojen

kopararak 3-ketopalmitil-CoA' yı meydana getirir. Bundan sonra tiyoklastik reaksiyon gerçekleşir ve β -Tiyoketolaz enzimi, molekülün 2. ve 3. C atomları arasındaki bağı kopmasını katalize eder. Asetil-CoA reaksiyondan ayrılırken Palmitil-SCoA' dan geriye kalan 14 C' lu zincir bir başka CoA-SH üzerine alınır ve Miristil-CoA, β - oksidasyon döngüsünde aynı şekilde ilerler. Böylece döngünün her dönüşünde 2 C' lu Asetil-CoA, döngüyü terk ederken zincirden 2 C eksilen yağ asidi parçalanmaya devam eder. Tiyoklastik reaksiyonla parçalanmadan doğan enerji Asetil-CoA içinde depolanırken, redükte piridin- nükleotidler ve flavo proteinler elektron taşıma sisteminde tekrar okside olurlar. Asetil- CoA merkezi yoldan katabolizmaya katılır (Tunail, 2009).

2.4.2. Nötral yağlar ve yağ benzeri depo maddeleri

Birçok mikroorganizma, nötral yağları (trigliseritleri) veya yağ benzeri maddeleri depolar. Kuvvetli ışık kıran bu yağ damlacıkları veya granüller etrafları sarılı tanecikler halinde kuru ağırlığının %80-90' ına ulaşırlar. Yağ ve benzeri depo maddelerinden trigliseritler en çok maya ve küflerde (ökaryotik hücre) vakuoller içinde depolanır, ayrıca ortama da salgılanırlar. Nötral yağların bu mikroorganizmalardaki sentez yolu yüksek canlılardaki gibi β - oksidasyon döngüsü üzerinden olur. Asetil-CoA derivatları olarak oluşan uzun zincirli yağ asitleri, gliserol ile ester bağları yaparak birleşir ve nötral yağları oluşur. Hücrede membran veya intrasitoplazmik membran oluşumlarının bileşeni olan yapısal lipitler (lipopolisakkaritler, lipoproteinler) ortam koşullarına bağlı olmaksızın sentezlenirken, depo yağları besiyerinde veya mikroorganizmanın bulunduğu doğal ortamda yüksek miktarda C kaynağı ve yetersiz düzeyde N kaynağı (yüksek C/N) olması durumunda hızla sentezlenir ve vakuoller içinde birikir. Yapısal lipitlerin hücreden izolasyonlarının zor olmasına karşılık depo yağları hücreden kolaylıkla izole edilebilir (Waltermann ve ark., 2005; Tunail, 2009).

2.4.3. Gliserol degradasyonu I

2.4.3.1. Bakteriye ait gliserol degradasyon 1. metabolik yol

Bakterilerde gliserol alımı, gliserol difüzyon kolaylaştırıcı integral membran protein yoluyla olur. Ki bu protein gliserolün sitoplazmik membranından geçişinde konsantrasyonunu hızlıca dengelenmesini katalizler. Gliserol kinaz, ATP' yi fosfor donörü olarak kullanarak intrasellular gliserolü sn-glycerol-3-phosphate dönüştürür. Glycerol-3-P, gliserol difüzyon kolaylaştırıcı substrat değildir. Bu yüzden hücrede kalır ve fazlası metabolize edilir. Sonuç olarak, gliserol alımı için itici güç gliserol kinaz tarafından gliserol fosforilasyon ile oluşturulur.

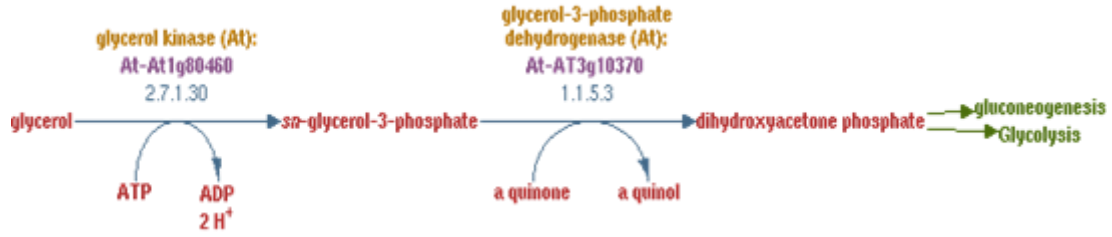
sn-glycerol-3-phosphate sitoplazmadan ayrılmadığında, GlpT transporter ile hücre içine alınır. *E.coli'* de sn-glycerol-3-phosphate fazlası iki mambrana bağlayan enzim ile dihydroxyacetone phosphate' a metabolize olur. Bu enzimler, bakterinin üreme şartlarına bağlıdır.

Aerobik koşullarda, homodimerik aerobik glycerol-3-P dehydrogenase (glpD geni tarafından kodlanır) üretilir. Ki bu oksijen veya nitratı elektron alıcısı olarak kullanır. (<http://biocyc.org/>, 2012).

2.4.3.2. Maya' ya ait gliserol degradasyon 1. metabolik yol

Aerobik şartlarda *Saccharomyces cerevisiae* S288c alttürü gliserolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmaktadır. Gliserol degradasyonu, iki adımda gerçekleşmektedir. İlk adım, translokasyondur. Sitosolde gliserol fosforilasyonu meydana gelmektedir. Bunun sonucunda gliserol-3-fosfat ürün olarak meydana gelmektedir, gliserol-3-fosfat, mitokondriye girmektedir ve dihidroksiaseton fosfata dönüşmektedir. Dihidroksiaseton tekrar sitosole dönmektedir, glikolizis veya glukoneogenezise girmektedir.

Gliserol katabolizmasını kodlayan genler karbon kaynakları tarafından düzenlenmektedir. Gen ekspresyonu glukoz gibi fermente edilebilen karbon kaynakları ile ya da gliserol, etanol gibi fermente edilemeyen karbon kaynakları ile baskılanabilmektedir (<http://biocyc.org/>, 2012).



Şekil 2.1. *Escherichia coli* K12 substr. MG1655, *Saccharomyces cerevisiae* S288c' nin gliserol biyodegradasyonu (<http://biocyc.org/>, 2012).

Ham biyodizel atıksuyun aktif çamurdan izole edilen *E.coli* ve *P.aeruginosa* ile artırılabilirliği çalışmalarında *E.coli*' nin tercih edilme sebebi yağ asitlerini ve gliserölyü parçalayabilme yeteneğinin olması sebebiyledir. *P.aeruginosa*' nın seçilme sebebi ise çok çeşitli hidrokarbon türevlerini rahatlıkla parçaladığının bilinmesidir.

2.5. Aktif Çamur Mikrobiyolojisi

Ham biyodizel atıksuyunu ekstraksiyon veya elektrokoagülasyon işlemlerinden sonra hala alıcı ortama verilebilecek düzeyde değildir, bu sebeple ekstraksiyon ve elektrokoagülasyon sonrası atıksuların aktif çamura olan etkisi de incelenmiştir.

Aşağıda aktif çamur mikrobiyolojisine kısaca değinilmiştir.

Aktif çamur, atıksudaki biyodegrade olabilen maddelerin mikroorganizma karışımı (heterotrofik flagellatlar, siliyatlar, rizopodlar ve küçük metazoonlar) ile sindirilmesi olarak tanımlanabilmektedir. Aktif çamur sisteminin optimum koşullarda işletilebilmesi için biyotik komponentlerin oldukça iyi bilinmesi gerekmektedir. Protistlerin geniş komüniteleri, bakteri popülasyonları ile beslenmektedir. Siliyatlı protistalar, aerobik biyolojik arıtma sistemlerinde önemli bir yer kaplamaktadırlar. İyi karışmış aktif çamur numunesinde siliyatlı protistaların yoğunluğu 10000 hücre/ml aktif çamur olmalıdır. Bu da yaklaşık olarak Askıda Katı Madde (AKM) nin %9 una karşılık gelmektedir. Aerobik sistemlerde 200' den fazla protist (33 flagellat, 25 rizopod, 6 aktinopod ve 160 siliyat) ve bol miktarda bakteri çeşitlerine rastlanabilmektedir (Madoni, 2003).

Biyoloji arıtma tesislerinde aktif çamuru oluşturan mikrofauna aşağıda incelenmiştir;

2.5.1. Bakteriler

Aktif çamur biokütlesinin %80' i bakterilerden oluşmaktadır. Bu tek hücreler atıksuda bulunan biyodegrade edilebilen protein, karbonhidrat, yağ ve diğer bileşikleri tüketebilmektedirler. Atıksuda yeterli besi maddesi varlığında bakteriler flagella içerebilmektedirler. Flagella, bakterinin besin etrafında hareketini sağlar. Bakteri belli bir büyüklüğe ulaştınca ikiye bölünür. Fakat besi maddesi eksikliğinde bakteriler flagellalarını kaybederler ve enerjilerini minimum miktarda harcamaya başlarlar. Ayrıca hücre duvarları etrafında ince bir tabaka oluştururlar.

Bakterilerin büyüme karakteristikleri aktif çamurun hangi aşamada olduğu hakkında fikir verir;

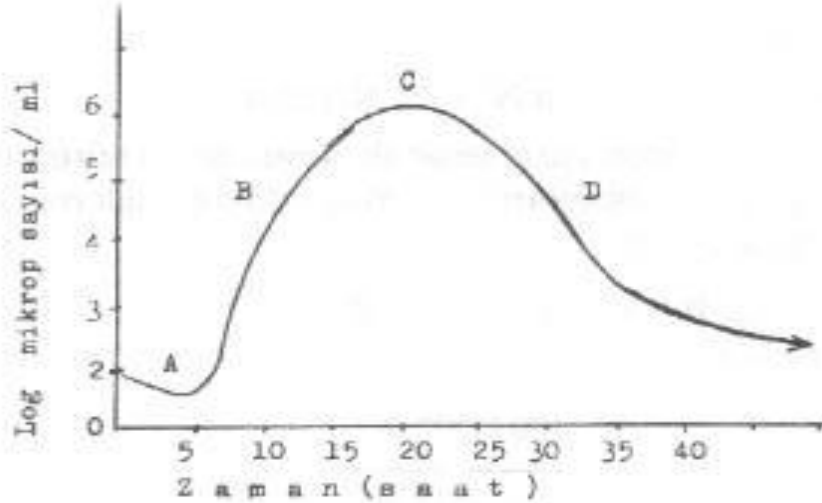
Sıvı besiyerine belirli sayıda bakteri ekilecek ve düzenli aralıklarla bu basiyerinden alınan örneklerde her milimetresindeki bakteri sayısı sayılacak olursa bunların düzenli ve aynı hızda üremedikleri görülür. Bakterilerin üremesi zamana bağlı olarak dört dönem halinde seyir gösterir.

Bakteri üremesinde başlıca dört dönem vardır;

- a) Başlangıç Dönemi: Bakteri bu dönemde çoğalma için hazırlıklarını yapar. Ortamdaki bakterilerin metabolizmaları artar. Bakteri bu dönemde cinsinin en büyük hacmine ulaşır. Bakterilerin üremesinde yavaş yavaş artma görülür.
- b) Logaritmik Üreme Dönemi: Bakteri sayısının hızla arttığı dönemdir. Her 20 dakikada bakteri türünün sayıca iki katına çıkar. Bu dönemde bakteri cinsinin hacimce en küçük durumundadır. Hücreler dağınık olarak ortamda bulunurlar.
- c) Durma Dönemi: Bakterilerin üremesi devam ederken bir yanda da bakterilerde ölüm görülür. Ölen bakteri ile üreyen bakteri birbirine eşit olduğundan ortamdaki bakteriler sayıca değişmez. Bakteriler bu dönemde ölmeye başlamıştır. Bazı bakteriler direnç kazanır, flagellalarını kaybeder ve hücre duvarları etrafında ince bir

tabaka oluştururlar. Bu ince tabaka, bakterilerin flok oluşturmalarını sağlar. Flok yapısı büyüktür. Ve iyi çökelir.

d) lm Dönemi: Ölen bakteri hücreleri sayıca artmıştır. Daha sonra üreyen bakteri sayısı sıfıra düşer ve bakteri ölümü giderek artar, sonuçta ortamda hiç canlı bakteri kalmaz.



şekil 2.2. Bakteri reme dönemleri (mikrobiyoloji. org, 2012)

2.5.2. Besin – mikroorganizma oranı (F:M)

Mikroorganizmaların besi maddesi biyodegradasyonu, BOİ (Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı) veya KOİ (Kimyasal Oksijen İhtiyacı) ile llebilmektedir. Mikroorganizmaların ağırlığı, UAKM (uçucu askıda katı madde) llerek belirlenmektedir. Bu bilgiler bize F:M oranı hakkında bilgi verir. F:M oranı, mikroorganizmaların büyümesi ve hücrenin durumu hakkında fikir vermektedir. Eğer bu oran yüksek ise yeterli besin var ve bakteri büyümesi hızlıdır, aktif çamur gençtir demektir. Eğer bu oran düşük ise besi maddesi azdır ve bakteri büyüme hızı yavaştır demektir.

2.5.3. Giriş suyunun besin niteliği

Bakteriler çoğalmak ve hücrel fonksiyonlarını yerine getirebilmek için besin maddelerine ihtiyaç duyarlar. Karbon, azot, fosfor ve sülfür kaynaklarına ek olarak magnezyum, kalsiyum, demir ve bakır gibi mikro besinlere de ihtiyaç duyarlar. Evsel atıksular içerdikleri karbonhidratlar, proteinler ve yağlar ile bakterilerin ihtiyaç duyduğu birçok besin maddesine kaynak oluşturlar. Bakterilerin ihtiyacı olan besin oranının hesaplanması için belirlenmiş bir oran vardır, bu oran Karbon/Azot/Fosfor (C/N/P) 100/5/1 veya 100/10/1 oranı olarak bilinir. Eğer bu değerlerden birinde bile azalma söz konusu olursa, mukus kaynaklı çamur kabarması ve köpük gibi sorunlarla karşılaşılabilir.

2.5.4. Protozoa ve Rotiferler

Aktif çamurda protozoaların bulunması, arıtmadan çıkan atıksuyun kalitesi ve sistemin işletme şartları hakkında fikir vermektedir. Aerobik biyolojik arıtmada protozalar ikincil öneme sahiptirler fakat suyun pürifikasyonunda oldukça önemlidirler.

Aktif çamurda bulunan protozoaları üç büyük sınıfa ayırmak mümkündür.

1. Amibler
2. Flagellatlar
3. Siliyatlar (sahlı siliyat, serbest yüzücü siliyat, kayan siliyatlar)

2.5.5. Amibler

İlkel ve tek hücreli protozoanlardır. Düşük debili ve kısa süre havalandırılan ortamda, besin maddesinin bol bulunduğu ortamda bulunurlar. Amibler çok yavaş hareket edebilirler bu nedenle besin maddelerine zor ulaşırlar. Havalandırma tankında kısa sürede bulunurlar. Küçük organik partiküllerle beslenirler. Eğer ortamda amibler çok fazla miktarda bulunursa bu durum arıtma tesisine şok yüklemelerin yapıldığı ve çözünmüş oksijenin miktarının da düştüğü anlamına gelir.

2.5.6. Flagellatlar

Flagellatların çoğu çözünmüş besi maddelerini absorbe ederek beslenirler. Amibler görünmemeye başlayınca ve hala çözünmüş besi maddesi miktarı fazla olunca ortamda flagellatlar gözlemlenmeye başlanır. Flagellat ve bakteriler çözünmüş organik madde miktarı azalma başlayınca rekabete girerler. Bu durumda flagellat sayısında azalma meydana gelebilmektedir. Flagellat varlığının ortamda çok olması ortamda çözünmüş organik maddelerin bol bulunduğunu ifade etmektedir.

2.5.7. Siliyatlar

Ortamda siliyatların bulunması, çözünmüş organik maddelerin ortamda bittiğinin göstergesidir. Siliyatlar tamamen diğer siliyatlarla beslenirler. Rotiferler ise ortamdaki bakterileri tüketirler. Ortamda siliyat varlığı iyi bir çamurun göstergesidir. Siliyatlar, flok oluştuktan ve organik nutriyentler tükenince ortaya çıkarlar.

2.5.8. Serbest yüzücü Siliyatlar

Bu siliyatlar, flagellatlar ortamda görünmemeye başlayınca ortaya çıkar. Bakteri popülasyonunun arttığı ve ortamda iyice yayıldığı, flok yapısı oluşmaya başladığı durumda serbest yüzücü siliyatlar ortamda dominant olmaya başlar. Çöktürme tankında yaygın olarak bulunurlar.

2.5.9. Kayan Siliyatlar

Flok partikülleri büyüktür ve stabildir. Kayan siliyatlar, flok partiküllerin üzerinde veya flok içinde, biyofilm tabakasında bulunmaktadır. Çünkü ancak bu şekilde besinlerine ulaşabilirler.

2.5.10. Saplı Siliyat

Substrat yüzeyine tutunarak sabitlenirler. Çamur floklarında veya biyofilmlerde yaygın bulunurlar. Çöktürme tankında aktif çamur ile dibe çökerler. Bazı siliyatlar predatör, bazıları da omnivordurlar (çeşitli küçük siliyatlar, flagellatlar ve ortamda

dağınmık bulunan bakteriler ile beslenirler). Saplı siliyatlar, olgun çamurda gözlenmektedir. Olgun çamurda kayan siliyatlar ve saplı siliyatlar dominanttır.

Bakteriler ile beslenen tüm siliyatlar, askıdaki bakterileri ağız bölgeleri ile tüketirler. Bunlara en yaygın örnek *Peritrichia*' dir. Birçok *Peritrich*' ler saplı siliyat şeklinde arıtma tesisinde bulunurlar. Bu mikroorganizmaların saplı siliyat mı yoksa serbest yüzücü siliyatlardan mı ortamda ağırlıklı bulunacağı aktif çamur veya biyofilm oluşumu belirler. Çünkü serbest yüzücü siliyatlar ve saplı siliyatlar su ortamında dağılmış bulunan bakteriler için rekabet içindedirler. Partiküllerin yüzeyinde kayarak beslenen siliyatlar, besinlere daha kolay ulaşabilmektedirler.

2.5.11. Protozoaları etkileyen faktörler

Protozoaları Etkileyen Faktörler; Sıcaklık (15-25 C⁰), pH: 7.2-7.4 ve besi maddeleridir.

2.5.12. Rotiferler

Rotiferler, sık sık arıtma tesislerinde bulunurlar, bakterileri tüketerek beslenirler ve mukus salgılayarak flok yapısını şekillendirirler. Flok yapısına katılmayan bakterileri tüketirler ve bulanıklığın giderilmesini sağlarlar. Rotiferler, ortamda uzun bir süre sonra ortaya çıkarlar. Organik atıkların stabilizasyonunu sağlarlar.

2.5.13. Filamentli mikroorganizmaların tanımlanması

Filamentler mikroroganizmalar, Filament Şekli, Filament Boyu, Hücre şekli, Hücre Boyu, Hücre Septa, Kılıf (var/yok), Dallanma (doğru/yanlış), Epifit (eklenti oluşturarak üreme), Hareketlilik, İntrasellülar granül varlığına göre tanımlanabilmektedirler (Tablo 3.1).

2.5.14. Tipik Aktif Çamurda bulunan Protozoa ve Metazoalar

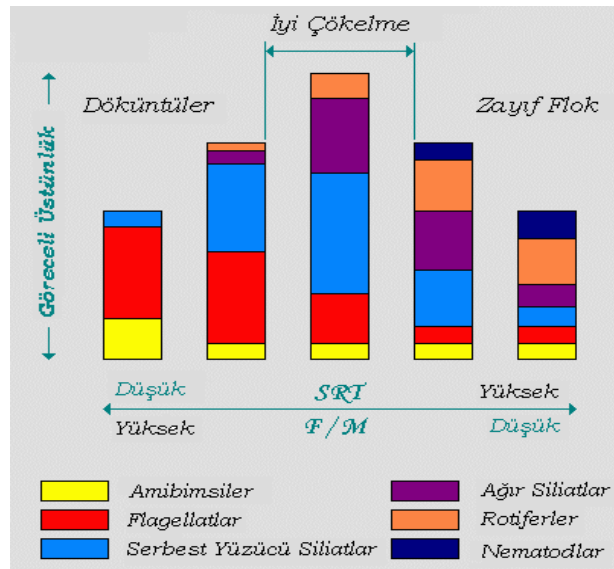
Protistler, aktif çamur sistemlerinde atıksuyun arıtılmasında çok önemlidirler. Çünkü bakteriyel biyokütle ile beslenerek atıksuyun temizlenmesinde birincil rol üstlenmektedirler. Siliyatlı protista grubunun eksikliğinde atıksuyun BOİ si yükselir ve bulanıklık oldukça artar. Siliyatlar ayrıca patojenik ve fekal bakterilerle beslenirler. Siliyat yokluğunda ortamdaki *E.coli* %50 oranında varlığını sürdürmektedir. Fakat siliyat varlığında bu oran %5'e düşmektedir.

Aktif çamur sisteminde mikro fauna indikatör olarak kullanılabilir. Bunun için aktif çamurun şu karakteristiği göstermesi gerekir;

- Mikro fauna hücreleri yüksek yoğunlukta olmalı ($\geq 10^6$ hücre/L)' dir.
- Mikro fauna, başlıca kayan siliyatlar, saplı siliyatlar ve yüzücü siliyatlardan oluşmalıdır.
- Mikro fauna çeşitliliği yüksek olmalı, türler arasında baskınlık olmamalıdır.

Mikrofaunada baskın grupların teşhisi ve identifikasyonu tesisin işletme şartları hakkında önemli bilgiler vermektedir (Şekil 2.3). Eğer mikrofaunada saplı ve kayan siliyatların miktarı artıyorsa sistemin işletme performansı artıyor demektir. Ayrıca serbest yüzücü siliyatların baskınlığı, farklı kayan siliyat türlerinin ortaya çıkması çeşitli işletme şartları ile yakından ilişkilidir. Örneğin, çamur kalitesi düşük aktif çamurda, *Opercularia* ve *Trachelophyllum* genusları (cins), ve *Vorticella microstoma* türü bulunmaktadır. Çamur kalitesi yüksek aktif çamurda ise *Aeroplasm* sp., *Arcella* sp., *Carchesium* sp., *Epistylis* sp., *Euglypha* sp., *Euplotes* sp., order Monogonata, *Peranema* sp., *Trithigmostoma* sp., *Trochilia* sp., *Vorticella aquadulcis* ve *Zoothamnium* sp. bulunmaktadır. Ayrıca aktif çamurda Nemotoda alt sınıfı da yer almaktadır. *Opercularia* sp. ve *V. microstoma*' nın havalandırmanın yetersiz olduğu durumda ortaya çıktığı düşünülmektedir ($0.2-0.5 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$). *Aelosoma* sp., *Carchesium* sp., *Euglypha* sp., *Arcella* sp., order Monogonata, *Trochilia* sp., *Vorticella aquadulcis* ve *Zoothamnium* sp oksijen yeterli olduğunda ($1-2 \text{ mg O}_2\text{L}^{-1}$) ortaya çıkmaktadırlar. Nitrifikasyon proseslerinde *Aelosoma* sp., *Arcella*

sp., *Carchesium* sp., *Coleps* sp., *Epistylis* sp., *Euplotes* sp., *Trochilia* sp., ve order Monogonata yoğun olarak bulunmaktadır. Ayrıca *Peranema* sp., ve *Vorticella microstoma* genç aktif çamur (birkaç günlük) için indikatör iken *Aelosoma* sp., *Arcella* sp., *Euglypha* sp., ve Digonata, Monogonata order varlığı ise yaşlı çamur (20 günden fazla) için indikatördür (Ginoris ve ark., 2007). Protozoa ve metazoa komuniteleri, işletme şartları ile çok hızlı değişim göstermektedir ve her arıtma tesisinde düzenli olarak her gün faunal yapı gözlenmelidir. Arıtma tesislerinde faunal yapı dinamiklerinin anlaşılabilmesi için aylık olarak izlenmesi gerekmektedir (Chen ve ark., 2004; Amaral ve ark., 2008).



Şekil 2.3. Mikroorganizmaların göreceli üstünlük diyagramı

Aktif çamur sisteminde flok yapısı, çözülmüş oksijen miktarı, karıştırma etkisi, pH, besi maddesi kontrol altında tutularak iyi bir arıtma sağlanabilmektedir.

BÖLÜM 3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Analiz Yöntemleri

3.1.1. KOİ analizi

Kimyasal oksijen ihtiyacı analizleri Standart Methods 5220-B-COD-1998-P:5-14' e göre yapılmıştır.

3.1.2. BOİ analizi

BOİ analizleri HACH LANGE - WTW marka BOİ seti ile manometrik olarak ve Standart Methods 5210-C, BOD-1998-P:5-7' ye göre de yapılmıştır.

3.1.3. Yağ-Gres analizi

Yağ-gres analizleri FOSS marka yarı otomatik yağ-gres cihazıyla Standart Methods SM5520-D-YG-1998-P:5-38' e göre yapılmıştır.

3.1.4. TOK/TN analizi

TOK/TN analizleri HACH LANGE marka cihazla yapılmıştır.

3.1.5. Sabun analizi

Biyodizel atıksuyundaki sabun miktarı, sabun değeri olarak bulunmuştur. Yapılan analizde 0.1 N HCL, Bromfenol Blue İndikatörü, İzopropil alkol (%99.5) kullanılmaktadır. Deney numunesinden 5-10 gr numune tartılarak 250 mL lik erlenmeye konur. 50 mL İzopropil alkol ilave edilir. Bromfenol Blue İndikatörü eklenir. Kalıcı sarı renk verinceye kadar 0.1 N HCL ile titre edilir. Ham biyodizel atıksuyu ile yapılan deney sonucunda sabun değeri: 19.52 mg sabun/gr numune olarak elde edilmiştir.

3.1.6. Askıda Katı Madde (AKM) analizi

Askıda Katı Madde analizleri Standart Methods 2540-D-Total Suspended Solids Dried at 103-105 °C -1998-P:5-14' e göre yapılmıştır.

3.1.7. Uçucu Askıda Katı Madde (UAKM) analizi

Uçucu Askıda Katı Madde analizleri Standart Methods 2540-E-Fixed and Volatile Solids Ignited at 550 °C' e göre yapılmıştır.

3.1.8. pH ölçümü

pH, HANNA pH 211 marka pH metre ile ölçülmüştür.

3.1.9. Çözünmüş Oksijen ölçümü

Çözünmüş Oksijen, WTW Oxi 315i taşınabilir Oksijen Metre, Cellox 325 elektrotlu proba ölçülmüştür.

3.1.10. Bakteri boyama yöntemleri

3.1.10.1. Gram boyama

Preparat hazırlanır, kurutulur ve tespit edilir. Kristal violet (veya metil violet) solüsyonu ile 2-3 dakika boyanır. Boya dökülür ve preparat üzerine lugol solüsyonu konarak 1-2 dakika beklenir. Lugol solüsyonu dökülür. Absolut alkolde dekolere edilir (alkol renksiz akıncaya dek). Su ile yıkanır. Safranin (veya eosin, sulu fuchsin) ile 5-10 saniye boyanır. Su ile yıkanarak boya giderilir. Kurutma kâğıdında (veya havada) kurutulur. Sedir yağı konarak immersiyon objektifi ile muayene edilir. Bu yöntemle mor görülen mikroorganizmalar Gram pozitif ve pembe görülenler de Gram negatif olarak değerlendirilirler. Genç mikrobiyal kültürler, genellikle kuvvetli Gram pozitif görülmelerine rağmen, eski kültürlerde Gram negatifliğe doğru bir eğilim vardır (Jenkins, Richard ve Daigger, 2004).

3.1.10.2. Neisser boyama (Albert Metodu)

Boyama anında bir tüp içinde iki kısım Neisser A, bir kısımda Neisser B eriyikleri karıştırılır. Havada kurutulmuş ve tespit edilmiş preparatın üzeri bu boya ile kaplanır. 10 sn bekledikten sonra yıkamadan, kurutma kağıtları arasında kurutulur. Preparatın üzerine krizoidin eriyiği dökülür, 3 sn tutulup hemen kurutma kağıtları arasında kurutulur ve bu boyada fazla tutulmamasına özen gösterilir. İmmersiyon objektifi ile bakıldığında sarı boyalı bakterilerin içlerinde (daha çok uç ve orta kısımlarında) koyu kahverengi-mor boyalı metakromatik cisimcikler görülür (Jenkins, Richard ve Daigger, 2004).

3.1.10.3. PHB boyama

Preparat hazırlanır ve havada kurutulur. Lam üzerine 10 dakika Solusyon 1 dökülür. 1 saniye su ile yıkanır. 10 saniye Solusyon 2 ile lam muamele edilir. Lam yıkanır ve kurutulur. İmmersiyon yağlı objektifte incelenir. Gözlenen mavi-siyah granüller hücre içi PHB granülleridir (Jenkins, Richard ve Daigger, 2004).

3.2. Biyodizel ve Atıksuyu Üretilmesi

Deneylerde kullanılacak olan atıksuyun özelliklerinin değişmemesi ve proje döneminde biyodizel üretimine ülke genelinde ara verilmesi sebebiyle laboratuvarında biyodizel ve atıksu üretilmiştir. Deneylerde kullanılacak olan atıksuların elde edilebilmesi için önce biyodizel üretimi yapılmıştır.

Metil ester üretimi için, reaksiyon girdisi olarak yağın litresi başına 200 mL metanol, 3,5 - 4 g. KOH kullanılmıştır. İlk olarak, katalizör vazifesi görecektir KOH, metanol içerisinde karıştırılmak suretiyle çözündürülmüş, daha sonra alkol-katalizör karışımı o sırada başka bir kabın içerisinde 40°C' ye kadar ısıtılmış durumda bekleyen yağın içerisine boşaltılmıştır.

Daha sonra bu karışım, 1 saat boyunca 55-60 °C sabit sıcaklıkta karıştırılmaya tabi tutulmuştur. Karıştırma işlemi için sıcaklık termostatlı ve devir ayarlı manyetik karıştırıcı kullanılmıştır. Karıştırma durdurulduğunda, açık kahverengi renkte

'gliserin' tabakası çökelmeye başlamış ve iki faz oluşmuştur. Şekil 3.1' de üretilen esterler ve gliserin tabakaları görülmektedir. Bir gece boyunca ayrışmanın tamamen gerçekleşebilmesi için bekletilen 'ester + gliserin', daha sonra birbirinden ayrılarak ester tabakası ayrı bir kaba alınmıştır. Elde edilen esterin içerisinde reaksiyondan arta kalan alkol, katalizör, gliserin vs. artıklarını uzaklaştırmak için yıkama işlemi yapılmıştır. Bu işlem için, bir kaba ester hacminin yarısı kadar saf su ilave edilmiş, hava pompası ve hava taşı vasıtasıyla kabarcıklı bir şekilde yıkama yapılmıştır. İlk yıkama yaklaşık 7-8 saat sürmüş, ihtiyaca göre tekrar edilmiştir. İlk yıkama sonrası elde edilen biyodizel ve yıkama suyu fazları Şekil 3.1 ve 3.2' de görülmektedir. Yıkama sırasında emülsiyon oluşmamasına dikkat edilmiştir.



Şekil 3.1. Üretilen esterler ve gliserin tabakasının çökelti olarak oluşumu.



Şekil 3.2. İlk yıkama sonrası ester tabakası ve beyaz renk almış su tabakasının görünümü

3.3. Ekstraksiyon Çalışmaları

Biyodizel atıksuyu 17294- 25252 mg/L gibi çok yüksek değerlerde yağ-gres içermektedir. Yağ-gres, biyodizel üretimi sırasında, reaksiyonun tamamlanmamış olmasından dolayı esterleşmemiş olan yağdan ileri gelmektedir. Sabun ise serbest yağ asitlerinin KOH katalizörüyle reaksiyonu sonucunda meydana gelmektedir.

Atıksuyun KOİ ve TOK değerinin çok önemli bir kısmı bu yağ ve sabundan ileri gelmektedir. Yağ ve sabunun atıksudan uzaklaştırılması durumunda KOİ ve TOK değerinin önemli ölçüde azaltılabileceği beklenebilir. Bu safsızlıkların atıksudan alınabilmesi için değişik solventler ile ekstraksiyon çalışmaları yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemiyle atıksudaki bütün uçucu olmayan hidrokarbonlar, sabunlar, vakslar, yağlar ve solvent fazına geçebilecek diğer maddeler ekstrakte edilebilir. Ekstraksiyonlarda organik faz olarak hekzan (Merck marka, %95 saflıkta ve 20⁰C de sudaki çözünürlüğü 0.0095 g/L), ve metil tersiyer bütül eter (Merck marka, %99 saflıkta ve suda çözünürlüğü olmayan) kullanılmıştır. Ekstraksiyon çalışmaları termostatlı ve magnetik karıştırıcılı su banyosunda 100-250 mL lik erlenmeyerler içinde yapılmıştır (Şekil 3.3). Atıksuyun pH'ı 1:1 HCl ile ayarlanmıştır. Ekstraksiyon çalışmaları değişik pH, sıcaklık, solvent-atıksu oranı ve değişik süreler için tekrarlanmıştır.



Şekil 3.3. Ekstraksiyon sistemi

3.4. Elektrokoagülasyon Çalışmaları

Elektrokoagülasyon demir ve alüminyum anotların çözünmesi sonucunda oluşan 3 değerli katyonları oluşturur. Bu katyonların koagülant etkisinin yanı sıra katotta oluşan hidrojen gazı yumakların ve yağ-gresin flote olmasını sağlar. Elektrokoagülasyon, özellikle yağlı atıksuların arıtılmasında çok etkilidir. Biyodizel atıksuları yüksek oranda yağ-gres içerdiğinden, ön arıtmada elektrokoagülasyon işleminden yararlanabileceği düşünülmüştür.

3.5. Biyolojik Arıtma Çalışmaları

Biyolojik arıtma çalışmalarında ilk adım, tam karışimli sürekli aktif çamur sistemini kurmaktır. Bu nedenle tam karışimli sürekli aktif çamur biyoreaktör çalışmaları öncesinde ekstraksiyon ve elektrokoagülasyon sonrası atıksuların aktif çamura etkisini öngörmek için kesikli çalışmalar yapılmıştır. Çünkü bu atıksuların aktif çamur mikrobiyolojisine nasıl etki ettiği hakkında literatürde çalışma yer almamaktadır. İlk adım olarak biyoreaktör sisteminin verimli çalışabilmesi için optimum koşullar belirlenmiş, iki farklı atıksu numunelerinde önce pH, Çözünmüş Oksijen, Optimum süre, C/N oranı, Seyreltme oranları ayarlanmıştır. Daha sonra KOİ, BOİ, Yağ-Gres, TOK, TN, TP, AKM parametrelerin analizi yapılmış ve biyokinetik sabitler hesaplanmıştır.

3.5.1. Aktif Çamur ile biyolojik arıtma çalışmaları

3.5.1.1. Kimyasal parametrelerin analizi

Giriş ve Çıkış Atıksuyunda, Filtrelenmemiş KOİ, TOK, pH parametreleri ölçümü yapılmış, biyoreaktörde ise, AKM, UAKM, Sıcaklık, pH, Çözünmüş Oksijen (ÇO) parametreleri analiz edilmiştir.

3.5.1.2. Nutrient ilaveleri

Kesikli ve sürekli yapılan çalışmalarda KOİ:N:P oranları 100:6:1 olacak şekilde NH₄Cl, KH₂PO₄, MgSO₄*7H₂O çözeltilerinden gerekli azot ve fosfor ve iz element ilaveleri yapılmıştır.

3.5.1.3. Sıcaklık ölçümleri

Kesikli ve sürekli çalışmalarda biyoreaktör içindeki sıcaklık 25 ± 2 °C arasında değişmiştir.

3.5.1.4. Çözünmüş oksijen ölçümleri

Kesikli ve sürekli çalışmalarda reaktör içindeki çözünmüş oksijen 2 mg/L' nin altına düşmeyecek şekilde kompresör ve hava pompası ile ayarlanmıştır.

3.5.1.5. pH ölçümleri

Besleme suyunun pH değeri 7-7.5 arasında tutulmuştur.

3.5.1.6. BOİ kinetik parametreleri hesaplanması

BOİ kinetik parametreleri Thomson yöntemi ile hesaplanmıştır. Aşağıda bu metot verilmektedir.

Thomas Grafik Metodu:

Bu bir yaklaşık metottur. Aşağıdaki eşitliğe dayanır (Singh, 2004).

$$(t/y)^{1/3} = 1/(2.3 kL_0)^{1/3} + [(2.3 k)^{2/3}/6 L_0^{1/3}]. t \quad (3.1)$$

$$k=2,61 \text{ (b/a)} \quad (3.2)$$

$$k'=2,303.k \quad (3.3)$$

$$L_0=1/(2,3.k.a^3) \quad (3.4)$$

BOI deneyleri sonucunda elde edilen verilerlerden k , k' ve L_0 kinetik parametreleri yukarıda yer alan formlere göre hesaplanmıştır.

3.5.2. EBA, FeELBA, AIELBA ile yapılan kesikli çalışmalar

Karaman/SAKARYA biyolojik arıtma tesisinden alınan aktif çamur numunesi, laboratuvarında kurulan kesikli sistemlere konularak sürekli işletmeye alınmadan önce kesikli olarak çalıştırılmıştır.

Bu çalışmaların yapılmasındaki amaç;

- Ön çalışmalarla farklı seyreltmelerdeki EBA' nın kesikli sistemde arıtılabilirliğini ortaya koymak
- Çeşitli S_0/X_0 değerlerinde TOK değişimini incelemektir.

3.5.2.1. EBA ve AIELBA ile yapılan ön çalışmalar

Karaman biyolojik arıtma tesisinden alınan aktif çamur numunesi, laboratuvarında kurulan kesikli sisteme konularak sürekli işletmeye alınmadan önce kesikli olarak çalıştırılmıştır. Bu çalışma, 10L hacminde cam akvaryum içine havalandırma taşları yerleştirilerek sürekli havalandırılarak yapılmıştır. Aktif çamur, belli bir konsantrasyona gelene kadar yaklaşık 14 gün kesikli olarak EBA ile beslenmiştir, her gün havalandırma durdurulduktan 30 dakika sonra üst sıvıdan 5 L alınıp atılmıştır. Daha sonra da EBA' dan 5 L ilave edilerek KOİ giderimi izlenmiş ve maksimum AKM 2500 mg/L olunca bu çalışma sonuçlanmıştır. Aynı çalışma AIELBA için de tekrarlanmıştır.

3.5.3. Tam karışımli sürekli reaktör

Biyodizel atıksuyunun hekzan ile ekstraksiyonundan sonrası (EBA) ve Al elektrokoagülasyonu sonrası (AIELBA), biyolojik olarak arıtılabilirliğini incelemek üzere tam karışımli sürekli akımlı bir havalandırma reaktörü dizayn edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Tam karışımli sürekli reaktör

Havalandırma ünitesinin boyutları; 140 cm X 200 cm X 180 cm olup hacmi 5L' dir. Çöktürme ünitesinin de hacmi 2,7 L, son ünite de 106 cm x200 cm x103 cm boyutlarında olup 3.29 L hacmindedir.

Laboratuvarda kurulan tam karışımli sürekli aktif çamur sistemi; 4.35 saat hidrolik bekleme süresinde sürekli olarak 25.82 L/gün debide EBA ile beslenerek ve çözülmüş oksijen seviyesi 2-3 mg/L arasında havalandırılarak çalıştırılmıştır.

Hidrolik bekleme süresi hesabı 1.5 no' lu denklem ile hesaplanmıştır.

$$\theta_h = \frac{V}{(Q+q)} \quad (3.5)$$

Burada;

V = aerobik arıtma reaktör hacmi (L)

Θ_H = hidrolik bekleme süresi (sa)

Q = giriş debi (L/sa)

q = çamur geri devir debisi (L/sa)

Literatürde konvansiyonel arıtma için F/M oranı 0.8 - 2 arasında olmasının uygun olacağı belirtilmektedir. EBA' nın ve ALELBA' nın konsantrasyonu, F/M oranına göre çalışılmıştır. F/M oranı 1.6 no' lu denklem ile hesaplanmıştır.

$$\frac{F}{M} = \frac{S_0 Q_0}{XV} \quad (3.6)$$

Burada;

S_0 = Giriş atıksu KOİ değeri (kg/m³)

Q_0 = Giriş atıksu debisi ($m^3/gün$)

X = Karışmış askıda katı madde (kg/m^3)

V = Reaktör hacmi (m^3)

Yukarıdaki işletme şartlarında işletilen ve kararlı haldeki biyoreaktörün, kirlilik parametrelerinin giriş, çıkış değerleri ve arıtma verimleri Tablo 4.12 ve 4.13' te yer almaktadır. Aktif çamur kinetik katsayıları ise grafik metodu ile belirlenmiştir. Bu sonuçlar Şekil 4.14 -4.15-4.16-4.17 de yer almaktadır.

Kinetik sabitler elde edildikten sonra, biyoreaktör 2 ay süre ile işletilmiş ve haftalık olarak aktif çamur örneği DNA izolasyonu için toplanarak depolanmıştır. Bu süre boyunca, TOK, TN, AKM, UAKM, SV, SVI parametreleri analiz edilmiştir. Ayrıca mikroorganizmaların fenotipik identifikasyonu yapılmıştır.

3.6. Aktif Çamur Fenotipik İdentifikasyon

Biyoreaktörden haftalık alınan numunelere Gr, Neisser, PHB boyama yapılarak ve canlı olarak mikroskopta incelenmiştir. Hazırlanan preparatlar, faz kontrast (Olympus BX51) özellikli, DP 20 Kameralı, BSW yazılım özelliği olan mikroskop ile incelenmiştir. Preparatlar Tablo 3.1' e göre tanımlanmış ve sonuçlar Tablo 4.15-4.16' da belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Filamentli bakterilerin teşhis anahtarları

Filament Tipi	Gr Boyama	Neisser Trikom	Neisser Granül	S Granül <i>in situ</i>	S Granül S Test	Diğer Hc. İnküzyonları	Trikom Genişliği	Trikom Uzunluğu	Trikom Şekli	Trikom Lokasyonu	Hc. Septası Açık Görülüyor	Girintili Hc. Septası	Kılıf	Eklentili Büyüme
<i>S.natans</i>	-	-	-	-	-	PHB	1.0-1.4	500	D	FY	+	+	+	-
Tip 1701	-	-	-	-	-	PHB	0.6-0.8	20-80	D-B	DŞ - FY	+	+	+	++
Tip 0041	+,D	-	-,+	-	-	-	1.4-1.6	100-500	D	DŞ - FY	+	-	+	++, -
Tip 0675	+,D	-	-,+	-	-	-	0.8-1.0	50-150	D	DŞ	+	-	+	++, -
Tip 021N	-	-	-,+	-,+	+	PHB	1.0-2.0	50-500	D-HK	FY	+	+	-	-
Thiothrix I	-,+	-	-,+	+, -	+	PHB	1.4-2.5	100-500	D-HK	FY	+	-	+	-
Thiothrix II	-	-	-,+	+, -	+	PHB	0.8-1.4	50-200	D-HK	FY	+	-	+	-
Tip 0914	-,+	-	-,+	-,+	-	PHB	1.0	50-200	D	FY - SFD	+	-	-	-
<i>Beggiatoa</i>	-,+	-	-,+	+, -	+	PHB	1.2-3.0	100-500	D	SFD	++	-	-	-
Tip 1851	+	?	-	-	-	-	0.8	100-300	D-B	FY	+-	-	+	-,+
Tip 0803	-	-	-	-	-	-	0.8	50-150	D	FY - SFD	+	-	-	-

1: Gr, 2: Neisser (trikom), 3: Neisser (granül), 4: S granül (*in situ*), 5: S granül (Stest), 6: Diğer Hc. İnküzyonları, 7: Trikom genişliği, 8: Trikom uzunluğu, 9: Trikom şekli, 10: Trikom bölgesi, 11: Hc. Septası açık, 12: Girintili Hc. Septası, 13: Kılıf, 14: Eklentili Büyüme

+: Pozitif, -: Negatif, D: Değişken +, - veya -, +: Değişkenin 1. i daha çok gözleniyor, D: Düz, B: Bükülmüş, HK: Hafif Kıvrımlı, S: Spiral, DŞ: Düzensiz Şekil, FY: Flok Yüzeyinde yer alıyor, SFD: Serbest Flok Dışında yer alıyor.

Tablo 3.1. (Devamı)

Filament Tipi	Gr Boyama	Neisser Trikom	Neisser Granül	S Granül <i>in situ</i>	S Granül S Test	Diğer Hc. İnküzyonları	Trikom Genişliği	Trikom Uzunluğu	Trikom Şekli	Trikom Lokasyonu	Hc. Septası Açık Görülüyor	Girintili Hc. Septası	Kılıf	Eklentili Büyüme
Tıp 0092	-	+	-	-	-	+	0.8-1.0	20-60	D-B	DŞ	++	-	-	-
Tıp 0961	-	-	-	-	-	-	0.8-1.2	40-80	D	FY	+	-	-	-
<i>M. parvicella</i>	+	-	+	-	-	PHB	0.8	100-400	S	DŞ	-	-	-	-
<i>Nocardia</i>	+	-	+	-	-	PHB	1.0	10-20	DŞ	DŞ	++	-	-	-
<i>N. limicola I</i>	+	+	-	-	-	-	0.8	100	S	DŞ-FY	-	-	-	-
<i>N. limicola II</i>	-, +	+, -	-	-	-	PHB	1.2-1.4	100-200	S	DŞ-FY	+	+	-	-
<i>N. limicola III</i>	+	+	-	-	-	PHB	2.0	200-300	S	DŞ-FY	+	+	-	-
<i>H. hydrossis</i>	-	-	-	-	-	-	0.5	20-100	D-B	FY-SFD	-	-	+	-, +
Tıp 0581	-	-	-	-	-	-	0.5-0.8	100-200	S	DŞ	-	-	-	-
Tıp 1863	-	-	-, +	-	-	-	0.8	20-50	B-DŞ	FY-SFD	+	+	-	-
Tıp 0411	-	-	-	-	-	-	0.8	50-150	B-DŞ	FY	+	+	-	-
1: Gr, 2: Neisser (trikom), 3: Neisser (granül), 4: S granül (<i>in situ</i>), 5: S granül (Stest), 6: Diğer Hc. İnküzyonları, 7: Trikom genişliği, 8: Trikom uzunluğu, 9: Trikom şekli, 10: Trikom bölgesi, 11: Hc. Septası Açık, 12: Girintili Hc. Septası, 13: Kılıf, 14: Eklentili Büyüme														
+ : Pozitif, - : Negatif, D: Değişken +,- veya -,+: Değişkenin 1.i daha çok gözleniyor, D: Düz, B: Bükülmüş, HK: Hafif Kıvrımlı, S: Spiral, DŞ: Düzensiz Şekil, FY: Flok Yüzeyinde yer alıyor, SFD: Serbest Flok Dışında yer alıyor.														

3.7. Aktif Çamurdaki Mikroorganizmaların Moleküler Tanısına Yönelik Çalışmalar

3.7.1. Aktif Çamur örneklemeleri

EBA ve AIELBA' nın 2 aylık sürelerde arıtma çalışmaları sırasında aktif çamur örnekleri kullanılmaya kadar -20°C ' de depolandı. Daha sonra bu örneklerden, ticari olarak satılan *FastDNA® SPIN Kit for Soil* (MP Biomedicals) protokolüne uyularak genomik DNA ekstraksiyonu yapıldı. Ve PZR çalışmalarına başlanmaya kadar -20°C ' de depolandı.

3.7.2. Genomik DNA izolasyonu

Haftalık olarak toplanan aktif çamurdan DNA saflaştırılması *FastDNA® SPIN Kit for Soil* kiti kullanılarak yapıldı. Kısaca; 500 mL aktif çamur örneği Lysing Matrix E tüpüne transfer edildi ve 978 μL Sodyum Fosfat Tamponu ile 122 μL MT tamponu eklendi. Numune 40 saniye süreyle homojenizatörde (Roche, MagNA Lyser) 7000 rpm de tutularak homojenize edildi. Numune daha sonra, 5-10 dak. 14.000 x g de santrifüjlendi ve üst sıvı alındı. Süpernatant yerine üst sıvı, temiz 2.0 mL' lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak 250 μL PPS (Protein Çöktürme Çözeltisi) ilave edildi ve el ile 10 defa karıştırıldı. Peletlerin çökmesi için 14.000 x g de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, 15 mL temiz tüpe aktarıldı. Yeniden süspansiyon edilen Binding Matrix Süspansiyonundan 1 mL, 15 mL tüpteki süpernatanta ilave edildi. Numune 2 dakika boyunca (DNA' nın bağlanması için) elde ya da vorteks yardımıyla karıştırıldı. Örnekler tüp sporuna konularak 3 dakika (silika matrisin çökmesi için) bekletildi. Binding Matrix in çöklediği tüpten 500 μL süpernatant, alınarak yeni tüpe transfer edildi. Engellenerek ayrılıp boşaltıldı. Süpernatantın kalan Binding Matrix, tekrar süspansiyon edilerek yaklaşık 600 μL karışmış numune, SPIN™ Filter ' a transfer edilip 14.000 x g de 1 dakika santrifüj edildi. Yakalama tüpü (catch tube) boşaltılıp SPIN™ Filter ' deki artı kalan karışım, tekrar önceki gibi santrifüj edildi. Yakalama tüpü (catch tube), tekrar boşaltıldı. Daha önce hazırlanmış olan SEWS-M' den 500 μL , numuneye (SPIN fitlerdaki içerik) ilave edilip ve pipetleme ile peletler nazikçe tekrar süspansiyon edildi. Numune, 14.000 x g de 1 dakika santrifüj edildi. Yakalama tüpü (catch tube), boşaltılıp ve yenisi ile değiştirildi.

Herhangi bir sıvı ilave edilmeksizin numune, 14.000 x g de 2 dakika süresince ikinci defa santrifüj edildi (matrixin yıkama solüsyonu artıklarından kurtulması ve numunenin kuruması için). Yakalama tüpü çıkarılıp yerine yenisini takıldı. SPIN™ Filter, oda sıcaklığında 5 dakika havada (etanolun uçması için kapak açık) kurutuldu. Binding Matrix (SPIN™ Filter üzerindeki), 50 - 100 µL DES (DNase/Pyrogen-free Water) ile nazıkçe tekrar süspanse edildi. Temiz yakalama tüpü içinde 14.000 x g de 1 dakika santrifüjle yıkanmış DNA elde edildi. Genomik DNA örnekleri, -20 °C de uzun süre veya 4 °C de kullanıncaya kadar saklandı.

3.7.3. Moleküler tanı için mikroorganizma gruplarının seçimi ve primerlerin tasarımı

Aktif çamur biyokütlesini oluşturan çeşitli mikroorganizmaları tanımlamak için; filamentli bakteriler, *Actinomyces*, Amonyak okside eden bakteriler (AOB), çeşitli funguslar, *Acinetobacteria* ve çamur kabarmasını tanımlamak için mikroorganizmalara ait primerler tasarlanmıştır. Kullanılan primerler, Tablo 3.2' de yer almaktadır.

Tablo 3.2. Aktif çamurun moleküler düzeyde tanısı için kullanılan primerler.

Hedef Grup	rRNA Kaynağı	Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	Boyut (Bç)	Kaynak
Filamentli Bakteriler	16S rRNA	341f 341f-GC 926r	CCTACGGGAGGCAGCAG CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGG CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	585	(Gulez ve de los Reyes, 2008)
<i>Actinomyces</i>	16S rRNA	F243 R1378 F984GC	GGATGAGCCCGCGGCTA CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG gc-AACGCGAAGAACCTTAC	1175 433	(Heuer ve ark., 1997)
Bakteri	16S rRNA	Vr Vf	ATTACCGCGGCTGCTGG CCTACGGGAGGCAGCAG	193	
Amonyak Okside Eden Bakteriler (AOB)	16S rRNA	CTO654r CTO189r	CTAGCYTTGTAGTTCAAACGC GAGRAAAGYAGGGGATCG	485	(Pholchan ve ark., 2010)
Fungi	18S rRNA	530f 1392r nu-SSU-0817-5' nu-SSU-1196-3' nu-SSU-1536-3'	GTGCCAGCMGCCGCGG ACGGGCGGTGTGTRC TTAGCATGGAATAATRAATAGGA TCTGGACCTGGT GAGTTTCC ATTGCAATGCYCTATCCCCA	862 400-500	(Bomeman ve Hartin, 2000)
Bakteri	16S rRNA	27f 1492r	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	1505	(Vanbroekhoven ve ark., 2004)
<i>Acinetobacter</i>	16S rRNA	Ac436f Ac676r GCAc436r	TTT AAG CGA GGA GGA GG ATT CTA CCA TCCTCT CCC CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G	240 460	
Çamur Kabamasının Belirlenmesi	16S rRNA	repF repR	IIICGICGICATCIGG CGICTTATCIGGCTAC	-	(Soltysık ve ark., 2011)

3.7.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Öncelikle Aktif çamurdan izole edilen DNA örneklerinde yukarıda açıklanan primerlerle teşhise yönelik olarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. PZR bileşikleri ve miktarları Tablo 3.3' te verilmiştir.

Tablo 3.3. Aktif çamurda yaygın bulunan mikroorganizmalara özgü primerlerle yapılan PZR ve REP-PZR bileşenlerin miktarları.

PZR Bileşenleri	PZR Bileşenlerin Miktarları (µl)	REP-PZR Bileşenlerin Miktarları (µl)
Genomik DNA (10ng/µl)	1	1
Primer 1 (ileri) (10 pmol)	1	1
Primer 2 (geri) (10 pmol)	1	1
dNTP karışımı (2.5mM)	1	2.5
MgCl ₂ (25mM)	1	1
Enzim Tamponu (10x)	2.5	2.5
Taq DNA polimeraz (0.5U/1 µl)	1	1
Toplam hacim*	25	25

*Karışım toplam hacme bidistile su ile tamamlanır.

PZR makinesinde (Progene Techne) ayarlanan döngülerin ısı ve süreleri Amonyak Okside eden bakteriler, Filamentli bakteriler ve *Acinebacteria* için 95°C'de 5 dakika ön-denatürasyon, 95°C' de 35 saniye, 56°C' de 55 saniye; 72°C' de 2 dakika olmak üzere toplam 35 döngü ve son olarak 72°C' de 10 dakikadır. Toplam eubakteriyal popülasyon ve funguslar için 95°C'de 5 dakika bekletildikten sonra 95°C' de 35 saniye, 57°C' de 55 saniye; 72°C' de 2 dakika olmak üzere toplam 35 döngü ve son olarak 72°C' de 10 dakikadır. *Actinomyces*' ler için 95°C'de 5 dakika bekletildikten sonra 95°C' de 35 saniye, 63.5°C' de 55 saniye; 72°C' de 2 dakika olmak üzere toplam 35 döngü ve son olarak 72°C' de 10 dakikadır tutularak PZR sonlandırılmıştır.

REP-PZR için ise için 94°C' de 5 dakika bekletildikten sonra 94°C' de 1, 41°C' de 1 dakika; 72°C' de 2 dakika olmak üzere toplam 40 döngü ve son olarak 72°C' de 10 dakikadır tutularak PZR sonlandırılmıştır.

3.7.5. PZR ürünlerinin analizi

Tanı amaçlı PZR ürünlerinin analizi için %2' lik; REP-PZR da ise %1.5' lik agaroz jeller kullanıldı. Agaroz, 1X Tris - Asetat - EDTA (TAE) tamponunda (Tablo 3.4) eritildi ve DNA' nın ultraviyole ışık altında görünmesini sağlayan etidyum bromür (0.6 µl/ml) ilave edilerek elektroforez kasetine döküldü. Jel polimerize olduktan sonra 1X TAE içeren elektroforez tankına yerleştirildi. PZR ürünleri yükleme tamponu (Tablo 3.4) ile karıştırılarak DNA' nın kuyulara çökmesi sağlandı. DNA' lar, 80V elektrik akımında (Thermo EC 250-90) yaklaşık 60 dakika, REP-PZR çalışmalarında ise 90 dakika yürütüldü. Daha sonra 312 nm UV ışık altında (Dual-Intensity Transilluminatör B-689) fotoğraflandı. Ayrıca REP-PZR' da elde edilen bant boyutlarının görüntü analiz cihazı ve programı (KODAK Image Station 4000MM) kullanılarak belirlendi.

Tablo 3.4. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar

Tampon	İçerik	Miktar/100ml
Tris - Asetat -EDTA (TAE) Tamponu	Tris Bazı Glasiyal Asetik Asit EDTA (pH 8.0)	242 gr 57.1 ml 0.5 M (100 ml)
Elektroforez Yükleme Tamponu	Bromo fenol mavisi Sukroz	%0.25 %40

3.8. Seçilen Mikroorganizmaların Aktif Çamurdan İzolasyonu

Kararlı şartlarda işletilen biyoreaktördeki aktif çamur numunesinden, aseptik şartlarda 10^{-1} - 10^{-5} seyreltme hazırlanarak içinde durham tüp bulunan 10 mL lik Laktoz Buyyon ve Nutrient Buyyon tüplere 1 mL numune ilave edilmiştir. Hazırlanan tüpler, 48 saat süresince 35 ± 2 °C de inkübe edilmiştir. 48 saat sonra Laktoz Buyyonda gaz oluşumu gözlenmiştir.

Kullanılan besiyerleri Nutrient Buyyon (NB, Merck), Laktoz Buyyon (LB, Merck) zenginleştirici besiyeri olarak kullanılmış, NB ve LB Buyyon' da üreyen mikroorganizmalar, Flourocult Violet Red Bile Agar (VRB-MUG Agar, Merck) *E.*

coli aranması ve sayılması için selektif katı besiyeri olarak, Cetrimid Agarda (Merck) *P. aeruginosa*'nın izolasyonu ve ön tanımlanması için selektif katı besiyeri olarak kullanılmıştır (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Koloni Doğrulama Testleri (Çiftçi, 2008).

Aranan Bakteri	Zenginleştirme	Besiyeri	Doğrulama Test
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NB-LB	Cetrimide Agar (Merck)	BBL Crystal E/F
<i>Escherichia coli</i>	NB-LB	VRB- MUG Agar (Merck)	BBL Crystal E/NF

NB: Nutrient Buyyon, LB: Laktöz Buyyon, VRB-MUG Agar: Flourocult Violet Red Bile Agar

Doğrulama testleri için *E.coli* ve *P.aeruginosa* şüpheli kolonilerden Tryptic Soy Agar (TSA- Merck) ekim yapılarak 18-24 saat 35 ± 2 °C de inkübe edilmiştir.

Aktif çamurdan izole edilen *E. coli*, Gram-negatif, oksidaz negatif, indol pozitifdir. *P. aeruginosa*, Gram-negatif, oksidaz ve indol pozitifdir. Yukarıdaki testlerden sonra BBL Crystal İdentifikasyon kitlerine Tryptic Soy Agar 24 saatlik taze kültürden ekim yapılmıştır. 24 saat inkübe edildikten sonra sonuçlar gözlenmiştir (Tablo 4.18). Aktif çamurdan izole edilen *E. coli* ve *P. aeruginosa* doğrulama testlerine ilave olarak, ticari satılan suşlarla yukarıdaki testlere paralel ekimler yapılarak identifikasyon tamamlanmıştır. Satın alınan suşlar, *E.coli* ATCC 8739 ve *P.aeruginosa* ATCC 9027' dir. İzole edilen *E.coli* ve *P.aeruginosa* biyodegradasyon çalışmalarında kullanılmak üzere -70 °C de dondurularak stoklanmıştır (Çiftçi, 2008).

3.8.1. Minimum inhibisyon konsantrasyon testleri (MİK)

Tanısı yapılan izolatların ve ticari olarak satın alınan suşların, mikroorganizmalar için toksik olabilecek maddelerin inhibisyon dozunu hesaplamak amacı ile Ham Biyodizel Atıksuyu (HBA) ile Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu tesleri uygulanmış, MİK değerleri bir sonraki adımda HBA' yu ile muamele edilecek izolatların ve ticari olarak satın alınan suşların HBA ilave edilme miktarları için belirleyici olarak kullanılmıştır. Deneylede, biyodizel üretimi sırasında çıkan HBA otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır. MİK deneylerinde 96 mikro kuyucuk bulunan steril plakalar kullanılmıştır. HBA, ilk kuyucukta 50 µl olmak üzere Tablo

3.6' da belirtildiği şekilde sonraki kuyucukta HBA oranı mineral salt medium (MSM) ile seyreltilerek kuyucuklara eklenmiştir. 1 no' lu kuyucukta 50 µl HBA ve 50 µl bakteri solüsyonu mevcuttur. Bakterilerin buyyon kültürlerinden alınarak McFarland 3 (9×10^8 CFU/ml) bulanıklığa göre ayarlanarak hazırlanan bakteri solüsyonları 50 µl olarak kuyucuklara yerleştirilmiştir. Bakteri solüsyonu % 0.8' lik FTS (fizyolojik tuzlu su) ile hazırlanmış ve böylece HBA dışında karbon kaynağı bulunması engellenmiştir. 10 numaralı son kuyucuğa sadece MSM ve bakteri solüsyonu konularak MİK testinin pozitif kontrolü oluşturulmuştur. Kuyucuklar mikropilaka okuyucu ile okutulmuş bakteriyel üremesi kontrol edilmiştir (Çiftçi, 2008). Tüm kuyucuklara 1. kuyucukta 50 µl den başlayarak Tablo 3.6 da görüldüğü şekilde seri sulandırma yapılarak HBA eklenmiştir.

Tablo 3.6. Seri sulandırma sonrasında kuyucuklarda oluşan HBA miktarları (Çiftçi, 2008)

Kuyucuk Numarası	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
µl HBA	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.19	-
µl MSM	-	50	50	50	50	50	50	50	50	50
µl Bakteri	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

3.8.1.1. Seçilen izolatların ve satın alınan suşların ham biyodizel atıksuyu (HBA)' nu parçalama eğilimi testleri

Tanısı yapılan izolatların ve ticari olarak satın alınan suşların, MİK sonuçları kaydedildikten sonra, her bir izolat için 250 ml' lik erlen içinde 50 ml MSM, 50 ml HBA ve 50 ml McFarland 3 (9×10^8 CFU/ml) bulanıklık testine göre hazırlanmış bakteri solüsyonundan oluşan düzenekler hazırlanmıştır.

Erlenler çalkalamalı etüvde 25°C de 150 rpm' de 30 gün boyunca inkübasyona bırakılmış, 48 saatte bir pH, TOK, TN ölçümü yapılarak kaydedilmiştir (Çiftçi, 2008).

HBA parçalama yeteneklerinin belirlenmesi testleri 3 farklı grup oluşturularak yapılmıştır. 1. grupta satın alınan suşlar; *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 9027, 2. grupta bu iki türün karışımı (*E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC

9027) 3. grupta aktif çamur izolatları; *E. coli*, *P. aeruginosa*, 4. grupta; aktif çamur izolatlarından iki türün karışımı (*E. coli*, *P. aeruginosa*) incelenmiştir.

BÖLÜM 4. SONUÇLAR

4.1. Biyodizel Atıksuyunun Karakterizasyonu

Üretilen biyodizel atıksularının analizi yapılmış ve Tablo 4.1’ deki sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 4.1. Biyodizel atıksularının analiz sonuçları

Parametre (mg/L)	Değer
pH	11
KOİ	305500 - 403540
Yağ-Gres	17294 - 25252
TOK	54000 - 110000
TN	0
BOİ ₅	210400
AKM	12800
BOİ ₅ /KOİ	0.69 - 0.52
C/N	-

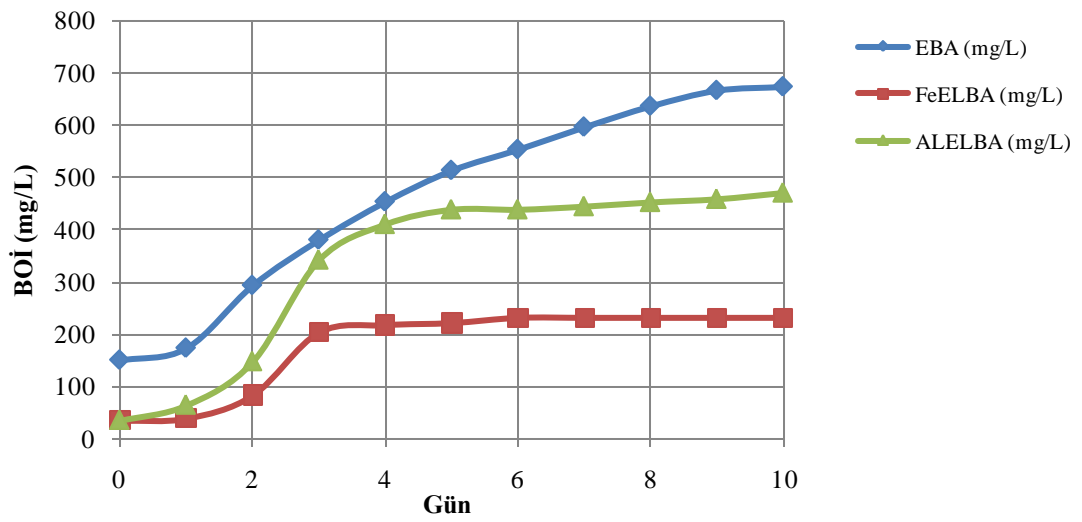
4.2. Biyolojik Arıtma Çalışmaları

Deneylerde kullanılan biyodizel atıksuyu, materyal ve metot bölümünde de belirtildiği gibi laboratuvarımızda yaş yıkama yöntemi ile biyodizel üretimi sonucunda elde edilmiştir. Ham biyodizel atıksuyu, hegzan ile ekstrakte edildikten (EBA) sonra KOİ değeri 15 000 - 40 000 mg/L aralığında kalmaktadır. Ham biyodizel atıksuyu, Fe elektrot ile elektrokoagülasyon (FeELBA) sonrasında KOİ değeri 25 000 – 45 000 mg/L aralığında, Al elektrot ile elektrokoagülasyon (AIELBA) sonrasında ise KOİ değeri 26 000 – 30 000 mg/L aralığında kalmaktadır.

Bu atıksuların, KOİ değerinin SKKY' inde belirtilen değarj limitlerine indirilebilmesi için biyolojik arıtılabilirliği incelenmiştir.

4.2.1. BOİ deneyleri

EBA, FeELBA, AIELBA nununelerine ait BOİ değerleri aşağıdaki Tablo 4.2 ve Şekil 4.1-4.2-4.3-4.4' te verilmiştir.



Şekil 4.1. EBA, FeELBA, AIELBA nununelerine ait BOİ-Zaman grafiği

Tablo 4.2. EBA, FeELBA, AIELBA nununelerine ait BOI değerleri

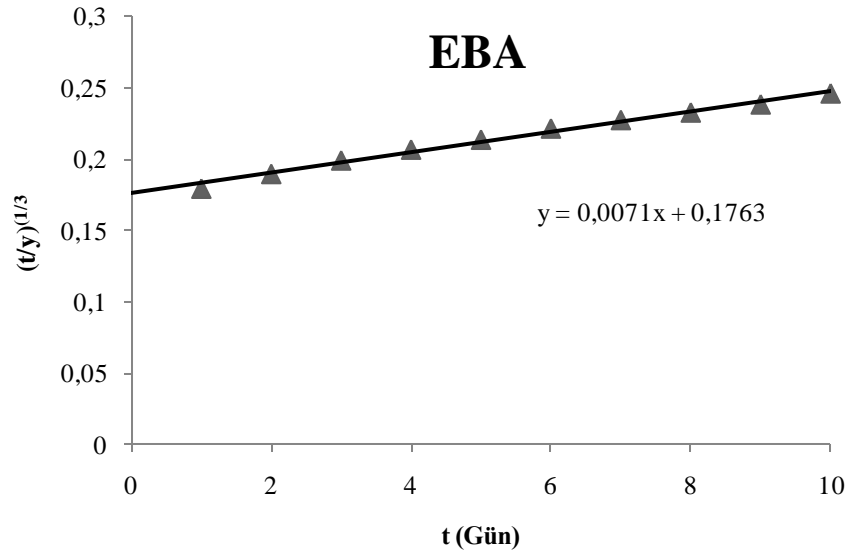
t (Gün)	EBA y, BOI (mg/L)	FeELBA y, BOI (mg/L)	AIELBA y, BOI (mg/L)
0	150	36	36
1	173	40	65
2	293	84	148
3	30	20	342
4	453	218	410
5	513	222	438
6	553	232	438
7	596	232	444
8	636	232	452
9	666	232	458
10	673	232	470

Tablo 4.2' de yer alan deneysel veriler kullanılarak BOI kinetik parametreleri Thomson yöntemi ile hesaplanmıştır. Aşağıda bu sonuçlar verilmiştir.

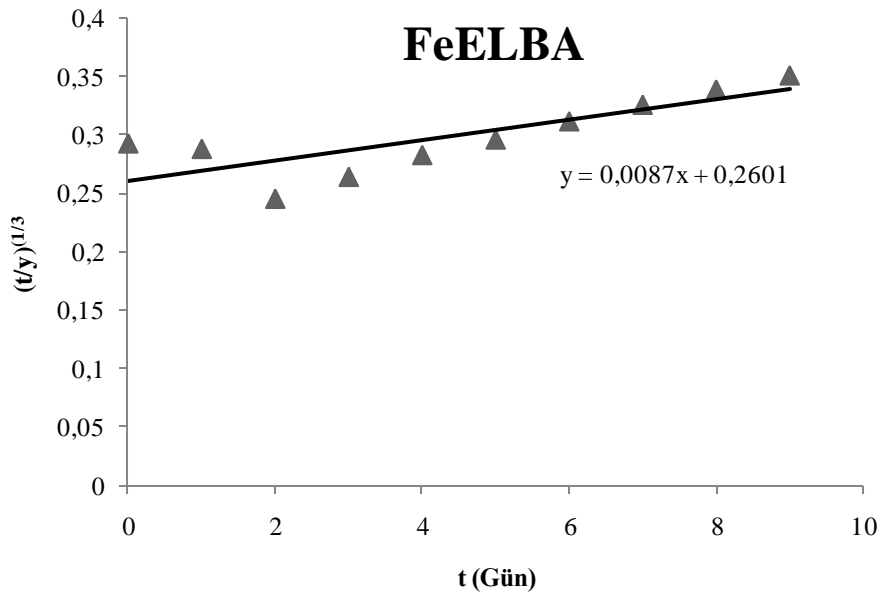
Tablo 4.3. Thomas Metodu için hesaplanan EBA, FeELBA, AIELBA numunelerinin BOI değerleri

t (Gün)	EBA y, BOI(mg/L)	EBA (t/y) ^{1/3}	FeEBA y, BOI(mg/L)	FeELBA (t/y) ^{1/3}	AIELBA y, BOI(mg/L)	AIELBA (t/y) ^{1/3}
0	150	-	36	-	36	-
1	173	0.179467	40	0.292402	65	0.248711
2	293	0.189694	84	0.287685	148	0.23819
3	380	0.199119	204	0.244999	342	0.206236
4	453	0.206691	218	0.263755	410	0.213677
5	513	0.213608	222	0.282405	438	0.225164
6	553	0.221382	232	0.295725	438	0.239272
7	596	0.227309	232	0.311317	444	0.250749
8	636	0.232565	232	0.325487	452	0.260606
9	666	0.23819	232	0.33852	458	0.269852
10	673	0.245845	232	0.350621	470	0.277098

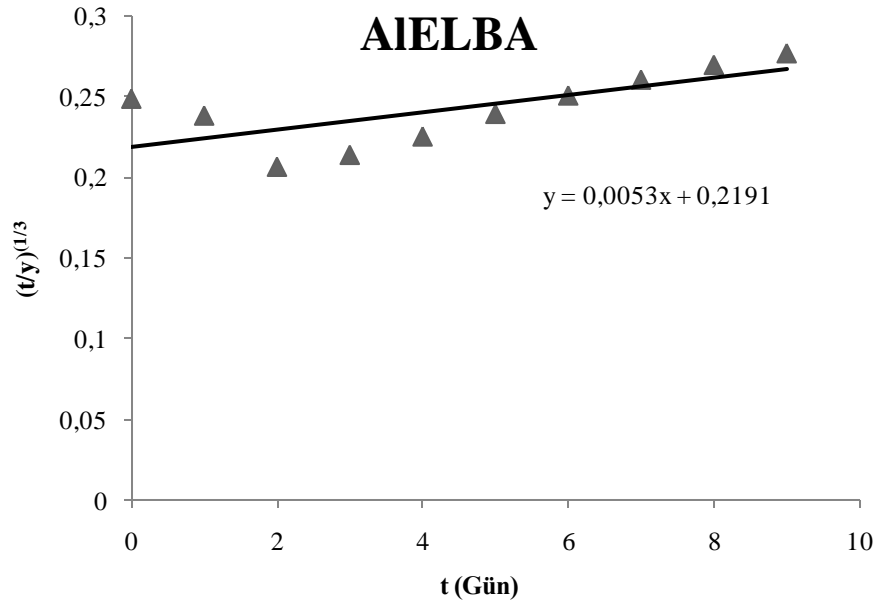
Thomas Metoduna göre $(t/y)^{1/3}$, e karşı t değerlerinin grafiği çizilerek eğim ve kesim noktaları bulunur.



Şekil 4.2. Thomas Metodu ile BOİ ölçümlerinden k ve Lo değerlerinin tayini (EBA)



Şekil 4.3. Thomas Metodu ile BOİ ölçümlerinden k ve Lo değerlerinin tayini (FeELBA)



Şekil 4.4. Thomas Metodu ile BOİ ölçümlerinden k ve L_0 değerlerinin tayini (AIELBA)

Grafiğin eğimi b ve ordinatı kesim noktası a değerini verir. 1.2, 1.3 ve 1.4 no' lu denklemler kullanılarak hesaplanan k, k' ve L_0 değerleri aşağıdaki Tablo 4.4' de verilmiştir.

Tablo 4.4. Thomas Metodu için hesaplanan EBA, FeELBA, AIELBA numunelerinin BOİ Kinetik Sabitleri

	Eğim (b)	Kesim (a)	k	k'	L_0 (mg/L)
EBA	0.0071	0.1763	0.105	0.242	754.864
FeELBA	0.0087	0.2601	0.087	0.201	283.029
AIELBA	0.0053	0.2191	0.06	0.145	654.743

4.2.1.1. BOİ kinetik sonuçları

Tablo 4.4' de yer alan Thomas Metodu için hesaplanan EBA, FeELBA, AIELBA numunelerinin BOİ kinetik sabitleri sırasıyla 0.242, 0.201 ve 0.145 olarak elde edilmiştir. BOİ kinetik sabitlerine göre EBA en yüksek hızda biyodegrade olabilmektedir. Sonrasında FeELBA ve en son olarak ta AIELBA biyodegrade olabilmektedir.

Şekil 4.1' e göre her üç atıksuyun arıtılmasında bakteriler ortalama 1 gün kadar ortama adapte olmaya çalışmışlardır (Lag faz). BOİ eğrisinde bakterilerin logaritmik faz dönemi, arıtılacak atıksu karakterine göre değişkenlik göstermektedir. Elde edilen BOİ deneyi sonuçlarına göre EBA' nın tamamı neredeyse biyodegrade olabilmektedir. Fakat FeELBA ve AIELBA da durum farklıdır. AIELBA biyodegradasyonu FeELBA biyodegradasyona göre daha iyidir. BOİ deney sonuçları, EBA' nın AIELBA' ya göre daha az toksik olduğu FeELBA nın ise en toksik olduğunu göstermektedir.

4.2.2. EBA ile yapılan kesikli ön çalışma sonuçları

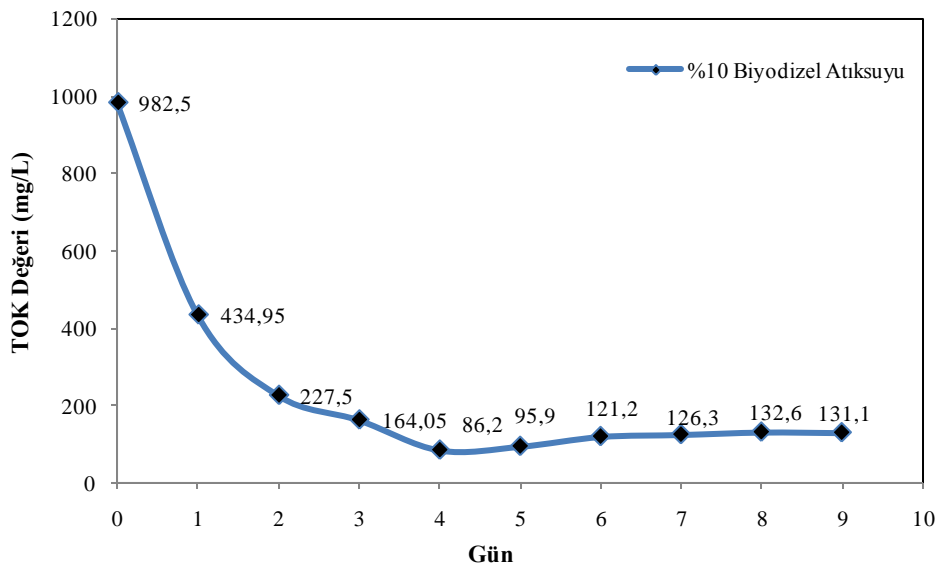
EBA' nın farklı konsantrasyonlarda kesikli işletme şartlarında 10 gün süre ile havalandırılarak TOK giderimini tespit etmek amacıyla Karaman biyolojik arıtma tesisinden alınan aktif çamur numunesi, laboratuvarında kurulan kesikli sistemlerde çalışılmıştır. Çünkü bu atıksuyun, klasik aktif çamur sistemlerine olan etkisini ortaya koyan literatür mevcut değildir. Biyolojik arıtma çalışmalarında kullanılan EBA' nın karakteristik özellikleri biyodizel üretimi sırasında değişiklik göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan EBA' nın karakteristik özellikler Tablo 4.5' te gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Kesikli sistemde biyolojik arıtmada kullanılan EBA' nın ve EBA' nın elde edildiği HBA' nın karakteristik özellikleri

Ölçülen Parametreler	HBA	EBA
KOİ (mg/L)	403000	23750
TOK (mg/L)	54000	12160
BOİ (mg/L)	185456	18860
TAKM (mg/L)	980	580
Yağ ve Gres (mg/L)	25000	1422
NH ₄ -N (mg/L)	0.98	0.142
PO ₄ -P (mg/L)	0.56	0.75

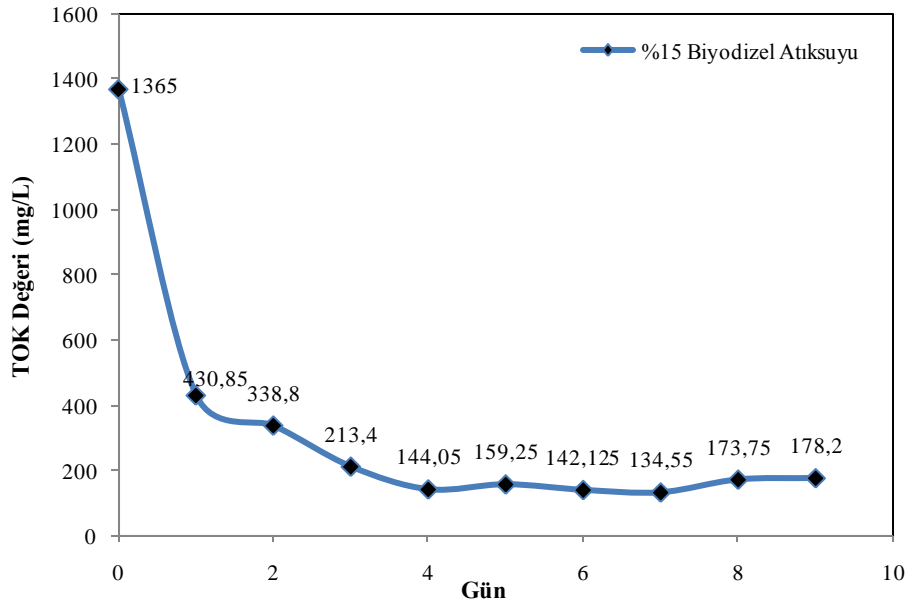
4.2.2.1. EBA' nın farklı konsantrasyonlarda kesikli sistemde biyolojik artırılabilirliği

%10, %15, %25, %50 %75 ve %100 EBA içeren deney düzeneklerinde biyolojik artırılma sonucu elde edilen Toplam Organik Karbon (TOK) değerlerinin zamanla değişimi aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan EBA' nın kirlilik değerleri Tablo 4.5' te yer almaktadır. Atıksudaki N ve P eksikliği nedeniyle Bölüm 3 te yer alan nutrientler ilave edilerek KOİ/N/P oranı ayarlanmıştır.



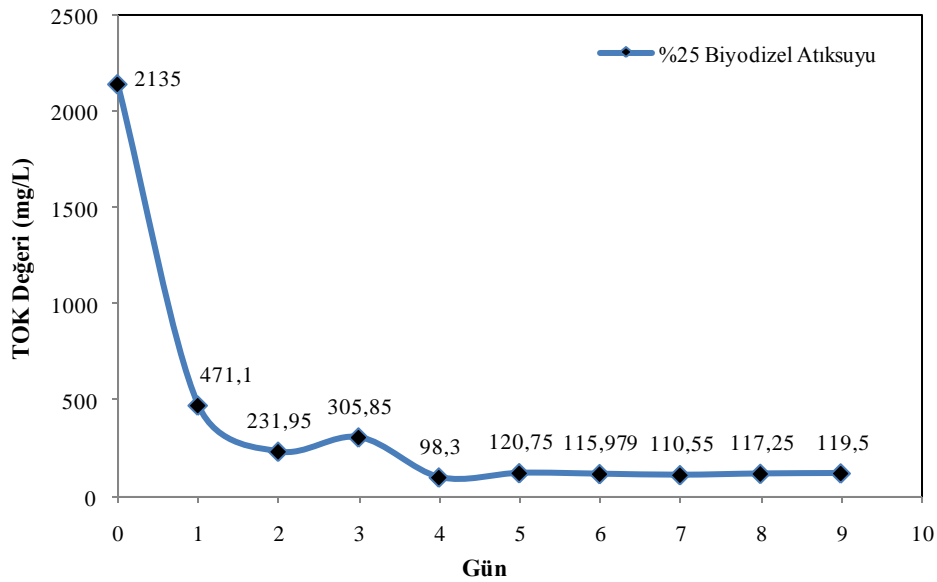
Şekil 4.5. % 10 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinin biyolojik artırılma ile günlere göre TOK (mg/L) değişimi

Şekil 4.5. de %10 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinde (4 gün içinde) TOK değerinin 982.5 mg/L den 86.2 mg/L ye düştüğü tespit edilmiştir.



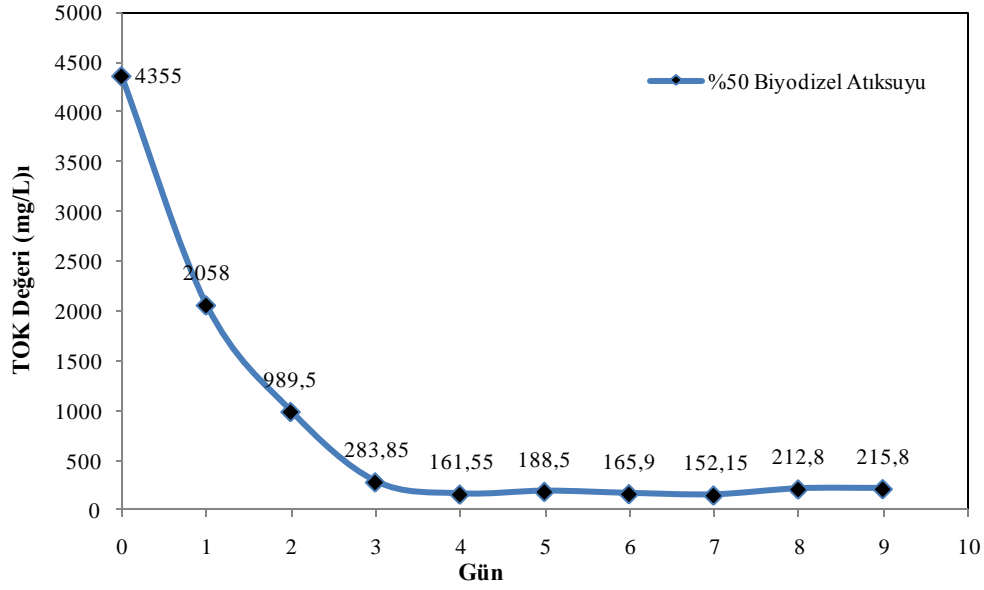
Şekil 4.6. % 15 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinin biyolojik arıtılma ile günlere göre TOK (mg/L) değişimi

Şekil 4.6 da %15 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinde (4 gün içinde) TOK değerinin 1365 mg/L den 144.05 mg/L ye düştüğü tespit edilmiştir.



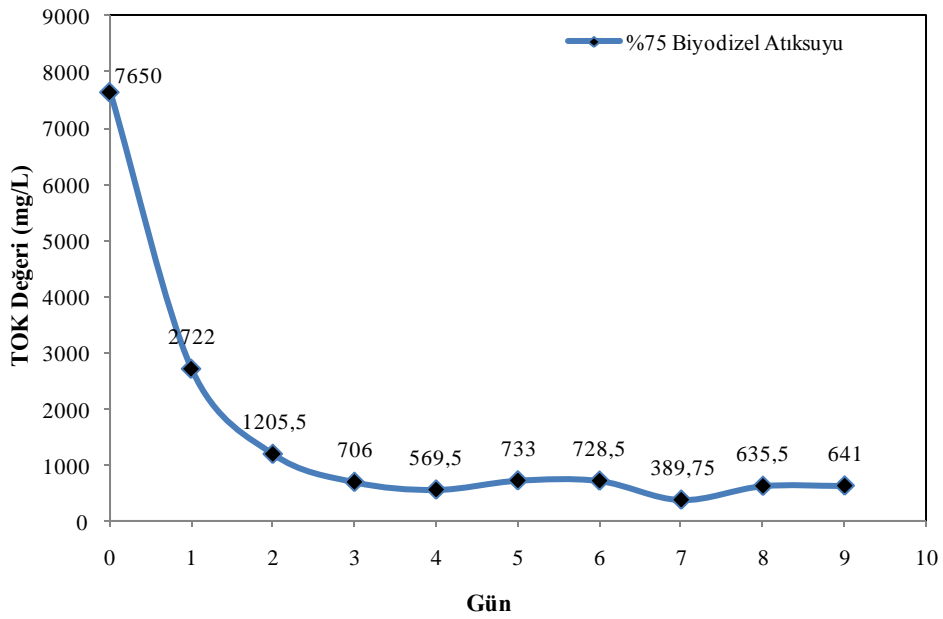
Şekil 4.7. % 25 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinin biyolojik arıtılma ile günlere göre TOK (mg/l) değişimi

Şekil 4.7 de %25 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinde (4 gün içinde) TOK değerinin 2135 mg/L den 98.3 mg/L ye düştüğü tespit edilmiştir.



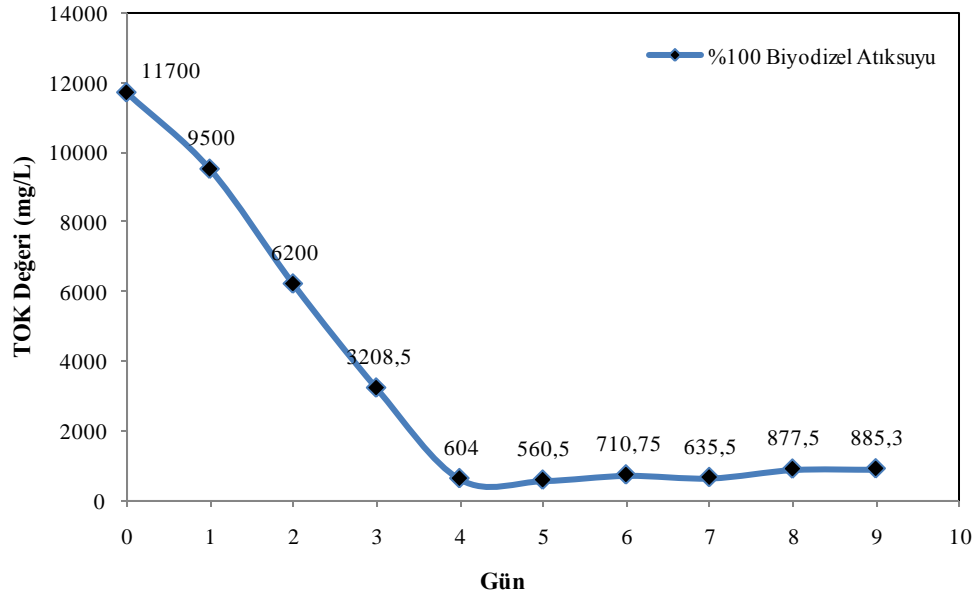
Şekil 4.8. % 50 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinin biyolojik arıtılma ile günlere göre TOK (mg/L) değişimi

Şekil 4.8 de %50 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinde (4 gün içinde) TOK değerinin 4355 mg/L den 161.55 mg/L ye düştüğü tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. %75 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinin biyolojik arıtılma ile günlere göre TOK (mg/L) değişimi

Şekil 4.9 da %75 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinde (4 gün içinde) TOK değerinin 7650 mg/L den 569.5 mg/L ye düştüğü tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. % 100 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinin biyolojik arıtılma ile günlere göre TOK (mg/L) değişimi

Şekil 4.10 da %100 ekstrakte biyodizel atıksuyu içeren deney düzeneğinde (4 gün içinde) TOK değerinin 11700 mg/L den 604 mg/L ye düştüğü tespit edilmiştir.

Yukarıdaki şekillerde yer alan sonuçlardan hesaplanan yüzde KOİ giderim verimleri Tablo 4. 6 da yer almaktadır.

Tablo 4.6. Farklı seyreltmelerde EBA' nın kesikli sistemde biyolojik arıtılma ile günlere göre Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ mg/L) değişimi ve %KOİ giderim verimi

EBA Seyreltme Oranları	KOİ(mg/L) 0. Gün	KOİ(mg/L) 10. Gün	KOİ Giderim Verimi (%)
10%	1890	114	93
15%	3195	142	96
25%	4720	102	98
50%	15500	150	99
75%	29000	510	98
100%	25000	406	98

Yukarıdaki şekillerde de yer aldığı gibi EBA'nın çeşitli konsantrasyonlarda kesikli sistemde biyolojik arıtımının gerçekleştiği ve hiç seyreltme yapılmadan da TOK gideriminin 10 gün içerisinde %98 oranında gerçekleştiği tespit edilmiştir.

4.2.3. EBA, FeELBA, AIELBA ile yapılan kesikli çalışma sonuçları

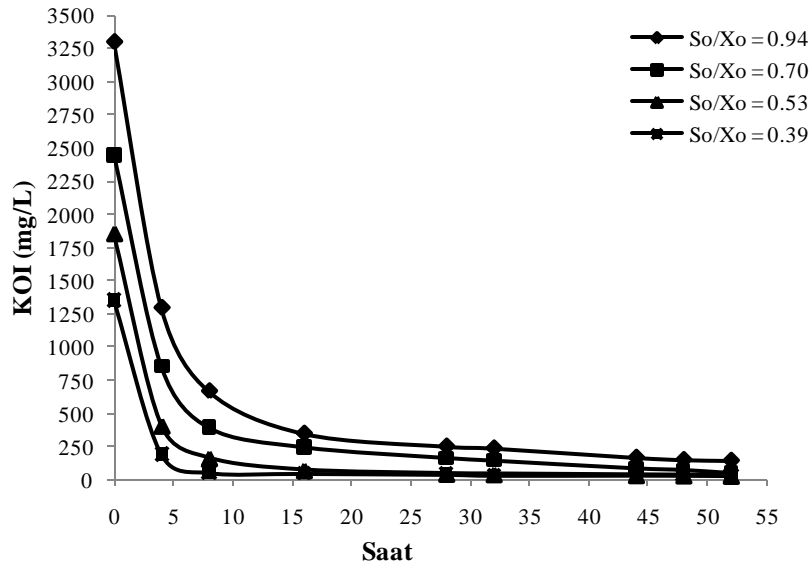
Karaman biyolojik arıtma tesisinden alınan aktif çamur numunesi, laboratuvarında kurulan kesikli sistemlerde bölüm 3.5.2.1. te yer alan koşullarda çalıştırılmıştır. Bu çalışmanın yapılma amacı, sürekli arıtmada kullanılacak atıksuların biyolojik arıtmaya etkisini ön görmektir. Biyolojik arıtma çalışmalarında kullanılan EBA, FeELBA, AIELBA' nın karakteristik özellikleri biyodizel üretimi sırasında değişiklik göstermektedir. Bu özellikler Tablo 4.7' de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Kesikli sistemde biyolojik arıtmada kullanılan HBA, EBA, FeELBA ve AIELBA' nın karakteristik özellikleri

Ölçülen Parametreler	HBA	EBA	FeELBA	AIELBA
KOİ (mg/L)	362500	15400	27500	29440
TOK (mg/L)	65000	4400	7400	10475
BOİ (mg/L)	211680	14870	18560	18800
TAKM (mg/L)	2748	28	107	1162
Yağ ve Gres (mg/L)	9503	46.5	218	764
NH ₄ -N (mg/L)	0.105	0.132	0.121	0.111
PO ₄ -P (mg/L)	0.90	0.89	0.74	0.68

Tablo 4.8. EBA ile beslenen kesikli sistemde başlangıç KOİ ve AKM konsantrasyonları ile S₀/X₀ oranları ve KOİ giderim hızları

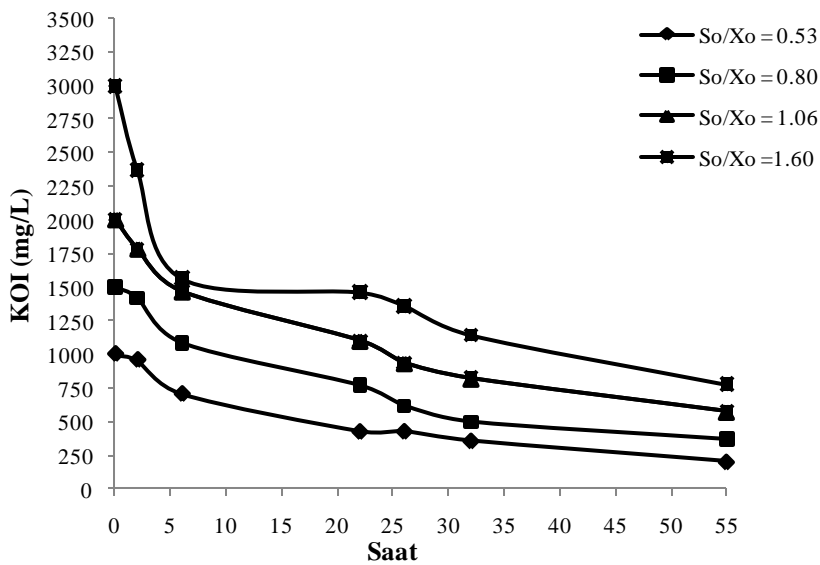
Deney No	S ₀ (mg/L)	X ₀ (mg/L)	S ₀ /X ₀	R _{KOİ} (mg KOİ/L.sa)
1	1350	3500	0.39	81
2	1851	3500	0.53	111
3	2445	3500	0.70	137
4	3296	3500	0.94	184



Şekil 4.11. EBA ile beslenen kesikli sistemde farklı S_0/X_0 oranlarında aktif çamur biyokütlesinin zamanla TOK giderimi

Tablo 4.9. FeELBA ile beslenen kesikli sistemde başlangıç KOİ ve AKM konsantrasyonları ile S_0/X_0 oranları ve KOİ giderim hızları

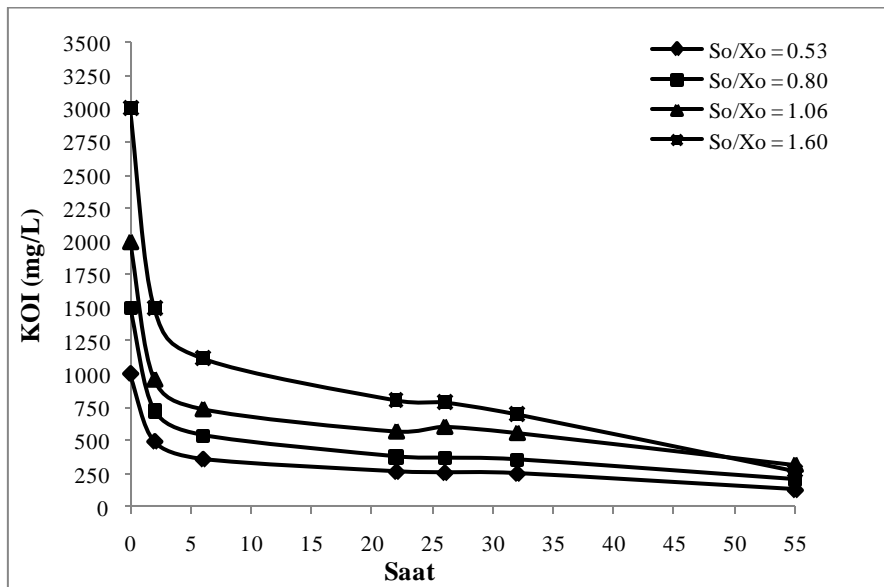
Deney No	S_0 (mg/L)	X_0 (mg/L)	S_0/X_0	R_{KOI} (mg KOİ/L.sa)
1	1000	1875	0.53	36
2	1500	1875	0.80	46
3	2000	1875	1.06	56
4	3000	1875	1.60	96



Şekil 4.12. FeELBA ile beslenen kesikli sistemde farklı S_0/X_0 oranlarında aktif çamur biyokütlesinin zamanla TOK giderimi

Tablo 4.10. AIELBA ile beslenen kesikli sistemde başlangıç KOİ ve AKM konsantrasyonları ile S_0/X_0 oranları ve KOİ giderim hızları

Deney No	S_0 (mg/L)	X_0 (mg/L)	S_0/X_0	$R_{KOİ}$ (mg KOİ/L.sa)
1	1000	1875	0.53	46
2	1500	1875	0.80	70
3	2000	1875	1.06	89
4	3000	1875	1.60	137



Şekil 4.13. AIELBA ile beslenen kesikli sistemde farklı S_0/X_0 oranlarında aktif çamur biyokütlesinin zamanla TOK giderimi

EBA ile beslenen kesikli sistemde başlangıç KOİ ve AKM konsantrasyonları ile S_0/X_0 oranları ve KOİ giderim hızları Tablo 4.8 ve Şekil 4.11 de yer almaktadır. S_0/X_0 oranının en düşük olduğu aktif çamur sisteminde başlangıç KOİ giderim hızı ($R_{KOİ}$) ilk 16 saat için hesaplanmıştır ve 81 mgKOİ/L.sa olmuştur. S_0/X_0 oranı arttıkça başlangıç KOİ giderim hızları sırasıyla 81 mgKOİ/L.sa, 111 mgKOİ/L.sa, 137 mgKOİ/L.sa, 184 mgKOİ/L.sa olmuştur. KOİ giderim hızı, ilk 16 saatte başlangıç KOİ konsantrasyonu arttıkça artış göstermiş daha sonra ise yaklaşık sabit seviyelerde kalmıştır.

FeELBA ile beslenen kesikli sistemde başlangıç KOİ ve AKM konsantrasyonları ile S_0/X_0 oranları ve KOİ giderim hızları Tablo 4.9 ve Şekil 4.12 de yer alan almaktadır. S_0/X_0 oranının en düşük olduğu aktif çamur sisteminde başlangıç KOİ giderim hızı ($R_{KOİ}$) ilk 16 saat için hesaplandığında, 36 mgKOİ/L.sa bulunmuştur. S_0/X_0 oranı arttıkça başlangıç KOİ giderim hızları sırasıyla 36 mgKOİ/L.sa, 46 mgKOİ/L.sa, 56 mgKOİ/L.sa, 96 mgKOİ/L.sa olmuştur. KOİ giderim hızı, ilk 5 saatte başlangıç KOİ konsantrasyonu arttıkça artış göstermiş daha sonra ise yavaşça azalarak sabit seviyelerde kalmıştır.

AIELBA ile beslenen kesikli sistemde başlangıç KOİ ve AKM konsantrasyonları ile S_0/X_0 oranları ve KOİ giderim hızları Tablo 4.10 ve Şekil 4.13 te yer alan almaktadır. S_0/X_0 oranının en düşük olduğu aktif çamur sisteminde başlangıç KOİ giderim hızı ($R_{KOİ}$) ilk 16 saat için, 46 mgKOİ/L.sa bulunmuştur. S_0/X_0 oranı arttıkça başlangıç KOİ giderim hızları sırasıyla 46 mgKOİ/L.sa, 70 mgKOİ/L.sa, 89 mgKOİ/L.sa, 137 mgKOİ/L.sa olmuştur. KOİ giderim hızı, ilk 16 saatte başlangıç KOİ konsantrasyonu arttıkça artış göstermiş daha sonra ise yaklaşık sabit seviyelerde kalmıştır.

BOİ deney sonuçları ve kesikli çalışmalardan elde edilen sonuçlar, EBA ve AIELBA' nın FeELBA' ya göre aktif çamurda arıtılabilirliği daha iyi olacağını göstermektedir. Çalışmanın sonraki aşamalarında bu sebeple sadece EBA ve AIELBA' nın aktif çamur ile arıtılabilirliği incelenmiştir.

4.2.4. Aktif Çamur sistemi ile sürekli işletme çalışmaları

Laboratuvar ölçekli tam karışımli sürekli reaktör, KOİ yükü ($L_{KOİ}$) ve seçilen çamur yaşı (Θ_c) için kararlı durum halinde sisteme giren KOİ konsantrasyonu, atıksu debisi ve sistemin havalandırma bölümü hacminden yararlanılarak hesaplanmıştır. Bu KOİ yükü, kararlı durumda tespit edilen ortalama UAKM konsantrasyonlarına bölünerek çamur yükü (F:M oranı) bulunmuştur (Tablo 4.11). Sürekli reaktör, hidrolik bekleme süresi 4.35 saat alınmış, EBA ve AIELBA' nın debisi 25.92 L/gün olarak işletilmiştir.

Tablo 4.11. Sürekli reaktör işletme koşulu

Θ_c (gün)	L_{KOI} (kgKOİ/m ³ .gün)	F:M oranı (kgKOİ/kgUAKM.gün)	
		EBA	AIELBA
3	4.67	1.87	1.87
5	4.67	1.64	1.65
10	4.67	1.46	1.47
15	4.67	1.33	1.37

Tablo 4.12. Aktif çamur sürekli reaktörde EBA' nın, 4.35 saatlik hidrolik bekleme süresinde ve kararlı halde ortalama kirlilik parametrelerin giriş, çıkış değerleri ve arıtma verimleri

Θ_c (gün)	UAKM (mg/L)	KOİ			TN		
		Giriş (mg/L)	Çıkış (mg/L)	Verim (%)	Giriş (mg/L)	Çıkış (mg/L)	Verim (%)
3	2500	900	120	87	55	25	55
5	2850	900	63	93	55	22	60
10	3200	900	40	96	55	23	58
15	3500	900	24	97	55	18	67

Çamur yaşı 3, 5, 10, 15 gün olacak şekilde işletilen sürekli reaktörde KOİ giderim verimi sırasıyla %87, %93, %96, %97 ve TN giderim verimi %55, %60, %58, %67 olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlar, çamur yaşı arttıkça KOİ ve TN gideriminin arttığını göstermektedir.

Tablo 4.13. Aktif çamur sürekli reaktörde AIELBA' nın, 4.35 saatlik hidrolik bekleme süresinde ve kararlı halde ortalama kirlilik parametrelerin giriş, çıkış değerleri ve arıtma verimleri

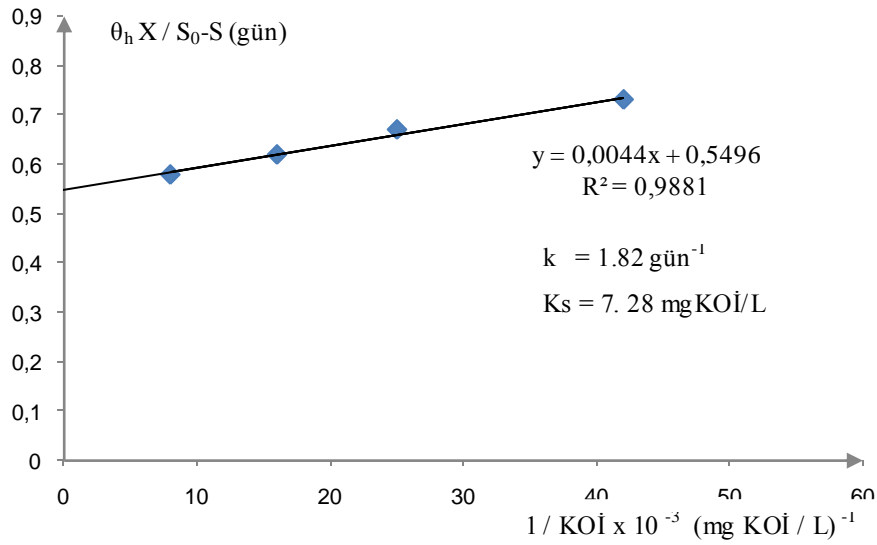
Θ_c (gün)	UAKM (mg/L)	KOİ			TN		
		Giriş (mg/L)	Çıkış (mg/L)	Verim (%)	Giriş (mg/L)	Çıkış (mg/L)	Verim (%)
3	2500	900	60	93	55	35	36
5	2836	900	80	91	55	29	47
10	3178	900	90	90	55	18	67
15	3400	900	88	88	55	10	82

Çamur yaşı 3, 5, 10, 15 gün olacak şekilde işletilen sürekli reaktörde KOİ giderim verimi sırasıyla %93, %91, %90, %88 ve TN giderim verimi %36, %47, %67, %82

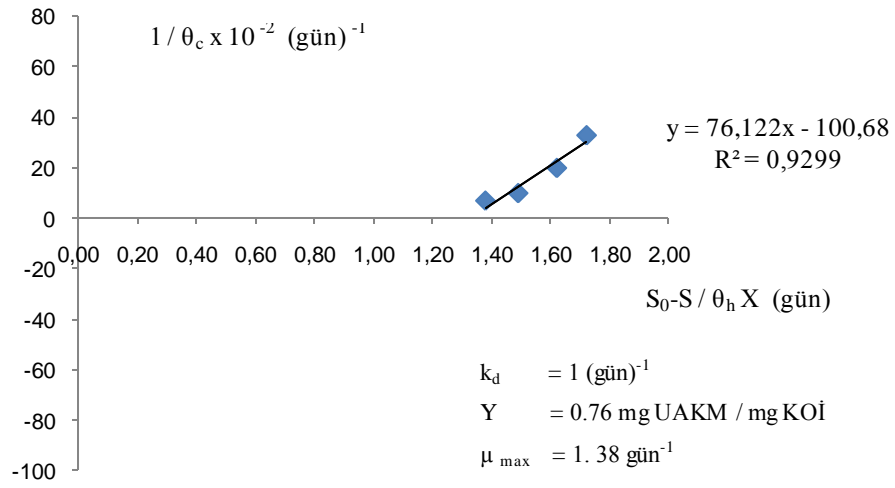
olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlar, çamur yaşı arttıkça KOİ gideriminde anlamlı bir artış olmadığı fakat TN gideriminde artış olduğunu göstermektedir.

4.2.4.1. Sürekli işletmeli aktif çamur sisteminde kinetik katsayıların tayini

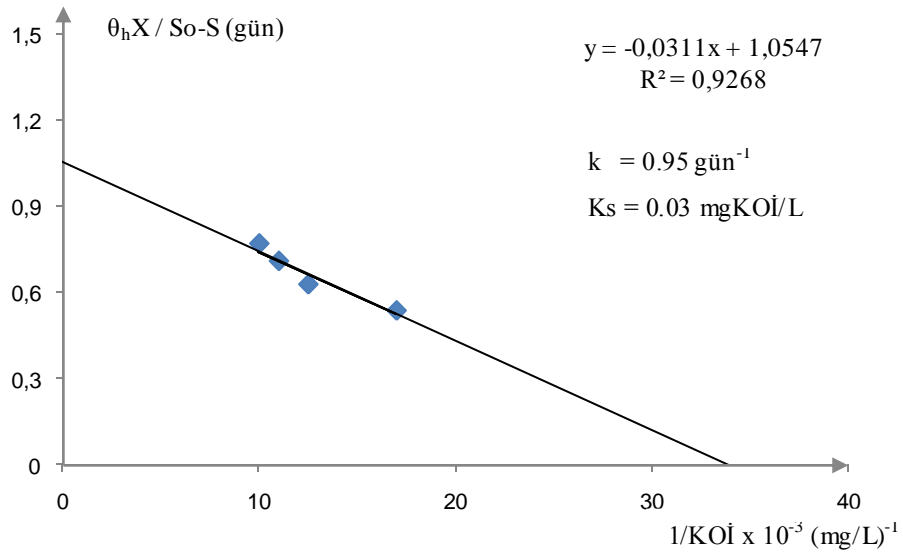
EBA ve ALELBA' nın sürekli işletmeli aktif çamur sistemi ile arıtımında Monod kinetiği kullanılarak maksimum KOİ kullanım hızı (k), yarı doygunluk KOİ konsantrasyonu (K_s), verim katsayısı (Y), ölüm hız katsayısı (k_d) ve maksimum spesifik büyüme hızı (μ_{max}) değerleri hesaplanmıştır. Kinetik parametreler; giriş, çıkış KOİ konsantrasyonları (Tablo 4.12-4.13) baz alınarak grafik metoduyla (Şekil 4.14-4.15-4.16-4.17) hesaplanmış olup, hesaplanan biyokinetik sabitler Tablo 4.14' te verilmiştir.



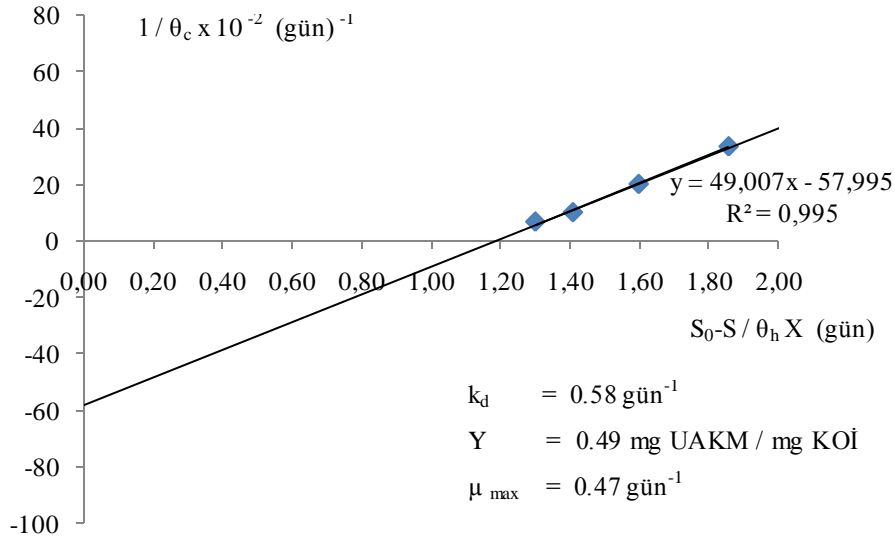
Şekil 4.14. Aktif Çamurda kinetik katsayılar (EBA); k ve K_s ' in grafik ile bulunması



Şekil 4.15. Aktif Çamurda kinetik katsayılar (EBA); k_d ve Y' nin grafik ile bulunması



Şekil 4.16. Aktif Çamurda kinetik katsayılar (AIELBA); k ve K_s ' in grafik ile bulunması



Şekil 4.17. Aktif Çamurda kinetik katsayılar (AIELBA); k_d ve Y' nin grafik ile bulunması

Tablo 4.14. EBA ve AIELBA' nın Sürekli İşletmeli Aktif Çamur Sisteminde Arıtılmasında Hesaplanan Kinetik Katsayılar

Kinetik Katsayılar	EBA	AIELBA
k (gün^{-1}) Maksimum KOİ Kullanım Hızı	1.82	0.95
K_s (mgKOİ/L) Yarı Doygunluk KOİ Konsantrasyonu	7.28	0.03
k_d (gün^{-1}) Ölüm Hızı	1	0.58
Y (mg UAKM / mg KOİ) Verim Katsayısı	0.76	0.49
μ_{\max} (gün^{-1}) Maksimum Spesifik Büyüme Hızı	1.38	0.47

EBA' nın sürekli işletmeli aktif çamur sistemi ile arıtılmasında elde edilen maksimum KOİ kullanım hızı 1.82 gün^{-1} dir. Yarı doygunluk KOİ konsantrasyonu 7.28 mgKOİ/L olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.14). Organik içerikli evsel atıksuların aktif çamur ile arıtılmasında literatürdeki K_s değeri, ortalama 60 mgKOİ/L civarındadır (Metcalf-Eddy, 2003). K_s değerinin literatüre göre düşük olması, aktif çamur biyokütlesinin substrata (yani EBA' ya) ilgisinin yüksek olduğunun bir göstergesi olduğu düşündürmektedir. Verim katsayısı da 0.76 , ölüm hızı ise 1 gün^{-1} olarak hesaplanmıştır. Ölüm hızının yüksek olması, EBA' nın karakteri ile ilişkilidir. EBA' da biyodizel üretiminden kalan reaksiyona girmemiş metil esterleri ve kısa zincirli yağ asitleri bulunmaktadır. EBA' nın içeriğinin kolay parçalanabilen organik

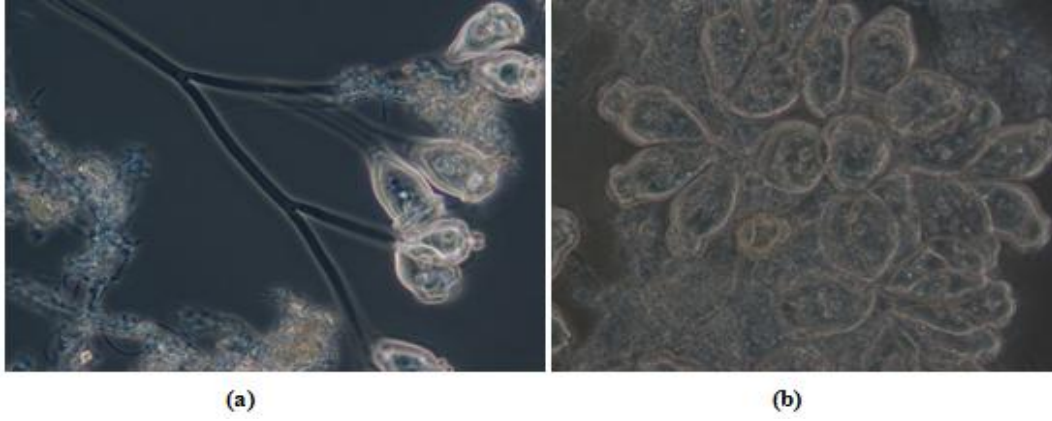
yapıda olması aktif çamur biyokütlesinde bazı türlerin baskın hale gelmesi (*Zooglea ramigera*, *S.natans*, *Actinomyces* ve Fungus) ve tespit edilen bu türlerden (*Actinomyces* ve Fungus) bazılarının sekonder metabolit üretme yeteneklerin varlığıyla açıklanabilir. Bilindiği gibi *Actinomyces* ve funguslar çeşitli antibiyotikler üretmektedir.

AIELBA' nın sürekli işletmeli aktif çamur sistemi ile arıtılmasında elde edilen maksimum KOİ kullanım hızı 0.95 gün^{-1} dır. Yarı doygunluk KOİ konsantrasyonu 0.03 mgKOİ/L olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.14). Ks değerinin literatüre (Metcalf-Eddy, 2003) göre çok düşük olması, aktif çamur biyokütlesinin substrata (yani AIELBA' ya) ilgisinin yüksek olduğunun bir göstergesi olduğu düşünülebilir fakat bu değer tek başına anlamlandırılması doğru değildir. Grafik yolu ile elde edilen kinetik katsayılarından verim katsayısı da 0.49 , ölüm hızı ise 0.58 gün^{-1} olarak hesaplanmıştır. Ölüm hızının yüksek olması, AIELBA' nın karakteri ile ilişkilidir. AIELBA' da elektrokoagülasyon sonrasında Al iyonları ve tuz bulunmaktadır. Bu durumda Al ve tuz, aktif çamur biyokütlesinde bazı türlerin daha baskın olmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Aktif çamurun mikroskop ile gözlenmesi sırasında tespit edilen ve baskın olan türlerin, ağırlıklı olarak fungus türleri olduğu görülmüştür. EBA' da da elde edilen sonuçlarda fungus varlığı net olarak gözlenmiştir. Fakat EBA' da diğer mikroorganizmalar da varlığını sürdürmüştür. Fakat AIELBA' da neredeyse genel olarak boyama ile gözlenebilen türlerin, baskın tür olan funguslardan (Tablo 4.16) ibaret olduğu gözlenmiştir. Fungusların çeşitli antibiyotik üretebilme yetenekleri ve toksik ortama hızlı olarak adapte olabilmeye yetenekleri onların baskın duruma geçmesinin sebebi olduğu düşünülmektedir.

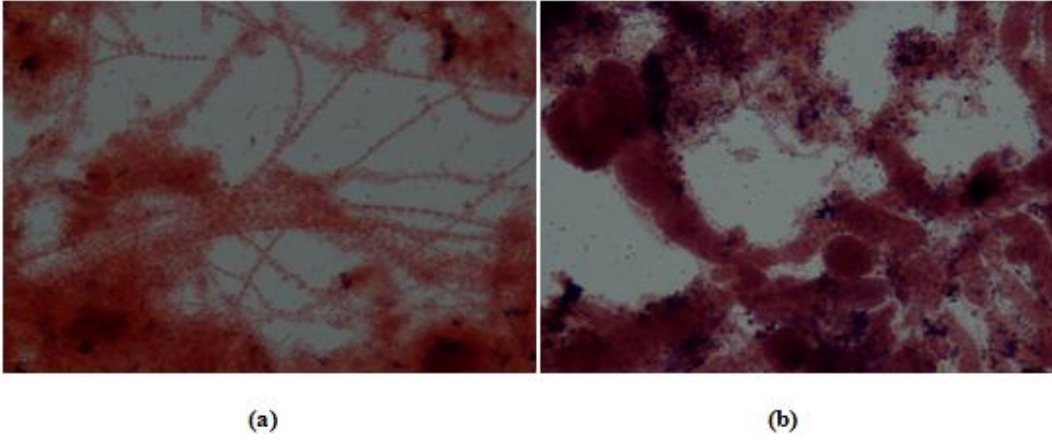
Bu sekonder ürünler, diğer mikroorganizmaları inhibe ederek ölümlerine neden olabileceği sonucuna varılmıştır. Fakat biyoreaktörün işletilmesi sırasında biyokütlenin EBA' da çok hızlı arttığı da UAKM deneyleri ile gözlenmiştir. Fakat AIELBA' da biyokütlenin daha yavaş arttığı da gözlenmiştir. Daha net bir sonuca ulaşmak için respirometrik çalışmalara ihtiyaç vardır. Çünkü biyokinetikler, grafik metodu ile hesaplanmıştır.

4.2.4.2. Aktif Çamur fenotipik identifikasyon

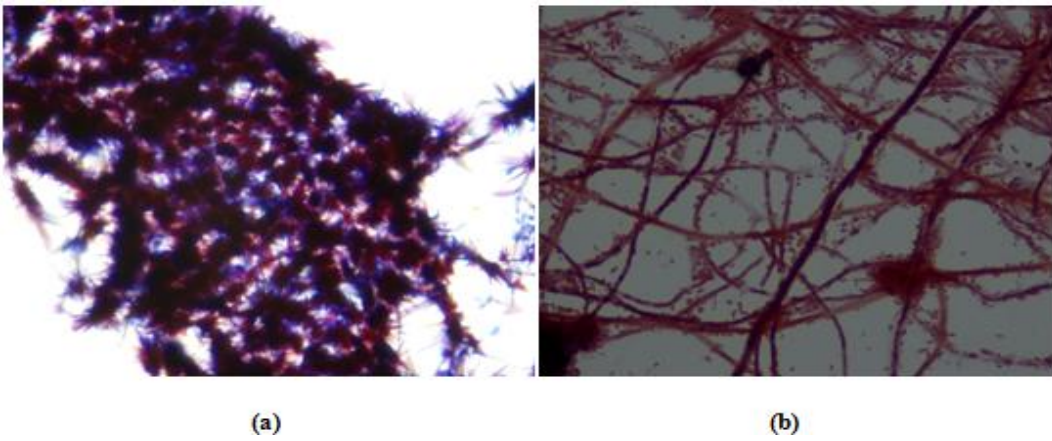
EBA' nın ve AIELBA' nın biyolojik arıtımında kullanılan sürekli işletmeli aktif çamur reaktör sistemi, 2 ay süre ile işletilmiş ve haftalık olarak aktif çamur örneği DNA izolasyonu için toplanarak depolanmıştır. Bu süre boyunca, TOK, TN, AKM, UAKM, SVI parametreleri analiz edilmiştir. Aynı zamanda haftalık olarak fenotipik identifikasyon için EBA ve AIELBA' nın arıtılmasında kullanılan aktif çamurdan hazırlanan preparatlar; Gr, Neisser, PHB boyamaları yapılarak ışık mikroskopunda filamentli bakterilerin teşhis anahtarına (Tablo 3.1) göre tanımlanmış olup (Şekil 4.19-4.20), faz kontrastta canlı olarak gözlenen protozoalara da, Tablo 4.15-4.16 ve Şekil 4.18' de yer verilmiştir.



Şekil 4.18. *Epystilis* sp. kolonisinin aktif çamur flok yapısında görünümü (faz kontrast mikroskobu, 400X), (a) normal işletme şartlarında (b) çamur kabarması meydana geldiğindeki koloniler



Şekil 4.19. Aktif çamurda rastlanan bakteriler (gram boyama, ışık mikroskobu, 1000X), (a) Çamur kabarmasına neden olduğu bilinen filamentli bakteri *S.natans* (b) *Zooglea ramigera*'nin amorf yapısı



Şekil 4.20. *Actinomycetes*'in rozet formu (a), Fungi (b) (gram boyama, ışık mikroskobu, 1000X)

Tablo 4.15. EBA' nın sürekli işletmeli aktif çamur sistemiyle arıtılmasında tespit edilen mikroorganizmalar

Boyama Uygulanmadan Gözlenen Mikroorganizmalar	Aktif Ç.	1. Hafta	2. Hafta	4. Hafta	5. Hafta	6. Hafta	7. Hafta	8. Hafta
Arcella	X	X						
<i>Amoeba proteus</i>	X	X		X				
Paranema	X							
Euglena	X	X		X			X	
Bodo	X	X						
Aspidisca	X	X						
Lecane			X		X			
Tardigradeler	X	X		X			X	
Paramecium	X	X						
Trachelophyllum			X		X		X	X
Chidonella	X	X		X				
Epistylis	X	X	X				X	X
Vorticella	X	X		X				X
Carchesium	X	X		X			X	
Notommata	X	X						
<i>Zooglea ramigera</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
Boyamadan Sonra Gözlenen Filamentli Mikroorganizmalar	Aktif Ç.	1. Hafta	2. Hafta	4. Hafta	5. Hafta	6. Hafta	7. Hafta	8. Hafta
Actinomycetes	X	X	X	X	X	X	X	X
Fungi	X	X	X					
Flexibacter	X	X		X				
<i>N. limicola I</i>			X			X		
<i>N. limicola II</i>	X	X		X	X	X	X	
<i>Snatans</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Thiotrix</i>			X					
<i>Beggiatoa</i>	X	X						
<i>M. parvicella</i>	X	X						
Tip 1701	X	X						
Tip 0092	X	X	X		X	X	X	X
Tip 021N				X	X			
Tip 1863				X				
Tip 0914							X	
Tip 0803	X	X						

Tablo 4.16. AIELBA' nın sürekli işletmeli aktif çamur sistemiyle arıtılmasında tespit edilen mikroorganizmalar

Boyama Uygulanmadan Gözlenen Mikroorganizmalar	Aktif Ç	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	5. Hafta	6. Hafta	7. Hafta	8. Hafta
Arcella	X	X	X						
<i>Amoebae proteus</i>	X	X	X						
Euglena		X			X				X
Bodo		X							
Lecane	X		X			X			X
Paramecium	X	X							
Euchlanis sp.	X	X							
Epistylis sp.	X		X		X	X		X	
Vorticella	X	X				X			X
Carchesium	X	X					X		
Nematodlar					X				
Notommata		X							
<i>Zooglea ramigera</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Boyamadan Sonra Gözlenen Filamentli Mikroorganizmalar	Aktif Ç	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	5. Hafta	6. Hafta	7. Hafta	8. Hafta
Actinomycetes	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fungi		X	X	X	X	X	X	X	X
Flexibacter	X								
<i>N. limicola I</i>	X		X				X		
<i>N. limicola II</i>				X	X	X	X	X	X
<i>N. limicola III</i>	X			X					
<i>Gordona amarae</i>			X						
<i>S.natans</i>				X	X				
Tip 1701		X							

4.2.4.3. Aktif Çamur' un mikrobiyolojik yapısı

EBA' nın aktif çamur sistemi ile arıtılmasında aktif çamur flok yapısının değişken olduğu görünmektedir. Ayrıca Karaman Biyolojik Arıtma Tesisinden temin edilen aktif çamur örneğindeki bazı mikroorganizmaların biyoreaktörde üremeye devam ettikleri gözlenmiştir. Bu mikroorganizmaların bazıları çamur kabarmasına sebeptir. Fakat çalışma süresince sisteme, bu mikroorganizmaları yok etmek için herhangi bir müdahale yapılmamıştır.

Haftalık olarak alınan numunelerde yapılan canlı mikroskopik incelemelerde aktif çamur flok yapısının zengin bir mikrobiyolojik yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Flok yapıcı *Zooglea ramigera* aktif çamurda yer almaktadır. Çamur kabarmasına bağlı olarak çeşitli protozoa, rotifer ve ender olarak da nematodlara rastlanmıştır. Kamçılı protozoalardan *Bodo* spp. ve *Aspidisca* spp. ve silli protozoalardan *Paramecium* spp. ye rastlanmıştır. Saplı protozoaların, sistemin iyi işlediği durumlarda sayılarını arttırdığı gözlenmiştir. Bunlar arasında; *Epistylis* spp., *Vorticella* spp., *Carshesium* spp. yer almaktadır.

Metazoa grubundan olan rotiferlerin sayısının zaman zaman arttığı gözlenmiştir. Bu artış özellikle çamur kabarmasının meydana geldiği zamanda olmaktadır.

Aktif çamurda zaman zaman rastlanan Nematodlar, çamur yaşlandığının bir göstergesidir.

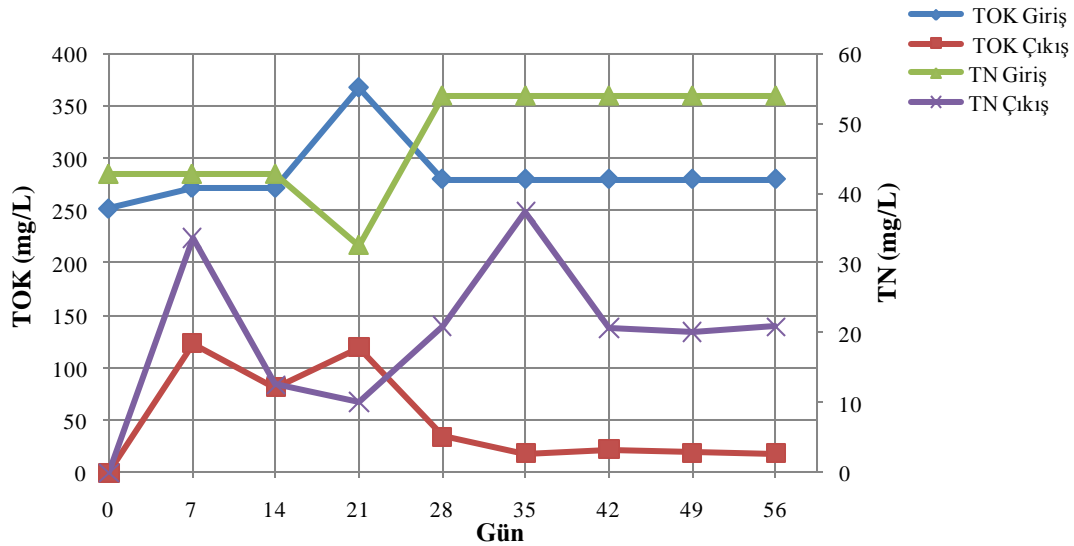
Filamentli mikroorganizmaları içeren preparatlar, boyama yapılarak mikroskopta incelenmiş ve literatürdeki filamentli bakteri tanımlarıyla karşılaştırılarak teşhis edilmiştir (Övez ve ark. 2006). Biyoreaktörde haftalık yapılan incelemelerde *Actinomyces*, *S.natans*, ve Tip 0092' nin sürekli olarak ortamda varlığını sürdürdüğü *N.limicola* II ve Tip 021N de zaman zaman bulunduğu tespit edilmiştir. Ortamda *Actinomyces* ve *S.natans* varlığının sebebi ortamda küçük moleküllü organik bileşenlerin fazla olması ile ilişkili bir durumdur. Çünkü yeterli miktarda O₂, N ve P mevcuttur. Tip 0092' nin fizyoloji ile ilgili literatürdeki bilgiler yetersizdir. Endüstriyel tesislerde su ile floklar arasında serbest olarak buldukları gözlenmiştir.

N.limicola II ve Tip 021N' nin organik atık mevcudiyetinde geliştiği bilinmektedir (Övez ve ark. 2006). Aktif çamurda ökaryotik mikroorganizmalardan Fungi' ye de zaman zaman rastlanmıştır.

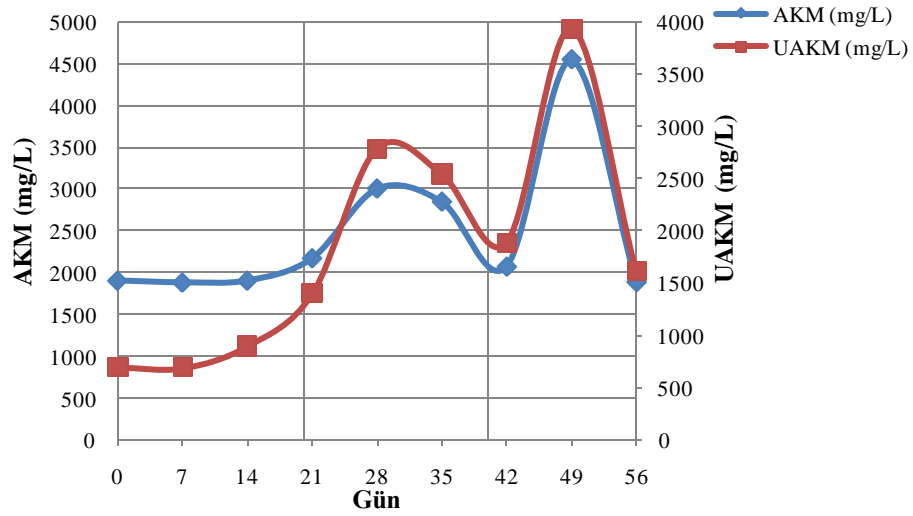
AIELBA' nın aktif çamur sistemi ile arıtılmasında aktif çamur flok yapısının EBA' nın arıtılması ile kıyaslandığında daha az çeşitlilik gösterdiği görünmektedir. Ayrıca Karaman Biyolojik Arıtma Tesisinden temin edilen aktif çamur örneğinde filamentli mikroorganizma çok az olduğu gözlenmiştir.

AIELBA' nın arıtılması sırasında haftalık olarak alınan numunelerde yapılan mikroskopik incelemelerde fungus ve *N. limicola* II varlığı sürekli olarak gözlenmiştir. Flok yapıcı *Zooglea ramigera* aktif çamurda yer almaktadır. Saplı protozoalardan *Epistylis* spp., *Vorticella* spp. gözlenmiştir. Özellikle *Epistylis* spp. varlığının zamanla arttığı görülmüştür.

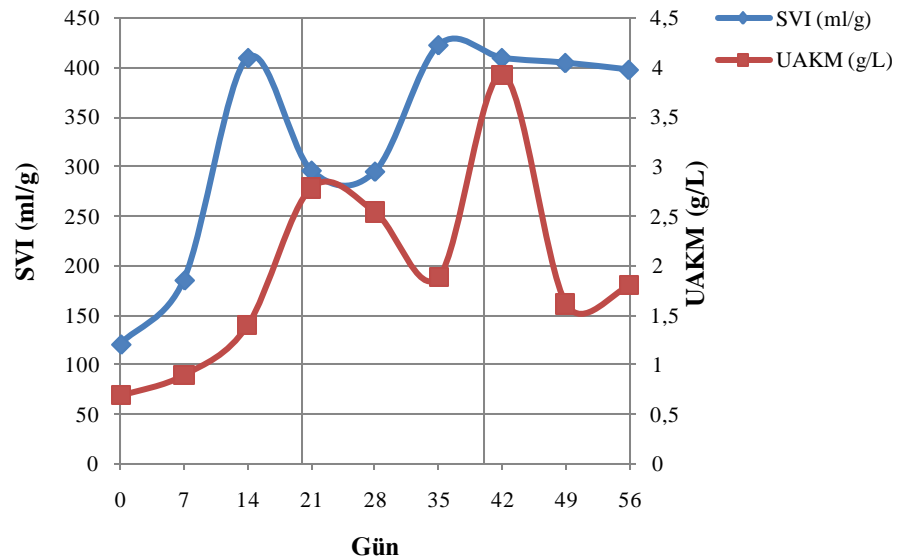
Bu çalışmalara paralel olarak TOK, TN, AKM, UAKM, SVI parametreleri analiz edilmiş ve sonuçlar aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Aktif çamur sisteminde (EBA' nın arıtılmasında) TOK, TN giriş ve çıkış konsantrasyonlarının zamanla değişimi



Şekil 4.22. Aktif çamur sisteminde (EBA'nın arıtılmasında) AKM ve UAKM konsantrasyonlarının zamanla değişimi



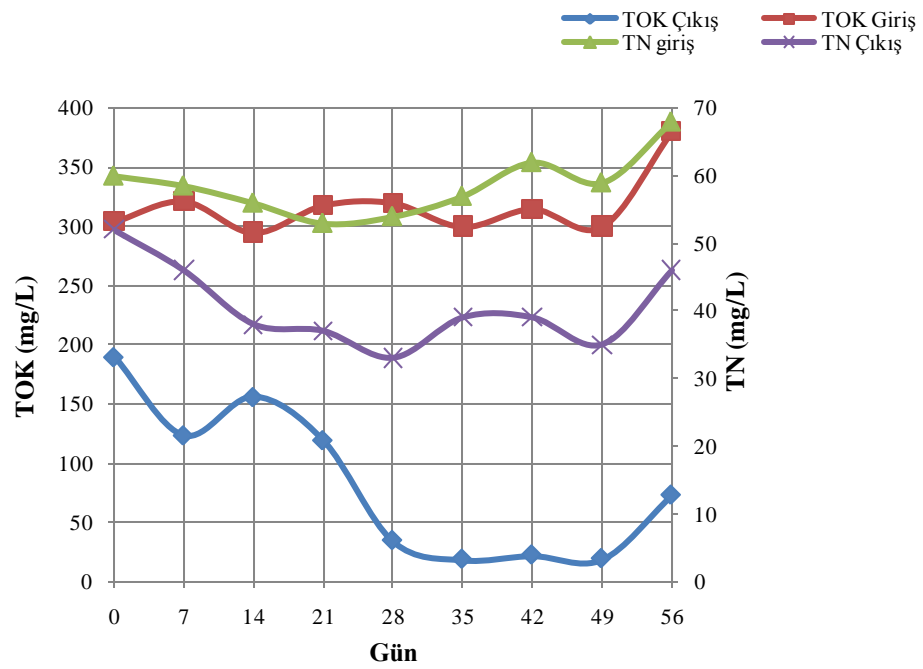
Şekil 4.23. Aktif çamur sisteminde (EBA'nın arıtılmasında) SVI ve UAKM'nin zamanla değişimi

Sistemin işletilmesi esnasında TOK girişi değerinde 250-350 mg/L (Şekil 4.21) arasında değişimler meydana gelmiştir bu durumun nedeni atıksuyun hafif yağlı yapısından kaynaklanmaktadır. Atıksu sistemde kullanıldıkça altta kalan atıksu daha stabil hale gelmiştir. Bu duruma bağlı olarak da TN giriş değeri ayarlanmıştır.

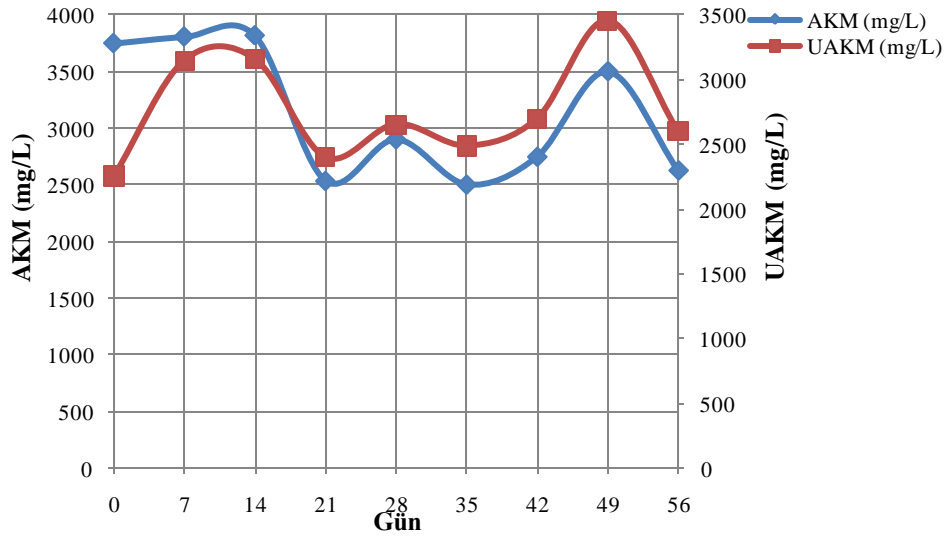
TOK'un çıkış değeri 2. ayda daha stabil hale gelmiştir. Yine TN çıkış değeri daha dinamik bir yapı göstermektedir. Bunun sebebi biyokütlenin 2500-3000 mg/L arasında kalması için düzenli olarak atılan aktif çamur olduğu düşünülmektedir.

Çünkü ototrofik biyokütle heterotrofik biyokütleyle göre daha uzun zamanda çoğalmaktadır.

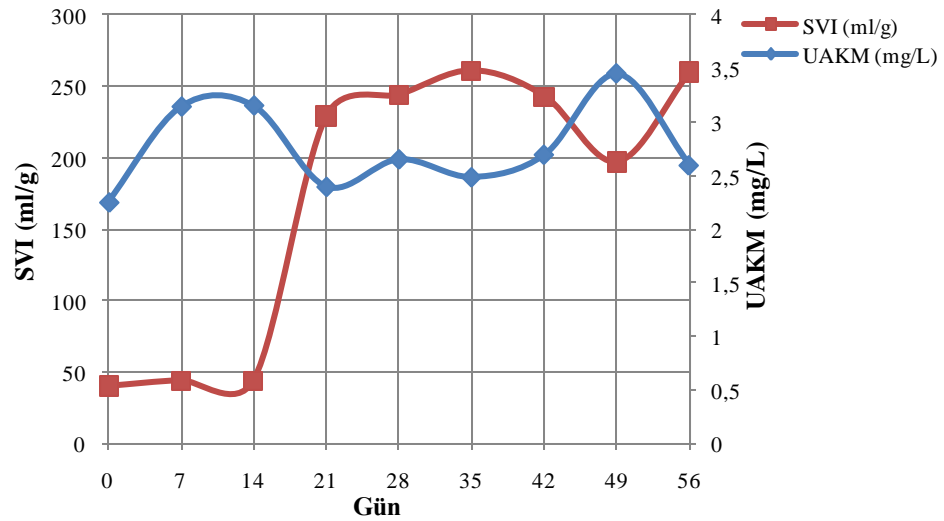
SVI değerleri 120-425 (Şekil 4.23) arasında değişmektedir. SVI değerinin artışına paralel olarak filamentli mikroorganizmalar da artmış ve filamentli çamur kabarması meydana gelmiştir. Bunun sebebinin EBA' nın karakterinden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca laboratuvar ortamında geri devirli sürekli reaktör çalışmalarında çamur kabarması bir dezavantaj olarak meydana gelmektedir.



Şekil 4.24. Aktif çamur sisteminde (AIELBA' nın artırılmasında) TOK, TN giriş ve çıkış konsantrasyonlarının zamanla değişimi



Şekil 4.25. Aktif çamur sisteminde (EBA' nın arıtılmasında) AKM ve UAKM konsantrasyonlarının zamanla değişimi



Şekil 4.26. Aktif çamur sisteminde (EBA' nın arıtılmasında) SVI ve UAKM' nin zamanla değişimi

AIELBA' nın arıtılmasında sürekli reaktörün işletilmesi esnasında TOK girişi değerinde 300-380 mg/L arasında değişmektedir. Bu duruma bağlı olarak da TN giriş değeri 53-68 mg/L olarak ayarlanmıştır.

TOK' un çıkış değeri 2. Ayda daha stabil hale gelmiştir. Yine TN çıkış değeri daha dinamik bir yapı göstermektedir. Bunun sebebi biyokütlenin 2500-3000 mg/L arasında kalması için düzenli olarak atılan aktif çamur olduğu düşünülmektedir.

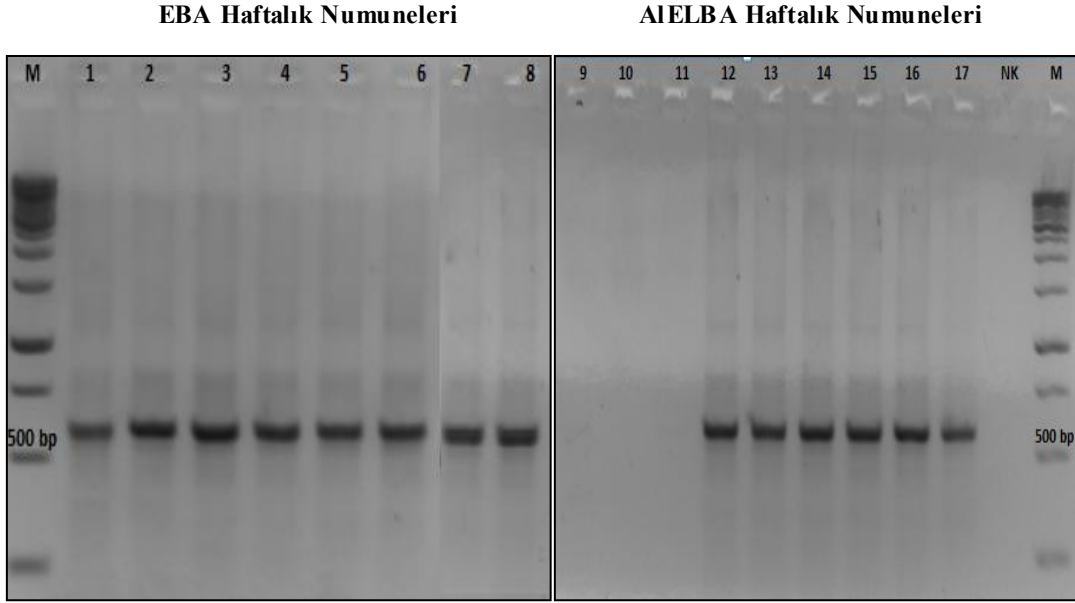
Çünkü ototrofik biyokütle heterotrofik biyokütleyle göre daha uzun zamanda çoğalmaktadır.

SVI değerleri 40-261 (Şekil 4.26) arasında değişmektedir. SVI değerinin artışına paralel olarak filamentli funguslar da artmış ve fungal çamur kabarması meydana gelmiştir. Bunun sebebinin AIELBA' nın toksik karakterinden olduğu düşünülmektedir.

4.2.5. Aktif Çamurdaki mikroorganizmaların moleküler tanısına yönelik çalışmalar

4.2.5.1. EBA ve AIELBA' nın arıtılmasında kullanılan aktif çamurun PZR ile genetik tanısı

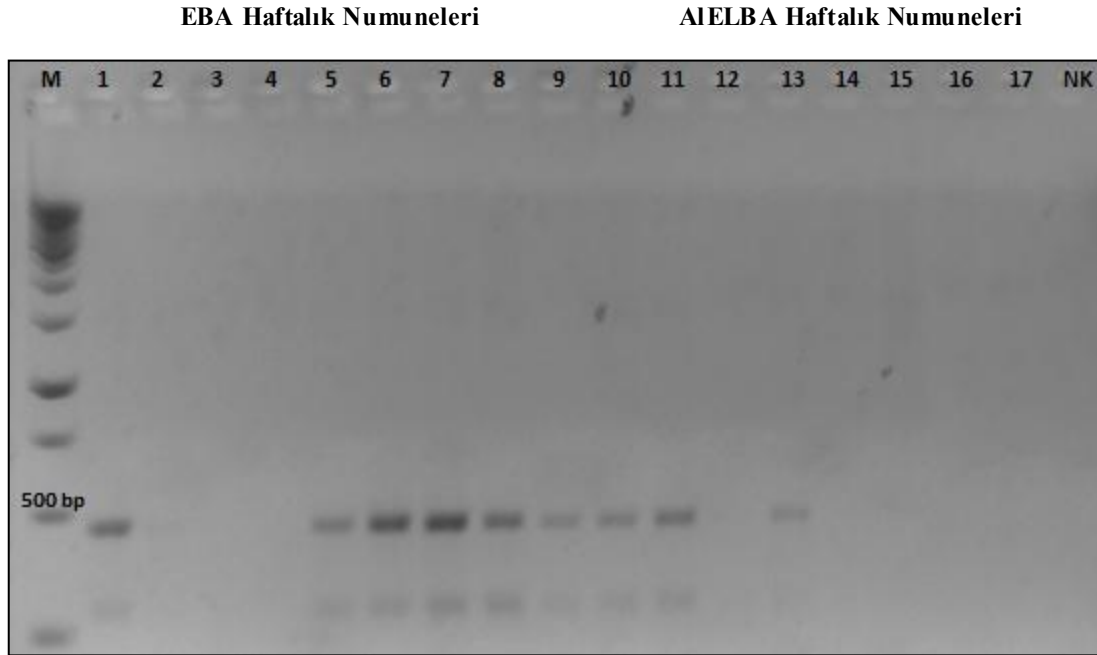
Aktif Çamurun tanısında Tablo 3.2' de belirtilen sekiz farklı primer seti kullanıldığında beklenen boyutlarda bantlar elde edildi. 341f, 341f-GC, 926r primerleri (filamentli bakterilere ait) ile yapılan uygulamada 585 bç' lik (Şekil 4.27); CTO189f, CTO654r primerleri (Amonyak Okside Eden bakterilere ait) ile yapılan uygulamada 485 bç' lik (Şekil 4.28); 27f, 1492r primerleri (bakteriye ait) ile yapılan uygulamada 1505 bç' lik (Şekil 4.29); Ac436f, Ac676r primerleri (*Acinetobacter*' e ait) ile yapılan uygulamada 1500-240 bç' lik (Şekil 4.30); F243, R1378, F984GC primerleri (*Actinomyces*' e ait) ile yapılan uygulamada 1175-433 bç' lik (Şekil 4.31); 530F, 1392R universal primerler ile yapılan uygulamada 862 bç' lik (Şekil 4.32); nu-SSU-0817-5', nu-SSU-1196-3' primerleri (fungi' ye ait) ile yapılan uygulamada 422 bç' lik (Şekil 4.33); nu-SSU-0817-5', nu-SSU-1536-3' primerleri (fungi' ye ait) ile yapılan uygulamada 762 bç' lik (Şekil 4.34); Vf, Vr primerleri (bakteriye ait) ile yapılan uygulamada 193 bç' lik (Şekil 4.35) bantlar elde edildi.



Şekil 4.27. EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun 341f, 341f-GC, 926r primerleri ile yapılan PZR analizi. M: Markır, NK: Negatif Kontrol, 1: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 2: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 3: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 4: 4. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 5: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 6: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 7: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 8: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 9: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 10: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 11: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 12: 3. Hafta Aktif Çamur Numunesi 13: 14. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 16: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 17: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi

Şekil 4.27' de EBA ve AIELBA' nın aktif çamur ile yapılan arıtma çalışmalarında filamentli bakterilerin varlığı net olarak görülmektedir (-585 bç bant elde edilmiştir). 9, 10, 11 numuneleri (başlangıç ve ilk 2 hafta AIELBA ile arıtılması) ise filamentli bakterilerin ortamda bulunmadığının gözlemlendiği numunelerdir. Bunun sebebinin Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen aşı aktif çamurun iyi olmamasından kaynaklanmaktadır. Bu durum, mikroskopik gözlemlerle de paralellik göstermektedir (Tablo 4.15-4.16).

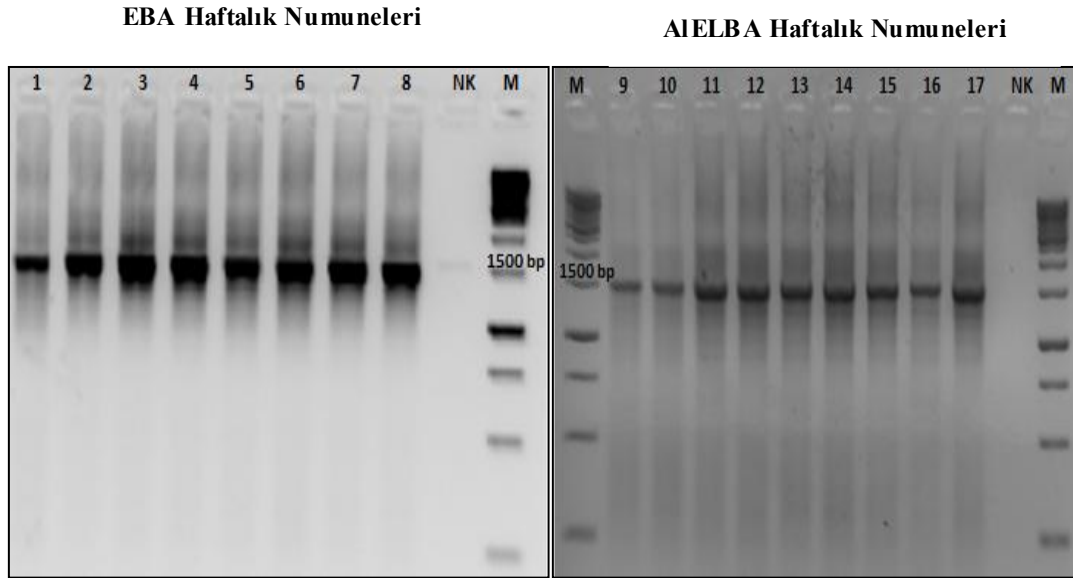
CTO189f, CTO654r primerleri (Amonyak Okside Eden bakterilere ait) ile yapılan uygulamada 485 bç' lik (Şekil 4.28) bantlar elde edildi.



Şekil 4.28. EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun CTO189f, CTO654r primerleri ile yapılan PZR analizi. M: Markır, NK: Negatif Kontrol, 1: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 2: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 3: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 4: 4. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 5: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 6: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 7: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 8: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 9: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 10: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 11: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 12: 3. Hafta Aktif Çamur Numunesi 13: 14. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 16: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 17: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi

Şekil 4.28' de EBA ve AIELBA aktif çamur ile yapılan arıtma çalışmalarında amonyak okside eden bakterilerin (AOB) varlığı görülmektedir (~485 bç bant elde edilmiştir). 2, 3, 4 numunelerinde AOB' lerin üremelerin yavaş olması (ototrofik bakteriler) sebebiyle varlıklarının gözlenememesi ilerleyen haftalarda EBA ve AIELBA aktif çamur ile yapılan arıtma çalışmalarında AOB' ların varlığı net olarak gözlenmesi ile sonuçlanmıştır (5, 6, 7, 8). 9, 10, 11 numunelerindeki varlığının sebebi yine ortamda önceden bulunmaları ve ilerleyen haftalarda AIELBA' nın bu mikroorganizmalara toksik etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Bu mikroorganizmaların varlığı mikroskopik olarak gözlenememekte ve özel besiyerleri ile izole edilebilmektedir. Fakat PZR ile varlığı kalitatif olarak saptanabilmektedir.

27f, 1492r primerleri (bakteriye ait) ile yapılan uygulamada 1500 bç' lik (Şekil 4.28) bantlar elde edildi.



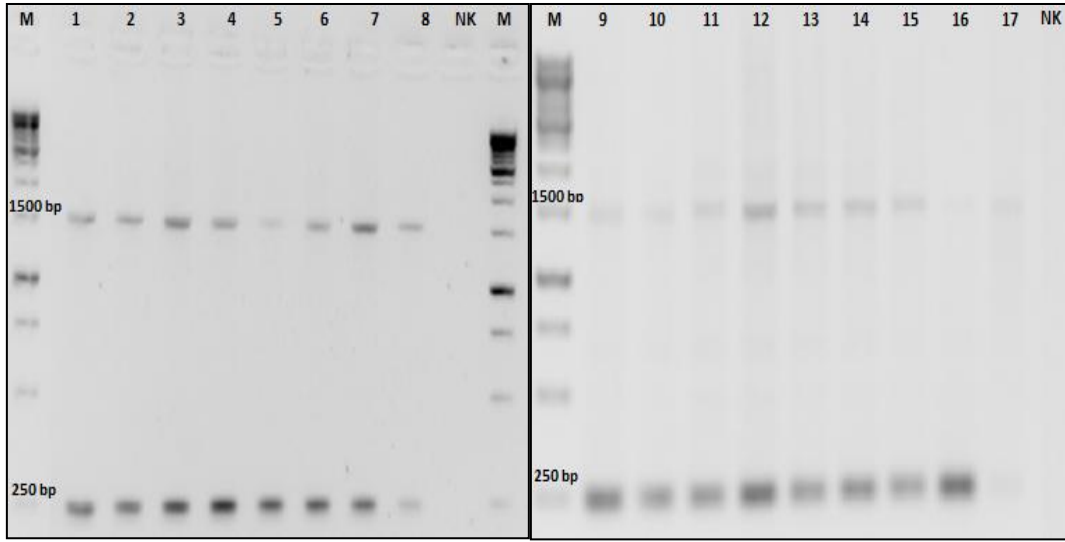
Şekil 4.29. EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun 27f, 1492r primerleri ile yapılan PZR analizi. M: Markır, NK: Negatif Kontrol, 1: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 2: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 3: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 4: 4. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 5: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 6: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 7: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 8: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 9: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 10: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 11: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 12: 3. Hafta Aktif Çamur Numunesi 13: 14. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 16: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 17: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi

Şekil 4.29' de EBA ve AIELBA aktif çamur ile yapılan arıtma çalışmalarında bakterilerin varlığı görülmektedir (-1505 bç bant elde edilmiştir). Elde edilen PZR ürünü, Nested PZR olarak *Acinetobacteria* tayininde kullanılmıştır.

27f, 1492r primerleri kalıp olarak kullanılarak (Nested PZR) Ac436f, Ac676r primerleri (*Acinetobacter*' e ait) ile yapılan uygulamada 1500-240 bç' lik (Şekil 4.30) bantlar elde edildi.

EBA Haftalık Numuneleri

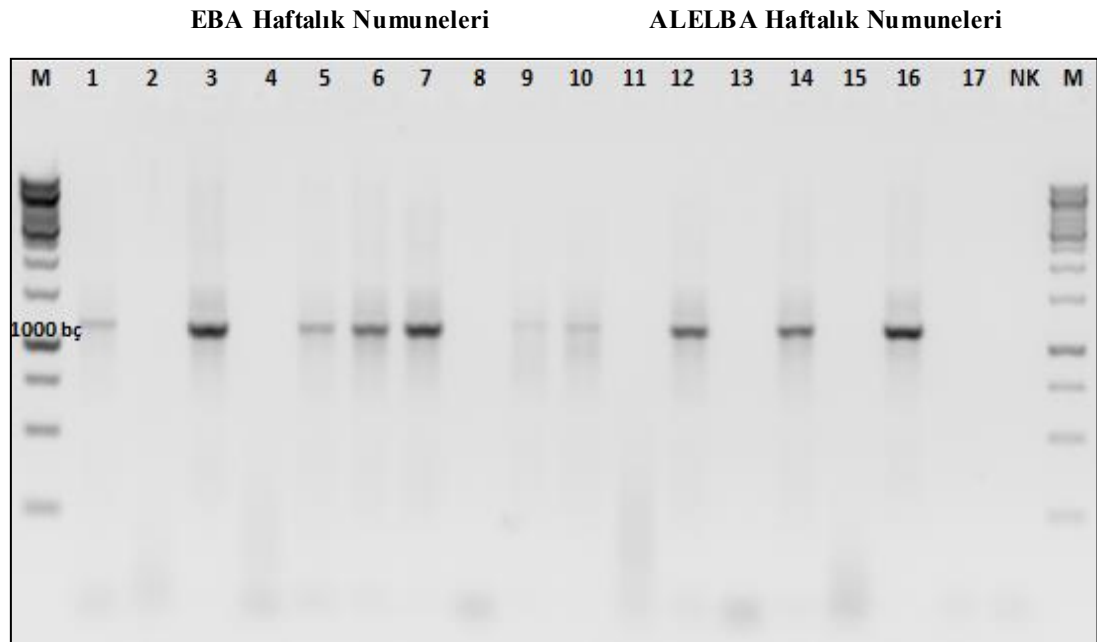
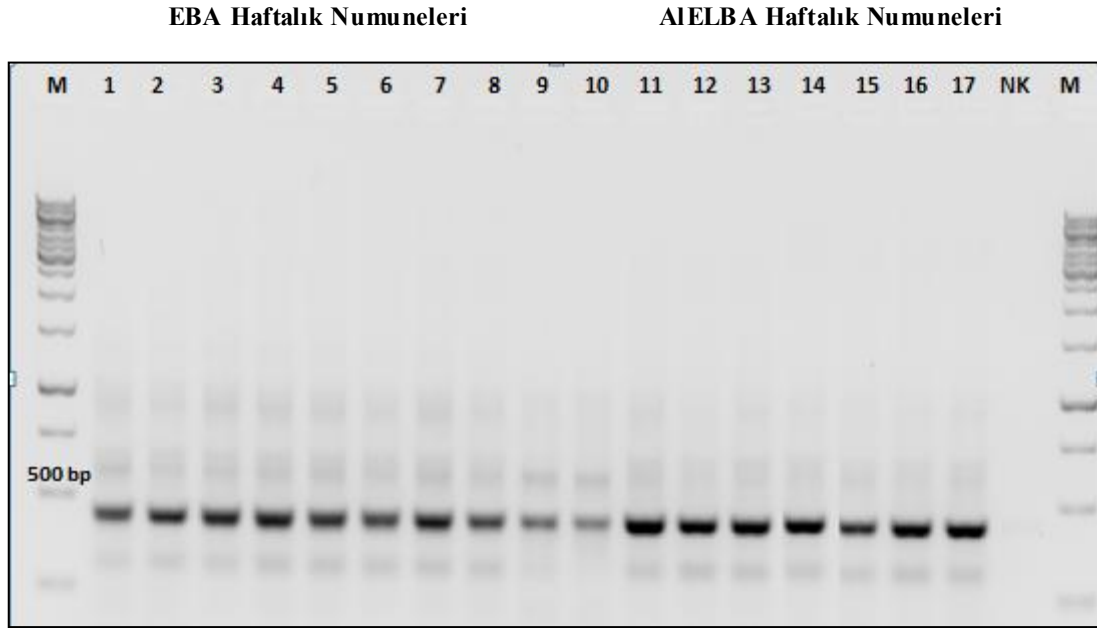
AIELBA Haftalık Numuneleri



Şekil 4.30. EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun Ac436f, Ac676r, primerleri ile yapılan PZR analizi. M: Markır, NK: Negatif Kontrol, 1: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 2: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 3: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 4: 4. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 5: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 6: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 7: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 8: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 9: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 10: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 11: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 12: 3. Hafta Aktif Çamur Numunesi 13: 14. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 16: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 17: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi

Şekil 4.30' da EBA ve AIELBA aktif çamur ile yapılan arıtma çalışmalarında *Acinetobacteria* varlığı görülmektedir (-1500-250 bç bant elde edilmiştir).

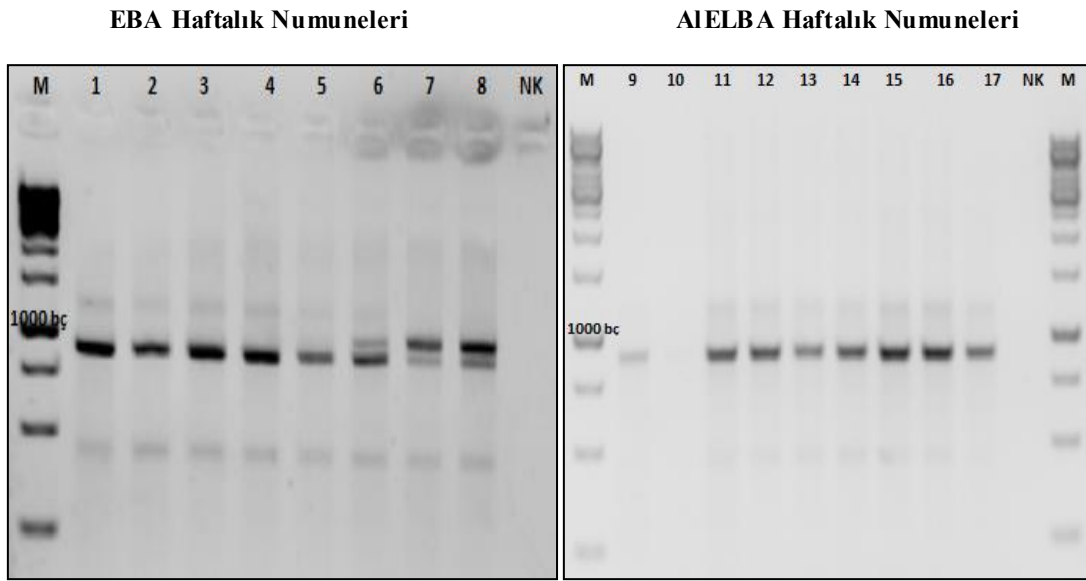
F243, R1378, F984GC primerleri (*Actinomyces*' e ait) ile yapılan uygulamada 433-1175 bç' lik (Şekil 4.31) bantlar elde edildi.



Şekil 4.31. EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) artırılmasında kullanılan aktif çamurun F243, R1378, F984GC primerleri ile yapılan PZR analizi. M: Markır, NK: Negatif Kontrol, 1: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 2: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 3: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 4: 4. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 5: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 6: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 7: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 8: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 9: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 10: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 11: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 12: 3. Hafta Aktif Çamur Numunesi 13: 14. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 16: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 17: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi

Şekil 4.31' de EBA ve AIELBA aktif çamur ile yapılan arıtma çalışmalarında *Actinomyces* varlığı görülmektedir (-433-1175 bç bant elde edilmiştir). *Actinomyces*' lerin varlığı mikroskopik gözlemlerle de gözlenmiştir (Tablo 4.15-4.16).

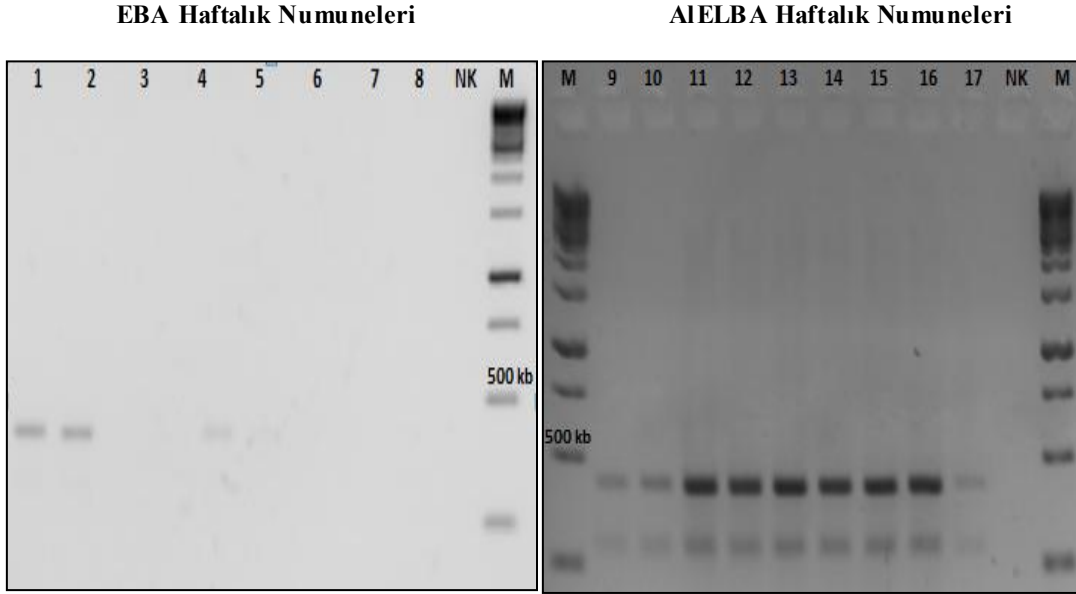
530F, 1392R universal primerler ile yapılan uygulamada 862 bç' lik (Şekil 4.32) bantlar elde edildi.



Şekil 4.32. EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun 530F, 1392R primerleri ile yapılan PZR analizi. M: Markır, NK: Negatif Kontrol, 1: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 2: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 3: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 4: 4. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 5: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 6: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 7: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 8: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 9: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 10: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 11: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 12: 3. Hafta Aktif Çamur Numunesi 13: 14. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 16: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 17: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi

Şekil 4.32' de EBA' da tüm numunelerde-862 bç bant elde edilmiştir. AIELBA' da ise başlangıç ve ilk hafta hariç diğer haftalarda -862 bç bant elde edilmiştir.

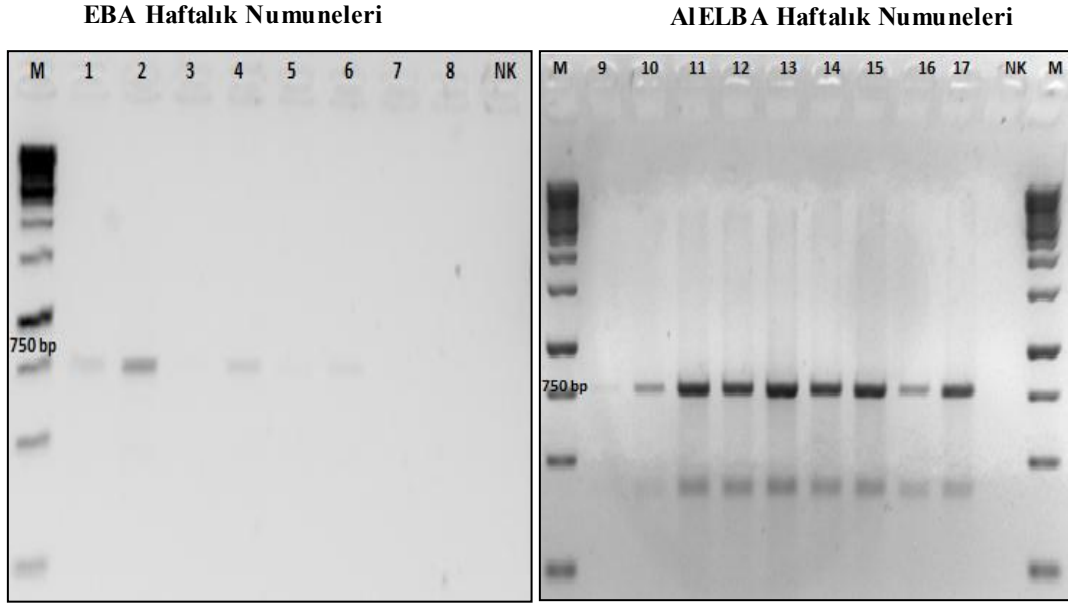
nu-SSU-0817-5', nu-SSU-1196-3' primerleri (fungi' ye ait) ile yapılan uygulamada 422 bç' lik (Şekil 4.33) bantlar elde edildi.



Şekil 4.33. EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun nu-SSU-0817-5', nu-SSU-1196-3' primerleri ile yapılan PZR analizi. M: Markır, NK: Negatif Kontrol, 1: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 2: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 3: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 4: 4. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 5: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 6: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 7: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 8: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 9: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 10: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 11: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 12: 3. Hafta Aktif Çamur Numunesi 13: 4. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 14: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 16: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 17: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi

Şekil 4.33' de EBA ve AIELBA aktif çamur ile yapılan arıtma çalışmalarında fungus varlığı görülmektedir (-422 bç bant elde edilmiştir). EBA aktif çamur numunelerinde fungus varlığının AIELBA' ya göre oldukça az olduğu bantların jeldeki görüntüsünden anlaşılmaktadır. AIELBA da ise fungus varlığı oldukça belirgin olarak elde edilmiş, fungus varlığı mikroskopik olarak da gözlenmiştir.

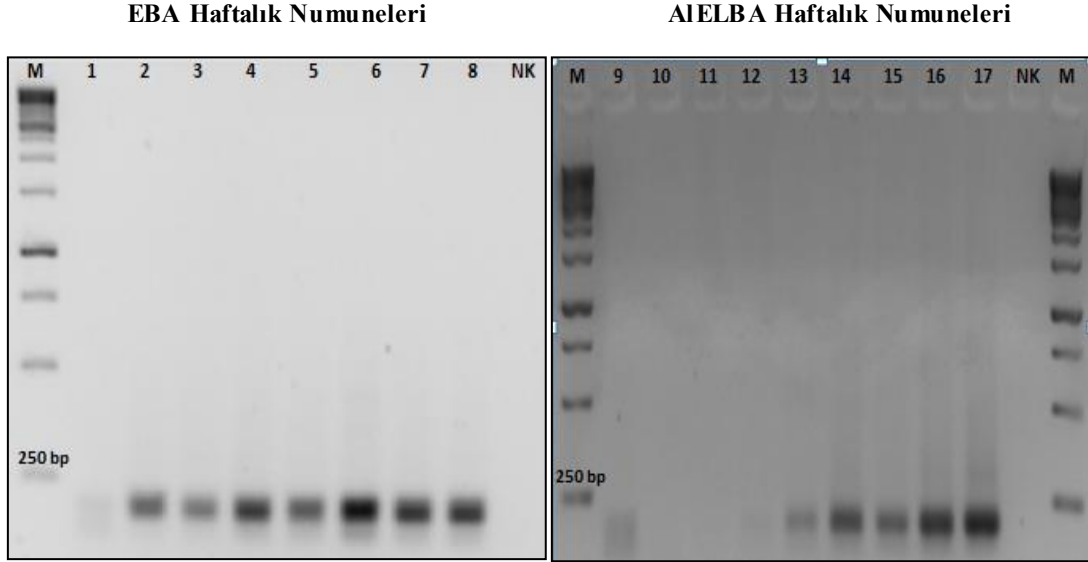
nu-SSU-0817-5', nu-SSU-1536-3' primerleri (fungi' ye ait) ile yapılan uygulamada 762 bç' lik (Şekil 4.34) bantlar elde edildi.



Şekil 4.34. EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun nu-SSU-0817-5', nu-SSU-1536-3' primerleri ile yapılan PZR analizi. M: Markır, NK: Negatif Kontrol, 1: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 2: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 3: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 4: 4. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 5: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 6: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 7: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 8: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 9: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 10: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 11: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 12: 3. Hafta Aktif Çamur Numunesi 13: 14. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 16: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 17: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi

Şekil 4.34' te EBA ve AIELBA aktif çamur ile yapılan arıtma çalışmalarında fungus varlığı görülmektedir (~762 bç bant elde edilmiştir). EBA aktif çamur numunelerinde fungus varlığının AIELBA' ya göre oldukça az olduğu bantların jeldeki görüntüsünden anlaşılmaktadır.

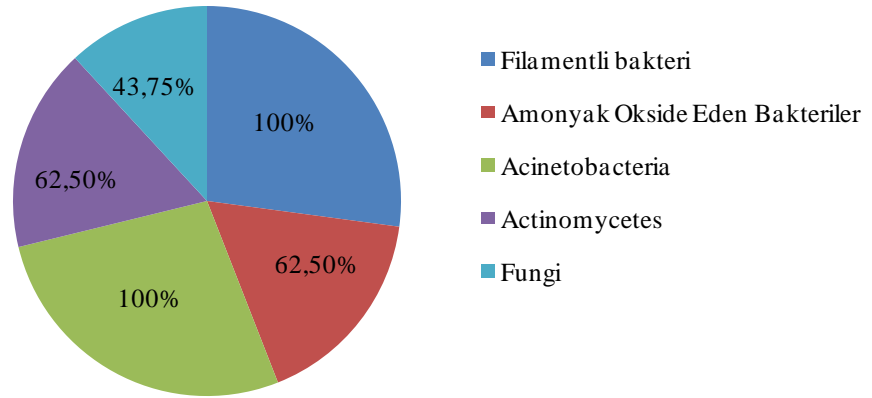
Vf, Vr primerleri (bakteriye ait) ile yapılan uygulamada 193 bç' lik (Şekil 4.35) bantlar elde edildi.



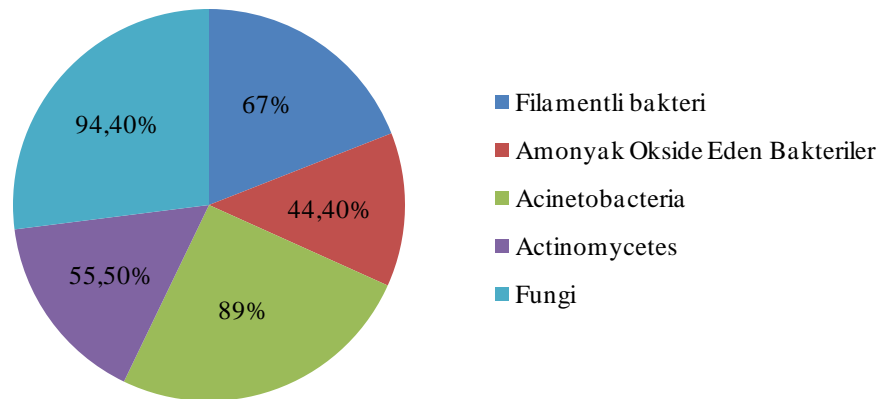
Şekil 4.35. EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun Vf, Vr primerleri ile yapılan PZR analizi. M: Markır (1kb), NK: Negatif Kontrol, 1: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 2: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 3: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 4: 4. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 5: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 6: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 7: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 8: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 9: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 10: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 11: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 12: 3. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 13: 14. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 16: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 17: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi

Şekil 4.35' te EBA ve AIELBA aktif çamur ile yapılan arıtma çalışmalarında bakteri varlığı görülmektedir (-193 bç bant elde edilmiştir). EBA aktif çamur numunelerinde bakteri varlığının başlangıç haftası hariç oldukça yoğun olduğu, AIELBA' da ise ilk üç hafta bakterilerin neredeyse ortamda bulunmadıkları sonraki haftalarda ise arttığı görülmektedir.

EBA ve AIELBA' nın sürekli tam karışimli geri devirli biyoreaktörde arıtılmasında 2 ay süresince haftalık alınan numunelerde mikroorganizma dağılımları Şekil 4.36 ve 4.37' de gösterilmiştir.



Sekil 4.36. EBA' nın sürekli tam karışimli geri devirli biyoreaktörde arıtılmasında 2 ay süresince haftalık alınan numunelerde mikroorganizma dağılımları



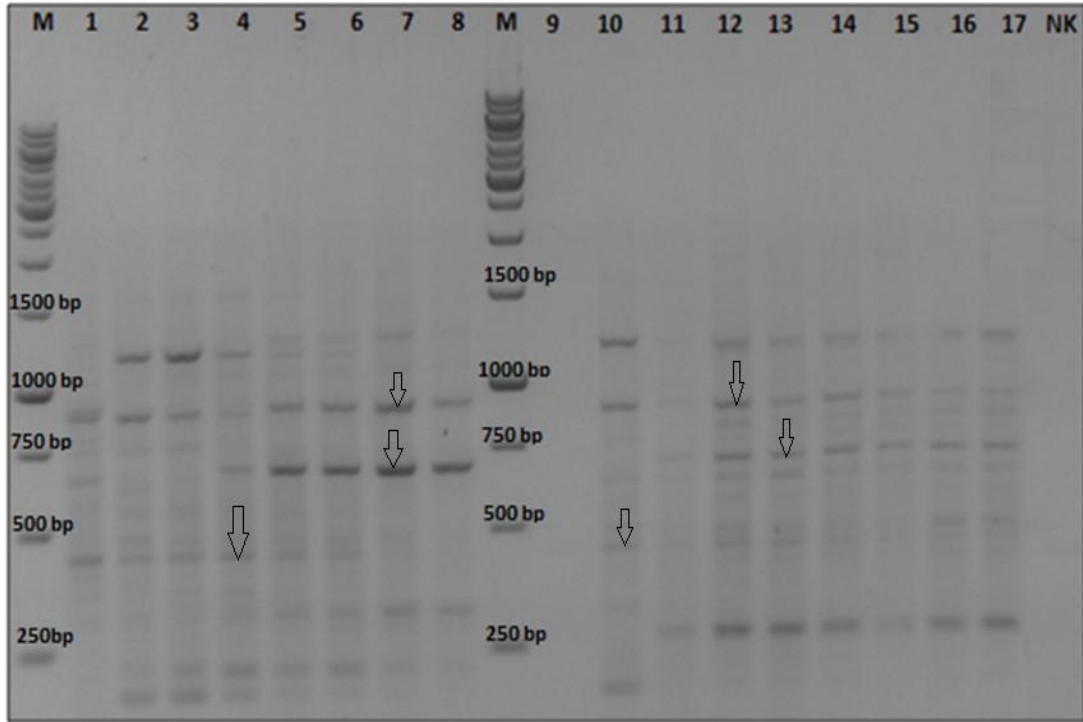
Sekil 4.37. AIELBA' nın sürekli tam karışimli geri devirli biyoreaktörde arıtılmasında 2 ay süresince haftalık alınan numunelerde mikroorganizma dağılımları

4.2.5.2. EBA ve AIELBA' nın arıtılmasında kullanılan Aktif Çamurun REP-PZR sonuçları

Tablo 3.2' de belirtilen ve çamur kabarmasının tanımlanmasında kullanılan primer çiftlerini içeren karışımlarla yapılan REP-PZR uygulamasının sonucu Şekil 4.38' de yer almaktadır, elde edilen REP-PZR bant yoğunlukları jel analizör' de (Tablo 4.17) analiz edilmiştir.

EBA Haftalık Numuneleri

AIELBA Haftalık Numuneleri



Şekil 4.38. EBA' nın (1-8) ve AIELBA' nın (9-17) arıtılmasında kullanılan aktif çamurun repF, repR primerleri ile yapılan PZR analizi. M: Markır, NK: Negatif Kontrol, 1: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 2: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 3: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 4: 4. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 5: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 6: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 7: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 8: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 9: Başlangıç Aktif Çamur Numunesi (Karaman Biyolojik Arıtmadan temin edilen Aktif Çamur), 10: 1. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 11: 2. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 12: 3. Hafta Aktif Çamur Numunesi 13: 14. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 5. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 15: 6. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 16: 7. Hafta Aktif Çamur Numunesi, 17: 8. Hafta Aktif Çamur Numunesi

Tüm örneklerden elde edilen REP-PZR ürünlerinin elektroforetik analizleri sonucunda 2200-180 bp arasında 37 farklı DNA bandı gözlemlendi (Şekil 4.38, Tablo 4.17). EBA’da farklı bant sayısı 25 (170- 2000bp arasında) iken, AIELBA’da farklı bant sayısı 26 (200-2200bp arasında) adettir. EBA için ilk 4 numunenin bant profilleri farklılık gösterirken 5-8 numuneler arasında daha benzer olarak gözlemlenmiştir. AIELBA’da ise 9. numune, REP-PZR profili diğer numunelere göre daha farklı bulunurken 10. numuneden sonra toplanan haftalık numunelerde REP-PZR profilleri çok benzer bulunmuştur. Ayrıca elde edilen bantlar içinde çoğu numunelerde ortak olan yaklaşık 450 bp, 700bp ve 950 bp’lik bantların varlığı “filamentli çamur kabarmasının meydana geldiği” ve “filamentli çamur kabarmasının meydana gelmediği” numuneler arasında farklılık gösterdiği bulunmuştur. EBA numunelerinde, 450bp, 950 bp ve 700 bp’ lik bantlar 2. aydan sonraki örneklerde bulunmamakta, 7. ve 8. haftalarda alınan örneklerde de gözlemlenmemektedir (Şekil 4.166). AIELBA numunelerinde, 950 bp bant bulunmazken; 3. haftadan (12-17 numuneler) itibaren 700bp.lik yeni markır oluşmuştur.

Son yıllarda moleküler biyolojideki hızlı gelişmeler nedeniyle su ve atıksudaki artırımında kullanılan mikrobiyal kommunitelerin hızlı ve kesin teşhisinde, morfolojik ve klasik biyokimyasal yöntemlerin yerini genetik tiplendirme almaktadır. Çünkü karışık ortamdaki mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan konvensiyonel metotlar ile saf kültür elde edilmesi, zahmetli deneysel çalışmalar yapılmasını gerektirmektedir. Kültür-bağımlı teknikler ile çeşitli çevrelerdeki bakterilerin ancak %1 tanımlanabilmektedir (Riesenfeld ve ark., 2004). Bu teknikler, zahmetli, zaman alıcı ve az bilgi verici olup kontaminasyona açıktır. Bu tekniklerle doğal mikrobiyel kommunitenin çeşitliliği ve kompozisyonu hakkında kısa zamanda bilgi edinilmez. Dolayısıyla, bu tekniklerin ekosistem mühendisliğinde ve biyoçeşitlilik çalışmalarında kullanılması yaygın değildir. 1990’ lı yıllarda geliştirilmeye başlanan yeni moleküler teknikler mikrobiyal ekoloji çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Ribozomal RNA temelli sistematik çalışmalarda sadece organizmaların klasifikasyonunda değil aynı zamanda kompleks mikrobiyal kommuniteler ile *in situ* çalışma yapılmasına olanak sağlamaktadır. Bu teknikler arasında, klonlama ve gen kütüphanelerin oluşturulması, ARDRA, RISA, T-RFLP gibi yöntemler yer almaktadır. Diğer yandan, PZR metoduna dayalı yöntemler kültüre edilemeyen

mikroorganizmaların tanımlanması hızlı, güvenilir ve kolaydır. Özellikle tür tanısında rDNA genleri en kesin sonuçları vermektedir. Bakterilerdeki rDNA (ribozomal DNA) operonuna spesifik olarak tasarlanmış evrensel PCR primerleri ile çok sayıda bakteri teşhis edilebilmektedir. Tür içi genetik yakınlıkların belirlenmesinde ve detaylı çeşitlilik analizlerinde ise gen dışı korunmuş tekrarlı bölgeler kullanılmaktadır (Shannon ve ark., 2007; Herrera ve ark., 2007). Bu diziler “tekrarlı gen dışı palindromik” (REP), “enterobakteriyel tekrarlı genler arası ortak diziler” (ERIC) ve BOX elementidir (Versalovic ve ark., 1991; Louws ve ark., 1994).

Su ve atıksudaki arıtımında kullanılan mikrobiyal komünitelerin PZR yöntemi ile aktif çamuru oluşturan mikroorganizmalar türe özgül DNA dizilerine dayalı olarak tasarlanmış primerler yardımıyla kesin sonuçlar elde etmemizi sağlar. PZR sonuçlarının bir gün içinde değerlendirilmesi; genomik DNA kullanılabilmesi bu yöntemin avantajlarıdır (Çepni, 2007).

Bu çalışmada 16S-18S rDNA genlerine uygun primerler tasarlanmış ve PZR ile çoğaltılmıştır.

Elektroforez ile de PZR ürünleri görünür hale getirilmiştir. Bu yöntem ile klasik zenginleştirme yöntemleriyle mikroorganizmaların çoğaltılması ve saflaştırılması adımı yapılmamış, hem maliyet, zaman ve analizin doğruluğu açısından üstünlük sağlanmıştır.

Çalışmamızda ayrıca REP-PZR kullanılarak iki farklı (EBA, AIELBA ile beslenen) aktif çamurda çok sayıda moleküler markırlar elde edilmiştir. Bu markırlar toplam bakteri popülasyonu kökenli olup farklı şartlarda oluşabilecek değişikliklere bağlı olarak polimorfizme işaret edebilir. REP-PZR’ in aktif çamurda kullanımına yönelik literatürde tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, REP-PZR parmak izi metodu kullanılarak çamur kabarması olmadığı ve çamur kabarmasının meydana geldiği çamur örneklerindeki bakteriyel komünite değişimi belirlenmiştir. Karakteristik REP-PZR parmak izi profilleri, elde edilen bantların entegre optik yoğunluk (IOD) ölçülerek ve birbiri ile karşılaştırılmasıyla elde edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen REP markırlarının yoğunluğu, 499 bp, 501 bp ve 685 bp’ lik

olarak elde edilmiş ve çamur kabarmasının olduğu - çamur kabarmasının meydana gelmediği örneklerde karşılaştırılmıştır. Çamur kabarmasının meydana geldiği çamur örneklerinden 449 bp elde edilen bantlar çamur kabarmasının meydana gelmediği 499 bp lik bantlardan daha az yoğunlukta; 501 ve 685 bp' lik bantların ise çamur kabarmasının meydana gelmediği bantlara göre daha az yoğun olarak bulunmuştur (Sołtysik ve ark., 2011).

Bizim çalışmada elde edilen REP markırlarının varlığı (450bp, 700bp ve 950 bp' lik) çamur kabarması olmadığı ve çamur kabarmasının meydana geldiği çamur örneklerindeki numuneler arasında farklılık göstermiştir. 950 bp ve 700 bp' lik bantların varlığı 2. aydan itibaren artarken, 450bp' lik bantın varlığı 2. ayda azalmış hatta 7. ve 8. haftalarda gözlemlenememiştir (Şekil 4.36). Bu nedenle elde edilen sonuçlar, literatürde daha önce belirlenmiş sonuçlarla paralellik göstermiştir (Sołtysik ve ark., 2011). AIELBA numunelerinde, 950 bp bant varlığı azalırken 700 bp' lik bantların varlığı 3. haftadan (12-17 numuneler) itibaren ortaya çıkar, 450 bp' lik bantın yoğunluğu ise düşük yoğunlukta gözlemlenmektedir. AIELBA numunelerinde elde edilen bant profilleri EBA numunelerine göre farklılık göstermiştir. Çünkü, EBA numunelerinde filamentöz çamur kabarması (Şekil 4.19, Tablo 4.15) meydana gelirken AIELBA numunelerinde fungal çamur kabarması (Şekil 4.20, Tablo 4.16) meydana gelmiştir. Bu sonuç, mikroskopik gözlemlerle elde edilmiştir. Ve REP-PZR bant profilleri de bu sonucu doğrulamaktadır. Ayrıca reaktör, 2. ayda kararlı şartlarda işletilmiştir. DNA numuneleri reaktörün başlangıç ve kararlı işletme şartlarındaki mikrobiyel komünitenin değişimini ortaya koymak için haftalık olarak toplanmıştır. AIELBA' da kararlı şartlarının oluşumu daha hızlı olmuştur. Bu durumda, atıksuyun toksik karakterde olduğu ve bu atıksuda diğer mikroorganizmalara göre üstünlük kazanan mikroorganizmaların ürediği düşünülmektedir.

4.2.6. Bakteri izolasyonu ve identifikasyonu

Kararlı şartlarda işletilen biyoreaktördeki aktif çamur numunesinden, aseptik şartlarda 10^{-1} - 10^{-5} seyreltme hazırlanarak içinde durham tüp bulunan 10 mL lik Laktoz Buyyon ve Nutrient Buyyon tüplere 1 mL numune ilave edilmiştir.

Hazırlanan tüpler, 48 saat süresince 35 ± 2 °C de inkübe edilmiştir. 48 saat sonra Laktoz Buyyonda gaz oluşumu gözlenmiştir.

Kullanılan besiyerleri Nutrient Buyyon (NB, Merck), Laktoz Buyyon (LB, Merck) zenginleştirici besiyeri olarak kullanılmış, NB ve LB Buyyon' da üreyen mikroorganizmalar, Flourocult Violet Red Bile Agar (VRB-MUG Agar, Merck) *E. coli* aranması ve sayılması için selektif katı besiyeri olarak, Cetrimid Agarda (Merck) *P. aeroginosa*' nın izolasyonu ve ön tanımlanması için selektif katı besiyeri olarak kullanılmıştır (Tablo 3.5).

Tablo 4.18. Ticari olarak satın alınan ve izolasyonu yapılan bakterilerin BD BBL Crystal (Bacton Dickinson) sonuçları

Bakteri İsmi	ARA	MNS	SUC	MEL	RHA	SOR	MNT	ADO	GAL	INO	PHO	BGL	NPG	PRO	BPH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Echerichia coli</i> ATCC 8739	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Echerichia coli</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+

ARA: Arabinoz MNS: Mannoz SUC: Sükroz MEL: Melibioz RHA: Ramnoz SOR: Sorbitol MNT: Mannitol ADO: Adonitol GAL: Galaktoz INO: İnositol PHO: p-n-p-fosfat BGL: p-n-p- α - β -glukozid NPG: p-n-p- α - β -galaktozid PRO: Proline nitroanilid BPH: p-n-p bis-fosfat

Bakteri İsmi	BXY	AAR	PHC	GLR	NAG	GGL	ESC	PHE	URE	GLY	CIT	MLO	TTC	ARG	LYS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Echerichia coli</i> ATCC 8739	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Echerichia coli</i>	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+

BXY: p-n-p-ksilozid AAR: p-n-p- α -arabinozid PHC: p-n-p-fosforilkolin GLR: p-n-p- β -glukuronid NAG: p-n-p-N-asetil glukozaminid GGL: γ -L- glutamil p-nitroanilid ESC: Eskulin PHE: p-nitro-DL-fenilalanin URE: Üre GLY: Glisin CIT: Sitrat MLO: Malonik asit TTC: Trifenil Tetrazolium Klorid ARG: Arjinin LYS: Lizin

4.2.7. Minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri

HBA kullanılarak seçilen aktif çamur izolatları ve satın alınan suşların minimum inhibisyon konsantrasyon dozları Tablo 4.19’ da özetlenmiştir.

MİK değeri için yapılan testlerde satın alınan (*Echerichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), ve bu suşların karışımı (*Echerichia coli* ATCC 8739 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC), Aktif Çamur İzolatları (*Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) ve yine bu izolatların (*Echerichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*) karışımı %50 HBA da üreme göstermektedir.

Tablo 4.19. MİK Deney Sonuçları

Ham Biyodizel Atıksu (%)										
Bakteri	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0
<i>Echerichia coli</i> ATCC 8739	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Karışım (<i>E.coli</i> ATCC 8739 ve <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Echerichia coli</i> (Aktif Çamur İzolatı)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Aktif Çamur İzolatı)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aktif Çamur İzolatlarının Karışımı (<i>E. coli</i> ve <i>P. aeruginosa</i>)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: Üreme pozitif, -: Üreme negatif

4.2.7.1. Seçilen izolatların ve satın alınan suşların ham biyodizel atıksuyu (HBA)' nu parçalama eğilimi test sonuçları

Biyodizel atıksuyunu arıtmak için kullanılan sürekli reaktör aktif çamur sisteminden izole edilen ve satın alınan suşların ham biyodizel atıksuyunu (HBA) parçalama yeteneklerini belirlemek amacıyla testler yapılmıştır. Bu çalışmalar, Bölüm 3' te anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Buna göre 30 gün boyunca 72 saatte bir numune alınarak TOK, KOİ, pH parametreleri analiz edilmiştir. Elde edilen değerler Tablo 4.20-4.21' de gösterilmiştir.

Tablo 4.20. Satın alınan suşların ham biyodizel atıksuyu (HBA)' nu parçalama eğilimi testleri

Gün	<i>E.coli</i> ATCC8739		<i>P.aeruginosa</i> ATCC9027		<i>E.coli</i> ATCC 8739 + <i>P.aeruginosa</i> ATCC9027		<i>E.coli</i> ATCC8739	<i>P.aeruginosa</i> ATCC9027	<i>E.coli</i> ATCC8739+ <i>P.aeruginosa</i> ATCC9027
	TOK (mg/L)	KOİ (mg/L)	TOK (mg/L)	KOİ (mg/L)	TOK (mg/L)	KOİ (mg/L)	pH		
0	16137	56457	16137	56457	16137	56457	7	7	7
3	11046	33140	11166	33555	9864	29563	7.5	7.5	7.5
6	6732	21206	9414	28242	6930	21275	7.5	7.5	7.5
9	9762	29380	11412	34236	8376	25346	7.5	7.4	8
12	7200	21600	10692	30000	5394	16182	7.5	7.3	8
15	5387	17293	9648	29427	4329	13187	7.5	6	8
18	3558	10959	9432	28400	4116	12348	7.5	5.5	8
21	3198	9786	9420	28260	3900	12967	7.5	5	8
24	3000	9600	8988	28762	3861	12559	7	6.5	8
27	2988	8964	7896	23725	3897	11568	7	6.5	7
30	2946	8892	7260	21780	3786	11358	7	6.5	7

Satın alınan suşlardan *E.coli* ATCC8739 ile yapılan deneyde başlangıçta 16137 mg/L TOK ve 56457 mg/L KOİ içeren HBA, 30 gün sonunda TOK değeri 2946 mg/L, KOİ değeri 8892 mg/L ye düşmüş, pH değeri 7-7.5 arasında değişkenlik göstermiştir. *P.aeruginosa* ATCC9027 ile yapılan deneyde ise başlangıçta 16137 mg/L TOK ve 56457 mg/L KOİ içeren HBA 30 gün sonunda TOK değeri 7260 mg/L, KOİ değeri 21780 mg/L ye düşmüş, pH değeri 7-6.5 arasında değişkenlik göstermiştir. *E.coli* ATCC8739 + *P.aeruginosa* ATCC9027 karışımı ile elde edilen sonuçlar ise başlangıçta 16137 mg/L TOK ve 56457 mg/L KOİ içeren HBA 30 gün sonunda

TOK değeri 3786 mg/L, KOİ değeri 11358 mg/L ye düşmüş, pH değeri 7-8 arasında değişkenlik göstermiştir.

Tablo 4.21. Seçilen izolatların ham biyodizel atıksuyu (HBA)'nu parçalama eğilimi testleri

Gün	<i>E.coli</i> AÇ. izolatı		<i>P.aeruginosa</i> AÇ. izolatı		<i>E.coli</i> AÇ. + <i>P.aeruginosa</i> AÇ. izolatları		<i>E.coli</i> AÇ. izolatı	<i>P.aeruginosa</i> AÇ. izolatı	<i>E.coli</i> AÇ. + <i>P.aeruginosa</i> AÇ. izolatları
	TOK (mg/L)	KOİ (mg/L)	TOK (mg/L)	KOİ (mg/L)	TOK (mg/L)	KOİ (mg/L)	pH		
0	16137	56457	16137	56457	16137	56457	7	7	7
3	9300	32550	9420	29425	10602	33345	7.5	7.5	7.5
6	8043	24129	7236	24346	7914	23742	7.5	7.5	7.5
9	8154	24523	7122	21365	7674	24487	7.6	7.5	7.5
12	6690	20846	4998	14993	5985	17955	7.8	8	7.5
15	5691	17165	4605	11233	5139	15417	7.9	8	7.8
18	4518	14753	4626	13800	3414	11096	8	8	8.8
21	3954	12796	4092	12285	4038	12114	8	8	8.8
24	3888	13000	3900	10000	3966	11890	8	8	8.8
27	3000	10068	3759	11239	3795	11385	7.5	7	7.5
30	2850	8476	3723	11000	3609	10430	7	7	7.5

AÇ: Aktif Çamur

Aktif Çamur izolatlarından olan *E.coli* ile yapılan deneyde başlangıçta 16137 mg/L TOK ve 56457 mg/L KOİ içeren HBA 30 gün sonunda TOK değeri 2850 mg/L, KOİ 8476 mg/L değerlerine düşmüş, pH değeri 7-8 arasında değişkenlik göstermiştir. *P.aeruginosa* izolatı ile yapılan deneyde ise başlangıçta 16137mg/L TOK ve 56457 mg/L KOİ içeren HBA 30 gün sonunda TOK değeri 3723 mg/L ye, KOİ 11000 mg/L değerlerine düşmüş, pH değeri 7-8 arasında değişkenlik göstermiştir. *E.coli* + *P.aeruginosa* karışımı ile elde edilen sonuçlar ise başlangıçta 16137 mg/L TOK ve 56457 mg/L KOİ içeren HBA 30 gün sonunda TOK değeri 3609 mg/L, KOİ de 10430 mg/L değerlerine düşmüş, pH değeri 7-8.8 arasında değişkenlik göstermiştir.

HBA' nın biyodegradasyonunda aktif çamur izolatları ve satın suşlar karşılaştırıldığında, *E.coli* aktif çamurdan izolatı ile *E.coli* ATCC8739 arasında anlamlı bir fark gözlenmezken *P. aeruginosa* AÇ. izolatı ve *P.aeruginosa* ATCC9027 arasında fark gözlenmiştir. HBA' nın biyodegradasyonunda *P. aeruginosa* AÇ. izolatının daha etkin olduğu gözlenmiştir. *E.coli*

ATCC8739+*P.aeruginosa* ATCC 9027 karışımı ve *E.coli* AÇ.+*P.aeruginosa* AÇ. karışımı ile arasında ise anlamlı bir fark elde edilmemiştir.

BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Biyodizel atıksuyunda yağ asitleri, metil esterleri, gliserin ve metanol gibi maddeler bulunmaktadır. Bu maddelerin atıksudan uzaklaştırılması için ön işlem olarak bazı solventlerle ekstraksiyon ve elektrokoagülasyon ile ön arıtmadan sonra aktif çamur sistemi ile ya da doğrudan ham biyodizel atıksuyunun bazı mikroorganizmalarla biyolojik arıtılabilirliğinin ortaya konmaya çalışıldığı bu çalışmada, aşağıdaki sonuçlar ulaşılmıştır.

1. Ön arıtmadan sonra, atıksuyun kesikli biyolojik reaktörde arıtılabilirliği çalışmalarında KOİ değerinin 25000 mg/L den 406 mg/L ye düştüğü tespit edilmiş ve %98 KOİ giderim verimi elde edilmiştir. %50 seyreltilen ekstrakte atıksuyun kesikli biyolojik arıtma çalışmalarında ise KOİ değerinin 15500 mg/L den 150 mg/L ye düştüğü tespit edilmiştir ve böylece KOİ giderme verimi %99 olarak sonuçlanmıştır.
2. BOİ deney sonuçları, EBA' nın AIELBA' ya göre daha az toksik olduğu FeELBA nın ise en toksik olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, sürekli biyolojik arıtma çalışmaları sadece EBA ve AIELBA ile yapılmıştır.
3. Ekstraksiyon veya elektrokoagülasyondan elde edilen atıksuların, tam karışımli sürekli akımlı aktif çamur sisteminde direkt olarak arıtılması mümkün olmamaktadır. Ancak KOİ değeri 1000 mg/L civarına kadar seyreltilmesi durumunda arıtma sonuçları aşağıdaki gibi olmaktadır;

Ekstraksiyon sonrasında biyodizel atıksuyun tam karışımli sürekli akımlı aktif çamur reaktörünün kararlı şartlarda, hidrolik bekleme süresi 4.35 saat ve atıksu debisi 25.92 L/gün olarak işletilmiş ve TOK giderme verimi %92, TN giderme ise %44 olarak tespit edilmiştir.

Alüminyum elektrotlu elektrokoagülasyon prosesinden elde edilen atıksuyun tam karışımı aktif çamur sürekli reaktöründe TOK %90 ve TN %36 oranında giderilmiştir.

4. Aktif çamur mikrobiyel komunitasinin tanımlanması amacıyla, filament identifikasyonu ve aktif çamur biyokütlesinin faz kontrast mikroskopta incelenmesinin yanı sıra, PZR ile genotiplendirme de yapılmıştır.
5. Ekstrakte biyodizel atıksuyu (EBA)' nun tam karışımı aktif çamur sürekli reaktöründe arıtılmasında haftalık alınan numunelerde yapılan filament teşhisinde *S.natans*, *Actinomyces*, *Zooglea ramigera* türlerinin baskın olduğu tespit edilmiştir. Aktif çamurun PZR ile tanısında mikroorganizma tür dağılımlarının, %100 filamentli bakteriler ve %100 Acinetobacter, %62.5 AOB komunitası, %62.5 Actinomyces, %43.75 de fungus olduğu tespit edilmiştir.
6. Aynı çalışmalar, Elektrokoagülasyon sonrası atıksuyun (AIELBA) arıtılmasında da yapılmıştır. Filament teşhisiyle aktif çamurda fungusların baskın olduğu gözlenmiştir. Aktif çamurun PZR ile tanısında mikroorganizma tür dağılımlarının, %67 filamentli bakteriler, %89 Acinetobacter, %44.4 AOB komunitası, %55.5 Actinomyces, %94.40 de fungus olduğu tespit edilmiştir.
7. Mikrobiyel tanımlama yapıldıktan sonra, gliserin biyodegradasyon yeteneği olan *E.coli* ve çeşitli toksik bileşenleri (hidrokarbonlar) metabolize etme yeteneği olan ve biyoremediasyon çalışmalarında kullanılan *P.aeruginosa* aktif çamurdan izole edilmiştir.
8. İzole edilen mikroorganizmalarla ve satın alınan referans suşlar ile ham biyodizel atıksuyunda "Parçalama Eğilim Testleri" yapılarak, atıksuyun biyolojik ayrışma durumu tespit edilmiştir. 250 mL' lik tüm erlenere 450×10^8 CFU/150 mL bakteri eklendiğinde, içinde *E.coli* ATCC8739 bulunan erlenede 30 gün sonunda KOİ değeri 8892 mg/L olarak, *P.aeruginosa* ATCC9027 bulunan erlenede KOİ değeri 21780 mg/L olarak, *E.coli* ATCC8739+*P.aeruginosa* ATCC9027 bulunan erlenede

KOİ değeri 11358 mg/L olarak tespit edilmiştir. Aynı alışma Aktif amur izolatları ile de yapılmıştır ve içinde *E.coli* A izolatı bulunan erlende 30 gün sonunda KOİ değeri 8476 mg/L olarak, *P.aeruginosa* A izolatı bulunan erlende KOİ değeri 11000 mg/L olarak, *E.coli* A.+*P.aeruginosa* A bulunan erlende KOİ değeri 10430 mg/L olarak tespit edilmiştir.

E.coli ATCC8739, *P.aeruginosa* ATCC9027, *E.coli* ATCC8739+*P.aeruginosa* ATCC9027 karışık kültürü ile KOİ giderme verimleri sırasıyla %84, %61, %80 olarak elde edilmiştir. *E.coli* A ve *P.aeruginosa* A. izolatları ile yaklaşık %80.5 oranında KOİ giderme verimi *E.coli* A.+*P.aeruginosa* A karışık kültürü ile %82 oranında KOİ giderme verimi sağlanmıştır.

Bu sonuçlar, aslında *P.aeruginosa* A izolatının referans suşa göre Ham Biyodizel atıksuyu (HBA)' nu daha iyi parçaladığını göstermiştir. *E. coli* A izolatının ise HBA' yı parçaladığı tespit edilmiş fakat referans suş ile kıyaslandığında anlamlı bir fark elde edilememiştir.

Sonuçlarımızı karşılaştıracadığımız biyodizel atıksuları ile ilgili ülkemizde henüz resmi bir standart bulunmamaktadır. Ancak Atıksuların Kanalizasyona Deşarj Yönetmeliği baz alındığında (Tablo 4.22) doğrudan Ham Biyodizel Atıksuyunun bakterilerle parçalanması sonucunda KOİ değerlerinin istenen değerde olması için bakteriler ile doz değerlendirme testlerinin sürdürülmesi gerekmektedir.

Tablo 4.22. ADASU atıksuların kanalizasyona deşarj yönetmeliği

İKİ SAATLİK KOMPOZİT ATIKSU ÖRNEĞİNDE İZİN VERİLEBİLİR DEĞER	
Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ, mg/l)	800
Askıda Katı Madde (AKM, mg/L)	350
Toplam Azot (TN, mg/L)	100
Amonyum Azotu (NH ₄ -N, mg/L)	75
Toplam Fosfor (P, mg/L)	10
Yağ/Gres (YAĞ-GRES, mg/L)	100
Sıcaklık (°C)	40
pH	6-10

Bu alışma sonucunda, ham biyodizel atıksularının doğrudan bakterlerle artırılmasında *P. aeroginasa* önerilebilir. Fakat KOİ değerinin alıcı deşar limitini sağlayabilmesi için bazı düzenlemelerin yapılabileceği düşünölmektedir.

Bunlardan biri, bakteri yoğunluğunun yaklaşık 14 kat arttırılarak (126×10^8 CFU/mL) deşarj limitini (800 mg/L KOİ değeri) sağlayabilir. Buna ilave olarak farklı kirlilik karakterindeki ortamlardan çok sayıda mikroorganizma (bakteri, fungus, maya) izolasyonu yapılarak, bunların tek tek ve karışım halindeki biyodegradasyon yetenekleri üzerinde çalışmalar yapılabilir.

Sonuç olarak, biyodizel atıksularının, solvent ekstraksiyonu veya elektrokoagölasyon prosesinden sonra, tesisdeki yıkama suları ve evsel atıksularla birlikte kesikli aerobik sistemde yönetmelik sınır değerlerini sağlayabileceği tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

ADASU, Atıksuların Kanalizasyona Deşarj Yönetmeliği,
www.sakarya-saski.gov.tr/SaskiKutuphane/Yönetmelikler/desarj.pdf, (Erişim Tarihi:
20.04.2012)

APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Edition.
Clesceri, L.S., A.E Greenberg and A.D Eaton (eds)., American Public Health
Association, American Water Works Association and Water Environment Federation.
Washington, D.C., 1999.

Alternatif Enerji ve Biyodizel Üreticileri Birliği, Türkiye'de Biyodizel,
http://www.albiyobir.org.tr/trde_b3.htm, (Erişim Tarihi: 01.05.2012).

AMARAL, A.L., GINORIS, Y.P., NICOLAU, A., COELHO, M.A.Z., FERRIERE,
E.C., Stalked protozoa identification by image analysis and multivariable statistical
techniques, Anal Bioanal Chem, 391, 1321-1325, 2008.

ANTOLIN, G., TINAUT, F.V., BRICENO, Y., CASTANO, V., PEREZ, C.,
RAMIREZ, A.I., Optimisation of biodiesel production by sunflower oil
transesterification, Bioresource Technology, 83, 111-114, 2002.

BARLAS, N., Adapte bakteri kültürleri kullanımının deşarj noktalarında su kalitesi
üzerinde iyileştirici etkilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul
Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010.

BERRIOS, M., SKELTON, R.L., Comparison of purification methods for biodiesel,
Chemical Engineering Journal, 144, 459–465, 2008.

BORNEMAN, J., HARTIN, J.R., PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples, *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (10), 4356-4360, 2000.

Canola Council Of Canada,

https://canola-council.merchantsecure.com/canola_resources/product45.aspx, (Erişim Tarihi: 23.03.2012).

CHEN, S., XU, M., CAO, H., ZHU, J., ZHOU, K., XU, J., YANG, X., GAN, Y., LİU, W., ZHAI, J., SHAO, Y., The activated-sludge fauna and performance of five sewage treatment plants in Beijing, China, *European Journal of Protistology*, 40, 147-152, 2004.

COOKE, B.S., ABRAMS, S., BERTRAM, B., Purification of biodiesel with adsorbent materials, US Patent 0509959P, 2003.

ÇEPNİ, E.F., Bitkisel patojenlerin PCR' a dayalı yöntemlerle genetik tiplendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.

ÇİFTÇİ, S.P., Marmara Denizi'nden İzole Edilen Bakterilerin Polisiklik Aromatik Hidrokarbonları (PAH) Parçalama Yeteneklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Temel Bilimler ABD Deniz Biyolojisi Programı, 2008.

ÇİLDİR, O., ÇANAKÇI, M., Çeşitli bitkisel yağlardan biyodizel üretiminde katalizör ve alkol miktarının yakıt özellikleri üzerine etkisinin incelenmesi, *Gazi Üniv. Müh. Mim. Fak. Der.*, 21, 2, 367-372, 2006.

DİZGE, N., AYDİNER, C., İMER, D.Y., BAYRAMOĞLU, M., TANRİSEVEN, A., KESKİNLER, B., Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer, *Bioresource Technology*, 100, 1983–1991, 2009.

Enerji Piyasası Düzenleme Kurumu, Motorin türlerine ilişkin teknik düzenleme tebliğinde değişiklik yapılmasına dair tebliğ, Resmî Gazete, Sayı: 28067, 27.Eylül 2011.

FREEDMAN, B., PRYDE, E.H., MOUNTS, T.L., Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 1638–1643, 1984.

GINORIS, Y.P., AMARAL, A.L., NICOLAU, A., COELHO, M.A.Z., FERREIRA, E.C., Development of an image analysis procedure for identifying protozoa and metazoa typical of activated sludge system, *Water Research*, 41, 2581-2589, 2007.

GULEZ, G., DE LOS REYES III, L.F., Multiple approaches to assess filamentous bacterial growth in activated sludge under different carbon source conditions, *Journal of Applied Microbiology*, 106, 682-691, 2009.

HE, H., WANG, T., ZHU, S., Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using supercritical methanol process, *Fuel*, 86, 442–447, 2007.

HEUER, H., KRSEK, M., BAKER, P., SMALLA, K., WELLINGTON, E.M., Analysis of Actinomycete community by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients, *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3233-3241, 1997.

HERRERA, A., COCKELL, S., Exploring microbial diversity in volcanic environments: A review of methods in DNA extraction, *Journal of Microbiological Methods*, 70, 1–12, 2007.

HOFFMANN, P., Tomorrow's energy: hydrogen, fuel cells and the prospects for a cleaner planet, The MIT Press, Cambridge, Massachusetts and London, England, Third Printing, 2002.

IMAHARA, H., MINAMI, E., HARI, S., SAKA, S., Thermal stability of biodiesel in supercritical methanol, *Fuel*, 87, 1–6, 2008.

ISENBERG, G., Assessment of Automotive Fuels, *Journal of Power Sources*, 84, 214-217, 1999.

JENKINS, D., RICHARD, G.M., DAIGGER, T.G., Manuel on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation problems, 3rd Edition, CRC Press Taylor and Francis Group, 2004.

LU, J., NIE, K., XIE, F., WANG, F., TAN, T., Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99-125, *Process Biochemistry*, 42 (9), 1367–1370, 2007.

LOUWS, F.J., FULBRIGHT, D.W., STEPHENS, C.T., DE BRUIJN, F.J., Specific genomic fingerprint of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens and strains generated with repetitive sequences and PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (7), 2286-2295, 1994.

MADONI, P., Protozoa as indicators of wastewater treatment efficiency, *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, Mara, D., Horan, N., Academic Press, Great Britain, pp: 361-371, 2003.

MARA, D., HORAN, N., *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, Academic Press, Great Britain, 2003.

MEDCALF & EDDY, *Wastewater engineering: treatment and reuse*, McGrawHill International Editions, Fourth Edition, 2003.

MetaCyc Pathway: glycerol degradation I,
<http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY4261>,
(Erişim Tarihi: 23.03.2012).

Bakterilerde Üreme,

<http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAA F6AA849816B2EF4A104B0BB01B54E0>, (Erişim Tarihi: 23.04.2012)

ÖVEZ, S., ORHON, D., KARAHAN, Ö., MURAT, S., ÖRS, C., Filamentli bakterilerin neden olduğu kabarma ve köpük problemi ve popülasyon dinamiğine olan etkileri: deri endüstrisi aktif çamur arıtma sistemi, TÜBİTAK ÇAYDAG, 2006.

POULTON, M.L., Alternative fuels for road vehicles, Computational Mechanics, Inc., UK, 1994.

PHOLCHAN, K.M., BAPTISTA, C.J., DAVENPORT, J.R., CURTIS, P.T., Systematic study of the effect of operating variables on reactor performance and microbial diversity in laboratory-scale activated sludge reactors, Water Research, 44, 1341-1352, 2010.

RASHID, U., ANWAR, F., Production of biodiesel through optimized alkaline-catalyzed transesterification of rapeseed oil, Fuel, 87, 265–273, 2008.

RIESENFELD, C.S., SCHLOSS, P.D., HANDELSMAN, J., Metagenomics: genomic analysis of microbial communities, Annu. Rev. Genet., 38, 525–52, 2004.

ROYON, D., DAZ, M., ELLENRIEDER, G., LOCATELLI, S., Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent, Bioresource Technology, 98, 648–653, 2007.

SOLTYSIK, D., BEDNAREK, I., LOCH, T., GAŁKA, S., SYPNIEWSKI, D., Repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR) as a method used for bulking process detection in activated sludge, Environ Monit Assess, 176:343–354, 2011.

SUEHARA, K., KAWAMOTO, Y., FUJI, E., KOHDA, J., NAKANO, Y., YANO, T., Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 437–442, 2005.

SCHLEICHER, T., WERKMEISTER, R., RUSS, W., MEYER-PITTROFF, R., Microbiological stability of biodiesel-diesel-mixtures, *Bioresour. Technol.*, 100, 724–730, 2009.

SHANNON, K.E., LEE, Y., TREVORS, J.T., BEAUDETTE, L.A., Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment, *Science of the Total Environment*, 382, 121–129, 2007.

SINGH, B., Determination of BOD kinetic parameters and evaluation of alternatif methods, Master Thesis, Thapar Institute of Engineering and Technology, Deemed University, Patiala, 2004.

TUNAİL, N., *Mikrobiyoloji, Pelin Ofset*, Ankara, S. 448, 2009.

VANBROEKHOVEN, K., RYNGAERT, A., WATTIAU, P., DE MONT, R., SPRINGAEL, D., *Acinetobacter* diversity in environmental samples assessed by 16S rRNA gene PCR-DGGE fingerprinting, *FEMS Microbiology Ecology*, 50, 37-50, 2004.

VERSALOVIC, J., KOEUTH, T., LUPSKI, R.J., Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes, *Nucleic Acids Research*, Vol.19, No:24, 6823-6831, 1991.

VICENTE, G, MARTINEZ, M, ARACIL, J., Optimisation of integrated biodiesel production, Part I. A study of the biodiesel purity and yield, *Bioresource Technol.*, 98, 1724–1733, 2007.

VIVEK, R., V., GIRIDHAR M., G., Synthesis of biodiesel from edible and non-edible oils in supercritical alcohols and enzymatic synthesis in supercritical carbon dioxide, *Fuel*, 86, 2650–2659, 2007.

WÄLTERMANN, M., HINZ, A., ROBENEK, H., TROYER, D., REICHEL, R., MALKUS, U., GALLA, H.J., KALSCHUEER, R., STÖVEKEN, T., VON LANDENBERG, P., STEINBÜCHEL, A., Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up., *Mol. Microbiol.*, 55 (3), 750-763, 2005.

YÜCESU, H.S., ALTIN, R., ve ÇETİNKAYA, S., Dizel motorlarında alternatif yakıt olarak bitkisel yağ kullanımının deneysel incelenmesi, *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 25, 39-49, 2001.

ÖZGEÇMİŞ

Nursel KIRATLI YILMAZÇOBAN, 1978 yılında Ruse' de (Bulgaristan) doğdu. 1995 yılında Adapazarı Atatürk Lisesi' nden mezun oldu. 1996-2000 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans (Mikrobiyoloji Kümesi) eğitimini tamamladı. 2001-2004 yılları arasında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği ABD' de yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2006 yılında, Çevre Mühendialığı ABD' de Doktora eğitimine başladı. 2001 yılından beri Sakarya Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak görevine devam etmektedir.