



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AEROBİK ÇAMUR STABİLİTESİNİN İNCELENMESİ

**Çevre Mühendisi Ümit BOZKURT
Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Programı**

**Danışman
Yard. Doç. Dr. Gülsüm YILMAZ**

Şubat, 2011

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AEROBİK ÇAMUR STABİLİTESİNİN İNCELENMESİ

**Çevre Mühendisi Ümit BOZKURT
Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Programı**

**Danışman
Yard. Doç. Dr. Gülsüm YILMAZ**

Şubat, 2011

İSTANBUL

Bu çalışma 03/02/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Çevre Mühendisliğı Anabilim Dalı Yüksek Lisans programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Y. Doç. Dr. Gülsüm YILMAZ (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Nilgün BALKAYA
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Süleyman TANYOLAÇ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Bülent MERTOĞLU
Marmara Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Y. Doç. Dr. Gülsüm YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalar sırasında yardımlarını esirgemeyen ve sorularımı yanıtsız bırakmayan çok kıymetli arkadaşım Biyolog Karin ALEKSANYAN MAĞDEN'e (Çevre Uzmanı);

Moleküler analizlerin yürütülmesi ve yorumlanmasında bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan Prof. Dr. Nazlı ARDA ve Dr. Evren UÇAR'a;

Morfolojik incelemeler kapsamında yapılan elektron mikroskobu incelemelerini gerçekleştiren Boğaziçi Üniversitesi Araştırma Geliştirme Merkezi Uzmanlarından Dr. Bilge GEDİK ULUOCAK'a;

Mikrobiyal popülasyonu değerlendirme çalışmalarının yürütüldüğü Marmara Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Mikrobiyal Ekoloji Laboratuvarı çalışanlarına ve sonuçların yorumlanmasında katkıda bulunan Doç. Dr. Bülent MERTOĞLU'na;

Partikül boyutu ölçümlerinin yürütüldüğü İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü Partikül Madde Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince benden maddi ve manevi hiçbir yardımı esirgemediğim yanımda oldukları için babam Kazım BOZKURT'a, annem Sudiye BOZKURT'a ve sevgili kardeşlerime tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu çalışma TÜBİTAK 107Y137 nolu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	İ
İÇİNDEKİLER	İİ
ŞEKİL LİSTESİ	V
TABLO LİSTESİ	Vİİ
SEMBOL LİSTESİ	Vİİİ
ÖZET	İX
SUMMARY	Xİ
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. AKTİF ÇAMUR SİSTEMLERİ	3
2.1.1. Aktif Çamur Mikroorganizmalarının Rolü	3
2.1.2. Biyoflokülasyon Mekanizması	3
2.1.3. Katyonlar	9
2.2. GRANÜLASYON PROSESİ	13
2.2.1. Aerobik Granülasyon Teknolojisi.....	14
2.2.1.1. Aerobik Granüllerin Oluşumu	14
2.2.1.2. Mikrobiyal Yapı Ve Çeşitlilik	16
2.2.2. Granül Yapısı.....	18
2.2.2.1. Aşı Çamuru.....	18
2.2.2.2. Atıksu Kompozisyonu	18
2.2.2.3. AKR'ün İşletilmesi.....	19
2.2.3. Granül Karakterizasyonu	21
2.2.3.1. Fiziksel Parametreler	21
2.2.3.2. Kimyasal Parametreler	22
2.2.3.3. Biyolojik Parametreler	22
2.2.4. Granülasyon Mekanizması	23
2.2.4.1. Granülasyonun Aşamaları.....	23
2.2.4.2. Seleksiyon Baskısı.....	25
2.2.4.3. Hücre dışı Polimerik Maddeler (EPS).....	26
2.2.4.4. Granülasyon Modeli.....	27
2.2.5. Aerobik Granülasyon Teknolojisinin Uygulamaları.....	27
2.2.5.1. Toksik Organik Atıksuların Giderilmesi	28

2.2.5.2. Süt Endüstrisi Atıksularının Arıtımı	29
2.2.5.3. Azot ve Fosfor Giderimi	29
2.2.5.4. Ağır Metal ve Boyar Madde Giderimi	31
2.2.5.5. Partiküler Madde Giderimi	31
2.2.5.6. Nükleer Atık Giderimi	32
2.3. KATYONLARIN GRANÜL ÇAMUR ÜZERİNE ETKİLERİ.....	33
2.4. KATYONLARIN FLOKÜLER ÇAMUR ÜZERİNE ETKİLERİ	38
3. MALZEME VE YÖNTEM	46
3.1. ÇALIŞMA PLANI.....	46
3.2. ÇALIŞMA DÜZENİĞİ	46
3.2.1. Aklimasyon Periyodu	47
3.2.2. Fe ²⁺ 'nin Aerobik Granül Çamur Oluşumuna ve Stabilitesine Etkisinin İncelenmesi	48
3.3. ANALİZ YÖNTEMLERİ.....	50
3.3.1. Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu (ESEM) İle Morfolojinin İncelenmesi	50
3.3.2. Işık Mikroskobu İle Morfolojinin İncelenmesi.....	51
3.3.3. EPS Ekstraksiyonu	51
3.3.4. Protein Analizi.....	52
3.3.5. Elektroforetik Analizler	53
3.3.5.1. Denatüre Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	53
3.3.6. Boyama Yöntemi	55
3.3.6.1. Coomassie Boyama	55
3.3.6.2. Hızlı Gümüş Boyama.....	55
3.3.7. Karbonhidrat analizi	56
3.3.8. Partikül boyutu ölçümü	57
3.3.9. PCA Yöntemi İle Kimyasal Olarak Çökelen Fosfatın Belirlenmesi	57
3.3.10. Uhlmann Prodedürü İle Kimyasal Bağlı Fosfor Türlerinin Belirlenmesi.....	58
3.3.11. Metal Analizi Numune Hazırlık	58
3.3.12 Real-time PCR ile Tür Tayini.....	59
3.3.12.1 Nükleik Asit Ekstraksiyonu	60
3.3.12.2 Real-time PCR.....	60
4. BULGULAR	62
4.1. FE ²⁺ 'NİN AEROBİK GRANÜL CAMUR OLUSUMUNA ETKİSİ	62
4.1.1. İşletmeye Alma ve Granülasyon.....	62
4.1.2. Aerobik Granüllerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi.....	67
4.1.3. Nutrient Gideriminin İncelenmesi	84

4.1.4. Granüllerin Yapısının İncelenmesi	93
4.1.4.1. Metal İçeriğinin Belirlenmesi	93
4.1.4.2. Granül Yapısının ESEM ve EDX ile İncelenmesi	96
4.1.4.3 Aerobik Granüllerin EPS'nin İncelenmesi	109
4.1.4.4. Aerobik Granüllerde Kimyasal Çökelmenin Belirlenmesi	112
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	115
KAYNAKLAR	119
EKLER	125
ÖZGEÇMİŞ	126

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	:Kalsiyumun Bulunması Durumunda Alginat Jel Oluşturma ve Yumurta Kutusu Modeli.....	6
Şekil 2.2	:Flok Matriksindeki +2 Değerlikli Katyon Köprülerinin Gösterimi.....	7
Şekil 2.3	:(i) Fe İyonları İle Flokların Biyolojik Bileşenleri Arasındaki Etkileşimin (a ve b) ve (ii) Fe Dozlanan Flokların (c ve d) Şematik Gösterimi (Ölçekli Değil).....	8
Şekil 2.4	:Bazı İyonların İyonik ve Hidrat Yarıçaplarının Şematik Gösterimi.....	10
Şekil 2.5	:Glikozla (a) ve Asetatla (b) Beslenen Aerobik Granüllerin Makroyapıları (Tay vd., 2001a)	15
Şekil 2.6	:Glikozla (a) ve Asetatla (b) Beslenen Aerobik Granüllerin Mikroyapıları (Tay vd., 2008)	15
Şekil 2.7	:1000 mg/L Asetat İçeren Atıksu Beslenen Aerobik Granüllerin Görünümü (Tay vd., 2008)	16
Şekil 2.8	:Karbon Kaynağının Mikrobiyal Yapı Üzerindeki Etkisi (Adav vd., 2007b)	20
Şekil 2.9	:Farklı Aşamalardaki Biyoagregatların CLSM Görüntüleri (Lee vd., 2008)	25
Şekil 2.10	:R1 ve R2'deki Olgun Granüllerin Görünümü (Tay vd., 2003).....	35
Şekil 2.11	:105. Döngüden Sonra Granüllerin Gelişimi: R1:Ca ve R2:Mg (Gao vd., 2010).....	36
Şekil 2.12	:Farklı AKR'lerdeki SEM Görüntüleri (Jiuyi Li, 2005)	40
Şekil 2.13	:(a) Demir Eklenmeden Önceki Islak Flok, (b) demir (III) Eklenen Flok (c) demir (II) Eklenen Flok (Oikonomidis vd., 2010)	43
Şekil 3.1	:Çalışmada Kullanılan Reaktör	47
Şekil 4.1	:(a) R1 ve (b) R2'de Çalışma Boyunca Ölçülen Reaktörlerin İçinde ve Reaktörlerden Atılan Çıkış Suyundaki AKM ve UAKM Konsantrasyonları ile Buna Karşılık Gelen CHI Ve $\text{CHI}_5/\text{CHI}_{30}$ Değerleri ve Granül Boyutu	65
Şekil 4.2	:Çalışmanın 13.Gününde R1 ve R2'deki Granüllerin Görünümü (Ölçek=1mm)	66
Şekil 4.3	:Aşı Çamurunun Işık Mikroskobu Görüntüsü (40x).....	67
Şekil 4.4	:Işık Mikroskobu Görüntüsü (2. Gün, 40x)	68
Şekil 4.5	:Işık Mikroskobu Görüntüsü (8. Gün, 40x)	68
Şekil 4.6	:Işık Mikroskobu Görüntüsü (8. Gün, 100x)	69
Şekil 4.6	:(Devamı) Işık Mikroskobu Görüntüsü (8. Gün, 100x)	69
Şekil 4.7	:Işık Mikroskobu Görüntüsü (17. Gün, 40x)	70
Şekil 4.8	:Granüllerin Genel Görüntüsü (20.Gün)	70
Şekil 4.9	:Işık Mikroskobu Görüntüsü (22. Gün, 40x)	71
Şekil 4.10	:Granüllerin Genel Görüntüsü (48. Gün).....	71
Şekil 4.11	:Granüllerin Genel Görüntüsü (64. Gün).....	72
Şekil 4.12	:Işık Mikroskobu Görüntüsü (80. Gün, 40x)	73
Şekil 4.13	:Granüllerin Genel Görüntüsü (85. Gün).....	73
Şekil 4.14	:Granüllerin Genel Görüntüsü (99. Gün).....	74
Şekil 4.15	:Işık Mikroskobu Görüntüsü (99. Gün, a, b, c, d, e 40x, f 100x).....	74
Şekil 4.16	:Granüllerin Genel Görüntüsü (111. Gün).....	75
Şekil 4.17	:Granüllerin Genel Görüntüsü (148. Gün).....	76
Şekil 4.18	:Işık Mikroskobu Görüntüsü (148. Gün, 40x)	76
Şekil 4.19	:Granüllerin Genel Görüntüsü (158. Gün)	77
Şekil 4.20	:Işık Mikroskobu Görüntüsü (158. Gün, 40x)	77

Şekil 4.21	:Granüllerin Genel Görüntüsü (192. Gün)	78
Şekil 4.22	:Işık Mikroskobu Görüntüsü (192. Gün, 40x)	78
Şekil 4.23	:Granüllerin Genel Görüntüsü (203. Gün)	79
Şekil 4.24	:Işık Mikroskobu Görüntüsü (203. Gün, 40x)	79
Şekil 4.25	:Granüllerin Genel Görüntüsü (217. Gün)	80
Şekil 4.26	:Işık Mikroskobu Görüntüsü (217. Gün, 40x)	80
Şekil 4.27	:Granüllerin Genel Görüntüsü (233. Gün)	81
Şekil 4.28	:Işık Mikroskobu Görüntüsü (233. Gün, 40x)	81
Şekil 4.29	:Işık Mikroskobu Görüntüsü (248. Gün, 40x)	82
Şekil 4.30	:Granüllerin Genel Görüntüsü (267. Gün)	82
Şekil 4.31	:Işık Mikroskobu Görüntüsü (267. Gün, 40x)	83
Şekil 4.32	:R1 ve R2’de Reaktör Çıkışında Ölçülen NH ₄ -N, NO ₃ -N, NO ₂ -N Ve PO ₄ -P Konsantrasyonları	85
Şekil 4.33	:R1 ve R2’de Tipik Bir Döngü Çalışması	88
Şekil 4.34	:R1 ve R2’de Real Time PCR İle Ölçülen AOB’ler	89
Şekil 4.35	:R1 ve R2’de Real Time PCR İle Ölçülen NOB’ler	89
Şekil 4.36	:R1 ve R2’de Real Time PCR İle Ölçülen Fosfor Depolayan Bakteriler ..	90
Şekil 4.37	:R1 ve R2’den 56. Günde Alınarak Analizi Yapılan Numunelerin Homojenizasyondan Önceki Görüntüsü	94
Şekil 4.38	:R1 ve R2’den Alınan Aerobik Granüllerde Na, Mg, P, K, Ca ve Fe Analizleri (ICP Kullanılarak Ölçülmüştür)	96
Şekil 4.39	:64. Günde R1’den Alınan Granül Numunesinin ESEM Görüntüleri	97
	(a) Genel Görünüm 100x, (b) Kesit1 200x, (c) Kesit2 8000x, (d) Kesit3 2000x, (e) Kesit4 3200x	97
Şekil 4.40	:64. Günde R2’den Alınan Granül Numunesinin ESEM Görüntüleri	98
	(a) Genel Görünüm 75x, (b) Kesit1 2000x, (c) Kesit2 4000x, (d) Kesit3 6000x, (e) Kesit4 3000x, (f) Işık Mikroskobu, 10x	98
Şekil 4.41	:64. Günde R2’den Alınan Filament Numunesinin ESEM Görüntüleri	99
Şekil 4.41	:(Devamı) 64. Günde R2’den Alınan Filament Numunesinin ESEM Görüntüleri	100
Şekil 4.42	:210. Günde R1’den Alınan Aerobik Granülün Dış ve İç Yüzeyinden Alınan ESEM Görüntüleri	103
Şekil 4.43	:210. Günde R2’den Alınan Aerobik Granüllerin Dış ve İç Yüzeyinden Alınan ESEM Görüntüleri	104
Şekil 4.43	:(Devamı) 210. Günde R2’den Alınan Aerobik Granüllerin Dış ve İç Yüzeyinden Alınan ESEM Görüntüleri	105
Şekil 4.44	:Real-Time PCR ile Ölçülen Filamentli Türlerin Değişimi	108
Şekil 4.45	:R1 ve R2’nin EPS’inde Ölçülen Karbonhidrat ve Protein Miktarları ..	109
Şekil 4.46	:(a) Fe İçermeyen Deney Grubuna Ait Örneklerin Suda Çözünebilen Protein Profilleri (b) Fe İçeren Deney Grubuna Ait Örneklerin Suda Çözünebilen Protein Profilleri	111

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	:Bazı Katyonların Yarıçapları ve Rölatif Flokülasyon Güçleri.....	11
Tablo 3.1	:Sentetik Atıksu Kompozisyonu.....	48
Tablo 3.2	:İz Element Çözeltileri Kompozisyonu.....	48
Tablo 3.3	:PBS Çözeltileri.....	52
Tablo 3.4	:“BSA Protein Assay Kit”in Bileşenleri ve İçerikleri	52
Tablo 3.5	:SDS-PAGE İçin Hazırlanan Çözeltiler	54
Tablo 3.6	:SDS-PAGE'de Kullanılan Jelin Hazırlanması.....	54
Tablo 3.8	:Mikrodalga Parçalama Programı.....	59
Tablo 3.7	:Hızlı Gümüş Boyama Yöntemi İçin Gerekli Çözeltiler	55
Tablo 3.9	:Real-Time PCR Deneylerinde Kullanılan Primerler.....	60
Tablo 4.1	:R1 ve R2’den 56. Günde Alınan Numunelerin Analiz Sonucu	94
Tablo 4.2	:64. Günde R1 ve R2’den Alınan Granüllerin ESEM Kesitlerinde Yapılan EDX Analiz Sonuçları (Wt%).....	101
Tablo 4.3	:R1 ve R2 Granüllerinin İç ve Dış Yüzeylerinde Yapılan EDX Analizleri	106
Tablo 4.4	:Cold PCA Metoduna Göre R1 ve R2’de Kimyasal Çökeltmenin Belirlenmesi (De Haas vd., 2000).	113
Tablo 4.5	:R1 ve R2’de Kimyasal Çökeleklerin Türünün Belirlenmesi (Uhlmann vd., 1990).....	114

SEMBOL LİSTESİ

AKR	:Ardışık kesikli reaktör
AOB	:Amonyum oksitleyen bakteriler
CLSM	:Konfokal lazer taramalı elektron mikroskobu (Confocal laser scanning electron microscope)
ÇHİ	:Çamur hacim indeksi
ÇHİ₅	:Çamur hacim indeksi (5 dakikalık)
ÇHİ₃₀	:Çamur hacim indeksi (30 dakikalık)
EDX	:Enerji dağılımlı X-ışını analizi (Energy Dispersive X-ray Analysis)
EPS	:Hücre dışı polimerik maddeler (Extracellular polymeric substances)
ESEM	:Çevresel taramalı elektron mikroskobu (Environmental scanning electron microscope)
FISH	:Floresanlı yerinde hibritleme (Fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
KOİ	:Kimyasal Oksijen İhtiyacı
NOB	:Nitrit oksitleyen bakteriler
OLR	:Organik yükleme hızı (Organic loading rate)
PBS	:Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate buffered saline)
PCA	:Perklorik asit
PHA	:Polihidroksialkonat
PN	:Protein
PS	:Polisakkarit
Q_{hava}	:Hava debisi
R1	:Reaktör 1
R2	:Reaktör 2
SMP	:Çözünmüş mikrobiyal ürünler (Soluble microbial products)
T_s	:Çöktürme süresi
T_c	:Döngü süresi
UAKM	:Uçucu askıda katı madde
UYA	:Uçucu yağ asitleri
V_{hava}	:Yüzeysel yukarı akış hava hızı

ÖZET

AEROBİK GRANÜL ÇAMUR STABİLİTESİNİN İNCELENMESİ

Aerobik granülasyon prosesi aktif çamur prosesinin bazı dezavantajları nedeniyle yeni bir teknoloji olarak geliştirilmiştir. Aerobik granülasyon prosesi kompakt ve güçlü mikrobiyal yapıya, iyi çökelme özelliğine ve yüksek çamur yaşına sahip olması bakımından aktif çamur proseslerine üstünlük sağlamaktadır. Böylece, atıksu arıtımında aerobik granül çamur sistemi aktif çamur sistemlerinden daha az yer kaplamaktadır.

Aerobik açıklık, atıksu kompozisyonu, çamur yaşı, çöktürme süresi, aşı çamuru, reaktör konfigürasyonu, kesme kuvveti, +2 değerlikli metal iyonlarının varlığı gibi işletme şartları aerobik granülasyonu etkileyen faktörlerdir. Bunlardan +2 değerlikli metal iyonları aerobik granülasyon prosesinde önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle Ca^{2+} ve Mg^{2+} 'nin AKR'de aerobik granülasyonu arttırdığı yapılan çalışmalar sonucu ortaya konmuştur. Sisteme verilen +2 değerlikli iyonların EPS'deki negatif yüklü bölgelere tutunarak bir köprü görevi gördüğü ve granülasyonu arttırdığı gözlemlenmiştir. Literatürde Fe^{2+} 'nin floküler çamur üzerine etkilerini araştıran çalışmalar olmasına rağmen Fe^{2+} 'nin aerobik granülasyon üzerine etkilerini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, Fe^{2+} 'nin aerobik granül çamur oluşumu ve stabilitesi üzerine etkilerinin incelenmesidir. Bu amaçla çalışma kapsamında, Fe^{2+} ilave edilmeyen kontrol reaktörü ve 10 mg Fe^{2+} /L Fe^{2+} ilave edilen reaktör aynı işletme koşullarında 270 gün boyunca işletilmiştir. Bu iki reaktörde elde edilen aerobik granüller, oluşum hızları, stabilite ve yapılarının yanısıra; sistemlerin işletilmesi sonucu elde edilen organik madde ve nutrient giderim verimleri açısından da karşılaştırılmıştır.

Bu çalışma, Fe^{2+} ilavesinin, daha stabil granüllerin oluşumunu desteklemesinin yanısıra nutrient giderimini de iyileştirdiğini göstermiştir. Fe^{2+} ilave edilmeyen ve edilen reaktörlerde ilk granüllerin oluşumu aynı sürede gerçekleşmiş olmasına rağmen; oluşan granüllerin boyutunda ve morfolojisinde belirgin farklılıklar gözlenmiştir. Fe^{2+} ilave

edilen reaktörde olgun granüller 20. günde elde edilmiş ve işletme koşullarının değişimine bağlı bozulma periyodu dışında, stabil olarak kalmıştır. Fe^{2+} ilave edilmeyen reaktörde, aerobik granüller elde edilmesine rağmen; granül çamur filamentli ve gevşek yapısından dolayı belirli sürelerde bozularak tekrar büyüme eğilimi göstermiştir. Fe^{2+} ile beslenen granüller, Fe^{2+} eklenmeyen granüllerden daha iyi fiziksel özellikler, daha iyi çökebilme ve sıkışma özelliği ve daha kompakt bir yapı sergilemiştir. Çalışmamızda elde edilen aerobik granüller, Fe^{2+} ilave edilmeyen reaktörde açık sarı renkte, yuvarlak olmasına rağmen uçucu gevşek görünümlü filamentli yapıdadır. Fe^{2+} ilave edilen reaktörde, koyu sarı- kahverengi renkte, düzgün yüzeyli, filamentli olmayan granüller elde edilmiştir. Fe^{2+} ilave edilen reaktördeki granüllerin yüzeyi kesin hatlarla belirlenmiş, düzgün ve pürüzsüzdür. Düzgün ve stabil granüller Fe^{2+} ilavesinin, filamentli bakteri oluşumunu baskılamasından kaynaklanmaktadır. Fe^{2+} ilave edilmeyen reaktörde hiçbir koşulda nitrifikasyon gerçekleşmemesine rağmen; Fe^{2+} ilave edilen reaktörde 70. günden itibaren tam nitrifikasyon gerçekleşmiştir. Fe^{2+} 'siz aerobik granüllerin iç ve dış yapısında belirgin bir farklılık dikkati çekmezken; ağırlık yüzdesi olarak Fe^{2+} 'li aerobik granüllerin içinde dışından daha fazla Fe saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Aerobik granül çamur, EPS, Fe^{2+} , granül çamur oluşumu, katyonlar, kimyasal çökeltme, stabilite

SUMMARY

INVESTIGATION OF AEROBIC GRANULAR SLUDGE STABILITY

Aerobic granulation process was developed as an innovative technology due to the several drawbacks of activated sludge processes. Aerobic granulation process has advantages such as having a compact and strong microbial structure, good settling properties, high biomass retention time compared with activated sludge process. Thus, aerobic granulation process requires less area than activated sludge processes in wastewater treatment.

The operation conditions such as aerobic starvation, feed composition, solid retention time, settling time, seed sludge, reactor configuration, shear force and presence of the divalent metal ions affect the aerobic granulation process. In these factors, divalent metal ions play an important role in the process of aerobic granulation. The researches showed that especially Ca^{2+} and Mg^{2+} promote the aerobic granulation in SBR. Divalent cations participate in bridging of negatively charged sites on the EPS and promote the granulation. The effects of the Fe^{2+} on the flocculated sludge have been investigated but there is not any researches about the effect of Fe^{2+} on aerobic granular sludge.

The aim of this study is to investigate the effects of Fe^{2+} on the formation and stability of aerobic granular sludge. In this context the control reactor without Fe^{2+} addition and the reactor with 10 $\text{mgFe}^{2+}/\text{L}$ of Fe^{2+} addition were operated at the same operational conditions during 270 days. The aerobic granules obtained in these two reactors were compared for the formation, stability and structure of granular sludge together with the removal efficiencies of organic matter and nutrient.

The study showed that the Fe^{2+} addition supported the formation of stable granular sludge and also improved the removal of nutrient. The formation of granular sludge in both of the reactors was achieved at the same time but, the granules presented the different characteristics in size and morphology. The mature granules in the reactor with Fe^{2+} addition were obtained at day 20 and sustained stable. The mature granules in the reactor without Fe^{2+} addition were also obtained but, they disintegrated and grown again

because of their filamentous and loose structures. The granules with Fe^{2+} addition exhibited better physical characteristics, and demonstrated better settleability and more compact structure than the granules without Fe^{2+} addition. The aerobic granules without Fe^{2+} addition were light yellow in color, round in shape and, loose and fluffy filamentous structure. In the reactor fed with Fe^{2+} addition the granules were dark yellow- brownish in color, and smooth and non-filamentous structure. It was thought that the smooth and non-filamentous structure resulted from the Fe^{2+} addition since it repressed the growth of filamentous bacteria. Nitrification could not be achieved in the reactor without Fe^{2+} addition. On the other hand the complete nitrification could be obtained in the reactor with Fe^{2+} addition starting from 70th day of the study. The mature granules without Fe^{2+} addition had the similar structure for inner and outer layers but more FePO_4 precipitation in the granules with Fe^{2+} addition was observed in the inner layer than outer layer.

Key Words: Aerobic granular sludge, EPS, Fe^{+2} , formation, cations, chemical precipitation, stability

1. GİRİŞ

Ülkemizde şehirleşme çok hızlı yaşandığı için su kaynakları yetersiz kalmakta ve kirlenmektedir. Sınırlı olan su kaynaklarımızın korunması için su ve atıksu yönetimi, bu konudaki teknolojik gelişmeler dikkate alınarak uygulanmalıdır. İşletimi kolay, işletme maliyeti düşük, az alan kaplayan sistemler geliştirilmeli ve uygulaması yaygınlaştırılmalıdır. Bu sebeple, son yıllarda atıksu arıtma tesislerinde aktif çamur sistemlerine göre daha az yer kaplayan aerobik granül çamur prosesi geliştirilmiştir.

Granül çamur ilk defa 1980 yılında anaerobik sistemlerde tanımlanmış (Lettinga vd., 1980) ve 1990'lı yılların sonlarında aerobik granüllerin yapısı ve uygulamaları ortaya konmuştur (Morgenroth vd., 1997, Beun vd., 1999, Dangcong vd., 1999). Anaerobik granülasyon teknolojisinin; uzun işletmeye alma süresi, yüksek işletme sıcaklığı, düşük kuvvetteki organik atıksuların arıtımına uygun olmayışı ve atıksudan nutrient (N ve P) giderim veriminin düşük olması gibi bazı dezavantajlarının olduğu görülmüştür. Bu durum aerobik granül çamur teknolojisinin gelişmesini sağlamıştır.

Ardışık Kesikli Reaktör (AKR)'de kompakt yapıya sahip, değişik mikrobiyal türlerle biyolojik olarak verimli, mükemmel çökebilme kapasitesi bulunan aerobik granüller geliştirilmiştir. Aerobik granüller yoğun olarak bir araya gelmiş mikrobiyal agregatlardan oluşmaktadır ve yoğunlukları konvansiyonel aktif çamurdan daha yüksektir. Aerobik granüllerin önemli özellikleri,

- Düzenli, düz ve neredeyse yuvarlak bir şekle sahip olması,
- Mükemmel çökebilme,
- Yoğun ve kuvvetli mikrobiyal yapıya sahip olma,
- Yüksek biyokütle tutabilme,
- Yüksek organik yüklemelere dayanabilme,
- Toksikiteye karşı toleranslı olmasıdır.

Aerobik granülasyon teknolojisi; önemli özelliklerinden dolayı son yıllarda organik madde, azot, fosfor ve toksik bileşikleri içeren yüksek kuvvetteki atıksuların arıtılması

amacıyla geliştirilmiştir (Jiang vd., 2002; Moy vd., 2002; Tay vd., 2002b; Lin vd., 2003; Adav vd., 2007a,b,c,d; Adav ve Lee, 2008a, Yılmaz vd., 2009).

Aerobik granülasyon teknolojisi atıksu arıtımında önemli avantajlar sağlamasına rağmen, yeni gelişen bir teknoloji olmasından dolayı aerobik granül çamur oluşumunu hızlandırma stratejisi ve farklı işletme koşullarının aerobik granül çamur oluşumuna etkileri ile stabilitesine etki eden faktörler henüz net olarak tanımlanamamıştır. Literatürde özellikle +2 değerlikli katyonların (Ca^{2+} ve Mg^{2+}) aerobik granül çamur oluşumuna ve stabilitesine etkileri ile ilgili araştırmalar olmasına rağmen (Liu vd., 2008; Tay vd., 2010) Fe^{2+} 'nin aerobik granül çamur oluşumuna olan etkilerini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, Fe^{2+} 'nin aerobik granül çamur oluşumu ve stabilitesi üzerine etkilerinin incelenmesidir. Bu amaçla çalışma kapsamında, Fe^{2+} ilave edilmeyen kontrol reaktörü ve 10 mg Fe^{2+} /L Fe^{2+} ilave edilen reaktör aynı işletme koşullarında 270 gün boyunca paralel olarak işletilmiştir. Bu iki reaktörde elde edilen aerobik granüller oluşum hızı, stabilitesi ve granül yapısı yanında; sistemlerin işletilmesi sonucu elde edilen organik madde ve nutrient giderim verimleri açısından karşılaştırılmıştır. Aerobik granül çamur oluşumu, stabilitesi ve yapısı AKM-UAKM, ÇHI, boyut dağılımı, ışık mikroskobu, ESEM-EDX, EPS, PN ve PS analizi, elektroforez ve ICP analizi ile; granül yapısındaki kimyasal bağlı fosfor, cold PCA metodu (de Haas v.d., 2000) ve fosfor fraksiyonu prosedürü (Uhlmann vd., 1990) ile; sistem performansı KOİ, NH_4-N ve PO_4-P analizleri ile belirlenmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. AKTİF ÇAMUR SİSTEMLERİ

Aktif çamur sistemi, aerobik biyolojik aktif mikroorganizmaların atıksu ile havalandırılarak karıştırıldığı ve oluşan flokların ayrı bir yerde çöktüğü sürekli bir sistemdir. Atık suyun biyolojik olarak arıtılması havalandırma havuzunda, aktif çamur bakterileri vasıtasıyla olmaktadır. Son çökeltme havuzunda aktif çamur flokları çökmekte ve aktif çamur olarak havalandırma havuzuna geri pompalanmaktadır. Çöken çamurun bir kısmı havalandırma havuzuna geri devrettirilirken geri kalan kısmı atık çamur olarak uzaklaştırılmaktadır. Artık çamurun uzaklaştırılması ile havalandırma havuzundaki çamur miktarı ayarlanabilmektedir. Burada çamurun alınması aktif çamur sisteminin kararlılığını ve verimli çalışmasını sağlamaktadır (Samsunlu, 2006).

2.1.1. Aktif Çamur Mikroorganizmalarının Rolü

Biyolojik atıksu arıtımının verimi mikroorganizmaların flokülasyon yeteneğine bağlıdır. Aktif çamurun mikrobiyolojisi incelendiğinde yaklaşık olarak %95 bakteri ve %5 diğer organizmaları (protozoa, rotiferler, mantarlar, filamentli organizmalar, virüsler vb.) içerdiği görülmüştür. Aktif çamurdaki bakteriyel türler temel olarak Gram-negatiftir. Aktif çamur sistemlerindeki organizmaların virüslerden çok hücreli organizmalara kadar değişik türlerde olmasına rağmen en etkili ve baskın olan türler heterotrofik bakterilerdir. Bunlar *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Artrobacter*, *Micrococcus*, *Citromonas* ve *Zooglea* gibi türlerdir. Bu organizmalar hücre sentezi ve yeni hücre üretimi, sindirim ve hareket vb. faaliyetler için karbon kaynağı olarak atıksudaki organik maddeleri kullanırlar (Gangczarczyk, 1983).

2.1.2. Biyoflokülasyon Mekanizması

Bir biyolojik flok (biyoflok), iki veya daha fazla tekil mikroorganizmanın bir araya gelerek oluşturduğu kolonidir. Bu bir araya gelme reaksiyonunda, hücre dışı polimerler önemli rol oynar. Araştırmalar, mikroorganizmaların hücresel faaliyetler ya da hücre parçalanmasıyla hücre dışına salgılanan biyopolimerler ürettiklerini göstermektedir. Bu

hücre dışı polimerik maddeler (EPS) tipik olarak protein, polisakkarit, humik maddeler, nükleik asitler ve lipidlerden oluşmaktadır. Biyopolimerler mikroorganizmaları kapsül gibi kaplayan bir matris oluşturur ve böylece mikroorganizmaların agregasyonunu ya da flok oluşturmasını sağlar. Bir flokta EPS'in toplam kütesinin aktif çamur kütesinin %80'ine ulaştığı belirlenmiştir. Biyofloklar öncelikli olarak EPS'den oluştuğundan, EPS'in karakteristiği ile birlikte EPS arasındaki etkileşimler biyoflokülasyonda önemli olacaktır.

Mikroorganizmanın yüzey kompozisyonuna bağlı olarak, farklı flokülasyon mekanizmaları önem kazanır (Sanin ve Vesilind, 1996). Flok oluşumunu açıklamak için araştırmacılar tarafından çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Bu mekanizmalar *Zoogloea ramigera* teorisi (Butterfield, 1935; Heukelekian ve Littman, 1939; Wattie, 1943), filament omurga teorisi (Parker v.d, 1971; Sezgin v.d, 1978), polimer köprü modeli (Tenney ve Stumm, 1965; Busch ve Stumm, 1968), çift tabaka teorisi (DLVO) (Zita ve Hermansson, 1994), katyon köprüsü teorisi (McKinney, 1952; Tezuka, 1969; Kakii v.d, 1985; Eriksson ve Alm, 1991; Bruss v.d, 1992), alginat teorisi (Bruss v.d, 1992; Sanin ve Vesilind, 1996) ve hidrofobik etkileşimler (Urbain v.d, 1993; Jorand v.d, 1994) (Kara, 2007).

EPS'de bulunan fonksiyonel gruplar nedeniyle, biyoflokların genellikle net negatif yüke sahip olduğu bulunmuştur. Biyoflokların negatif yüke sahip olması nedeniyle, biyoflokülasyonda katyonların rolünün önemli olduğu görülmüş ve birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Bu çalışmaların çoğu, katyon ilavesi ve bunun biyoflok özelliklerine etkisini incelemiştir. Bu çalışmalara dayanarak araştırmacılar tarafından önerilen üç farklı teori, katyonların biyoflokülasyonu etkileyen mekanizmaları açıklamada kullanılmaktadır. Bunlar:

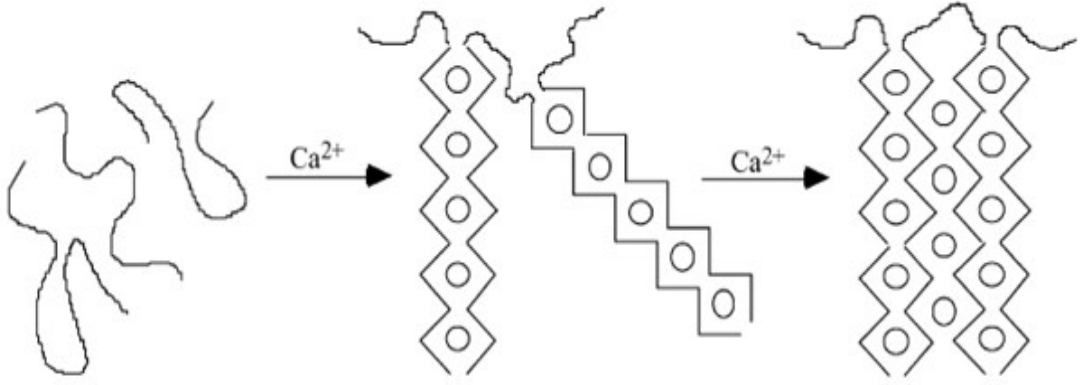
1. Çift tabaka teorisi ya da DLVO teorisi,
2. Alginat teorisi,
3. Katyon köprüsü teorisi.

Çift Tabaka (DLVO) teorisi: Adını teoriyi geliştiren Derjaguin, Landau, Verwey ve Overbeek (DLVO)'den alan teori, yüklü partikülleri tanımlayan klasik kolloid teorisidir. Bu teori partikül çevresinde bulunan zıt yüklü iyonların oluşturduğu çift tabakayı

tanımlamaktadır. İlk tabaka zıt yüklü iyonların sıkıca bağlanmasından oluşan Stern tabakasıdır. İkinci tabaka ise zıt yüklü iyonların daha gevşek bağlanması sonucu oluşan dağınık tabakadır. Dağınık tabakadaki iyon konsantrasyonu sudaki iyon konsantrasyonu ile eşitleninceye kadar partikül yüzeyine olan mesafenin artmasıyla azalır. Partikül çevresindeki bu çift tabaka çok yakın partiküller arasında itici bir güç olarak görev yapmakta ve agregasyonu engellemektedir.

Sisteme katyon eklenmesi çift tabaka boyutunun ve partiküller arasındaki itici gücün azalmasından dolayı biyoflokülasyonu geliştirmektedir. Birçok araştırmacı tarafından katyonların biyoflokülasyondaki rolüyle ilgili çalışmalar yapılmıştır. Cousin ve Ganczarczyk (1998) sodyum eklenmesinin flok boyutunu arttırdığını ve flok porozitesini geliştirdiğini belirtmişlerdir. Flok özelliklerindeki bu değişiklikleri DLVO teorisiyle açıklamışlardır. Zita ve Hermansson (1994) flok stabilitesinin sistemdeki iyonik kuvvetlerden etkilendiğini ve bu etkilerin DLVO teorisiyle açıklanabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca K^+ ve Ca^{2+} 'nin partikül stabilitesi üzerinde benzer etkiler yaptığını gözlemlemişlerdir.

Alginat Teorisi: Bu teori katyonların biyoflokülasyondaki rolü açısından ilk kez Bruus vd. (1992) tarafından önerilmiştir. Alginat bakteriler tarafından üretilen polisakkarittir ve bu polisakkarit kalsiyum varlığında alginat jeli yapısındadır. Aktif çamurda bulunan *Azotobacter sp.* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakterilerin alginat ürettiği bilinmektedir. Bu jel genellikle yumurta kutusu modeli olarak bilinmekte ve Şekil 2.1'de gösterilmektedir.

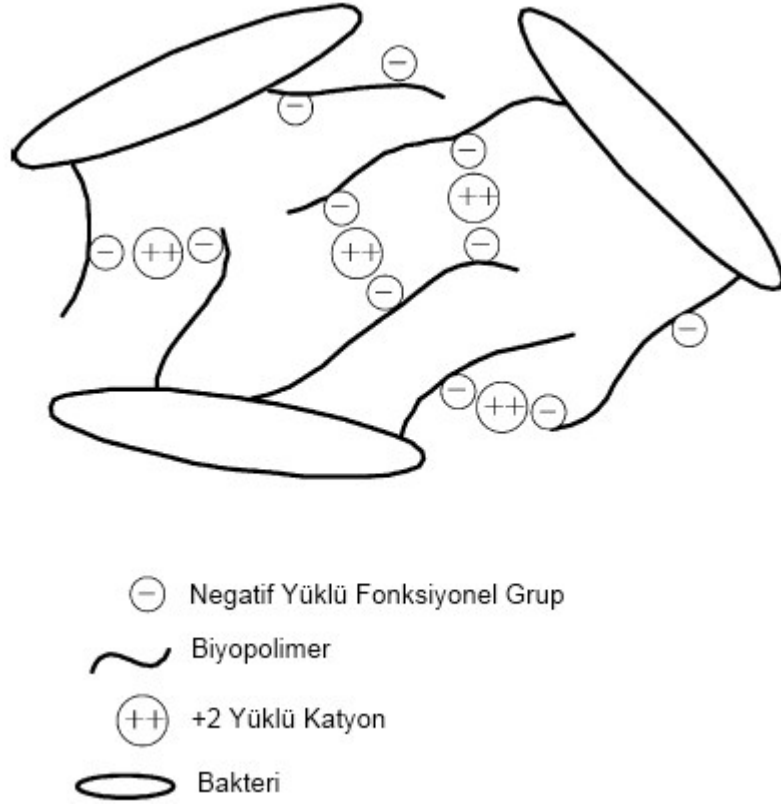


○ Yumurta kutusu modelindeki kalsiyum iyonları

Şekil 2.1 Kalsiyumun bulunması durumunda Alginat jel oluşturma ve yumurta kutusu modeli

Bu model kalsiyumun mikrobiyal agregasyondaki rolünün belirlenmesi sonucunda önerilmiştir. Bruus vd. (1992), aktif çamura yüksek konsantrasyonlarda sodyum eklendiğinde kalsiyumun flok içerisinde çıkarak iyon değişiminin gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Bu iyon değiştirme flok özelliklerinin kötüleşmesine sebep olmuştur. Ayrıca Mg^{2+} eklenmesi de Ca^{2+} 'nin flok içerisinde benzer şekilde değişmesine ve flok özelliklerini kötüleşmesine sebep olmuştur. Sonuç olarak biyoflokülasyonda alginatın rolünü destekleyen biyopolimerin Ca^{2+} için Mg^{2+} 'ye göre daha büyük yakınlığa sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Kasyon Köprüsü Teorisi: Bu teoriyi öneren ilk araştırmacılar McKinney (1952) ve Tezuka (1969)'dır. Tezuka (1969), saf kültürlerin büyümesi sırasında flok yapısını inceleyerek +2 değerlikli katyonların rolünü araştırmış ve kalsiyum ve magnezyumun biyoflokülasyon prosesi açısından önemli olduğunu belirtmiştir. Bu teoriye göre +2 değerlikli katyonlar EPS içerisindeki negatif yüklü fonksiyonel grupları bağlayarak agregasyona ve stabilizasyona yardımcı olmakta ve biyoflokülasyonu arttırmaktadır. +2 değerlikli kasyon köprüsü modeli Şekil.2.2'de gösterilmektedir.



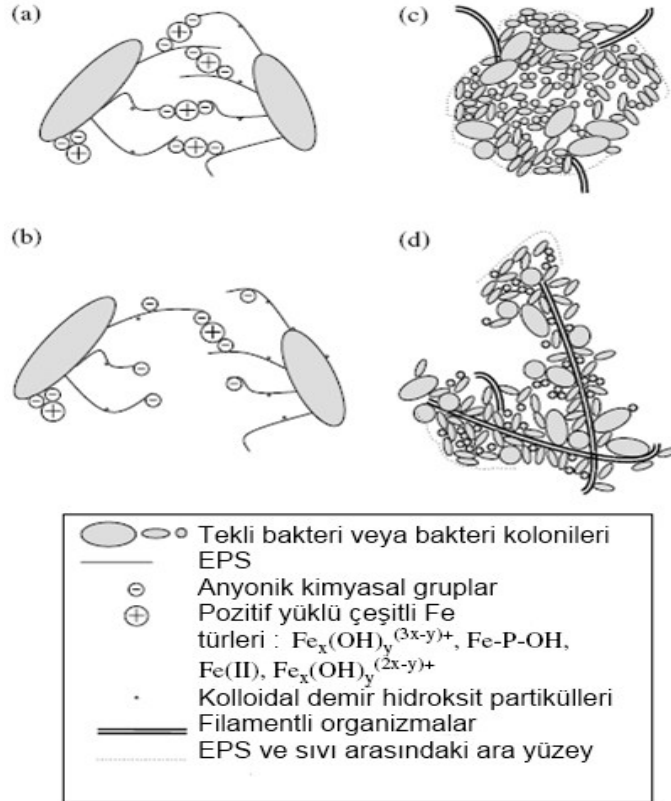
Şekil 2.2 Flok matriksindeki +2 değerlikli katyon köprülerinin gösterimi

Higgins ve Novak (1997) toplam monovalent katyon (Na^+ , NH_4^+ , K^+) konsantrasyonunun toplam divalent katyon (Ca^{2+} , Mg^{2+}) konsantrasyonuna oranının 2'den büyük olduğunda flok özelliklerinin kötüleştiğini rapor etmişlerdir. Bu sonuçla yüksek konsantrasyonlardaki monovalent katyonların (Na^+) flok özelliklerinde bozulmalara sebep olduğu durumlarda M/D oranı (meq/L) indikatör olarak belirlenmiştir (Higgins ve Novak, 1997). Ayrıca sisteme monovalent katyonların eklenmesinin flokülasyon üzerinde olumsuz etkiye sebep olduğu belirtilmiştir.

Sonuç olarak katyonların biyoflokülasyon üzerindeki etkilerini açıklamak amacıyla 3 teori geliştirilmiş ve katyonların biyoflokülasyondaki temel rolünü +2 değerlikli katyon köprüsü teorisi en iyi şekilde açıklamıştır.

Aktif çamura Fe^{2+} ve Fe^{3+} eklendiğinde, Fe iyonları ile biyofloklar arasındaki ilişki başka bir teori ile açıklanmıştır (Oikonomidis vd., 2010). Şekil 2.3'de Fe iyonları ile biyofloklar arasındaki ilişki şematik olarak verilmiştir. Buna göre, Fe^{2+} eklendiğinde oksidasyon/hidroлиз reaksiyonları başlamadan önce ya da çok kısa bir süre sonra; Fe^{2+}

EPS'deki negatif yüklü gruplarla etkileşmektedir. Bu etkileşimlere katılan Fe türleri Fe(II), monomerik ya da polimerik Fe(II)/Fe(III) hidroliz ürünleri ve ya Fe-P-OH kompleksleridir. Flok yüzeyindeki anyonik kimyasal gruplarla pozitif yüklü Fe türleri köprü oluşturarak, çok değerlikli katyon köprüsü teorisi (multivalent cation bridging theory)'ne göre biyoflokulasyonu desteklemektedir. Fe^{3+} eklendiğinde ise, havalandırma tankındaki pH koşullarında hızlıca $Fe(OH)_3$ oluşumu meydana gelmektedir. $Fe(OH)_3$ muhtemelen flok yüzeyine çok küçük boyutta koloidal partiküller olarak yerleşmektedirler. $Fe(OH)_3$ düşük nötralizasyon kapasitesine sahip olduğundan EPS yapısının anyonik adsorbsiyon bölgeleri ile iletişimi yeterli olmamaktadır. Bu da flok yapısıyla çökelme ürünlerinin entegrasyonunu sınırlayarak daha açık flok yapısının oluşmasına neden olmaktadır.



Şekil 2.3 (i) Fe iyonları ile flokların biyolojik bileşenleri arasındaki etkileşimin (a ve b) ve (ii) Fe dozlanan flokların (c ve d) şematik gösterimi (ölçekli değil).

Fe^{2+} eklendiğinde, flok matrisi ile etkileşime giren iyonların sayısı yüksektir (a), Fe^{3+} eklendiğinde etkileşim azdır (b). Fe^{2+} eklenecek flokda, geniş flok yüzeyi düzgün bir EPS tabakası ile kaplanırken (c), Fe^{3+} eklenecek flokda, flokülasyonda önemli bir role sahip olan filamentlerle floklar arasındaki yapı dağınıktır (d) (Oikonomidis vd., 2010) .

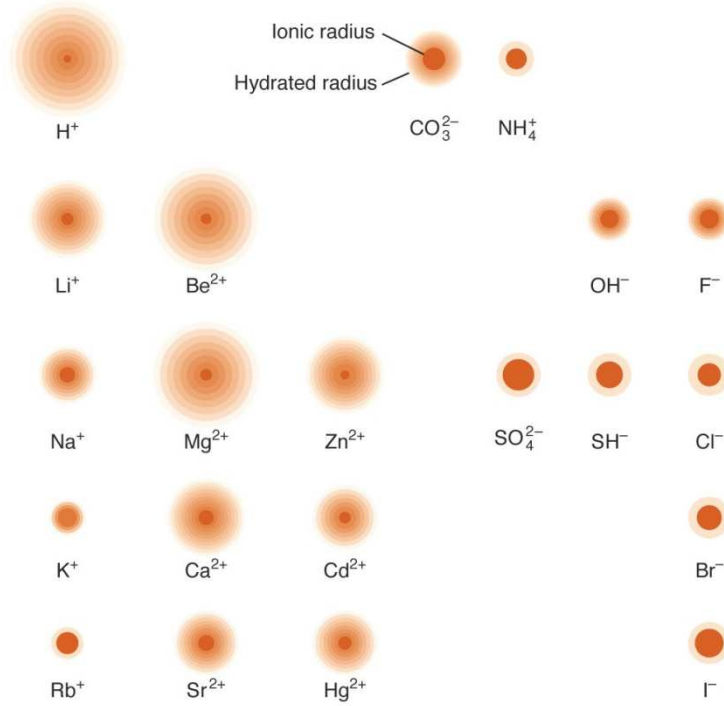
2.1.3. Katyonlar

Hücre makromoleküllerinin sentezi için karbon, oksijen, hidrojen, azot, fosfor ve sülfür gerekli olduğu halde iyonlar üç temel fonksiyon için gereklidir; i) koenzim veya metal kofaktör denilen enzim aktivatörü olarak ii) oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında elektronları transfer için iii) ozmotik basıncı düzenleyenlere hizmet için (Gerardi vd., 1994). Bunun yanısıra, pekçok araştırmacı, çok değerlikli katyonların hücre dışı polimer üzerinde negatif alanda köprü oluşturarak flokülasyonu sağladığını ortaya çıkarmıştır. (Tezuka, 1969; Pavoni vd., 1972; Bruus vd., 1992; Higgins ve Novak, 1997a,b; Dignac vd., 1998). Sodyum, potasyum, amonyum, kalsiyum, magnezyum, demir ve alüminyum aktif çamurda bulunan ana katyonlardır. Bu katyonların spesifik rolleri hakkında bazı tartışmalar olmakla beraber, genellikle iki değerlikli ve üç değerlikli katyonların tek değerlikli katyonlardan daha iyi flokülant olduğu kabul edilmektedir. Farklı tipteki çamurlar ve çeşitli deneysel yaklaşımlar kullanıldığı birçok çalışmada katyonların önemi vurgulanmıştır ve bunlar çok sayıda değişik flok yapısı modellerine yol gösterici olmuştur.

Katyon köprüsü oluşturmak için değişik katyonların eğilimi, iyonik yüke ve katyonların hidrasyon ölçüsüne bağlıdır. Her bir metal iyonu, iyonun etrafını saran çok sayıda su molekülüne sahiptir. Buna hidrasyon kabuğu (hidration shell) denir ve iyonun boyutu büyüdükçe, hidrasyon kabuğunun yarıçapı küçülür, böylece yüksek değerlik ve boyutta ve ince hidrasyon kabuklu katyonlar kolaylıkla yüklü yüzeye yaklaşır ve negatif yüklü polimerlerle bağ oluşturur (Piirtola vd., 1999). Şekil 2.4 ve Tablo 2.1'den görüldüğü gibi, kalsiyum ve magnezyum için, kalsiyum daha yüksek iyonik yarıçap ve daha düşük hidrasyon kabuğu yarıçapına sahip olduğundan, polimerik maddelerin yüzeyine yaklaştığı zaman kalsiyum hidrasyon kabuğunu kolaylıkla kaybeder. EPS'in negatif yüklü fonksiyonel grubu ile daha güçlü bir bağ meydana getirir. Magnezyumun yüzeye yaklaşımı etrafındaki su molekülleri tarafından engellenir. Bir değerlikli katyonlar için sodyum ve potasyumun hidrat yarıçapının kıyaslanması göstermiştir ki, 0,53 nm hidrat yarıçaplı potasyumun 0,79 nm hidrat yarıçaplı sodyum ile yer değiştirecektir. Bu demektir ki, potasyumun iyonik boyutuna kıyasla sodyum daha küçük iyondur, bu yüzden sodyum suyu öyle kuvvetli kaldırır ki yüklü EPS'in yakınındaki hidrasyon kabuğunu kaybetmez ve bu yüzden flokülasyon verimli şekilde oluşmaz. Bu katyonların

rölatif flokülasyon kuvveti hesaplanır ve karşılaştırılırsa, aralarında kalsiyumun en iyi flokülatör olduğu, sodyumun ise en zayıf olduğu, tek yüklü, küçük boyutlu geniş hidrat çapına sahip katyonların en zayıf flokülatör olduğu görülür (Rengasay ve Naiudu, 1998).

Forster ve Lewin (1972), aktif çamurdan alınan EPS üzerinde kalsiyumun magnezyum iyonundan daha bağlayıcı (binding) olduğunu göstermiştir. Forster (1985b), katyonların iyonik boyutlarının EPS içindeki yüklü (karboksil) ve yüksüz (hidroksil) gruplara bağlanma yeteneğine girişim yapabileceği hipotezini öne sürmüştür. Yani, kalsiyum iyonları magnezyum iyonlarından daha geniş olduğu için onların bağlanması tercih edilebilir.



Şekil 2.4 Bazı iyonların iyonik ve hidrat yarıçaplarının şematik gösterimi

Tablo 2.1 Bazı katyonların yarıçapları ve rölatif flokülasyon güçleri

Katyon	Değerlik	İyonik Yarıçap (nm)	Hidrat Yarıçapı (nm)	Rölatif Flokülasyon Gücü
Sodyum	1	0.095	0.79	1.0
Potasyum	1	0.133	0.53	1.7
Magnezyum	2	0.065	1.08	27.0
Kalsiyum	2	0.099	0.96	43.0
Demir	20	0.055	0.435	
Alüminyum	3	0.05	0.48	

Katyon köprüleme modeline göre, floktan iki değerlikli katyonların giderimi, flok yapısının zayıflamasından dolayı çökme ve susuzlaşma özelliklerinin bozulmasına yol açar (Tezuka, 1969; Novak ve Haugan, 1970; Bruus vd., 1992). Flok yapısı zayıflar çünkü, iki değerlikli katyonlar biyopolimerler üzerine negatif yüklerle bağlanır, mikrobiyal yüzey ve diğer biyopolimerlere bağlanır. Biyopolimerlere bağlanma, flok oluşumunu iyileştiren biyopolimer ağlarını stabilize eder.

Üç değerlikli katyonlar iki değerlikli katyonlardan daha yüksek etkiye değerine ve daha düşük çözünürlüğe sahiptir. Kakii vd. (1985)'e göre, kalsiyum ve magnezyumun çoğu ekstrakte olduğu halde, demir ve alüminyum aktif çamurun pH 3'de asit ile arıtımından etkilenmez. Bu da gösterir ki, demir ve alüminyum iki değerlikli katyonlardan daha kuvvetli olarak çamur matriksi ile birleşir. Demirin çamurdaki polimerlere ilgisinin olduğu ve demirin varlığının daha iyi susuzlaşan ürünlerle sonuçlanacağı bulunmuştur (Murthy, 1998). Demirin varlığı, aktif çamur floklarındaki biyopolimerlerin tutunması için önemli olabilir.

Cousin ve Ganczarcyzk (1998) biyolojik süspansiyona sodyum eklemenin flok boyutunu artırdığını ve flok porozitesini iyileştirdiğini rapor etmiştir. Zita ve Hermanson (1994), flok stabilitesinin solüsyondaki iyonik dayanıklılıktan etkilendiğini ve bunun DLVO teorisi ile açıklanabileceğini rapor etmiştir. Aynı zamanda potasyum ve kalsiyumun da partikül stabilitesi üzerinde benzer etkiyi meydana getirdiğini de rapor etmişlerdir. Diğer taraftan, Bruus vd. (1992), yoğunlaşmış çamura sodyum ve potasyum ilave etmenin kalsiyumun sıyrılması ve bulanıklığın artması ile sonuçlandırıldığını bulmuştur. Buna ilaveten bir değerlikli katyonların ilave edilmesinin

çamur susuzlaştırmasını kötüleşmesi ile sonuçlanacağını bulmuşlardır. pH kontrolü için sodyum hidroksit kullanıldığı endüstriyel atıksu arıtma tesislerinde genellikle çökme ve susuzlaştırma özelliği kötü olan çamur üretilir (Murthy vd, 1998). Bir değerlikli katyonların iyon değiştirme yoluyla flok yapısında köprülenen katyonlar içindeki iki değerlikli katyonlarla yer değiştirdiği teorisi kurulmuştur. Bu durum flok yapısında herhangi bir fizikokimyasal değişime karşı flokları zayıf ve hassas hale getirmektedir. Giriş atıksuyundaki sodyum iyonlarının solüsyonda protein ve polisakkaritlerin artışına sebep olduğu ve bundan dolayı arıtılmış evsel atıksuların çıkış KOİ konsantrasyonunun da arttığı bulunmuştur.(Murthy ve Novak, 2001) Araştırmacılar, türbidite ve çözünmüş karbonda artışla birlikte potasyum iyonunun artışına bağlı olarak çökme özelliklerinin iyileştiğini gözlemlemiştir (Higgins ve Novak, 1997b; Murthy ve Novak, 1998). Potasyum ve sodyumla ilgili mikrobiyal reaksiyonlar farklı olabileceğinden farklı sonuçlar ortaya çıkabilir.

Higgins ve Novak (1997a) bir değerlikli katyonların toplamının iki değerlikli katyonların toplamına oranının 2'den büyük olması durumunda flok özelliklerinin kötüleşmesine neden olduğunu rapor etmiştir. Bundan dolayı, yüksek konsantrasyonlardaki sodyum gibi bir değerlikli katyonların flok özellikleri üzerinde problem oluşturabileceği zamanı tespit etmek için, M/D (bir değerlikli katyon/ iki değerlikli katyon) oranının bir indikatör olarak kullanılabilir (Kara, 2007).

2.2. GRANÜLASYON PROSESİ

Aerobik ve anaerobik granülasyon proseslerini içeren granülasyon teknolojisi atıksuların arıtılması amacıyla geliştirilmiştir. Anaerobik granülasyon oldukça iyi bilinmesine karşın aerobik granülasyon ile ilgili araştırmalar son yıllarda başlamıştır. Dünya çapında anaerobik granüler çamur teknoloji kullanan birçok tam ölçekli arıtma tesisi başarı ile işletilirken; aerobik granül çamur teknolojisi ile işletilen birkaç tam ölçekli tesis bulunmaktadır.

Granülasyon biyolojik, fiziksel ve kimyasal olayların gerçekleştiği hücrel etkileşimleri içerir. Granülasyon aerobik ve anaerobik granülasyon olarak sınıflandırılabilir. Granüller, her bir gramında farklı bakteri türleri ve milyonlarca organizma bulunan biyokütlelerden oluşmuş yoğun mikrobiyal topluluklardır. Konvansiyonel aktif çamur sistemleriyle karşılaştırıldığında aerobik granüller düzenli, yoğun, güçlü yapıda ve iyi çökebilme özelliğine sahiptir. Bu durum yüksek biyokütle tutulmasına ve yüksek kuvvetteki atıksuya ve ani yüklemelere dayanma olanağı sağlar.

Anaerobik granül çamurun yapısı kapsamlı olarak araştırılmış ve en iyi yukarı akışlı anaerobik çamur yataklı reaktörde tanımlanmıştır. Bir çok atıksu arıtma tesisi anaerobik granülasyon teknolojisini uzun süreden beri uygulamaktadır (Alves vd., 2000). Yukarı akışlı anaerobik çamur yataklı reaktörlerin verimi, uygulanabilirliği ve bunların çeşitli modifikasyonları, evsel ve endüstriyel atıksulardan organik maddenin bakteriler tarafından giderilmesinde başarılı bir şekilde kanıtlanmıştır (Lettinga vd,1980; Frank ve Chui, 1993; Schmidt ve Ahring, 1996). Anaerobik granülasyon teknolojisinin bazı dezavantajları da vardır. Bunlar; uzun işletmeye alma süresine ihtiyaç duyulması, yüksek işletme sıcaklığı ve düşük kuvvetteki atıksuların arıtılmasına elverişsiz olmasıdır. Ayrıca anaerobik granülasyon teknolojisi azot ve fosfor gibi nutrientlerin atıksudan giderilmesi için uygun değildir. Bu gibi dezavantajların üstesinden gelebilmek için aerobik granülasyon teknolojisi geliştirilmiştir. Aerobik granülasyon teknolojisinin gelişimi ilk olarak Mishima ve Nakamura (1991) tarafından sürekli yukarı akışlı aerobik reaktörde rapor edilmiş ve 2 - 8 mm çapında iyi çökelebilen granüller geliştirilmiştir. Aerobik granülasyon birçok araştırmacı tarafından ardışık

kesikli reaktörlerde çalışılmış (Morgenroth vd., 1997; Beun vd., 1999; Peng vd., 1999; Etterer ve Wilderer, 2001; Tay vd., 2001; Liu ve Tay, 2002) ve organik madde, azot, fosfor ve toksik bileşikler içeren yüksek kuvvetteki atıksuların arıtılması amaçlanmıştır (Jiang vd., 2002; Moy vd., 2002; Tay vd., 2002; Lin vd., 2003; Yang vd., yılmaz v.d, 2009).

Son yıllarda aerobik granülasyonu etkileyen faktörler, aerobik granül çamur karakterizasyonu, farklı işletme parametrelerinin aerobik granülasyon üzerindeki etkileri, aerobik granüllerin farklı çevresel koşullara olan tepkisi üzerine araştırmalar yapılmaktadır.

2.2.1. Aerobik Granülasyon Teknolojisi

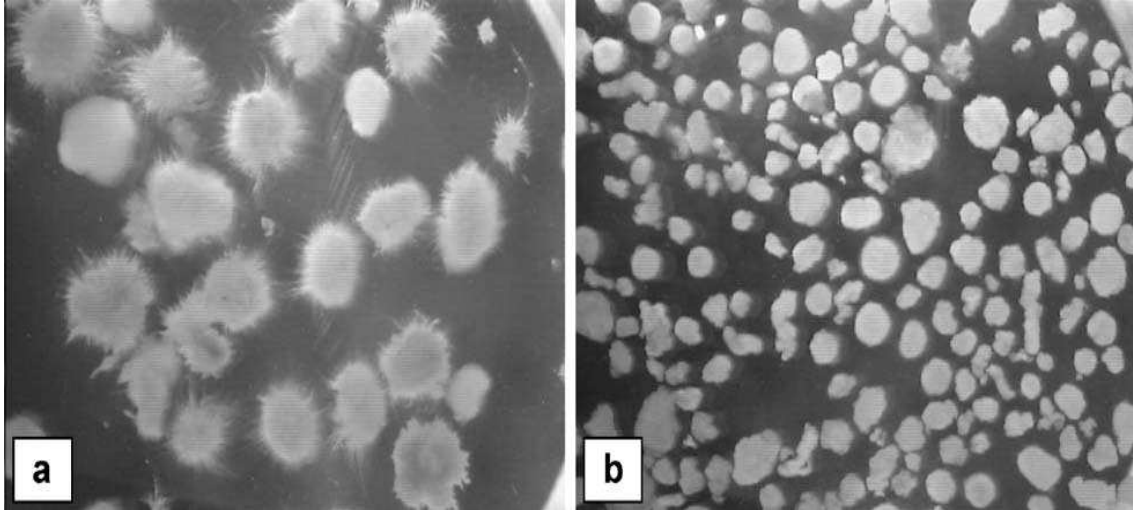
2.2.1.1. Aerobik Granüllerin Oluşumu

Aerobik granül çamur atıksuda bulunan organik madde ve nutrientleri kullanan mikrobiyal biyokütleden oluşmaktadır. Mikrobiyal granüller küresel biçimde kompakt ve yoğun mikrobiyal topluluklardır. Her bir aerobik granül milyonlarca bakteri içerir. Aerobik granülasyon mikrobiyal tutunma ile başlayabilir. Bakteriler aralarındaki itici elektrostatik kuvvet ve etkileşim sebebiyle doğal olarak bir araya gelemeyebilirler.

Aerobik granüllerin özellikleri; granül morfolojisi, çökebilirlik, yoğunluk ve dayanıklılık, hücre yüzeyi hidrofobitesi, spesifik oksijen tüketim hızı, hücre dışı polimerik maddeler (EPS) ile yakından ilişkilidir. Ayrıca substrat kompozisyonu, organik yükleme hızı, hidrodinamik kesme kuvveti, çöktürme süresi, değişim oranı, hidrolik bekletme süresi, aerobik açlık periyodu, +2 değerlikli metal iyonlarının varlığı, kesikli besleme stratejisi, çözünmüş oksijen, pH, sıcaklık, aşı çamuru, reaktör konfigürasyonu, aerobik granülasyon inhibisyonu, çamur yaşı ve yavaş çoğalan mikroorganizmalar aerobik granül oluşumunu etkileyen faktörlerdir (Tay vd., 2004).

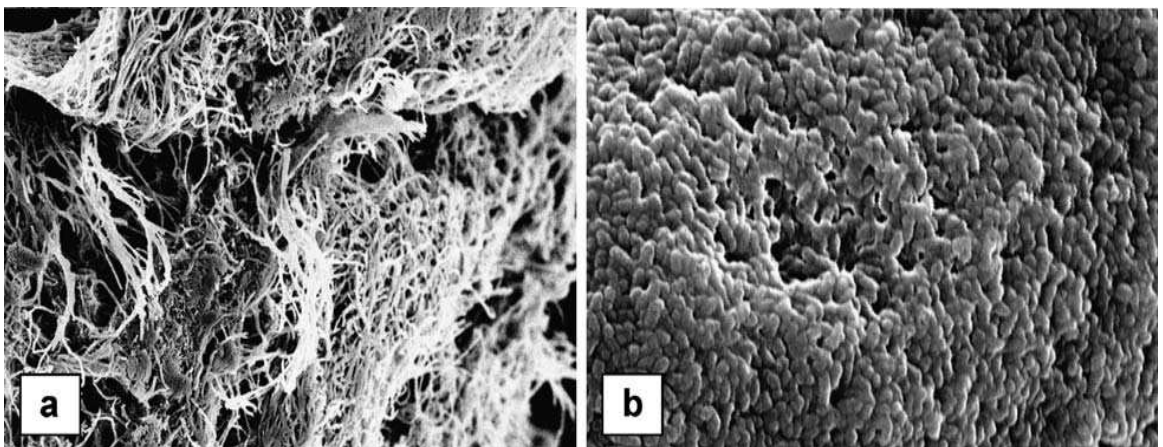
Tay vd. (2001a) aerobik granülün aşı çamurundan nasıl oluştuğunu araştırmak amacıyla; aşı çamuru, çözünmüş karbon kaynağı olarak birinde glikoz diğesinde ise asetat ile beslenen iki reaktörde aklime edilmiştir. Reaktörler başlatıldıktan 2 hafta sonra

her iki reaktörde de belirgin yuvarlak dış yüzeye sahip granüller oluşmuştur. Buna rağmen, filamentli bakteriler asetatla beslenen reaktörde tamamen ortadan kaybolmasına rağmen, glikozla beslenen reaktörde baskın durumdadır. Bu durum glikozun filamentli bakterilerin artışı desteklediğini göstermektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Glikozla (a) ve asetatla (b) beslenen aerobik granüllerin makroyapıları (Tay vd., 2001a)

Asetatla beslenen granüllerde, hücrelerin birbirlerine sıkıca bağlandığı ve çomak bakterilerin baskın olduğu ve granüllerin oldukça kompakt mikroyapıya sahip olduğu; glikozla beslenen olgun granüllerin ise filamentli bakterilerin baskın olduğu dış yüzeye sahip olduğu taramalı elektron mikroskobunda daha açık görülmektedir (Şekil 2.6)



Şekil 2.6 Glikozla (a) ve asetatla (b) beslenen aerobik granüllerin mikroyapıları (Tay vd., 2008)

Aerobik granülasyon aşısı çamurundan kompakt agregatların daha sonra granüler çamurun ve son olarak olgun granüllerin oluştuğu aşamalı bir süreçtir. Olumlu koşullar altında çok başarılı granüller elde edilebilmektedir. Şekil 2.7’de asetatla beslenmiş 60 günlük işletme süresi sonunda AKR’de elde edilmiş granüller görülmektedir. Maksimum granül boyutu 2,6 cm’dir. Bazı granüllerin merkezinde koyu bir bölge görülmektedir. Bu koyu bölge aerobik granül içerisindeki anaerobik bölgeyi göstermektedir (Tay vd., 2008).



Şekil 2.7 1000 mg/L asetat içeren atıksu beslenen aerobik granüllerin görünümü (Tay vd., 2008)

2.2.1.2. Mikrobiyal Yapı Ve Çeşitlilik

Atıksu artıma sistemlerinde mikrobiyal toplulukların ayrıntılı bir şekilde anlaşılabilmesi için mikrobiyal yapı ve yoğunluk hakkında bilgi sahibi olunması gerekmektedir. Bu konu oldukça karmaşıktır ve aerobik granüllerin mikrobiyal ekolojisi ile ilgilidir.

Aerobik granüllerin mikroyapıları ile ilgili çalışmalarda farklı oligonükleotid propları ve konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) kullanılmıştır (Tay vd., 2002d, 2003a; Toh vd., 2003; Jang vd., 2003; Meyer vd., 2003). Granül yüzeyinden 70 – 100 µm derinlikte amonyum oksitleyen *Nitrosomonas* bakterileri ve granül yüzeyinden 900 µm aşağılara kadar uzanan kanallar ve porlar bulunmuştur. Porozite, granül yüzeyinden 300 – 500 µm derinliklerde en yüksek sınıra ulaşmıştır (Tay vd., 2002d, 2003a). Bu kanal ve porlar granül içerisine oksijen ve nutrient transferine yardımcı olurken granül dışına da metabolitlerin transferini kolaylaştırmaktadır. Polisakkarid oluşumu granül yüzeyinden 400 µm derinlikte en yüksek sınıra ulaşmıştır. Anaerobik bakteri olan *Bacteroides*'de granül yüzeyinden 800 – 900 µm derinliklerde tespit edilmiştir (Tay vd., 2002e). Ayrıca 800 – 1000 µm derinliklerde ölü mikrobiyal hücre tabakası da tespit edilmiştir (Toh vd., 2003). Granül içerisinde aerobik mikroorganizmalardan tamamen yararlanabilmek için optimum aerobik granül çapı 1600 µm den daha düşük olmalıdır (Tay vd. 2002d). Sonuç olarak daha küçük granüller, daha çok canlı hücrelere sahip olduğundan aerobik atıksu arıtımında daha etkili olmaktadır.

Yüksek N/KOİ oranlarında geliştirilen aerobik granüllerde mantar şeklinde yapı gözlemlenmiştir (Liu vd., 2004). Nitrifikasyon popülasyonu çoğunlukla granül yüzeyinden 70 – 100 µm derinlikte yer edinmiştir (Tay vd., 2002d). Karışık bakteriyel topluluklardan oluşan biyofilmler mantar şeklindeki yapılardan farklı olarak kalın tabakalar oluşturur (Costerton vd. 1981). Bakterilerin nutrientlere doğru hareket ettiği gözlemlenmiştir (Prescott vd., 1999). Çoğunlukla nutrient konsantrasyonu tarafından belirlenen biyofilmler difüzyon hızını değiştirerek mantar şeklindeki yapıları oluştururlar (Wimpenny ve Colansanti, 1997). Bu mantar şeklindeki yapılar nitrifikasyon popülasyonu ile nutrientler arasındaki bağlantıyı geliştirmektedir. Granülde farklı mikrobiyal popülasyonların yayılması stabilitesini etkileyebilir.

Aerobik granüllerin mikrobiyal çeşitliliği moleküler biyoteknoloji teknikleriyle araştırılmıştır (Yi vd., 2003; Tay vd., 2002d; Jang vd., 2003; Meyer vd., 2003; Tsuneda vd., 2003). Farklı koşullar altında geliştirilen aerobik granüllerde heterotrofik bakteriler, nitrifikasyon ve denitrifikasyon bakterileri, fosfor akümüle eden bakteriler ve glikojen akümüle eden bakteriler gözlemlenmiştir (Jang vd., 2003; Meyer vd., 2003; Tsuneda

vd., 2003; Lin vd., 2003; Liu vd., 2003f; Yang vd., 2003b). Aerobik granüllerin mikrobiyal çeşitliliği granüllerin olduğu ortam kompozisyonu ve granül yapısıyla yakın ilişkilidir. Granül merkezinde anaerobik ve ölü hücrelerin bulunduğu tabaka gözlemlenmiştir (Tay vd., 2002e). Aerobik granüllerde anaerobik bakterilerin bulunması granül içerisinde organik asitlerin ve gazların üretilmesine sebep olmaktadır. Bunlar, granüllerin parçalanmasına veya uzun süreli stabilitelerinin azalmasına sebep olmaktadır.

2.2.2. Granül Yapısı

2.2.2.1. Aşı Çamuru

Aşı çamuru, besleme kompozisyonu, pH, sıcaklık, döngü süresi ve diğer AKR işletme parametreleri granülasyon prosesini etkilemektedir (Liu ve Tay, 2004). Bir çok çalışmada, aerobik granüller aşı çamuru olarak aktif çamurun aklımasyonu sonucu elde edilmiştir. Aşı çamurunda bulunan bakteriyal topluluk aerobik granülasyon prosesinde oldukça önemlidir. Hidrofilik bakteriler hidrofobik bakterilere nazaran çamur floklarına daha az tutunmakta ve tam ölçekli atıksu arıtma tesislerinde atıksudaki serbest bakterilerin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadırlar (Zita ve Hermansson, 1997). Aşı çamurundaki hidrofobik bakteri sayısının daha fazla olması daha hızlı aerobik granül oluşumunu sağlamak ve granüllere mükemmel çökelebilmeye özelliği kazandırmaktadır (Wilen vd., 2007).

2.2.2.2. Atıksu Kompozisyonu

Aerobik granüllerin aklımasyonu amacıyla, glikoz, asetat, fenol, nişasta, etanol, melas, sükröz ve diğer sentetik atıksu bileşiklerini içeren çeşitli substratlar kullanılmıştır (Liu ve Tay, 2004; Tay vd., 2002a; Tay vd., 2004a; Zheng vd., 2005, Adav vd., 2007a,b,c,d,e). Granüllerin karbon ve enerji kaynağı olarak fenolle aklımasyonunda *Proteobacterium*'un baskın olduğu görülmüştür (Jiang vd., 2004b; Whiteley ve Bailey 2000; Adav vd., 2007c). Adav ve Lee (2008b) fenol içeren atıksu ile oluşan granüllerin tek bir tür içerdiğini gözlemlemişlerdir.

pH mikrobiyal büyüme hızını önemli derecede etkilemektedir. Yüksek organik yükleme hızlarında oksidasyon sonucu yeterli CO₂ üretilmekte ve pH düşmektedir (McSwain vd., 2004a). Düşük pH da mantarlar büyümekte ve granülasyonun başlamasında katkıda bulunmaktadır (McSwain vd., 2004a; Beun vd., 1999; Williams ve de los Reyes, 2006). Yang vd., (2008) pH 4.0 deki mantar varlığında aerobik granülasyonda granül boyutunun 7 mm olduğunu, pH 8.0'de ise granülasyonun bakteriler tarafından kontrol edildiğini ve granül boyutlarının yalnızca 4,8 mm'ye ulaştığını gözlemlemiştir.

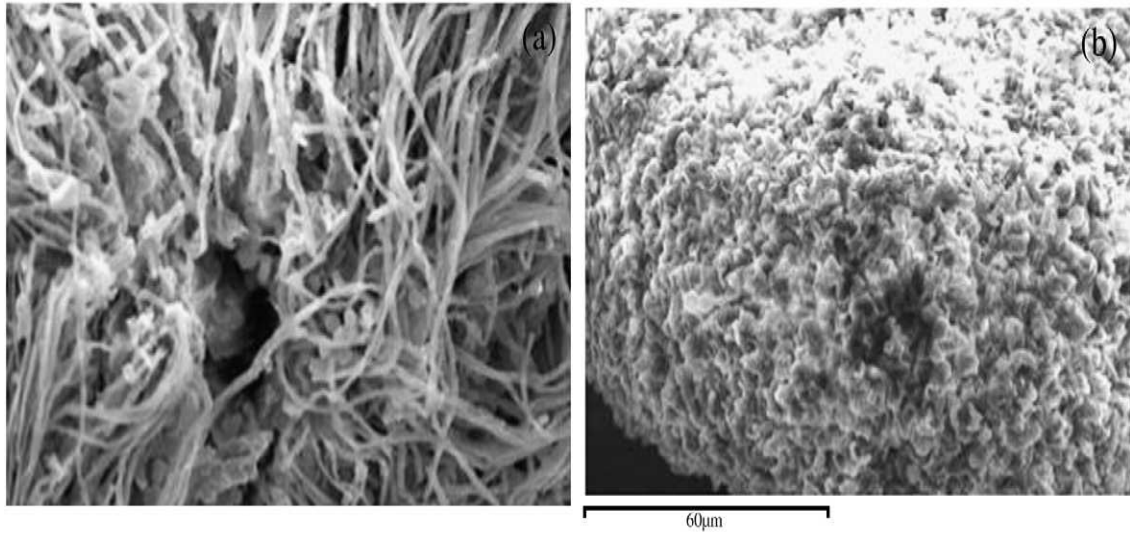
2.2.2.3. AKR'ün İşletilmesi

Aerobik granüllerin yalnızca AKR de başarılı bir şekilde elde edildiği görülmüştür. AKR'ün işletilmesi besleme, havalandırma, çöktürme ve boşaltma evrelerinden oluşmaktadır. Liu ve Tay (2007a) döngü süresi 1,5 saatten 8 saate çıkarıldığında gerçek dönüşüm oranı (Y_{obs}) 0,316 gUAKM/g KOİ'den 0,063 gUAKM/g KOİ'ye düşerken granül çamurun spesifik biyokütle büyüme hızı ise 0,266 gün⁻¹'den 0,031 gün⁻¹'e düştüğünü gözlemlemiştir. Ayrıca diğer döngü sürelerine nazaran 1,5 saatlik döngü sürelerinde en büyük boyutlu granüller oluşurken, 4 saatlik döngü süresinde ise kompakt olanlar oluşmuştur. Liu ve Tay (2004) granül stabilitesinin artırılması için optimum açıklık süresinin varlığını ortaya koymuşlardır. 6.0 kg KOİ/m³gün'lük organik yükleme hızında kompakt granüller oluşmuş fakat yavaş yavaş filamentli büyüme sebebiyle stabiliteyi kaybetmişlerdir (Zheng vd., 2006).

AKR'de havalandırma periyodu iki fazdan oluşmaktadır. Birinci faz substratın minimuma indirildiği çoğalma fazı ve ikinci faz ise substratın kalmadığı aerobik açıklık fazıdır. Uzun açıklık periyodu granül stabilitesini zayıflatmakta (Wang vd., 2005a, 2006), kesikli beslemeyle ise aerobik granülasyon artırılmaktadır (McSwain vd., 2004b). AKR'ün kesikli (pulse) beslenmesi kompakt aerobik granüllerin oluşmasına katkıda bulunmaktadır. Aerobik granülasyon için açıklık periyodunun önceden olması istenmemesine karşın (Liu ve Tay, 2008; Liu vd., 2007) karbon açıklığının hidrofobisiteyi arttırdığı gözlemlenmiştir (Sanin vd., 2003; Sanin, 2003; Chen ve Strevett, 2003). Açlık-bolluk periyodunun granülasyon prosesi üzerine olan etkisi tam olarak anlaşılabilmiştir.

Kısa çöktürme süresi düzgün çökelemeyen askıdaki biyokütlenin sistemden yıkanmasını ve sistemde sadece iyi çökelebilen granüllerin kalmasını sağlamaktadır (Qin vd., 2004a,b). Yapılan çalışmalar kısa çöktürme süresinin aerobik granülasyonu arttırdığını ortaya koymuştur (Jiang vd., 2002; Lin vd., 2003; Liu vd., 2003a; Yang vd., 2003; McSwain vd., 2004a; Hu vd., 2005).

Adav vd. (2007b) granülasyon prosesini üç adet aynı özellikte reaktörde aynı karakterizasyonda fenol içeren atıksuyla beslenmesi ve farklı hızlarda havalandırma yapılmasıyla karşılaştırmışlardır. Düşük hızlı havalandırmada (1 L/dak) granül oluşumu gerçekleşmemiştir. Yüksek hızlı havalandırmada (3 L/dak) olgun ve kompakt bir iç yapıya sahip stabil granüller (1 – 1,5 mm) oluşmuştur. Orta hızlı havalandırmada (2 L/dak) aşırı büyüyen filamentlerle kaplı geniş granüller oluşmuştur (Şekil 2.8). Adav vd. (2007b) orta hızlı havalandırmanın ne gerekli oksijen ihtiyacını karşıladığını ne de fazla büyüyen filamentlerin bozulmasını sağladığını ve bu nedenle AKR'ün düzgün işletilemediğini idda etmektedir. Yüksek kesme kuvveti granüllerin içerisinde kompakt agregatların oluşmasına yardımcı olmasının yanında yeterli oksijen sağlayarak filamentlerin büyümesini bastırmakta ve uzun süreli işletme stabilitesini sağlamaktadır.



Şekil 2.8 Karbon kaynağının mikrobiyal yapı üzerindeki etkisi (Adav vd., 2007b)

(a) asetatla beslenen granül, (b) fenolle beslenen granül. Granüller AKR'de 400 mg/L asetat, 400 mg/L fenol içeren sentetik atıksularla beslenmiş ve AKR 5 dakikalık besleme, 220 dakikalık havalandırma, 10 dakikalık çöktürme ve 5 dakikalık boşaltma süreleriyle işletilmiştir. Havalandırma için uygulanan hava hızı 3 cm/sn 'dir.

Granül stabilitesinin sürdürülmesi için reaktörün uygun çamur yaşında işletilmesi gerekmektedir (Li vd., 2007a). Li vd. (2007a) membran biyoreaktörde aerobik granülasyonu araştırmış ve toplam hücre dışı polimerik madde içeriğini 5. günde 39,6 mg/gAKM olarak ve 28. günde ise 749,5 mg/gAKM olarak ölçmüşlerdir. Nagaoka vd. (1996) hücre dışı polimerik maddelerin aerobik biyogranüllerin yüzeyinde adsoblandığını ve su içeriğinin artmasına ve granül yapısının bozulmasına sebep olduğunu gözlemlemişlerdir.

Birçok aerobik granül çamur çalışması oda sıcaklığında (20-25 °C) gerçekleştirilmiştir. 8 °C'de işletilen AKR'de elde edilen granüllerin düzensiz şekle sahip olduğu ve aşırı biyokütle yıkanmasına sebep olan filamentli organizmaların fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca granüllerin denitrifikasyon kapasitesinin ve nutrient giderim oranının zayıf olduğu belirtilmiştir (de Kreuk vd., 2005b). Aerobik granülasyonun düşük sıcaklıklarda ise mümkün olmadığı anlaşılmıştır.

2.2.3. Granül Karakterizasyonu

Aerobik granül karakterizasyonun tam olarak anlaşılabilmesi için aerobik granülasyonu etkileyen birçok parametre araştırılmıştır. Bu parametreler; fiziksel (çökme hızı, yoğunluk, çamur hacim indeksi (ÇHI), özgül ağırlık), kimyasal (spesifik oksijen tüketim hızı, hücre dışı polimerik maddeler) ve biyolojik parametrelerdir. Granül çamurun boyut, yapı, çöktürme performansı, kesme kuvvetine karşı olan stabilitesi, hücre dışı polimerik madde içeriği, reaktör performansı ve metabolizma hızı gibi genel karakteristikleri birçok araştırmada ortaya konulmuştur (de Kreuk vd., 2005a; Etterer ve Wilderer 2001; Hulshoff Pol vd., 2004; Inizan vd., 2005; McSwain vd., 2004a; Moy vd., 2002; Tay vd., 2003).

2.2.3.1. Fiziksel Parametreler

Granüllerin çökme hızı reaktörün katı-sıvı ayırma verimini belirleyen önemli bir parametredir. Granüllerin çökme hızı 25m/sa ile 70 m/sa arasında olup bu değerler floküler çamurunkinden (7 m/sa – 10 m/sa) çok daha yüksektir. Yüksek çökme hızı reaktörün biyokütle tutma kapasitesini ve sonrasında organik parçalama yeteneğini

arttırır. Mu vd. (2008) aerobik granüllerin direnç katsayısının düzgün sert kürelerin yada biyofilmle kaplı partiküllerinkinden daha az olduğunu belirtmişlerdir. Adav vd. (2008a) 140,000 Da'dan büyük olan moleküllerin granül içerisine taşınmasının difüzyonel direnç tarafından sınırlandırıldığını belirtmişlerdir. Diğer taraftan Kim vd. (2008) farklı KOİ yükleme oranlarında aerobik granüllerin karakterizasyonu amacıyla çökeltme hareketini dikkate alarak olası çatlakları gözlemlemişlerdir.

2.2.3.2. Kimyasal Parametreler

Liu vd. (2003e) hücre yüzey hidrofobisitesinin heterotrofik ve nitrifikasyon granüllerinin yapısıyla ilişkili olduğunu belirtmiştir. Granül çamurun hidrofobisitesi konvansiyonel biyofloklarinkinden iki kat daha yüksektir (Liu vd., 2004a).

Hücre dışı polimerik maddeler, bakteri hücrelerinin yüzeyinde akümüle olan metabolik ürünlerdir. Bu ürünler hücresel yüzeylerin yük, hidrofobisite ve diğer özellikleri gibi fizikokimyasal karakteristiklerini değiştirebilmektedir. Adav ve Lee (2008) farklı ekstraksiyon metodları kullanarak aerobik granüllerden hücre dışı polimerik maddeleri ekstrakte etmişlerdir. Granüller için toplam polisakkarid/toplam protein oranları 3,4 ile 6,2 arasında değişmektedir ve bu değer flokül çamurunkinden çok daha yüksektir (yaklaşık 0,9). Yüksek protein içeriğinin aklime edilmiş aerobik granüller için başlıca belirleyici özellik olduğu görülmüştür (McSwain vd. 2005).

2.2.3.3. Biyolojik Parametreler

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), ışık mikroskobu ve konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM), fluorescence in situ hybridization (FISH)'le birlikte aerobik granüllerin mikrobiyal yapılarının iç kısımlarının görüntülenmesi sağlanmıştır (Yi vd., 2003; Tay vd., 2002c; Jang vd., 2003; Meyer vd., 2003; Tsuneda vd., 2003). Aerobik granüllerde farklı koşullar altında gelişen heterotrofik bakteriler, nitrifikasyon, denitrifikasyon bakterileri, fosfor akümüle eden bakteriler ve glikojen akümüle eden bakteriler tanımlanmıştır (Jang vd., 2003; Meyer vd., 2003; Tsuneda vd., 2003; Lin vd., 2003; Yang vd., 2003). Aerobik granüllerin mikrobiyal çeşitliliği granüllerin oluştuğu ortam kompozisyonu ve granül yapısıyla yakın ilişkilidir. Atıksu arıtma tesisinde ve

fenolle beslenen aerobik granüllerdeki mikrobiyal çeşitlilik sınıflandırmasında *Proteobacteria*'nın baskın olduğu görülmüştür (Jiang vd., 2004b; Whiteley ve Bailey 2000; Snaidr vd., 1997).

Jiang vd (2004b) fenolle beslenmiş olgun granüllerde on bakteri türü tanımlamışlardır ve bu bakterilerin altı tanesinin β -*proteobacteria*, üç tanesinin *Actinobacteria* ve bir tanesinin de γ -*proteobacteria* ile taksonomik ilişkisi olduğu belirtilmiştir. Whiteley ve Bailey (2000) endüstriyel fenol giderim sisteminin özel bölümlerindeki bakteri popülasyonunu *Proteobacterium* grubu spesifik problemler kullanarak araştırmış, β - ve γ -*proteobacteria* 'ların sayıca üstün olduğunu gözlemlemiştir. Gram ve Nesisser boyama yöntemi ve FISH analizleri bira fabrikası atıksuyuyla aklime edilmiş aerobik granüllerdeki filamentli bakterilerin çoğunluğunun *Thiothrix* yada *Sphaerotilus natans* türlerine ait olduğu görülmüştür (Weber vd., 2007). FISH - CLSM teknikleri amonyum oksitleyen bakterilerin (*Nitrosomonas*) granül yüzeyinden 70 μ m ile 100 μ m derinliğinde olduğunu ve anaerobik *Bacteroides* bakterilerinin ise granül yüzeyinden 800 μ m ile 900 μ m derinliklerde tespit etmiştir (Tay vd., 2002c, Adav vd., 2007a,b,c,d,e). Toh vd. (2003) ölü mikrobiyal hücre tabakasının 800 μ m ile 1000 μ m derinliklerde olduğunu gözlemlemiştir. Adav ve Lee (2008a) dokuz tür tespit etmiş ve γ -*Proteobacterium*'un baskın olduğunu göstermiştir.

2.2.4. Granülasyon Mekanizması

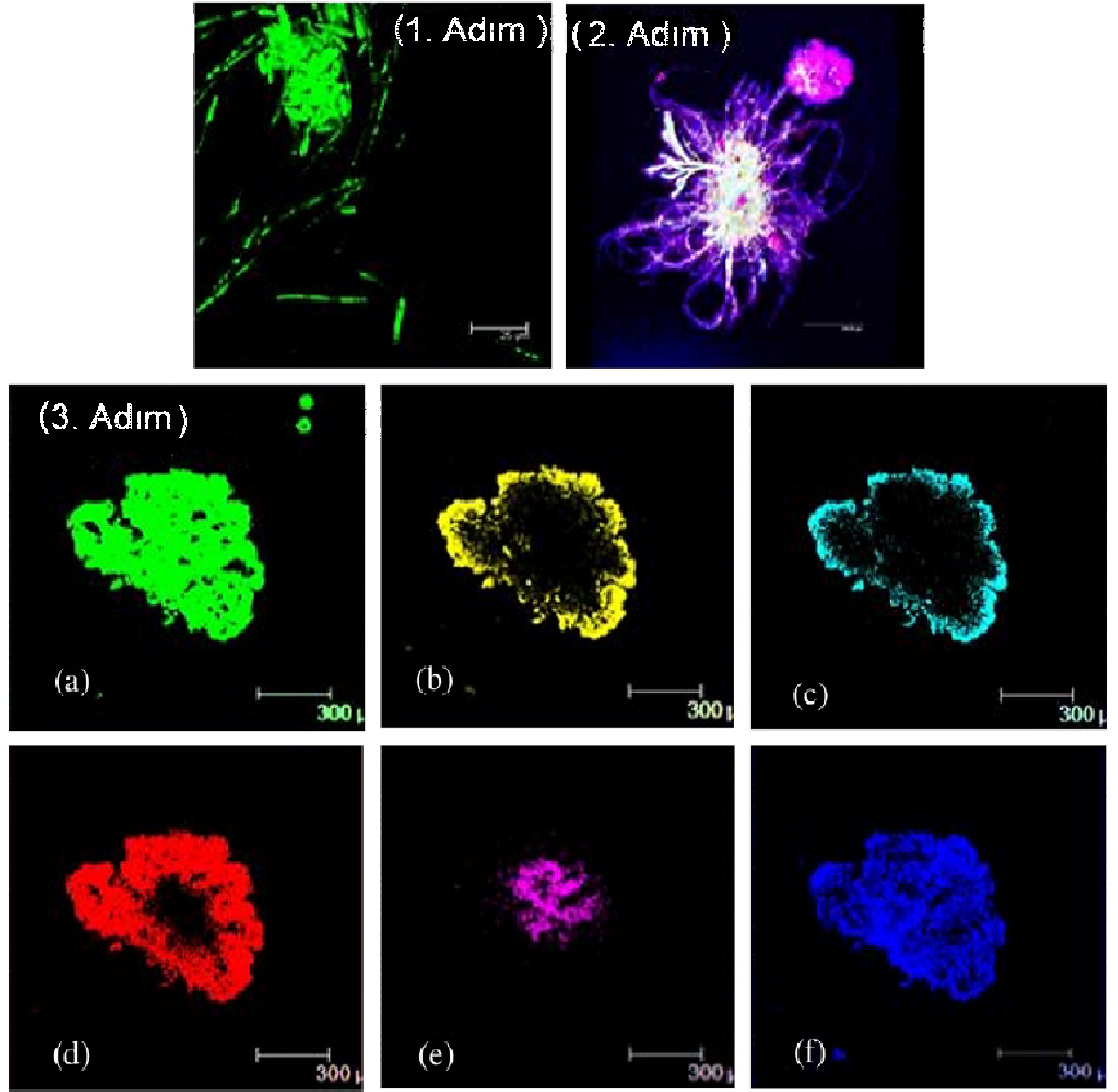
2.2.4.1. Granülasyonun Aşamaları

Granülasyon prosesine uygun olan mekanizmaların incelenmesi amacıyla bazı çalışmalar yapılmıştır. Mikrobiyal agregasyon, protein-polisakkarid ya da protein-protein etkileşimleri gibi hücre yüzey reseptörleri yoluyla hücrelerin birbirine tutunmasıyla meydana gelmektedir. (Kolenbrander 1985, 1999; Palmer vd., 2001). Tay vd. (2001a) aerobik granülasyonun taşıyıcı destek olmadan mikrobiyal hareketsizlik sonucu oluşan bir prosestir. Liu ve Tay (2002) granülasyon prosesini 4 aşamada açıklamışlardır.

1. Hidrodinamik, difüzyon, ağırlık ve/veya termodinamik kuvvetler yoluyla agregatların oluşması amacıyla mikroorganizmaların birbirlerine teması,

2. Fiziksel (van der Waals, termodinamik kuvvetler, zıt yükler), kimyasal (iyonik çift oluşturma, üçlü iyonik çift oluşturma), ya da biyokimyasal (hücre membran füzyonu, hücre yüzey dehidrasyonu) kuvvetler yoluyla agregatların oluşmasını sağlayan ilk çekicilik,
3. Hücresel kümelenme gibi biyolojik yapışma ve EPS salgılanması yoluyla agregatların oluşmasını sağlayan mikrobiyal kuvvetler,
4. Granülün üç boyutlu yapısını sağlamlaştırmayı sağlayan hidrodinamik kesme kuvveti.

Farklı spesifik CLSM kullanılarak aerobik granülasyon sırasında toplanan biyoagregatların iç yapısı incelenmiştir (McSwain vd., 2005, Adav vd., 2007b,c). Aşı çamuru ve olgun granüllerin CLSM görüntüleri Chen vd. (2006, 2007a,b) ve Yang vd. (2007) tarafından son yıllarda geliştirilen çoklu boyama tekniği kullanılarak Şekil 2.9'da gösterilmiştir. Açıklamada protein dağılımları, lipitler, α - ve β -polisakkarid, toplam hücreler ve ölü hücreler aynı biyoagregatta incelenmiştir. Çoklu boyama ve CLSM testleri mikrobiyal agregasyonun granül oluşumunda başlangıç adımı olduğunu göstermektedir (2. Adım – Şekil 2.9). Bakterilerin agregasyonu sonrasında EPS salgılanması meydana gelir daha sonra çoğalır ve geniş çamur flokları olarak büyürler (3. Adım, Şekil 2.9). Daha sonra bakterilerin hızla artmasından dolayı çamur flokları büyür ve yeniden bir araya gelerek granülleri oluştururlar.



Şekil 2.9 Farklı aşamalarındaki biyoagregatların CLSM görüntüleri (Lee vd., 2008)

Biyoağregatlar AKR'de 500 mg/L fenol içeren sentetik atıksuyla akline edilmişlerdir. EPS için boyanan granüllerde: a – proteinler (yeşil), b – lipitler (sarı), c – α -polisakkaridler (açık mavi), d – toplam hücreler (kırmızı), e – ölü hücreler (violet), f – β -polisakkarid (mavi). 1. Adım floküle olmamış hücreler. 2. Adım şişkin yapıdaki floküler çamur floğu. 3. Adım yeni oluşmuş granül ve çekirdeğindeki ölü hücreler. (Lee vd., 2008)

2.2.4.2. Seleksiyon Baskısı

AKR'de sadece verilen zaman aralığında çökelebilen partiküller reaktörde tutunabilirken, zayıf çökeltme özelliğine sahip olanlar sistemden yıkanır. Bu durum reaktör içindeki biyokütleyle seleksiyon baskısı sağlamış ve yalnızca bu duruma adapte olabilen hızlı çökebilmesi için yeteri kadar büyüklüğe ve yoğunluğa sahip biyokütle sistemde tutunabilmektedir (Liu ve Tay, 2002). Gerekli seleksiyon baskısı sabit kolon

yüksekliği ve farklı deşarj noktası yükseklikleriyle sağlanmıştır (Wang vd., 2004). Wang vd. (2007c) granül stabilitesinin seleksiyon baskısının adım adım artırılması sonucu yükseldiğini belirtmiştir.

Yüksek kesme kuvvetine maruz kalan mikroorganizmalar salgılanan EPS'lere yapışarak çevresel kuvvetlere karşı direnç kazanırlar (Trinet vd., 1991). Deneysel gerçekler hücrelerin reaktörde kalabilmek için yeteri kadar büyüklüğe sahip olabilmek amacıyla yüksek yukarı akışkanlığa karşı nasıl cevap vermeye çalıştığını ve birbirleriyle etkileşimlerini göstermektedir. Ayrıca reaktörden başlangıçta yıkanan zayıf flokların çevresel değişikliklerle birlikte gelişme şansı olmaması seleksiyonun adil olmadığını göstermektedir.

2.2.4.3. Hücre dışı Polimerik Maddeler (EPS)

Bakteriler; protein, polisakkarid, hümitik asit ve lipitler içeren EPS olarak adlandırılan yapışkan bir madde salgılamakta ve bu maddeler hücre adezyonuna yardımcı olarak aerobik granülasyonu başlatmaktadır (Schmidt ve Ahring, 1994; Tay vd., 2001c, Liu vd., 2004b). Salgılanan EPS akümüasyonu biyolojik adezyon ve mikrobiyal agregasyon varlığıyla ilişkilidir (Costerton vd., 1981, Cammarota ve Sant'Anna, 1998). Liu vd. (2004a,b) EPS 'in agregat içindeki bakteri hücrelerini diğer partiküler maddeleri bağladığını gözlemlemişlerdir. EPS atıksudaki organik maddeleri adsorblayan ve mikrobiyal agregatları bir arada ve üç boyutlu bir yapıda tutabilen temel bileşenlerdir (Sheng vd., 2010). Yüksek polisakkarid içeriği hücresel adezyonu kolaylaştırmakta ve mikrobiyal yapıyı kuvvetlendirmektedir (Costerton vd., 1981; Tay vd., 2001b; Liu vd., 2002). Di Iaconi vd. (2006) hidrodinamik kesme kuvvetinin granülleri kompakt bir hale getirdiğini ve EPS içeriğine ve bileşimine zarar vermediğini belirtmiştir. McSwain vd. (2005) PN/PS oranı 6,6 – 10,9 olan, pepton ve glikozla beslenen aerobik granüllerde yüksek protein içeriği gözlemlemişlerdir. Adav vd. (2007b) kesilmiş granüllerde proteinlerin polisakkaritlerden daha fazla zenginleştirildiğini belirtmişlerdir.

Aerobik granüllerin yapısal bütünlüğünden sorumlu olan EPS'in açlık periyodunda bile bileşenlerine kolayca parçalanabilir olmadığı bulunmuştur (Sutherland, 1999). Yapılan diğer çalışmalarda ise uzun açlık periyodunun EPS yapısının bozunarak flokların

parçalanmasına neden olduğu görülmüştür (Zhang ve Bishop 2003; Ruijsenaars vd., 2000). Bossier ve Verstraete (1996) açlık periyodunun hücre yüzey hidrofobisitesi üzerine negatif etki ettiği Castellanos vd. (2000) tarafından gözlemlenmiştir. Bunun aksine kararlı hücre yüzey hidrofobisitesi karbon açlığı sırasında gözlemlenmiştir (Sanin vd., 2003; Sanin, 2003).

2.2.4.4. Granülasyon Modeli

Ni vd. (2007) tarafından matematiksel bir model geliştirilmiş ve AKR'de eşzamanlı ototrofik ve hetetrotrofik büyüme gözlemlenmiştir. Granül içerisinde ototrof bakterilerin kenar kısımlarda heterotrofik bakterilerin ise çekirdek kısmında bulunduğu varsayılmaktadır. Bu modelde heterotrofların oksijen tüketiminin ototroflardan fazla olduğu görülmektedir. de Kreuk vd. (2007a,b) AKR'de işletilen ve eşzamanlı KOİ, azot, fosfor gideren aerobik granüler çamur reaktörü için matematiksel bir model önermişlerdir. Bu model toplam nutrient giderimi için özellikle oksijenin granül içerisine işleme derinliği ve anoksik ve aerobik biyokütle oranını göstermektedir. Xavier vd. (2007) aerobik granül çamur için dört bakteri grubunun (heterotrof bakteriler, amonyum oksitleyiciler, nitrit oksitleyiciler ve fosfor akümüle eden organizmalar (PAO)) iki boyutlu uzaysal düzenini göz önünde bulundurarak çok ölçekli AKR modeli geliştirmişlerdir. Ni vd. (2008) aktif çamur modellerini kullanarak denitrifikasyon bakterilerinin büyüme ve depolama dönemlerindeki davranışlarını gözlemlenmişlerdir.

2.2.5. Aerobik Granülasyon Teknolojisinin Uygulamaları

Atıksu arıtılmasında biyolojik sistemlerin performansı büyük ölçüde aktif biyokütle konsantrasyonuna, toplam biyodegrasyon hızına, reaktör konfigürasyonuna, kirletici ve oksijen hızına bağlıdır. Tam ölçekli arıtma tesislerinin proses verimi aerobik granül çamur kullanılarak geliştirilebilir. Aerobik granül çamur yüksek dönüştürme hızları ve biyokütlenin daha etkili ayrılması özelliğiyle reaktör hacminin küçülmesini sağlamaktadır.

2.2.5.1. Toksik Organik Atıksuların Giderilmesi

Aerobik granül çamur Moy vd. (2002) tarafından yüksek kuvvetteki atıksuların arıtılmasında başarılı bir şekilde uygulanmıştır. KOİ giderim verimi stabil hale geldiğinde organik yükleme hızları $6 \text{ kgKOİ/m}^3\text{gün}$ 'den $15 \text{ kgKOİ/m}^3\text{gün}$ 'e adım adım artırılarak granül bütünlüğünü bozmadan aerobik granüllerin potansiyeli incelenmiştir.

Fenolün suda yaşayan canlılar için toksik olduğu dikkate alınmış (Brown vd., 1967; Kibret vd., 2000; Chung vd., 2003) ve içme ve gıda proses sularına eklenmiştir (Ritman ve McCarty, 2001). Aerobik granüller fenolün parçalanmasını sağlamıştır (Jiang vd., 2002, 2004a; Chou vd., 2004; Chou ve Huang, 2005; Tay vd., 2005a,b). Adav vd. (2007a) aerobik granüllerin fenolü $1,18 \text{ gfenol/gUAKM gün}$ oranında parçalayabildiğini belirtmiştir.

Piridin ve türevleri kömür gazlaştırma (Stuermer vd., 1982) yanürünleridir ve farmasötik endüstrisinde katalizör olarak kullanılmaktadır. Aerobik granüller piridini $200 - 2500 \text{ mg/L}$ 'lik başlangıç konsantrasyonlarında etkili bir biçimde parçalayabilmiştir. (Adav vd., 2007a). Aerobik granüller 250 mg/L ile 500 mg/L pridin içeren atıksuları sırasıyla $73,0$ ve $66,8 \text{ mg}$ piridin/g UAKM sa'lik çözünme oranlarında parçalamıştır.

Fenolü parçalayabilen granüllerin fenol ve piridini birlikte kullanabilme kapasitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Adav vd. (2007a) Michaelis-Menten kinetiği ve Lineweaver-Burk fenol ve piridin varlığında granüllerin davranışlarını araştırmışlar ve rekabetçi türler bulmuşlardır. Piridinin parçalanması sırasında sistemde fenole karşı yüksek eğilime sahip spesifik enzimin varlığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçla pridin içeren endüstriyel atıksulardan fenol gideriminde kullanılan fenol granüllerinin uygulanabilir olduğu tespit edilmiştir.

Xie (2003) toksik organik bileşiklerin granül çamur tarafından giderimini araştırmıştır. Yi vd. (2006) AKR'de *p-nitrophenol* (PNP) 'ün aerobik granüller tarafından biyolojik olarak parçalanmasını gözlemlenmişlerdir. Spesifik PNP parçalanma hızı PNP

konsantrasyonunun 40.1 mg/L ye artmasıyla artmış ve 19.3 mg PNP/gUAKM sa değerinde en yksek noktaya ulaşmıştır.

Wang vd. (2007b) 2,4-diklorofenol içeren atıksuyun glikoz ilave edilerek etkili bir biçimde arıtılmasını sağlamıştır. Zhang vd. (2008) metil *t*-butil eter (MTBE)'in aerobik granoller tarafından etanol ilave edilmesiyle etkili bir biçimde biyolojik olarak paręalandıęını gzllemişlerdir.

2.2.5.2. Süt Endüstrisi Atıksularının Arıtımı

Geręek atıksuların biyolojik paręalanma açısından sentetik atıksulardan çok geniş aralıkta ve farklı turlerde organik maddeler iğermesinden dolayı oldukça farklı davranışlar sergilediği bilinmektedir. Yapılan çalışmaların hemen hemen tamamında sentetik atıksu kullanılmış fakat aerobik granollerin geręek atıksuların arıtılması üzerindeki performansı hakkındaki bilgiler oldukça nadirdir (de Bruin vd., 2004; de Villiers ve Ibala, 2003; Schwarzenbeck vd., 2004b). Süt endüstrisi atıksuları büyük konsantrasyonlarda nutrient iğermekte ve bundan dolayı arıtma verimi bu noktada büyük ilgi uyandırmıştır. Schwarzenbeck vd. (2005) aerobik granollerin süt endüstrisi atıksularının arıtımındaki performansını araştırmak amacıyla süt endüstrisi atıksu arıtma tesisinden alınan atıksularla çalışmışlardır. % 50 hacimsel değişim oranında toplam KOİ giderim verimi % 90, toplam azot giderim verimi % 80 ve toplam fosfor giderim verimi % 67 olarak belirtilmiştir.

2.2.5.3. Azot ve Fosfor Giderimi

Toplam azot giderimi nitrifikasyon ve denitrifikasyon evrelerini iğermektedir. Nitrifikasyon evresinde nitrit ve nitrat üretilir ve daha sonra denitrifikasyon bakterileri tarafından azot gazına indirgenirler. Tay vd. (2004) heterotrofik bakteriler, nitrifikasyon ve denitrifikasyon bakterilerinin aerobik granül çamurda bir arada bulunmasından dolayı aerobik granoller tarafından eş zamanlı organik madde ve azot giderimini araştırmışlardır. Aerobik granollerin nitrifikasyon ve denitrifikasyon aşamaları için kullanılması Beun vd (2001) tarafından da araştırılmıştır. Granül amur prosesinde çözünmüş oksijen konsantrasyonunun denitrifikasyon verimi üzerine güçlü bir etkisi olduğu grlmştir.

Mosquera-Corral vd. (2005) oksijenin eş zamanlı nitrifikasyon ve denitrifikasyon prosesi üzerine önemli etkisi olduğunu göstermişlerdir. Düşük oksijen konsantrasyonu düşük nitrifikasyon ve yüksek denitrifikasyon oranıyla sonuçlanmıştır. Picioreanu vd. (1998) düşük biyokütle büyüme hızı oranlarında düzgün biyofilmlerin oluştuğunu belirtmiştir. Eğer belirtilen oran granül yapısını da belirlerse yavaş büyüyen organizma seleksiyonu düşük oksijen konsantrasyonlarında stabil granül çamur oluşumuna katkıda bulunur. Yüksek konsantrasyonlarda amonyak içeren atıksular için yukarı akışlı akışkan yataklı reaktörde oluşturulan nitrifikasyon granüllerinin performansı araştırılmıştır (de Kreuk ve Van Loosdrecht, 2004; Tsuneda vd., 2006). de Kreuk vd. (2005b) düşük oksijen doygunluklarında granül içerisindeki heterotrofik büyüme sebebiyle eş zamanlı KOİ, azot ve fosfor gideriminin mümkün olduğunu belirtmiştir.

AKR'de farklı substrat P/KOİ oranlarında 1/100 ile 10/100 aralıklarında fosfor akümüle eden mikroorganizmalar aklime edilmiştir (Tay vd., 2003). Granüller fosfor akümüle etme özelliklerinin yanında çözünebilen organik karbon tüketme özelliğine sahiptir. Fosfor anaerobik periyotta salınırken aerobik periyotta hızlı bir şekilde fosfor alımı gerçekleşmektedir. Substrat P/KOİ oranındaki artışla akümüle edilen fosfor azalma trendi göstermektedir. Granül içerisindeki fosfor içeriği aralığının %1,9 ile %9,3 arasında olduğu ve atıksuyun P/KOİ oranına bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir. P/KOİ oranı %2,5 olan atıksudaki granüllerin fosfor içeriğinin yaklaşık %6 olduğu gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar P/KOİ oranı %2,8 olan atıksuda Cassidy ve Belia (2005) tarafından elde edilmiştir. Mezbaha atıksularının AKR'de aerobik granül çamur tarafından arıtılması sonucu %98 'in üzerinde KOİ ve P giderim verimi ve %97 'nin üzerinde azot ve UAKM giderim verimi elde edilmiştir (Cassidy ve Belia, 2005). Benzer KOİ, azot, fosfor, UAKM giderimleri aerobik AKR'de mezbaha atıksularının floküler çamur ile arıtılması sonucu elde edilmiştir (Thayalakumaran vd. 2003).

Yılmaz vd. (2009), yüksek kirliliğe sahip mezbaha atıksularının eş zamanlı nitrifikasyon, denitrifikasyon ve fosfor giderim (SNDPR) prosesi ile arıtımını 450 gün boyunca izlemişlerdir. AKR'de çalışma süresince e fosfor giderimi ve nitrifikasyon gerçekleşmiş, *Accumulibacter* spp. (polifosfat akümüle eden organizmalar, PAO) ve *Competibacter* spp. (glikojen akümüle eden organizmalar, GAO)'lerin baskın olduğu gözlemlenmiştir. *Accumulibacter* spp.'in granülün en dış kısmındaki 200 µm'lik alanda

Competibacter spp.'in ise granülün merkezindeki bölgede baskın olduğu görülmüştür. Ayrıca granül çamurda anaerobik sonunda %10,5 kimyasal bağlı fosforun döngü sonunda %1,9'a düştüğünü yani anaerobik sonunda oluşan kimyasal çökeleklerin aerobik periyotta pH'nın düşmesiyle yeniden çözündüğünü kanıtlamışlardır. Anaerobik periyod süresince yüksek fosfat, magnezyum ve amonyak konsantrasyonlarından dolayı kimyasal çökeleğin struvit formunda olduğu görülmüştür.

2.2.5.4. Ağır Metal ve Boyar Madde Giderimi

Marin algi, mantar, aktif çamur ve atık çamur (digested sludge) gibi bazı biyomateryaller biyosorbent olarak kullanılmaktadır (Lodi vd., 1998; Taniguchi vd., 2000; Valdman ve Leite, 2000). Son zamanlarda kullanılan başlıca adsorbantlar askıdaki biyokütle formlarından oluşmaktadır (Liu vd., 2003c,d) fakat ayrılma, biyosorbent stabilitesi ve yeniden kullanabilme gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu dezavantajlar biyosorbentlerin endüstriyel atıksulardan boyar maddelerin giderilmesi uygulamalarını sınırlandırmaktadır. Bakır(II) ve çinko(II)'nun aerobik granüller tarafından biyosorbsiyon kapasiteleri bakır ve çinkonun başlangıç konsantrasyonlarıyla yakından ilişkilidir ve sırasıyla 246.1 mg/g ve 180 mg/g 'dır (Xu vd., 2004). Aerobik granüller geniş yüzey alanı, gözenekli yapısı ve iyi çökeltme özelliklerinden dolayı toksik kimyasalların adsorbsiyonunda etkili bir rol oynamaktadır. Biyosorbsiyonla granül çamur kullanarak yüksek toksik ağır metallerin giderilmesi sağlanmıştır (Liu vd., 2002, 2003c,d). Granül çamur kullanarak Kaytonik boyar madde, Rodamin B 'nin adsorbsiyonla giderilmesi Langmuir adsorbsiyon izotermiyle sağlanmıştır (Zheng vd., 2005). Aerobik granüllerin maksimum adsorbsiyon yoğunluğu floküler çamurunkinden üç kat daha büyüktür.

2.2.5.5. Partiküler Madde Giderimi

Aerobik granüler çamur AKR'de başarılı bir şekilde aklime edilmiş ve yüksek partiküler organik madde içeren bira üretim tesisi atıksularının arıtılmasında kullanılmıştır (Schwarzenbeck vd., 2004a). Organik yükleme hızı 3,2 kg KOİ/m³gün, atıksu partikül konsantrasyonu 0,95 g/L AKM olan atıksuda %50 toplam KOİ ve %80 çözülmüş KOİ giderim verimleri sağlanmıştır. Aynı işletme şartları altında gelişen

granüler çamur ve floküler çamurun mukayesesinde spesifik oksijen tüketim hızı açısından granüllerin daha yüksek metabolik aktivite sergilemesine rağmen giderim verimleri bakımından önemli bir fark gözlenmemiştir. Partiküler madde giderimi sırasında iki farklı mekanizma gözlemlenmiştir: başlangıçtaki granül oluşumu sırasında partiküllerin biyofilmlerle birleşmesi ve olgun granüller için, partiküler KOİ giderme özelliği sağlayan granül yüzeyindeki yüksek seviyede protozoa artışıdır.

2.2.5.6. Nükleer Atık Giderimi

Çözünmüş uranyum gideriminde yeni bir biyomateryal olarak aerobik granüler biyokütle kullanılması Nancharaiah vd. (2006) tarafından araştırılmıştır. Çalışmada farklı başlangıç pH (1 - 8) değerlerinde ve uranyum [U(VI)] konsantrasyonlarında (6 – 750 mg/L) uranyumun biyosorbsiyonu araştırılmış ve asidik pH aralığında (1 – 6), pH 7.0 ve üzerine nazaran biyosorbsiyonun daha hızlı (< 1 sa) gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Hemen hemen uranyumun tamamının giderimi (6 – 100 mg/L) 1sa'den az sürdüğü belirtilmiştir. Deneysel veriler farklı izoterm denklemleri kullanılarak analiz edildiğinde Redlich-Peterson modeli en uygun sonucu vermiştir. U(VI)'un maksimum biyosorbsiyon kapasitesi 218 ± 2 mg/g kuru granüler biyokütle 'dir. Düşük kuvvetteki atıksulardan uranyumun giderilmesinde granüler biyokütlenin düşük seviyedeki sıvı uranyum atıklarının arıtılması için uygulanabileceği belirtilmiş ve diğer fizikokimyasal metotların pahalı ya da uygun olmadığı görülmüştür.

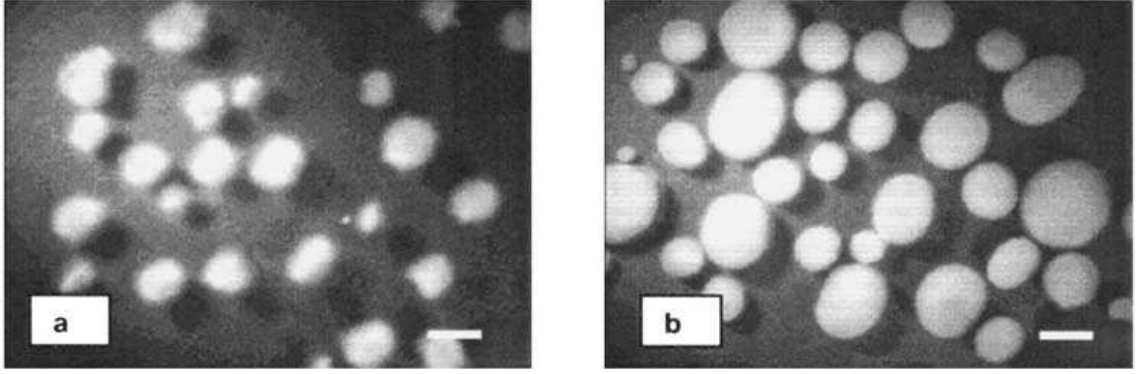
2.3. KATYONLARIN GRANÜL ÇAMUR ÜZERİNE ETKİLERİ

Yapılan araştırmalar aerobik granülasyonun mikrobiyal grupların bir fonksiyonu olmadığını, ama reaktörlerin işletim şartları, aerobik açlık, kesme kuvveti ve +2 değerlikli metal iyonları gibi faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir. (S.S. Adav, D.J. Lee, J.Y. Lai, 2009; T.T. Ren, L. Liu, G.P. Sheng, X.W. Liu, H.Q. Yu, 2008). Bu faktörlerden +2 değerlikli metal iyonları aerobik granülasyon prosesinde önemli rol oynamaktadır. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} ve Fe^{3+} gibi artı iki ve üç değerlikli iyonlar negatif yüklü hücrelere bağlanarak mikrobiyal agregatlar oluştururlar (Mahoney vd., 1987). Jiang vd. (2003) Ca^{2+} iyonunun eklenmesinin aerobik granülasyonu hızlandırdığı ve granül oluşumu için geçen sürenin yarı yarıya kısalttığı gözlemlenmiştir.

Ca^{2+} 'nin granülasyon prosesine iki şekilde yardımcı olduğu düşünölmektedir. Birincisi, Ca^{2+} bakteri yüzeyindeki ve hücreğışı polimerik moleküllerdeki negatif yüklü gruplara bağlanarak bir köprü görevi görmekte ve bu bileşenleri birbirine bağlayarak (Costerton vd. 1987, van Loosdrecht vd. 1987, Bruus vd. 1992) bakteriyel agregasyonu arttırmaktadır. İkincisi, Ca^{2+} ile beslenen granüller yüksek miktarda polisakkarit üretmektedir. Polisakkaridlerin hücresel adezyonu arttırarak mikrobiyal agregatların ve biyofilmlerin yapısal bütönlüğünü sürdürmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Fletcher & Floodgate, 1973). Polisakkaridler güçlü ve yapışkan bir iskelet oluşturur (Chistensen 1989, Sutherland 2001) ve bu durum aerobik granüllerdeki stabil granül yapısının sürdürölmesine ve oluşumuna yardımcı olmaktadır. Ayrıca polisakkarit içeriğinin yoğunluk ve biyofilm dayanıklılığı ile pozitif ilişki olduğu görölmüştür (Ohashi & Harada 1994). Polisakkaridlerdeki OH gibi ikinci fonksiyonel gruplar da rijit ve deforme olmayan polimerik jel oluşturmak için Ca^{2+} ile etkileşime girmekte (Costerton vd. 1987, Sutherland 2001) ve aerobik granüllerin yapısal stabilitesini arttırmaktadır.

Ca^{2+} 'nin aerobik granülasyon üzerindeki etkisi araştırılmış ve 100 mg/L Ca^{2+} eklenmesi aerobik granül oluşumunu 32 günden 16 güne düşürdüğü görölmüştür. Ca^{2+} ile beslenerek oluşan granüllerin daha yoğun, daha kompakt ve daha dayanıklı olduğu ve daha iyi çökeltme özelliği gösterdiği, ayrıca yüksek polisakkarid içeriğine sahip olduğu görölmüştür. Aşı çamurunun flok boyutu 76 μ m ve ÇHİ 187 mL/gAKM'dir. Başlangıç

evresinde biyokütle boyutu oldukça yavaş artmış ve iki reaktör arasında çok fazla bir fark görülmemiştir. R1'deki biyokütle boyutu 28. günde 600 μm 'ye ulaşmış ve flokülör görünümde olduğu görülmüştür. R1'de granül oluşumu 32. güne kadar görülmemiştir. Buna karşın R2'deki granül oluşumu reaktörün işletilmesinden kısa bir süre sonra görülmeye başlanmıştır. R2'deki biyokütle boyutu yaklaşık 12 gün sonra hızla artmaya başlamış ve 16. günden 21. güne kadar geçen sürede 500 – 1600 μm çapındaki granüller gözlenmiştir. Yaklaşık iki aylık işletme süresinin sonunda R1 ve R2'deki granüller sırasıyla 2000 μm ve 2800 μm olarak sabit kalmışlardır. İlk birkaç günün dışındaki diğer işletme süresince R2'deki biyokütle boyutunun R1'den sürekli olarak daha büyük olduğu görülmüştür. Ca^{2+} eklenmesi biyokütle konsantrasyonunun önemli derecede artmasını sağlamıştır. Sistemin kararlı hale gelmesinden sonra biyokütle konsantrasyonu R2'de 7,9 gAKM/L, R1'de ise 2 gAKM/L'dir. R2'deki yüksek biyokütle konsantrasyonunun bir sonucu olarak KOİ giderim veriminin R1'den daha yüksek olduğu görülmüştür. KOİ giderim verimi R2'de %98 iken bu değer R1'de %93'tür. R1'deki granüllerin tüylü ve yumuşak bir görünüme sahip olduğu gözlenirken R2'deki granüllerin düzgün ve kompakt bir yapıda olduğu görülmüştür (Şekil 2.10). Yapılan çalışmada Ca^{2+} eklenmesinin granüllerin fiziksel karakteristiklerini etkilediği görülmüştür. R1'in ÇHI değerinin 150 mL/g AKM'nin üzerinde olduğu buna karşın R2'nin ÇHI değerinin 100 mL/gAKM'nin altında olduğu ve mükemmel çökelme özelliği gösterdiği belirtilmiştir. Ca^{2+} eklenmesiyle granül dayanıklılığı artmıştır. Ayrıca hücre dışı protein miktarında Ca^{2+} eklenmesiyle herhangi bir değişiklik görülmemiş fakat hücre dışı polisakkarit miktarının iki kat arttığı (41 mg/g UAKM'den 92 mg/g UAKM'ye) görülmüştür. Sonuç olarak yapılan çalışmada Ca^{2+} eklenmesinin granülasyon prosesini geliştirdiğini ve üstün özellikte aerobik granül oluşumuna yardımcı olarak granül oluşum süresini kısalttığı belirtilmiştir (Tay vd., 2003).

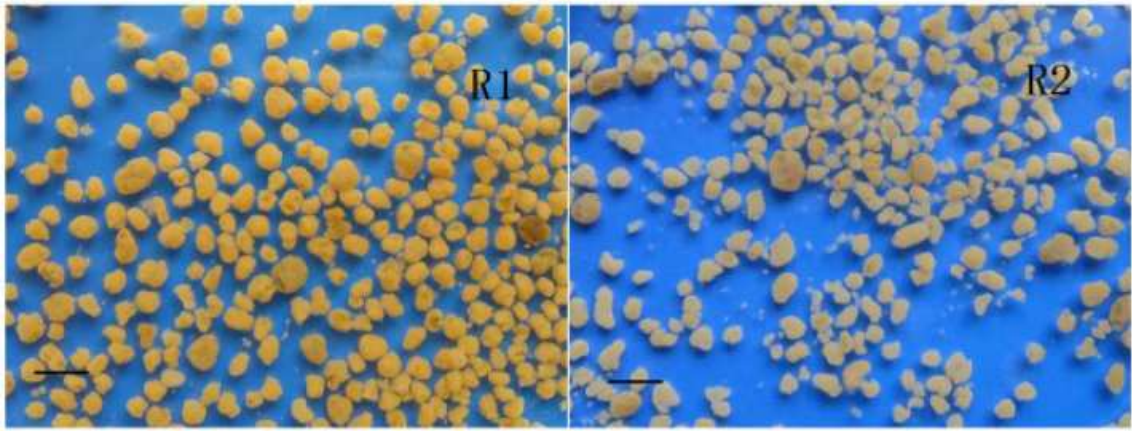


Şekil 2.10 R1 ve R2'deki olgun granüllerin görünümü (Tay vd., 2003)

Ölçek=2,5 mm

Gao vd., (2010), Ca^{2+} ve Mg^{2+} 'un aerobik granülasyon ve granül performansı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Aerobik granüllerde Ca^{2+} ve Mg^{2+} artışının etkisini araştırmak üzere iki adet AKR işletilmiştir; R1'e 40 mg/L Ca^{2+} ve R2'ye ise 40 mg/L Mg^{2+} eklenmiştir. Yapılan çalışmada 12 L hacimli, 60 cm yükseklik 22 cm çapa sahip iki adet kolon tipi AKR kullanılmıştır. Atıksu reaktörün en üst kısmından eklenmiş ve çıkış suyu reaktörün tabanından 10 cm yukarıdan deşarj edilmiştir. Sistem % 75'lik hacimsel değişim oranıyla işletilmiştir. Her iki reaktörde de döngü süresi 5 saat olarak ayarlanmıştır. Döngüler 1 dakika besleme, 280 dakika havalandırma, 1-10 dakika çöktürme ve 5 dakika boşaltma olarak ayarlanmıştır. Çöktürme süresi 10 dakika olarak başlamış ve zamanla 1 dakikaya kadar düşürülmüştür. Havalandırma reaktör dibinden difüzörler yardımıyla yapılmış ve yüzeysel hava hızı 1,2 cm/sn ve çözünmüş oksijen konsantrasyonu 4-6 mg/L olarak ayarlanmıştır. Reaktörler 24 ± 1 °C sıcaklıkta işletilmiştir. Aktif çamur evsel atıksu arıtma tesisinden alınmış ve aşı çamuru olarak kullanılmıştır. Çamurun başlangıç AKM'si 2300 mg/L ve UAKM'si ise 1620 mg/L CHI ise 92 mL/g olarak kaydedilmiştir. Aşı çamuru öncelikle havalandırma boyunca substrat eklenmeden 3 gün süreyle musluk suyuyla beslenmiş ve daha sonra R1 ve R2 reaktörlerinde aklima edilmiştir. Aşı çamurunun SVI_{30} değeri 92 mL/g'dır ve 3 gün sonra 64 mg/g'a düşmüştür. Aerobik granülasyon prosesinde 10 döngünün ardından çamur performansı iki reaktörde de çok fazla değişim göstermemiştir. Bununla beraber çamurun CHI_{30} değeri R1 ve R2'de 51 mL/g'a düşmüştür. Bu nedenle çöktürme süresi bu aşamada 5 dakikaya inmiştir. 16. döngüde Ca^{2+} birikmesi ile aerobik granüller ilk olarak R1'de gözlenmiş ve çamurun rengi yeşile dönmüştür. Mg^{2+} eklenen R2'de ise

30. döngüye kadar aerobik granül oluşumu gözlenmemiştir. Daha sonra aerobik granüllerin ve boyutlarının kademeli olarak arttığı gözlenmiştir. R2’de 51. döngünün ardından R1’de ise 41. döngünün ardından SVI_{30} ve SVI_5 arasındaki fark %10’dan daha az olduğu tespit edilmiştir. Böylece aerobik granülasyon R1’de 41. döngüden sonra R2’de ise 51. döngüden sonra elde edilmiştir. Floküler çamurun sistemden giderilmesi amacıyla çökelme zamanı 1 dakikaya düşürülmüştür. Tamamlanan granülleşmeye R1’de 88. döngüde ulaşılmış, bu aşamada R2’de ise küçük floklara rastlanmıştır. R2’de tamamen granül çamur oluşumu ancak 100. döngüde gerçekleşmiştir. Ca^{2+} birikmesi Mg^{2+} birikmesi ile karşılaştırıldığında Ca^{2+} birikmesinin aerobik granüleşmeyi biraz daha hızlandırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Granülleşmenin tamamlanmasından sonra iki reaktörde de KOİ giderimi aynıdır ve giderim verimi %94’ün üzerindedir. R1’de NH_4^+ -N ve P giderim verimleri %92 ve %97 iken R2’de %98 ve %99,6’dır. İki reaktördeki olgun granüllerin morfolojisi Şekil 2.11’de gösterilmiştir.



Şekil 2.11 105. döngüden sonra granüllerin gelişimi: R1:Ca ve R2:Mg (Gao vd., 2010)

Ca^{2+} nin çamurun granülasyonunu üç yolla arttırdığı belirlenmiştir: (1) reaktöre Ca^{2+} eklenmesi bakteri yüzeyindeki negatif yüklü iyonları nötralize ederek çamurun granülasyonunu artırması, (2) Ca^{2+} nin bakteri yüzeyindeki ve EPS üzerindeki negatif yüklü gruplara bağlanması ve bu bileşenleri köprü görevi görerek birbirine bağlaması ve EPS- Ca^{2+} -EPS zincirlerini oluşturması, (3) Ca^{2+} nin $CaCO_3$ şeklinde mikrobiyal agregasyonu hızlandırması ve olgun granüllerin fiziksel dayanıklılığını artırması şeklinde gerçekleştiği düşünülmektedir (Liu vd., 2007). Buna karşılık Mg^{2+} ’nin granül

yapısı üzerinde zayıf bir etkisi bulunmakta ve hücrelerin birbirine bağlanmasında etkili bir rol oynayamadığı görülmüştür. Mg^{2+} 'nin biyokimyasal yolla granülasyon prosesini arttırdığı düşünülmektedir. Mg^{2+} 'nin enzimler üzerinde etkili bir rol oynadığı ve enzim reaksiyonlarını hücre senteziyle birlikte canlandırdığı bilinmektedir (Brdjanovic vd, 1996). Yapılan çalışmada Mg^{2+} eklenmesiyle aerobik granüllerin protein içeriğinin oldukça arttığı görülmüştür. Ca^{2+} eklenmesiyle aerobik granüller protein üretiminden farklı olarak daha büyük miktarlarda polisakkarid üretmiştir (Jiang vd., 2003). Fakat Mg^{2+} eklenmesiyle granüllerin polisakkarid ve protein üretiminde önemli derecede artış göstermiştir. Bu durum Ca^{2+} ile karşılaştırıldığında Mg^{2+} eklenmesi sonucu aerobik granüllerin daha hızlı substrat biyodegradasyon oranına sahip olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak; Ca^{2+} eklenmesi aerobik granülasyon gelişiminin Mg^{2+} eklenmesine nazaran daha hızlı gerçekleşmesini sağlamıştır. Aerobik granüllerin optimum koşullara ulaşmasından sonra Ca^{2+} eklenen olgun granüllerin Mg^{2+} eklenen granüllere göre daha üstün fiziksel özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Bununla beraber Mg^{2+} birikmiş olgun granüllerin mikrobiyal topluluğu yüksek farklılığa sahiptir ve substrat biodegradasyon oranının biraz daha hızlı olduğu görülmektedir. Ayrıca Mg^{2+} eklenmesinin EPS artışında Ca^{2+} nazaran daha pozitif etkisi olduğu görülmüştür. Bu yüzden Mg^{2+} ve Ca^{2+} 'nin aerobik granülleşmede farklı roller oynadığı sonucuna varılmıştır.

Sülfat ve demirin anaerobik granül çamurun fizikokimyasal karakteristikleri üzerine etkisi araştırılmıştır (Lens vd., 2006). Sistem pH 7'de, 30 °C' de ve 1,2 gKOİ /Lgün (0,04 gKOİ/gUAKMgün)'lük organik yükleme hızında 30 gün boyunca işletilmiştir. Glikozla beslenen anaerobik çamurda sülfat varlığı (KOİ/sülfat = 1) inkübasyonun başından sonuna kadar fizikokimyasal karakteristikleri değiştirmemiştir. Buna rağmen 30 gün boyunca glikoz, sülfat ve demirle beslenen granüllerde önemli derecede farklı fizikokimyasal farklılıklar gözlenmiştir. Demir varlığının (glikoz ve sülfata ek olarak, KOİ/demir = 1) 30 günlük inkübasyon süresi sonunda EPS ve SMP'deki protein ve karbonhidrat içeriğini % 50 oranında azalttığı görülmüştür. EPS içeriğinin azalması demirle beslenen granüllerin parçalanmasına sebep olmuştur. Buna rağmen demirle beslenen granüllerin demirsiz granüllere göre daha kuvvetli bir yapıya sahip olduğu görülmüştür.

2.4. KATYONLARIN FLOKÜLER ÇAMUR ÜZERİNE ETKİLERİ

Aktif çamurun flok yapısı mikroorganizmalar, inorganik partiküller, hücre dışı polimerik maddeler (EPS) ve iyonlar arasındaki fiziksel ve kimyasal etkileşimlerin bir sonucudur (Eriksson L ve Alm B, 1991; Bruus vd., 1992). Bakteri hücreleri ve EPS içeren tüm flok ve diğer bileşenlerin negatif yüklenmesinde aktif çamurdaki katyonların rolü göz önünde bulundurulmuştur ve birçok araştırmacı tarafından araştırılmıştır. Biyolojik bir süspansiyona sodyum eklemenin flok boyutunu arttırdığını ve flok gözenikliliğini geliştirdiğini rapor edilmiştir (Cousin CP ve Ganczarzyk JJ, 1998). Zita ve Hermansson (1994) flok stabilitesinin iyonik solüsyon kuvvetinden olumsuz etkilendiğini ve K^+ ve Ca^+ 'un partikül stabilitesi üzerinde aynı etkiyi yarattığını gözlemlemiştir (Zita A ve Hermansson M, 1994). Bunun aksine Novak vd. (2001) kalsiyum ve magnezyum iyonlarındaki artışın çökeltme özelliklerini geliştirdiğini belirtmiştir, ancak sodyum artışı aktif çamurun çökeltme ve susuzlaşma özelliğinin kötüleşmesine neden olmuştur (Higgins M ve Novak JT, 1997; Novak JT, Muller CD ve Murthy SN, 2001; Higgins M ve Novak JT, 1997). +2 yüklü iyonların EPS'in negatif yüklü bölgelerine bağlanması flok boyutunu, yoğunluğunu ve flokların parçalanmaya karşı olan direncini arttırmaktadır (Higgins M ve Novak JT, 1997).

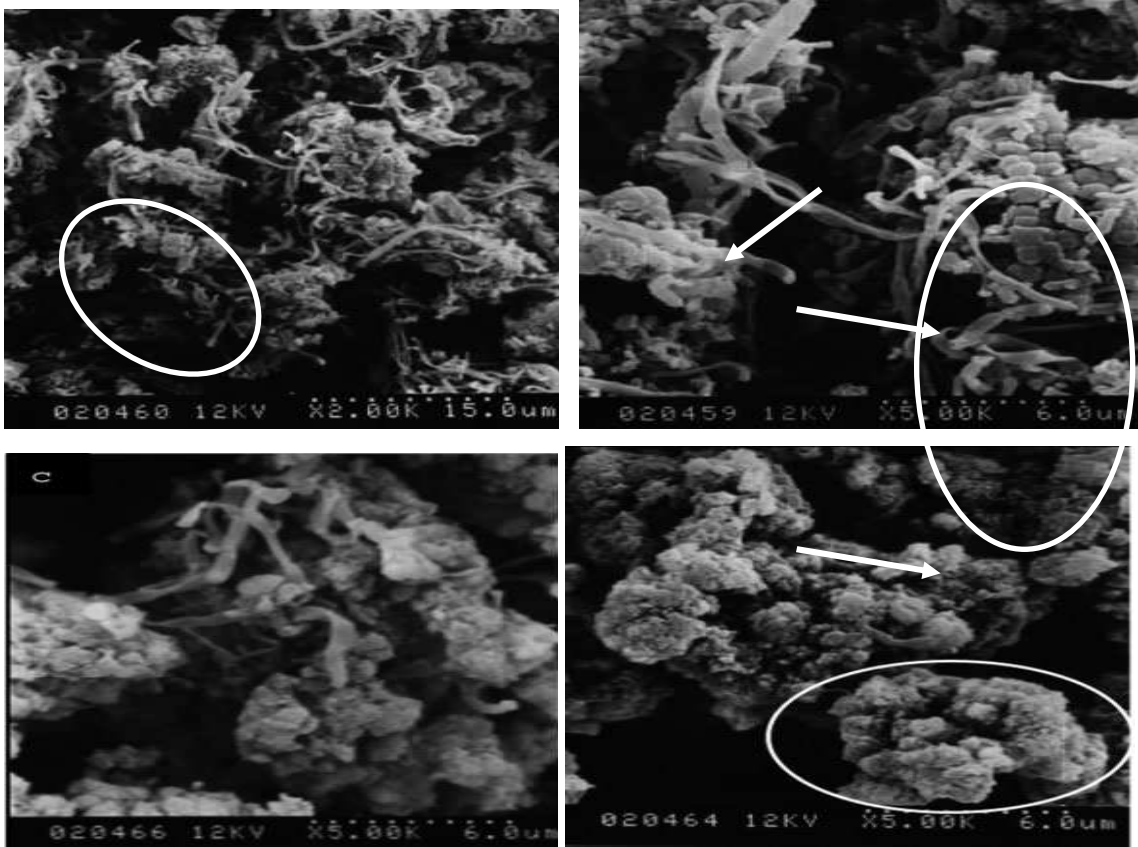
Literatürde tek değerlikli ve iki değerlikli katyonların floküler çamur üzerine olan etkileri araştırılmış ve +3 değerlikli iyonların katı-sıvı ayırımı üzerindeki rolü çok iyi anlaşılabilmiştir. Bununla birlikte evsel atıksuların ve bazı endüstriyel atıksuların yüksek oranda demir iyonu içerdiği gözlenmiştir. Bunun dışında demir tuzları atıksuların ön arıtılmasında yaygın bir metot olan koagülasyon prosesinde geniş kullanım alanları bulmuştur. Aktif çamur sisteminin havalandırma tankında demir iyonlarının eklenmesi fosfor giderimi açısından yaygın bir uygulamadır (Li Jiuyi, 2005).

Fe (III)'ün aktif çamur flok karakteristiğindeki etkileri konusundaki bilgiler oldukça sınırlıdır. Wuhrmann K vd., (1968) demir-klorür eklenmesinin aktif çamur kültüründeki protozoaların yok olmasına neden olduğunu ve atıksudaki bulanıklığı arttırdığını belirtmiştir. Sudaki bulanıklığın demir-hidroksi-fosfat parçalarından veya protozoaların bulunmayışından dolayı dağılan aktif çamur parçalarından kaynaklandığına dair kesin bir sonuca varılamamıştır. Nielsen PH ve Keiding K (1998) aktif çamur floklarında

Fe^{3+} 'ün FeS 'e indirgenmesinin flok direncinde zayıflığa ve aktif çamur floklarının parçalanmasına neden olduğunu rapor etmişlerdir. Novak vd. (2001) demirin indirgenmesinin flok dayanıklılığına katkıda bulunduğunu fakat çamurun susuzlaşma özelliğini olumsuz yönde etkilediğini belirtmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada Fe^{3+} 'ün aktif çamurun flok özellikleri üzerine etkileri, arıtma performansı, çamurun çökelebileme özelliği, flok yapısı ve boyut dağılımı parametreleri dikkate alınarak araştırılmıştır (Li Jiuyi, 2005). Fe^{3+} 'ün aktif çamurun flok karakteristikleri üzerindeki etkileri dokuz paralel yukarı akışlı reaktörde farklı miktarlarda $FeCl_3$ eklenerek araştırılmıştır. Demir klorür dozlaması çözünebilen proteinlerin birçoğunu ve bazı polisakkaritleri gidermiş ve çıkış suyu KO_2 'nda azalmaya sebep olmuştur. Bu sonuçlar ile birlikte Murthy ve Novak (2001) demirin flok içerisinde polisakkaritlerin küçük bir kısmını tutarken proteinin büyük bir kısmını tuttuğunu göstermiştir. Fe^{3+} 'ün uygun konsantrasyonlarının aktif çamur floklarının oluşumuna katkıda bulunabileceği ve aktif çamurun partiküler ve koloidal maddeleri flok içerisinde tutabilme yeteneğini arttırabileceği, bununla beraber Fe^{3+} 'ün aşırı dozlarının aktif çamurun agregasyonunu zayıflattığı ve flokların dağılmasına sebep olduğu gösterilmiştir. Reaktörlerdeki AKM konsantrasyonları demir klorür dozajındaki artışa bağlı olarak artmıştır. UAKM konsantrasyonları ise başlangıçta artmış daha sonra sabit kalmıştır. UAKM/AKM oranı ilk olarak 0.83'ten 0.61'e düşmüş, bu durum aktif çamurdaki inorganik maddelerin demir eklenmesi sonucu artış gösterdiği anlamına gelmektedir. Demir tuzlarının çamur içinde tutunması inorganik madde miktarının ve dolayısıyla çamur yoğunluğunun artmasını sağlamıştır. Fe^{3+} eklenmesi sonucu UAKM'nin artmasıyla çamurun CHI ile ölçülen çökebilirliğinin arttığı görülmüştür. Fe^{3+} eklemenin boyut dağılımında gözle görülebilir farklara neden olduğu gözlenmiştir. Fe^{3+} 'ün düşük konsantrasyonlarda flok boyutunu azalttığı gözlemlenmiştir. 23,8 mg/dm^3 'den dah az konsantrasyonlarda küçük flokların boyutlarında artış gerçekleşmemiştir. Demirin flok dayanıklılığını arttırdığını ve demirin indirgenmesinin çamurun susuzlaşmasını olumsuz yönde etkilediğini belirtmişlerdir. Reaktörlerdeki yüksek Fe^{3+} konsantrasyonlarının kuvvetli küçük aktif çamur floklarının oluşmasına sebep olduğu görülmüş ve bu durumun çıkış suyunda AKM konsantrasyonunun artmasına ve bulanıklığa sebep olabileceği belirtilmiştir. Aktif çamur floklarının morfolojisi SEM kullanılarak incelenmiştir. SEM'de reaktörlere $FeCl_3$ eklenmesi

sonucu flok morfolojisinde meydana gelen değişiklikler Şekil 2.12’de gösterilmiştir. Flokların dağınık bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca bakteri hücrelerinin mikrobiyal gruplar oluşturmak amacıyla EPS’lere yapıştığı filamentli bakterilerin bu mikrobiyal gruplarda omurga görevi gördüğü net bir şekilde görülmüştür (Şekil 2.12 (a ve b)).



Şekil 2.12 Farklı AKR’lerdeki SEM görüntüleri (Jiuyi Li, 2005)

(a) SBR-1, $\times 2000$; (b) SBR-5, $\times 5000$; (c) SBR-6, $\times 5000$; (d) SBR-9, $\times 5000$. Daire içerisindeki kısımlar aktif çamur partiküllerini ve oklar filamentli bakterileri göstermektedir.

Diğer taraftan FeCl_3 eklenmeye devam edilmesi sonucu oldukça farklı tipte bir morfoloji gözlemlenmiştir. Partikül sınırları net bir şekilde görülebilmektedir. Bazı filamentli bakterilerin partiküllerden dışarı yayıldığı ve yayılan bu filamentli bakterilerin agregasyon için oldukça önemli olduğu belirtilmiştir. Fe^{3+} ’ün geniş agregatların oluşumunu sağlayan filamentli bakterilerin sayısını azalttığı görülmüştür. $23,8 \text{ mg/dm}^3 \text{ Fe}^{3+}$ eklenen reaktörde bazı filamentli mikroorganizmalar görülürken (Şekil 2.12 (c)), $142,8 \text{ mg/dm}^3 \text{ Fe (III)}$ eklenen reaktörde hiç filamentli bakteri görülemediği (Şekil 2.12 (d)). Bunun dışında bakteri hücrelerinin yüzeyinde bazı

inorganik maddeler gözlemlenebilmiştir. Reaktörlerde yapılan EPS analizlerinde fosforun yüksek miktarlarda olması dikkat çekmiştir (%24 - 34). Ayrıca EPS'de magnezyum, potasyum ve kalsiyum gibi katyonların kontrol reaktöründe baskın olduğu görülmüştür. EPS ve mikrobiyal hücrelerin negatif yüklü olmasından dolayı katyonlar aktif çamurun biyoflokülasyonunda önemli bir rol üstlenmektedirler. Fe^{+3} 'ün fizikokimyasal olarak negatif yüklü iyonlarla etkileşime girmesi flokların daha kompakt ve yoğun olmasını sağlayabildiği belirtilmiştir. Sonuç olarak; reaktöre demir tuzlarının eklenmesi çıkış suyundaki KOİ, çözünmüş oksijen konsantrasyonu, protein ve polisakkarid kalitesini arttırmaktadır. Uygun konsantrasyonlardaki Fe^{3+} iyonları aktif çamurun floklar içerisinde koloidal madde ve partikül tutma kapasitesini arttırmakta fakat yüksek miktarlarda Fe^{3+} verilmesi aktif çamurun agregasyonunu olumsuz yönde etkilemekte ve flokların parçalanmasına sebep olmaktadır. Yüksek miktarlarda Fe^{3+} eklenmesi büyük flokları azaltmış ve küçük flok sayısını arttırmıştır. Bu durum küçük boyutlu flokların çöktürücülerde giderilememesine dolayısıyla çıkış suyunda bulanıklığa ve katı madde miktarının artmasına sebep olmaktadır. Hücre dışı polimerik maddelerin element analizi Fe^{3+} 'ün bazı biyopolimerlerle etkileşime girdiğini ve $FeCl_3$ miktarının artmasıyla +1 ve +2 değerlikli katyonlar azalırken EPS örneklerindeki demir yüzdesinin arttığı görülmüştür. Demir iyonları aktif çamur flok morfolojisinin değişmesine sebep olmaktadır. Yüksek Fe^{3+} konsantrasyonlarının aktif çamur partikülleri arasındaki bağları zayıflattığı ve geniş agregatların oluşumunu sağlayan filamentli mikroorganizmaların miktarını azalttığı belirtilmiştir.

Fe^{2+} ve Fe^{3+} 'ün aktif çamurun fiziksel ve biyolojik özellikleri üzerine olan etkisi karşılaştırılmıştır (Oikonomidis vd., 2010) Bu çalışmada laboratuvar ölçekli sürekli akışlı aktif çamur reaktörleri 25 mg/L konsantrasyonunda Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzlarıyla beslenmiş ve aktif çamurun özelliklerindeki değişiklikler ve demirin akümüasyonu gözlenmiştir. Çalışmada ilk 6 hafta hiçbir kimyasal eklemesi yapılmadan reaktörler kontrol periyodunda işletilmiştir. 6. haftadan itibaren reaktörlere 10 hafta boyunca 25 mg/L $FeCl_3$ ve $FeCl_2.4H_2O$ ilavesi yapılmıştır. Flokların morfolojik karakteristikleri kullanılan iyon tipine bağlı olarak göze çarpan değişiklikler göstermiştir. Fe^{2+} eklenen flokların Fe^{3+} eklenenlere göre daha kompakt daha az filamentli ve daha küçük boyutta olduğu gözlenmiştir. Ayrıca Fe^{2+} eklenen granüllerin çökeltme özelliğinin Fe^{3+}

eklenenlere göre daha az olduğu görülmüştür. Amonyum ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) ve nitrit ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) oksitleyen bakterilerin aktivitelerinin Fe akümülyasyonundan etkilendiği belirtilmiştir. Proses performansı KOİ, $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, giderimi ve toplam çıkış suyundaki katı madde miktarı açısından değerlendirilmiştir. Fe^{2+} ve Fe^{3+} eklenen aktif çamur proseslerinin ikisinde de benzer şekilde iyi bir KOİ giderim verimi sağlanmıştır. $\text{NH}_4^+\text{-N}$ giderim veriminin % 95'in üzerinde olduğu, Fe^{2+} ve Fe^{3+} eklenmesinden etkilenmediği gözlemlenmiştir. Demir eklenmesi $\text{PO}_4\text{-P}$ giderim verimini beklendiği üzere önemli ölçüde arttırmıştır. Çıkış suyundaki toplam katı madde miktarı demir eklenmesiyle her iki halde de ilerleyen bir azalma göstermiştir. AKM konsatrasyonu Fe^{2+} ve Fe^{3+} eklenmesiyle artış göstermiştir. Fe^{2+} 'nin flok yapısını Fe^{3+} 'e nazaran daha fazla değiştirdiği ve her bir demir elementinin farklı karakteristiklerde floklar oluşturduğu gözlemlenmiştir. Fe^{3+} ilavesi yapılan reaktördeki floklar genellikle dağınık ve düzensiz yapıda iken Fe^{2+} ilavesi yapılan reaktördeki flokların kompakt, daha az filamentli ve belirgin dış hatlara sahip olduğu görülmüştür. Dozlamadan kısa süre sonra Fe^{3+} eklenen reaktördeki flok boyutlarının Fe^{2+} eklenen reaktördeki flok boyutlarından gözle görülür derecede daha büyük olduğu görülmüş fakat daha sonra bu farkın giderek azaldığı belirtilmiştir. Dozlama süresince Fe^{3+} bulunan reaktördeki flok boyutunun Fe^{2+} bulunan reaktördeki flok boyutlarından % 5,8 – 41,8 daha büyük olduğu görülmüştür. Fe^{2+} 'nin Fe^{3+} 'den daha etkili bir flokulent olduğu görülmüş ve bu durum Fe^{3+} 'e oksidasyonundan önce floklarla daha güçlü iyonik bağ oluşturabilme yeteneğine bağlanmıştır. Demir eklenmesinin aktif çamurun organik madde giderim verimi, biyokütle aktivitesi ve mikrobiyal populasyon kompozisyonu gibi biyolojik karakteristikleri değiştirdiği de gözlemlenmiştir.



Şekil 2.13 (a) Demir eklenmeden önceki ıslak flok, (b) demir (III) eklenen flok, (c) demir (II) eklenen flok (Oikonomidis vd., 2010)

Her iki Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzlarının eklenmesinin flokların çökme özelliğini arttırdığı belirtilmiştir. Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzlarının çökme özelliğini artırma derecesi her iki reaktörde de farklıdır. Dozlama ve dozlamadan sonraki periyotlarda Fe^{2+} eklenen reaktörün ÇHI Fe^{3+} eklenen reaktördekine nazaran oldukça düşüktür. Fe^{2+} eklenen reaktördeki flokların daha iyi çökme özelliği göstermesinin nedeni daha küçük daha az filamentli ve daha kompakt bir yapıda olmalarından dolayıdır. Mikroskobik görüntüler Fe^{2+} 'nin Fe^{3+} 'den daha etkili bir flokulent olduğunu göstermektedir. EPS'deki negatif yüklü iyonların yüksek yoğunluğundan dolayı Fe gibi zıt yüklü

multivalent iyonlar polimerleri bağlamakta ve bu köprü biyopolimerleri ve bakterileri sağlamlaştırarak biyoflokülasyonu arttırmaktadır. Fe^{2+} eklenen çamurda eklenen iyon ve floktaki iyonik bölgeler arasında daha kuvvetli bağların oluşmasından dolayı daha iyi bir flokülen olduğu gözlemlenmiştir. Reaktör tamamen karışım haldeyken oksidasyon/hidroliz reaksiyonları başlamadan önce Fe^{2+} EPS üzerinde bulunan negatif yüklü iyonlarla etkileşime girmektedir. Sisteme Fe^{2+} eklendiği zaman flok içerisindeki iyonik etkileşimlerin sayısı Fe^{3+} eklenmesine göre daha fazladır (Şekil 2.13 a,b). Fe^{2+} eklenen floklarda flok yüzeyinin geniş alanları düzgün EPS tabakasıyla kaplanmıştır (Şekil 2.13 c). Buna karşılık Fe^{3+} eklenen floklarda ise flok yapısında önemli bir rolü bulunan filamentlerle floğun dağınık bir şekilde olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, laboratuvar ölçekli reaktörlerde Fe^{2+} ve Fe^{3+} eklenmesinin KOİ ve NH_4^+-N giderim verimlerini etkilemediği fakat PO_4-P giderim verimini her iki demir türü eklenmesinde benzer oranda arttırdığı görülmüştür. Fe eklenmesiyle uçucu olmayan askıda katı madde miktarının arttığı ve daha inorganik flokların oluştuğu belirtilmiştir. Mikroskobik görüntülerden Fe^{2+} eklenen flok yüzeylerinin tahminen hücre dışı polimerik maddelerden oluşan ve daha iyi flok oluşumunu sağlayan düzgün bir tabakayla geniş olarak kaplandığı buna karşılık Fe^{3+} eklenen sistemdeki flokların düzensiz ve dağınık oldukları görülmüştür. Flok boyutu Fe dozlamasıyla birlikte her iki sistemde de azalmıştır. Boyuttaki azalmanın sebebi Fe'in omurga filamentlerini parçalamasıdır. Flokların çökme özelliği Fe eklenmesiyle her iki reaktörde de artış göstermiş fakat Fe^{2+} eklenen reaktörde daha iyi çökme özelliği görülmüştür. Fe^{2+} 'nin eklenmesiyle Fe^{3+} 'e okistlenmeden önce eklenen iyon ve floktaki aniyonik bölgeler arasında kuvvetli bağlar oluşmasından dolayı sistemde iyi flokülasyon karakteristikleri gözlemlenmiştir. NH_4^+-N ve $NO_2^- -N$ oksitleyen bakteriler Fe eklenmesinden etkilenmiş mikroorganizma aktivitelerindeki değişimlerin çamurun inorganik içeriğinin artmasıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Başlangıç Fe konsantrasyonuna bağlı olarak flok yüzey özellikleri ve bunun morfolojik özelliklerine olan faydası, çökme özelliği ve aktif çamur sisteminin diğer içerikleriyle ilişkili olarak flokülasyonun arttığı gözlemlenmiştir. Diğer taraftan yüksek Fe konsantrasyonlarında flokların bozulabileceği belirtilmiştir.

Banu vd. (2008) evsel atıksulardan eş zamanlı fosfor gideriminde demir sülfatın nitrifikasyon üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Fe/P molar oranı 2.1 olarak ayarlanmış ve böylece çıkış suyundaki toplam fosfor konsantrasyonu 1 mg/L'nin altında

tutulmuştur. Koagülant eklenmesinden sonra pH, çökeleğin molar oranının belirlenmesinde temel rol oynamaktadır. Fosfor giderimi açısından aerobik havuzdaki pH değerinin koagülant eklendikten sonra başlangıç değerinden daha önemli olduğu görülmüştür. Çünkü koagülant eklenmesi sonucu sistemdeki alkalinite tükenmekte ve bu durum elverişli başlangıç pH aralığının daha az elverişli pH aralığına değişmesine sebep olmaktadır. Örneğin 35 mg demir eklenmesi durumunda aerobik havuzun son pH'ı 7,3 olduğu görülmüş ve bu pH'da 1 mg/L'nin altında fosfor giderimi gerçekleştirilebilmiştir. Demir miktarının artması sonucu son pH değeri 7,3'den 6,9'a düşmüş ve bu durum toplam fosfor giderim veriminin düşmesine sebep olmuştur. Azot giderimi biyolojik olarak anoksik/oksik sistemde sağlanmış ve çökeltmenin nitrifikasyon ve denitrifikasyon üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sistemin nitrifikasyon hızı çökeltmeden etkilenmemiş ve 0,046 – 0,059 g N-NH₄⁺/g UAKM/gün arasında değiştiği belirlenmiştir. Denitrifikasyonun tamamlandığı ve koagülasyon prosesinden etkilenmediği görülmüştür. Sistemde azot giderim oranı %78 ile %85 arasında değişmektedir. Demir dozajının artırılmasının nitrifikasyon hızı ve azot giderim verimi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Ayrıca reaktör içerisinde inorganik çökelek akümüülasyonunun olmadığı görülmüştür. KOİ giderim veriminin çökeltmeden etkilenmediği ve %94 ile %98 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Çökeltme süresince aynı zamanda yüksek azot giderim verimi elde edilmesi sistemin nutrient gideriminde ideal bir seçenek olmasını sağlamaktadır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA PLANI

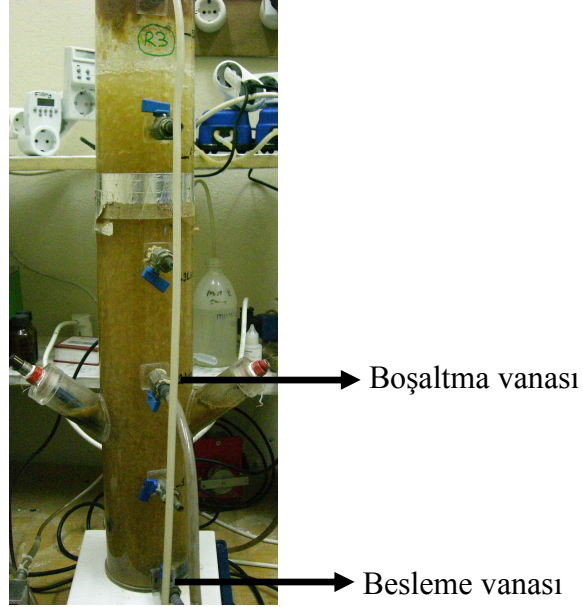
Çalışmada Paşaköy İleri Biyolojik Atıksu Arıtma Tesisi'nden alınan çamur 5 hafta süreyle AKR'de aklime edilmiştir. Daha sonra askıda katı madde muhtevasının istenilen düzeye gelmesiyle sistem R1 ve R2 olarak ikiye ayrılmıştır. R1 kontrol reaktörü olarak Fe^{2+} içermeyen atıksuyla, R2 ise 10 mgFe/L Fe^{2+} içeren atıksuyla beslenerek işletilmiştir. Çalışmada Fe^{2+} 'nin aerobik granül çamurun oluşumu ve stabilitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

3.2. ÇALIŞMA DÜZENİ

Aklimasyon süresince çapı 12 cm, çalışma yüksekliği 46 cm ve çalışma hacmi 5 L olan AKR kullanılmıştır. Reaktör evsel nitelikli sentetik atıksuyla beslenmiştir. Havalandırma 800 L/sa'lik bir debiyle vakum pompası ve reaktörün iki yanına yerleştirilmiş hava taşlarıyla sağlanmıştır. Reaktör % 60'lık hacimsel değişim oranıyla işletilmiştir. Karıştırma işlemi reaktör altına yerleştirilen 100 rpm dönme hızına sahip manyetik karıştırıcıyla sağlanmıştır.

Çalışmada kullanılan R1 ve R2 reaktörlerinin geometrik konfigürasyonu aklimasyon periyodunda kullanılan reaktörden farklıdır. Reaktörler 10 cm çapa, 55 cm çalışma yüksekliğine sahiptir ve %50 hacimsel değişim oranıyla işletilmişlerdir (Şekil 3.1). Sistemde başlangıç hacmi 2 L, doldurma hacmi 2 L olarak ayarlanmıştır. Besleme peristaltik pompayla, boşaltma selenoid vanayla, havalandırma 400 L/sa'lik bir debiyle vakum pompası ve reaktör dibine yerleştirilmiş hava taşlarıyla sağlanmıştır. R1 ve R2 proses kontrolü PLC (programlanabilir lojik kontrolör) ile yapılan pH ve çözülmüş oksijen konsantrasyonunun bilgisayar kontrollü olarak izlendiği bir sisteme bağlanmıştır. Reaktör yüksekliği boyunca 5 adet numune alma musluğu bulunmaktadır. Çalışmaların farklı dönemlerinde süreleri farklı olmak üzere bir döngü, statik doldurma, aerobik periyod, çöktürme, boşaltma safhalarından oluşmuştur. Çalışma süresince reaktörler sentetik atıksuyla beslenmiştir. Sentetik atıksu haftada iki kez hazırlanmış ve +4°C 'de saklanarak sisteme pompalanmıştır.

Besleme tankı ve besleme hortumları haftada bir kez olmak üzere biyolojik kirlenmeye karşı sıcak suyla temizlenmiştir. Ayrıca reaktörlerde biyofilm oluşumunu engellemek için reaktörler de haftada bir kez temizlenmiştir.



Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan reaktör

3.2.1. Aklımasyon Periyodu

Paşaköy İleri Biyolojik Atıksu Arıtma Tesisi'nin geri devir hattından alınan çamur 5 hafta süreyle AKR'de aklime edilmiştir. Reaktöre verilen sentetik atıksuyun kompozisyonu Tablo 3.1'de verilmiştir. Sentetik atıksuya 0.3mL/L oranında eklenen iz element çözeltisinin kompozisyonu Tablo 3.2'de verilmiştir. Hazırlanan atıksuyun KOİ'si 500 ± 50 mg/L, TKN'si 40 ± 5 mg/L, TP 8 ± 1 mg/L'dir. Aklımasyonda 6 saatlik bir döngü 8 dk statik besleme, 90 dk anaerobik periyot, 222 dk aerobik periyot, 30 dk çöktürme ve 10 dk boşaltma safhalarından oluşmaktadır. Aklımasyon süresince çamur yaşı 12 gün olarak seçilmiştir. 5 haftalık aklımasyon periyodu sonunda sistemde %96'dan fazla $\text{NH}_4\text{-N}$ ve $\text{PO}_4\text{-P}$ giderim verimi elde edilmiştir.

Tablo 3.1 Sentetik atıksu kompozisyonu

Bileşen	Konsantrasyon (mg/L)
Glikoz (C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O)	165
Sodyum asetat (NaCH ₃ COO.3H ₂ O)	345
Nişasta	75
Pepton	100
Et ekstresi	64
Üre ((NH ₂) ₂ CO)	32
NH ₄ Cl	95
K ₂ HPO ₄	31,5
KH ₂ PO ₄	10,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	6
CaCl ₂ .2H ₂ O	5
FeSO ₄ .7H ₂ O	5
İz element çözeltisi	0,3 mL/L

Tablo 3.2 İz element çözeltisi kompozisyonu

Bileşen	Konsantrasyon (g/L)
EDTAH ₂ Na ₂ .H ₂ O	52,5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,2
MnCl ₂ .7H ₂ O	3,97
(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ .H ₂ O	1,21
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,61

3.2.2. Fe²⁺'nin Aerobik Granül Çamur Oluşumuna ve Stabilitesine Etkisinin İncelenmesi

Fe²⁺'nin aerobik granül çamur oluşumuna ve stabilitesine etkisinin incelenmesi amacıyla, biri Fe²⁺ içermeyen sentetik atıksu ile beslenen kontrol reaktörü, R1 ve 10 mg Fe²⁺/L Fe²⁺ eklenen sentetik atıksu ile beslenen reaktör, R2 aynı şartlarda paralel olarak işletilmiştir. Sentetik atıksu kompozisyonu, Fe²⁺ hariç aklımasyon periyodu ile aynıdır. R1'e beslenen sentetik atıksuya hiç Fe²⁺ eklenmezken; R2'ye atıksu içinde 10 mg

Fe^{2+}/L olacak şekilde 50 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ilave edilmiştir. R1 ve R2'de 195 gün boyunca Fe^{2+} 'in etkisi izlendikten sonra, R1'e atıksu içinde 1 mg Fe^{2+}/L olacak şekilde 5 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ eklenmiştir. Reaktörler 9 ay boyunca izlenmiştir.

Reaktörlerde çöktürme süresi (T_s) 10 dakikaya ayarlanarak sistem işletilmeye başlanmıştır. Yavaş çöken flokül çamurun sistemden yıkanması için çöktürme süreleri 1. gün $T_s = 5$ dk, 2. gün $T_s = 3$ dk, 8. gün $T_s = 2$ dk olarak değiştirilmiştir. AKR'ler statik doldurma, aerobik, çökeltme ve boşaltma periyotlarında işletilmiştir. Reaktörlerde 6 saatlik bir döngü boyunca, 60 dk statik doldurma, 288 dk havalandırma, 2 dk çökeltme ve 10 dk boşaltma periyodu uygulanmıştır. 209. gün sadece havalandırma periyodu kısaltılarak döngü süresi 4 saate düşürülmüştür.

Aerobik periyotta havalandırma ve karıştırma işlemi, reaktörün tabanına yerleştirilen hava taşı ile yapılmıştır. Reaktörlere verilen hava miktarı debimetre ile kontrollü olarak 400 L/sa hızında verilmiştir.

3.3. ANALİZ YÖNTEMLERİ

AKM, UAKM, ÇHI, ortofosfat, toplam fosfor, amonyak azotu, toplam Kjehdahl azotu, nitrit, KOİ tayinleri standard metodlarda belirtildiği şekilde yapılmıştır (APHA, 1995). AKM, UAKM, ÇHI sırasıyla standard metodlarda 2540 D, 2540 E, 2710 E bölümlerinde belirtilen şekilde yapılmıştır. KOİ tayini bölüm 5220 D'de belirtilen kolorimetrik closed reflux metoduyla, nitrit tayini bölüm 4500-NO₂⁻ B'de belirtilen kolorimetrik metotla, amonyak tayini bölüm 4500-NH₃ C'de belirtilen titrimetrik metod ile, ortofosfat tayini bölüm 4500-P B'de belirtilen kalay klorür metodu ile yapılmıştır. Toplam fosfor tayini için gerekli parçalama işlemi 4500-P B'de belirtilen şekilde yapılmıştır. Nitrat tayini 1.14773.0001 ürün numaralı Merck kiti ile yapılmıştır. Kolorimetrik analizlerde süzölmüş numune elde etmek için 0,45 µm por çaplı şırınga ucu filtre (millipore, SLHV033NK) kullanılmıştır. Uçucu yağ asidi analizleri Agilent marka 6890 Model Gaz Kromatografi cihazıyla yapılmıştır. Tüm kolorimetrik analizlerde PG Instruments T80 UV/VIS Model spektrofotometre kullanılmıştır. 0,22 mm por çaplı şırınga ucu filtre (millipore SLGV033NK) kullanılarak süzölmüş numuneler 1:9 oranında (numune:asit) %10'luk H₃PO₄ ile seyreltilerek cihaza enjekte edilmiştir.

3.3.1. Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu (ESEM) İle Morfolojinin İncelenmesi

ESEM 15 yıl önce geliştirilmiştir. ESEM kullanmanın avantajlarından biri nemli modda çalışabilme özelliğidir, yani iletken olmayan numunelerin iletken bir madde ile kaplanması gerekli değildir. İncelenecek materyallerin kurutulmasına ve altın veya paladyum ile kaplanmasına gerek yoktur. Böylece analiz süresince numune orijinal özelliklerini koruyabilir (University of California Merced, 2007)

Deneysel çalışma süresince biyokütlerdeki morfolojik değişimleri takip etmek için ESEM (Philips XL series, XL 30ESEM-FEG) kullanılmıştır. ESEM ile görüntüleme dışında enerji dağılımlı X-ışınları analizi yapılmıştır. ESEM ile hem fikse edilmemiş hem de fikse edilmiş numune görüntüleri alınmıştır. Fiksasyon prosedürü Ek-1'de verilmiştir. Fikse edilmemiş numune ile alınan görüntülerde numune analizden bir gün

önce reaktörden alınmış ve 24 saat içinde görüntülenmiştir. Numuneler soğuk zincir korunarak taşınmıştır. ESEM ile görüntüleme Boğaziçi Üniversitesi İleri Teknolojiler Ar-Ge Merkez Laboratuvarları'nda yapılmıştır.

3.3.2. Işık Mikroskobu İle Morfolojinin İncelenmesi

Çamurun morfolojik değişimleri ESEM dışında, Olympus marka CH30 Model Işık Mikroskobu ile de takip edilmiştir. Işık mikroskobu ile görüntüler okülere bağlanan dijital fotoğraf makinesi (Casio FX-9850) ile alınmıştır.

3.3.3. EPS Ekstraksiyonu

EPS ekstraksiyonunda Frolund vd. tarafından (1996) önerilen, aerobik granül çamur ile yapılan çalışmalarda en yaygın olarak kullanılan protokol kullanılmıştır. Protokol Dülekürge'nin (2006) belirttiği şekilde orijinal prosedürde küçük değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Prosedürde EPS'i ekstrakte edebilmek için DOWEX 50x8 kation değiştirici reçine (Sigma Aldrich, kuvvetli asidik, Na⁺ form, 20-50 mesh size) kullanılmıştır. Deney sonuçlarının karşılaştırılabilir olması için tüm deneylerde aynı ekipman kullanılmıştır (erlen, magnet, magnetik karıştırıcı). Tüm deneyler soğukta (erlen ve tüpler buz dolu bir kapta bekletilerek) gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon için gerekli numune aerobik periyot sonrası reaktörden toplanmıştır. 0,5 g UAKM'ye karşılık gelecek numune hacmi aynı gün aerobik periyot sonrası reaktörde yapılan UAKM analizi sonucuna göre hesaplanmıştır. 0,5 g UAKM sağlayacak gerekli hacimdeki numune 50 ml falkon tübünde 9000g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülüp, pelet 30 mL PBS (Phosphate Buffer Saline) çözeltisinde vorteks kullanılarak süspanse edilmiştir. Kullanılan PBS çözeltisi Tablo 3.3'de verilmiştir. Bu adım yıkama adıdır. Pelet süspanse edildikten sonra 9000g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülmüş hacim PBS ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. 25 mL'ye tamamlanan numune ultra-turrax kullanılarak homojenize edilmiştir. Ultra-turrax hızı 1. seviyede tutulmuş homojenizasyon süresi 4 dakika seçilmiştir. Homojenizasyon sonrası numune içinde 35 gram yıkanmış, filtre edilmiş kurutulmuş kuvvetli asidik sodyum formu kation değiştirici reçine (Sigma-Aldrich - 91973) bulunan 250 mL hacmindeki erlene aktarılmıştır. Ultra-turrax'ın mili üzerinde kalan biyokütlede toplanarak erlene aktarılmıştır. Erlendeki son hacim PBS ile 100 mL'ye tamamlanmış ve karanlıkta

tutmak amacıyla erlen alüminyum folyo ile kaplanarak magnetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş ekstraksiyon başlatılmıştır. Ekstraksiyon süresi 4 saattir. Manyetik karıştırıcı 750 rpm'e ayarlanmıştır. 4 saat süresince buz miktarı kontrol edilmiş ve eridikçe takviye yapılmıştır. 4 saat sonunda erlen muhtevası 50 mL hacminde falkonlara aktarılmış 1 dakika 9000g'de santrifüj edilmiştir. Bu santrifüj reçinenin uzaklaştırılması içindir. Toplanan süpernatant kalan biyokütleyi ayırmak için 9000g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Bu santrifüj sonrası protein ve polisakkarid analizleri için gerekli miktarda süpernatant toplanmış; örnekler protein ve karbonhidrat analizine kadar -20°C'de saklanmıştır. EPS ekstraksiyonu İstanbul Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Tablo 3.3 PBS çözeltisi

Bileşen *	Konsantrasyon (g/L)
Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O	0,328
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,552
NaCl	0,526
KCl	0,0746

*Bileşenler 1 L destile suda çözünmüştür, pH 7'ye ayarlanmıştır.

3.3.4. Protein Analizi

EPS'in protein miktarı "BSA Protein Assay Kit" (Pierce, 23227) kullanılarak ölçülmüştür. Kite ait bileşenler Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4 "BSA Protein Assay Kit" in bileşenleri ve içerikleri

Kit bileşenleri	İçerikleri
BSA Belirteci A	Sodyum karbonat Sodyum bikarbonat Bişinkroninik asit Sodyum tartarat (0.1 M Sodyum hidroksit içinde hazırlanır)
BSA Belirteci B	%4 Bakır sülfat
Albumin standardı	2 mg/ml Bovin Serum Albumin (BSA)

Öncelikle kit bileşenlerinden “BSA Belirteci A” ve “BSA Belirteci B”, 50:1 oranlarında karıştırılarak Çalışma Belirteci (“Working Reagent”) oluşturulmuştur. Standart olarak, final konsantrasyonu 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml ve 2000 µg/ml olacak şekilde hazırlanan albumin standardı kullanılmıştır. Kit içinde bulunan mikropate prosedürüne uygun olarak, örnek ve standartlardan 25’er µl alınıp, üzerine 200’er µl Çalışma Belirteci eklenmiştir. Daha sonra plate 37°C’ta, 30 dakika inkübe edilmiştir. Plate’in sıcaklığı, oda sıcaklığına ulaştığında 562 nm’de köre karşı absorbans ölçümü yapılmıştır. Standartların konsantrasyonları ile absorbans değerleri kullanılarak standart grafik hazırlanmıştır. Örneklerin protein konsantrasyonu bu grafikte elde edilen doğru denklemi yardımıyla hesaplanmıştır. Her numunede üç kere protein analizi yapılmış ve değerler mg BSA/mg UAKM birimiyle ifade edilmiştir. Protein analizi İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarı’nda yapılmıştır.

3.3.5. Elektroforetik Analizler

3.3.5.1. Denatüre Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Proteinlerin denatüre jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrıştırılmasında Walker (2002) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. İşlem sırasında kullanılan çözeltiler Tablo 3.5’te, jellerin hazırlanması sırasında kullanılan çözelti oranları ve işlem sırası Tablo 3.6’te verilmiştir. Önce jelin 1. kısmı (ayırma jeli) dökülmüş ve hava ile teması engellemek üzere jel yüzeyi 1 ml distile su ile kapatılmıştır. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 1 saat) yüzeydeki su uzaklaştırılmış ve jelin 2. kısmı (yükleme jeli) dökülüp tarak yerleştirilmiştir. Polimerizasyon sonunda (yaklaşık 30 dakika) jel kaseti elektroforez aletine (Mini-PROTEAN 3 Cell, BIO-RAD) yerleştirilmiş ve örnekler 1:1 oranında örnek yüklemeye tamponu ile karıştırılıp 5 dakika kaynatıldıktan sonra, her bir cepte 10 µg protein olacak şekilde uygulanmıştır (Ausubel, 1989; Bloom 1987; Walker 2002).

Tablo 3.5 SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler

Çözeltiler	Bileşenleri
Stok akrilamid çözeltisi	Akrilamid.....30 g Bis.....0.8 g Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı
1.875 M Tris-HCl tamponu (pH 8.8)	Trizma-Baz.....45.43 g 3 N HCl ile pH 8.8'e ayarlandı Distile su ile 200 ml'ye tamamlandı
0.6 M Tris-HCl tamponu (pH 6.8)	Trizma-Baz.....14.54 g 3 N HCl ile pH 6.8'e ayarlandı Distile su ile 200 ml'ye tamamlandı
%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS)	SDS.....10 g Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı
%10 Amonyum persülfat (APS) (polimerizasyon başlatıcı, taze hazırlanır)	APS.....0.1 g Distile su ile 1 ml'ye tamamlandı
1 x Yürütme tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 SDS, pH 8.3)	Tris.....3.03 g Glisin.....14.4 g SDS.....1 g Distile su ile 1 litreye tamamlandı
Örnek yükleme tamponu	0.6 M Tris-HCl (pH 6.8).....5 ml SDS.....0.5 g Sukroz.....5 g β -Merkaptoetanol.....0.25 ml Bromofenol mavisi (% 0.5 stok).5 ml Distile su ile 50 ml'ye tamamlandı

Tablo 3.6 SDS-PAGE'de kullanılan jelin hazırlanması

Solüsyonlar	Ayırma jeli (%10 Akrilamid)	Yükleme Jeli (% 5 Akrilamid)
Stok akrilamid solüsyonu	13.3 ml	1.35 ml
1.875 M Tris-HCl tamponu (pH 8.8)	8.0 ml	-
0.6 M Tris-HCl tamponu (pH 6.8)	-	1.0 ml
%10 SDS	0.4 ml	0.1 ml
Su	18.1 ml	7.5 ml
%10 Amonyum persülfat (APS)	0.2 ml	0.05 ml
Karışımın havası alındı		
TEMED	14 μ l	14 μ l
Jel kasetine döküldü		

Elektroforez işlemi sabit voltajda (200 V) gerçekleştirilmiştir. Bromfenol mavisine ait bant jelin alt kenarına ulaşana dek (~40 dakika) ayırım sürdürülmüştür. İşlem sonunda akım kesilerek jel kaset arasından çıkarılmış ve bantlar Coomassie ya da gümüş nitrat boyama yöntemlerine göre boyanarak görünür hale getirilmiştir. Ölçümler İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.3.6. Boyama Yöntemleri

Elektroforez sonunda jelde ayrılmış proteinler iki farklı boyama yöntemi ile görünür hale getirilmiştir.

3.3.6.1. Coomassie Boyama

Bu yöntemde boyama işlemi hassasiyeti 0.3-1 µg protein/bant olan Asubell (1989)'e göre gerçekleştirilmiştir. Jel, alkole ve aside dayanıklı plastik bir kaptaki boyama çözeltisi [50:10:40 hacim oranlarındaki MeOH:AcOH (asetik asit):H₂O karışımı içinde hazırlanmış, % 0.05 (w/v) Coomassie parlak mavisi ("Coomassie brilliant blue" R-250)] içinde 2 saat, 37°C'da çalkalanmıştır. Daha sonra fazla boyayı uzaklaştırma ("destaining") çözeltisi [5:7:88 hacim oranlarında hazırlanmış MeOH:AcOH:H₂O karışımı] içinde 12 saat süreyle, 50 devir/dakika hızda çalkalayarak bekletilmiştir. Bu çözelti jelin alt zemini boyadan tamamen arınmaya kadar, sık sık değiştirilerek yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Jelde oluşan bantlar densitometrede (GS-800) analiz edilmiştir.

3.3.6.2. Hızlı Gümüş Boyama

Elektroforez sonunda jelde ayrılmış proteinler, duyarlılık sınırları yüksek, gümüş boyama yöntemi ile görünür hale getirilmiştir (Bloom ve diğ, 1987). Bu boyama yönteminde kullanılan çözeltiler Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.7 Hızlı gümüş boyama yöntemi için gerekli çözeltiler

Çözeltiler	Bileşenleri
A. Formaldehit fiksatif çözeltisi	%37 Formaldehit.....0.5 ml %40 (v/v) MeOH ile 1 litreye tamamlandı
B. 0.2 g/l Sodyum tiosülfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Na ₂ S ₂ O ₃0.2 g Distile su ile 1 litreye tamamlandı
C. %0.1 Gümüş nitrat (AgNO ₃)	AgNO ₃1 g Distile su ile 1 litreye tamamlandı
D. Görüntü oluşturma çözeltisi	Na ₂ CO ₃30 g B çözeltisi20 ml Distile su ile 1 litreye tamamlandı
E. 2.3 M Sitrik asit	Sitrik asit.....22.1 g Distile su ile 50 ml'ye tamamlandı

Hızlı gümüş boyama yönteminde jel sert plastik bir kap içerisinde 200 ml A çözeltisi içinde 20 dakika çalkalanmıştır. Fiksatif dökülüp 2 kez 10'ar dakika distile su ile hafif çalkalanarak yıkandıktan sonra 200 ml B çözeltisinde 1-2 dakika bekletilmiştir. B

çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra 2 kez 40'ar saniye distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra 200 ml C çözeltisi içinde 20 dakika çalkanmış ve C çözeltisi uzaklaştırılarak 200 ml D çözeltisi içinde, jelde kahverengi bantlar oluşuncaya kadar (yaklaşık 4 dakika) çalkalamaya devam edilmiştir. Son olarak jelin bulunduğu kaba 10 ml E çözeltisi eklenerek pH nötrleştirilmiş ve reaksiyon durdurulmuştur. Bant oluşumu tamamlandıktan sonra jelin fotoğrafı çekilmiştir.

3.3.7. Karbonhidrat Analizi

Karbonhidrat konsantrasyonu Dubois vd. (1956) tarafından geliştirilen fenol-sülfirik asit yöntemiyle tayin edilmiştir. Standard olarak alginat kullanılmıştır.

Analizde gerekli reaktifler %80 (w/w) fenol çözeltisi ve derişik sülfirik asittir. %80 (w/w) fenol çözeltisi hazırlamak için 80 g fenol tartılır üzerinde 20 mL destile su ilave edilir. Fenol kanserojen bir madde olduğundan bu çözelti hazırlanırken çeker ocak altında çalışılmalıdır. Fenol çözeltisinin hazırlandığı şişe ya da cam malzeme ışıktan korunmalı, bu nedenle etrafı alüminyum folyo ile sarılmalıdır. Çözeltinin çözünmesi 3-4 saat aldığından bir gün önceden hazırlanması tavsiye edilir. Standard eğri hazırlanırken kullanılan stok çözeltinin hazırlanışı ve yapılan seyreltmeler Ek-4'te verilmiştir.

Karbonhidrat konsantrasyonu tayin edilecek EPS örneğinden 2 mL alınarak test tübüne aktarılmıştır. Tüpe 50 µL %80 (w/w) fenol çözeltisi ve 5 mL derişik sülfirik asit ilave edilmiştir. Numune 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve ardından vorteks ile karıştırılarak 30°C inkübatörde 15 dakika bekletilmiştir. Oluşan sarı-turuncu rengin absorbansı 480 nm'de spektrofotometre ile ölçülmüştür. Numunenin karbonhidrat miktarının hesaplanması önceden hazırlanmış standard kalibrasyon eğrisiyle sağlanmıştır. Tüm örneklerde karbonhidrat ölçümleri 3 kere tekrarlanmış ve ortalama değerler hesaplanmıştır. Karbonhidrat analizi İstanbul Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.3.8. Partikül Boyutu Ölçümü

Partiküllerin boyut dağılımını incelemek için Malvern Master Sizer 2000 Lazer Kırınım cihazı kullanılmıştır. Cihaz 0,2-2000 μm arasındaki taneleri ölçebilmektedir. Master Sizer partikül boyutunu ölçmek için Mie kuramını kullanmaktadır. Mie kuramında bütün tanelerin şeffaf ve küre şeklinde olduğu ve tanelerle içinde buldukları ortamın saptırma indisleri arasındaki farkın küçük olduğu kabul edilmektedir (Özer, 2007).

Reaktörden aerobik faz sonunda alınan numune herhangi bir ön işlem uygulanmaksızın cihazın örnek hazırlama ünitesine ilave edilmiştir. Örnek hazırlama ünitesinde yaklaşık 1 L musluk suyu bulunmaktadır. Cihazda ölçülen bulanıklık değeri yaklaşık %15 olacak şekilde numune ilave edilmiştir. Örnek hazırlama ünitesinde bulunan mekanik karıştırıcı 500 rpm'e, santrifüjlü pompa ise 1000 rpm'e ayarlanmıştır. Analiz süresince örnek hazırlama ünitesine ultrasonik enerji uygulanmamıştır. Partikül boyutu ölçümleri İstanbul Teknik Üniversitesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü Partikül ve Seramik Malzemeler Karakterizasyon Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.3.9. PCA Yöntemi İle Kimyasal Olarak Çökelen Fosfatın Belirlenmesi

de Haas vd. (2000) tarafından önerilen bu yöntemde, numune önce santrifüj edilir ve supernatant başka bir tübe aktarılır. Pelet 10 mL NaCl ile yıkanarak tekrar santrifüj edilir ve süpernatant bir önceki süpernatant üzerine eklenir, tüp SUP olarak etiketlenir. Kalan biyokütle 3 kez soğuk perklorik asit ile yıkanır. Her bir yıkama sonrası 1000g'de 5 dakika santrifüj edilir. Her santrifüj sonrası süpernatant bir tüpte toplanır ve PCA olarak etiketlenir. SUP ve PCA'nın 10 mL'si 0,45 μm filtreden süzülür. Süzüntüde $\text{PO}_4\text{-P}$, süzülmemiş numunelerde toplam fosfor analizi yapılır. Kalan biyokütle başlangıç hacmine distile su ile tamamlanır, RES olarak etiketlenir. RES'de ve reaktörden alınan numunede toplam fosfor ölçülür. Hücre yapısı parçalanmadan kimyasal olarak bağlı fosfat PCA içinde çözündüğünden, PCA süzüntüsündeki $\text{PO}_4\text{-P}$ kimyasal bağlı fosfor miktarını verir. PCA yöntemi ile kimyasal olarak çökelen fosfatın belirlenmesi analizi İstanbul Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Sonuçlar ham numunede ölçülen toplam fosforun %'si olarak verilir.

3.3.10. Uhlmann Prodedürü İle Kimyasal Bağlı Fosfor Türlerinin Belirlenmesi

Uhlmann vd. (1990) tarafından önerilen prosedüre göre, numune santrifüj edilir ve süpernatant başka bir tübe aktarılır. Pelet 25 mL distile su ile tamamlanır, homojenize edilir ve santrifüjlenir. Süpernatant 0.45µm membran filtreden süzülerek çözünmüş ve toplam fosfor analizleri yapılır. Pelet, 25 mL 0.11M NaHCO₃ ve 0.11M Na₂S₂O₄ karışımı ilave edilerek 30 dak. 40°C’de çalkalayıcı etüvde ekstrakte edilir. Santrifüj ve süzme işleminden sonra çözünmüş ve toplam fosfor analizleri yapılır. Üçüncü adımda, pelet 25 mL 1 M NaOH ile 25°C’de 20 saat çalkalayıcı etüvde ekstrakte edilir, santrifüj ve süzmeden sonra çözünmüş ve toplam fosfor analizi yapılır. Son adımda, 0.5M HCL ile 25°C’de 20 saat çalkalayıcı etüvde ekstrakte edilir, santrifüj ve süzmeden sonra çözünmüş ve toplam fosfor analizi yapılır. Son olarak kalan pelet ilk hacmine tamamlanarak toplam fosfor analizi yapılır. Uhlmann prodedürü ile kimyasal bağlı fosfor türlerinin belirlenmesi İstanbul Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü Laboratuvarı’nda yapılmıştır. Sonuçlar ham numunede ölçülen toplam fosforun %’si olarak verilir.

3.3.11. Metal Analizi Numune Hazırlık

0,25 g kurutulmuş çamur elde edecek kadar numune reaktörden alınır ve bir falkon tüpte numune toplanır. 5 dakika 3500 rpm’de santrifüjler yapılır. Süpernatant atıldıktan sonra numune 103°C’de 24 saat kurutulur. Kurutulmuş çamurdan 0,25 g tartılır ve mikrodalganın teflon kaplarına eklenir. Mikrodalgada (CEM, Mars Express) parçalanmayı sağlamak için 5 ml nitrik asit (65 % w/v) ve 5 ml HF (40 % w/v) teflon kaplara eklenir. Çamur içermeyen yalnızca HNO₃ ve HF içeren şahit ile spektrometrede okumalar yürütülmelidir. (Bu şekilde HNO₃, HF ve destile su gelen kirlilik ihmal edilebilir). Kaplar mikrodalgaya yerleştirilir (kapların karşılıklı eşit ağırlıkta olması gerekmektedir) ve program başlatılır. Mikrodalga programı Tablo 3.8’de verilmiştir. Elde edilen numune 50 ml destile su ile tamamlanır. Numune 0,45 µm por çaplı millipore şırınga ucu filtreden geçirilir. Gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra ölçüm yapılır.

Elde edilen numune 50 ml destile su ile tamamlanır. Numune 0,45 µm por çaplı millipore şırınga ucu filtreden geçirilir. Gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra ölçüm

yapılır. Metal analizinde numune hazırlık ve mikrodalgada parçalama işlemleri İstanbul Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü Laboratuvarı'nda, konsantrasyon tayini ise İleri Analizler Laboratuvarı'nda ICP kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 3.8 Mikrodalga parçalama programı

Mikrodalga Programı			
Program	Zaman (dk)	Sıcaklık (°C)	Güç (W)
Aşama 1	40	200	800
Aşama 2	25	100	400
Aşama 3	1	20	400

3.3.12 Real-time PCR ile Tür Tayini

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) nükleik asitin çoğaltılması amacıyla kullanılan bir yöntemdir. PCR ile çok az miktardaki nükleik asidin hücre dışında birkaç saat gibi kısa bir sürede çoğaltılması sağlanmaktadır. PCR sırasında primer spesifik hedef dizileri kullanılarak nükleik asitin sadece istenilen bölgeleri kopyalanabilmektedir. Böylece türe özgü primerler kullanılarak numunenin içerisindeki sadece o türe ait DNA parçaları çoğaltılabilmektedir. Mikroorganizmaların standart PCR yöntemiyle yapılan tanılarıyla, kesin sonuçlar elde edilebilir olmasına rağmen, gerek PCR programının uzun sürede gerçekleşmesi gerekse işlem bitiminde örneklerin agaroz jelde yürütülmesi ve ethidium bromürle boyanıp UV altında görüntülenmesi problemler yaratmaktadır. Diğer klasik testlere göre daha kısa sürede kesin sonuçlar elde edilebilen gelişmiş PCR yöntemi, real-time PCR, DNA amplifikasyon sonuçlarının gerçek zamanlı olarak monitörden izlenebilmesini sağlamaktadır. Ayrıca deney sırasında DNA çoğalırken oluşabilecek bir kontaminasyon veya deneyin başarısızlığı halinde uzun süre beklemek yerine program hemen durdurulabilmektedir. Bu sayede başarısız deneyler için gereksiz zaman kaybından tasarruf edilir. Hedef türlerin toplam mikroorganizmalar içerisindeki yüzdesini tespit etmek amacıyla tüm bakterilere özgü 16S rRNA gen miktarı hesaplanıp, hedef türün gen oranları karşılaştırılmaktadır. Gen miktarını tespit edebilmek için gerekli standart miktarı bilinen DNA örnekleri daha önceden elde edilen

klonlama numunelerinden elde edilmiştir. Real-time PCR ile tür tayini Marmara Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Mikrobiyal Ekoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.3.12.1 Nükleik Asit Ekstraksiyonu

DNA izolasyonunda, numuneler 10 dakika 14000 devir/dakikada santrifüj edilerek konsantre hale getirildikten sonra FASTPREP-24 aleti ile seramik boncuklar kullanılarak 20 sn süreyle 4 m/s hızla mekanik olarak dağıtılmıştır. Mekanik parçalamadan sonra ortaya çıkan DNA, FastDNA SPIN Kit (Q-BIOgene) prosedürüne uygun olarak saflaştırılmıştır. Ekstre edilen DNA miktarının tespiti Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Reagent Kit (Moleküler Problar) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.12.2 Real-time PCR

Real-time PCR deneyinin prosedürü Roche tarafından sağlanan standart kitlere göre yapılmıştır. Kapılar tüplere konan 20µl PCR solüsyonu ve PCR (Lightcycler, Roche) şartları proje kapsamında tespit edilmiştir. Tüplere konan 20µl PCR solüsyonu; 2 µl DNA, 2 µl mastermix, 2 µl MgCl₂, 0.25'er µl forward ve reverse primerleri, ve 13.5 µl saf sudan (dH₂O) oluşmaktadır. PCR karışımı içine en son örneklerin ilavesinden sonra termal cyclerde 40 döngülük (5 sn 95°C, 20 sn 57°C, 45 sn 72°C) PCR yapılmıştır. Real-time PCR deneyinde kullanılan primerlerin listesi Tablo 3.9'da verilmiştir. SYBR-Green I boyası kullanılarak gerçekleşen amplifikasyonu takiben, erime eğrisi, sıcaklığın 65°C'den 95°C'ye kadar kademeli olarak 0.1 °C/saniye artırılmasıyla elde edilmiştir. Deneyin her bir aşaması bilgisayar yoluyla takip edilmiş ve elde edilen veriler LightCycler Software 4 programı ile analiz edilmiştir. Deneyin bütün kademeleri yaklaşık 1,5 saat gibi çok kısa bir zamanda gerçekleştirilmiştir. Bu sürenin yaklaşık bir saati PCR ve erime eğrisinin çıkartıldığı deney süresidir.

Tablo 3.9. Real-time PCR deneylerinde kullanılan primerler.

Hedef gen/tür	Primer	Nükleotit Dizisi (5'-3')	Kaynaklar
16S rRNA/	341f	CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer, 1993
Tüm bakteriler	907r	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	Muyzer, 1995
<i>amoA</i> /	<i>amoA</i> -1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	Rotthauwe,
Amonyak oksitleyen	<i>amoA</i> -2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	1997

bakteriler			Rotthauwe, 1997
16S rRNA/ <i>Nitrobacter</i> türleri	FGPS872 FGPS 1269	TTTTTTGAGATTTGCTAG CTAAAAC TCAAAGGAATTGA	Degrance, 1995 Degrance, 1995
16S rRNA/ <i>Nitrospira</i> türleri	NSR 1113F NSR 1264R	CCTGCTTTCAGTTGCTACCG GTTTGCAGCGCTTTGTACCG	Dionisi, 2002 Dionisi, 2002
16S rRNA/ <i>Accumulibacter</i>	518f PAO-846r	CCAGCAGCCGCGGTAAT GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	He, 2007 He, 2007
16S rRNA/ Actinobacteria	HGC236F HGC664R	GCGGCCTATCAGCTTGTT AGGAATTCCAGTCTCCCC	Warnecke, 2004 Warnecke, 2004
16S rRNA/ <i>Eikelboom type 021N</i>		CGTAGGCGGCTCTTTAAGTCRGA	
	21Nf	T	Vervaeren, 2005
	21Nr	CCGACGGCTAGTTGACATCGTTT A	Vervaeren, 2005
16S rRNA/ <i>Microthrix parvicella</i>	Par-0828 Par-1018	GGTGTGGGGAGAACTCAACTC GACCCCGAAGGACACCG	Kaetzke, 2005 Kaetzke, 2005

4. BULGULAR

4.1. Fe²⁺'nin AEROBİK GRANÜL ÇAMUR OLUŞUMUNA ETKİSİ

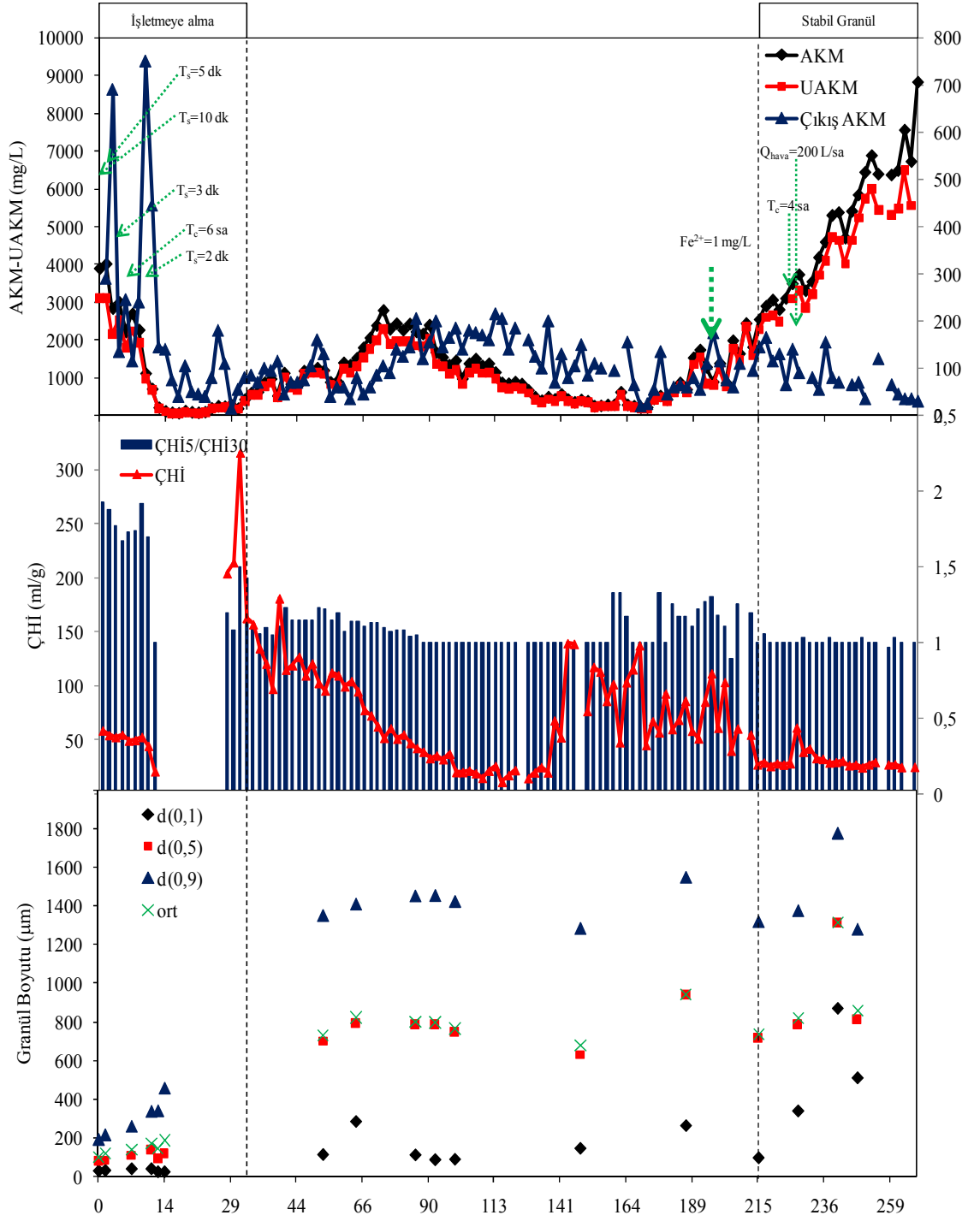
Literatürde, mikrobiyal biyokütlenin birbirine tutunmasındaki önemli rolünden ötürü +2 değerlikli metal iyonlarının (Ca²⁺, Mg²⁺ ve Fe²⁺) granülasyon prosesini hızlandırdığı rapor edilmiştir. Aerobik granül çamurda, Ca²⁺ ve Mg²⁺ iyonlarının granülasyon üzerine etkisi konusunda yapılmış çalışmalar bulunmasına rağmen (Yu vd., 2001; Jiang vd., 2003; Ren vd., 2008; Li vd., 2009); Fe²⁺ ile yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla beraber, Fe²⁺'nin anaerobik granülasyon prosesine etkisi uzun yıllardır bilinmektedir (Yu vd. 2000).

4.1.1. İşletmeye Alma ve Granülasyon

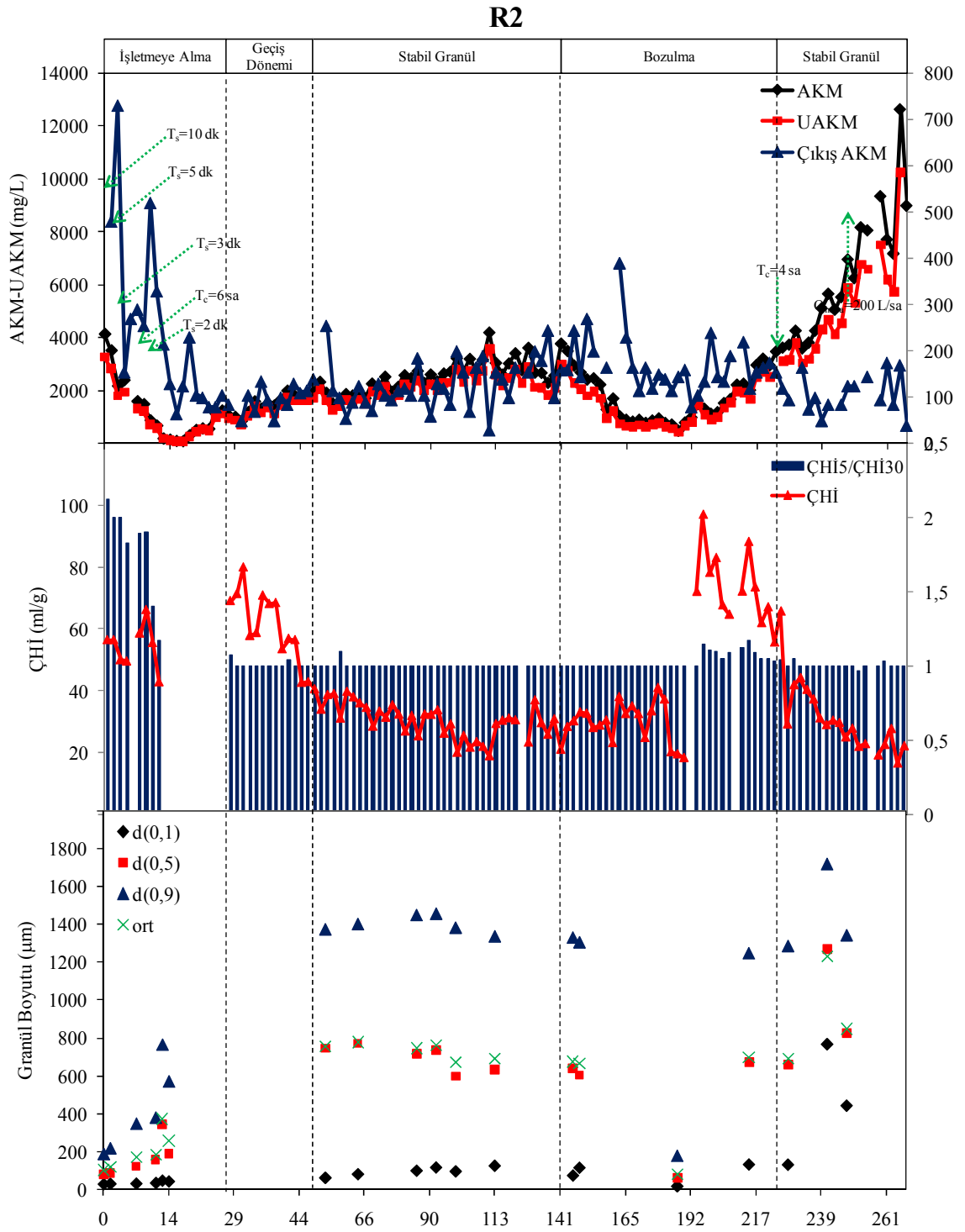
Paşaköy İleri Biyolojik Atıksu Arıtma Tesis'i çamur geri devir hattından alınan aşu çamuru 35 gün süreyle sentetik atıksuya aklime edilmiştir. Aklimasyon süresi, çamur çökelme özelliğinin bozulması nedeniyle uzamıştır. KOİ giderimi %95, NH₄-N giderimi \geq %95, PO₄-P giderimi \geq %95, ÇHİ=120mL/g, AKM=5100 mg/L olan aklime olmuş çamur, iki reaktöre bölünerek çalışmalar başlatılmıştır. Fe²⁺'nin aerobik granülasyona etkisini incelemek üzere, birincisi demir içermeyen atıksu ile beslenen kontrol reaktörü (R1) ve ikincisi 10 mgFe²⁺/L demir içeren atıksu ile beslenen reaktör (R2) işletmeye alınmıştır. Granülasyon stratejisi olarak kısa çöktürme süresi seçilmiştir. Bu çalışmada, biyolojik azot ve fosfor giderimi amaçlanmadığı için, kısa çöktürme süresinin en uygun ve hızlı strateji olduğu düşünülmüştür (Mağden, 2009). Çalışmanın başlangıcında her iki reaktördeki biyokütle konsantrasyonu 4000 mgAKM/L olarak ölçülmüştür. Aklimasyon süresince 20 dk olan çöktürme süresi, granülasyon sürecinde başlangıçta 10dk, 1. gün 5.dk, 2.gün 3 dk olarak seçilmiştir. 3 dk'lık çökelme süresi granülasyon için yeterli seleksiyon baskısı oluşturmadığından, 8.günde çöktürme süresi 2 dk'ya ayarlanmış ve çalışmanın sonuna kadar 2 dk'da çalıştırılmıştır. Şekil 4.1 (a) ve (b)'de R1 ve R2'de çalışma boyunca ölçülen, reaktörlerin içinde ve reaktörlerden atılan çıkış suyundaki AKM ve UAKM konsantrasyonları ile buna karşılık gelen ÇHİ, ÇHİ₅/ÇHİ₃₀ oranı ve granül boyutu verilmiştir. Kısa çöktürme süresi stratejisinde, çöktürme süresinin azaltılması ile yavaş çökelen flokların sistemden uzaklaştırılması böylece hızlı

Çöken biyokütle-flokların bir araya gelerek granül çamur oluşturması amaçlanmaktadır. Şekil 4.1 (a) ve (b)'de görüldüğü gibi, işletmeye almanın ilk üç gününde reaktörlerdeki çamurun büyük bir kısmı yıkanmış olmasına rağmen; reaktör içinde kalan çamurun çökeltme özelliğinin iyi olması (HI= 50-60 mL/g) nedeniyle, granül çamur oluşumu için yeterli seleksiyon baskısı sağlanamamıştır. 8. günde çöktürme süresinin 2 dk'ya indirilmesi sonucu, bir hafta içinde reaktörlerdeki AKM konsantrasyonu 100mg/L civarına düşmüştür. İlk granül yapıları her iki reaktörde de 12. günden itibaren gözlenmiş, ancak R2'deki granüllerin daha kompakt ve daha yoğun olduğı görülmüştür (Şekil 4.2). İşletmeye alma döneminde her iki reaktördeki boyut dağılımı farklılığı oldukça çarpıcıdır. 13. günde yapılan boyut dağılımı analizinde, R1'deki ortalama ve d(90) boyutu 150 ve 350µm; R2'de 375 ve 765 µm olarak ölçülmüştür. Her iki reaktörde de ilk granüller 12. günden itibaren gözlemlenmesine rağmen, granüllerin gelişimi birbirinden farklılıklar göstermiştir.

R1



(a)



(b)

Şekil 4.1 (a) R1 ve (b) R2’de çalışma boyunca ölçülen reaktörlerin içinde ve reaktörlerden atılan çıkış suyundaki AKM ve UAKM konsantrasyonları ile buna karşılık gelen ÇHI ve ÇHI₅/ÇHI₃₀ değerleri ve granül boyutu



R1 (13. gün)



R2 (13. gün)

Şekil 4.2 Çalışmanın 13.gününde R1 ve R2'deki granüllerin görünümü (ölçek=1mm)

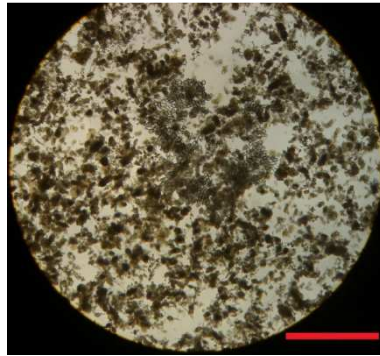
R1'de çalışma süresince, sistemde oluşan granüller büyük bir boyuta ulaşmasına rağmen, granüllerin etrafında oluşan yoğun filament tabakasından dolayı çamurun CHI değeri uzun bir süre kararlı hale gelememiştir. 60.günden sonra, CHI değeri kademeli olarak azalmış, $\text{CHI}_5/\text{CHI}_{30}$ oranı 1.1-1 değerine ulaşmıştır. Granül boyutu $d(0.9)$ $1290 \pm 221 \mu\text{m}$ elde edilmiştir (60-113. günler). Ancak oluşan granüller parçalandığından, granül boyutu sürekli salınım göstermiştir. Granüllerin parçalanarak sistemden yıkanması nedeniyle, reaktör içindeki AKM konsantrasyonu azalarak 250 mg/L değerine kadar düşmüştür. 186. günden itibaren AKM konsantrasyonu tekrar artmaya başlamış, CHI ve $\text{CHI}_5/\text{CHI}_{30}$ oranı kademeli olarak istenen değerlere ulaşmıştır. 195. günden itibaren Fe^{2+} 'in granül yapısı üzerine etkisini görmek amacıyla, atıksu içinde 1 mg Fe^{2+} /L olacak şekilde $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ilavesi yapılmıştır. Bu tarihten itibaren, Fe^{2+} ilavesinin etkisi ve döngü süresinin 6 saatten 4 saate indirilmesi ile AKM konsantrasyonu hızla artmıştır.

Fe^{2+} eklenen reaktör, R2'de 20. günden itibaren granül boyutu hızla büyüyerek; stabil granüllerin gözleendiği dönem süresince (50-140.günler) $d(0.9)$ $1390 \pm 50 \mu\text{m}$ 'ye ulaşmıştır. Granül boyutunda standart sapmanın bu kadar küçük olması bu dönem içinde granüllerin stabil olduğunun göstergesidir. Askıda katı madde konsantrasyonu bu dönemde kademeli olarak artmış, ve CHI ve $\text{CHI}_5/\text{CHI}_{30}$ oranı oldukça stabil kalmıştır. Çıkış AKM konsantrasyonunun yükselmesi ile reaktör AKM konsantrasyonunda hızlı bir düşüş gözlelenmiş, bozulmanın gözleendiği dönem içinden 187. günde 510 mg/L değerine kadar düşmüştür. 161. günde reaktörde aerobik periyot sonunda pH 5,8 ölçülmüştür. Granül stabilitesinin bozulduğu 161-190. günler arasında reaktör pH'si 0.1 N NaOH ile

6,5-8,5 arasında kontrol edilmiştir. R2’de pH’nın stabil granül sürecine dönmesi ile pH kontrolüne son verilmiştir. 190. günden itibaren AKM konsantrasyonu hızla artmıştır. Her iki reaktörde de döngü süresinin 4 saate indirilmesi ile AKM konsantrasyonundaki artış hızı artmıştır. Çalışmanın sonunda AKM konsantrasyonu R1’de 8830 mg/L, R2’de 9010 mg/L’ye ulaşmıştır. Granül boyutu da benzer şekilde artarak, her iki reaktörde de $d(0.9)=1800\mu\text{m}$, ortalama boyut $800\mu\text{m}$ ’ye ulaşmıştır. Granülasyonda önemli bir gösterge olan $d(0.1)$ boyutu da bu dönemde artarak 400-500 μm değerine ulaşmıştır.

4.1.2. Aerobik Granüllerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

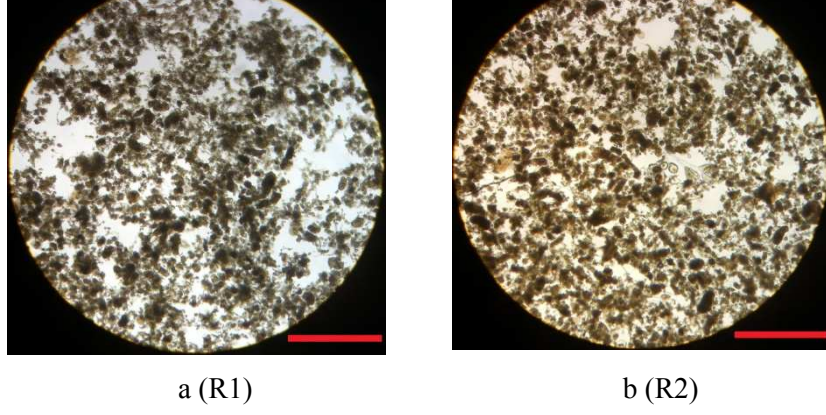
Aklime edilen çamur iki reaktöre bölünmeden önce alınan ışık mikroskobu görüntüleri flokların kompakt olduğunu, dağınık yapıların çok fazla bulunmadığını ancak flok boyutlarının küçük olduğunu göstermektedir ($d_{\text{ort}}=103\mu\text{m}$). Floklar etrafında filamentli organizmalar gözlenmemiştir (Şekil 4.3). Aklımasyon süresince reaktör Fe^{+2} konsantrasyonu 1 mg/L olan atıksu ile beslenmiştir (sentetik evsel atıksu karakterinde). Aklime edilen çamurda yoğun sesil siliat (*Epistylis sp.*) gözlenmiştir. Sentetik atıksuyun çözünmeyen nişasta içermesi bu türlerin sayısının artmasına olanak tanımıştır. Yapılan bir çalışma atıksu kompozisyonunda çözünmeyen nişastanın bulunmasının protozoa sayısını arttırdığını, nişastanın bir kısmının granül yüzeyindeki protozoa ile giderildiğini yapılan boyamalar ile kanıtlamıştır (de Kreuk vd., 2010).



Şekil 4.3 Aşı çamurunun ışık mikroskobu görüntüsü (40x)

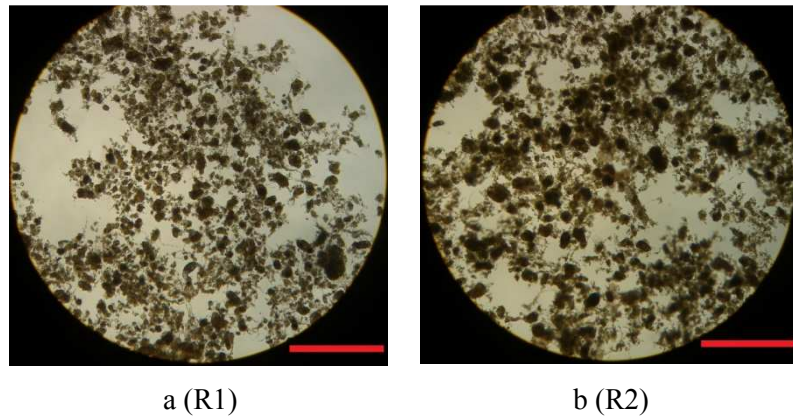
Her iki reaktörde de çamurun çökeltme özelliği iyi olduğundan çöktürme süresinin 2. gün 3 dakikaya düşürülmesi AKM konsantrasyonlarında ani bir düşüşe sebep

olmamıştır. Seçilen çöktürme süresi Şekil 4.4'de de görüldüğü gibi yavaş çöken flokların reaktörlerden tamamen yıkanması için yeterli olmamıştır.

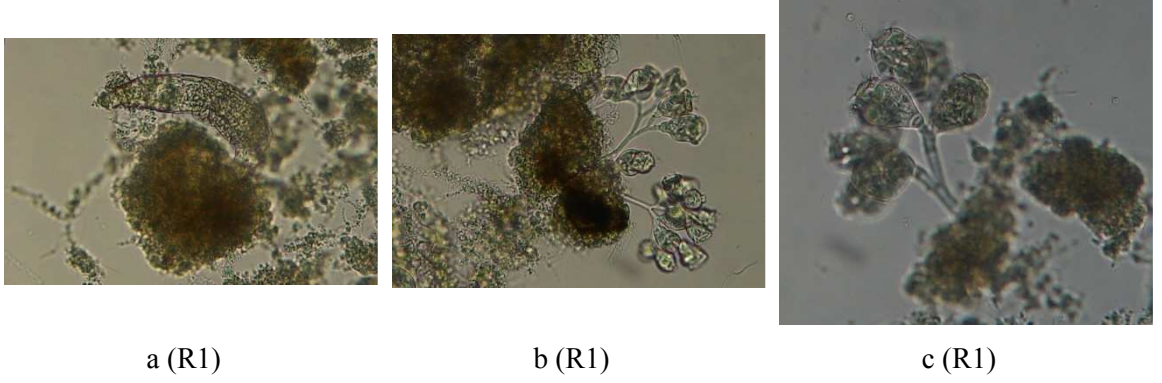


Şekil 4.4 Işık mikroskobu görüntüsü (2. gün, 40x)

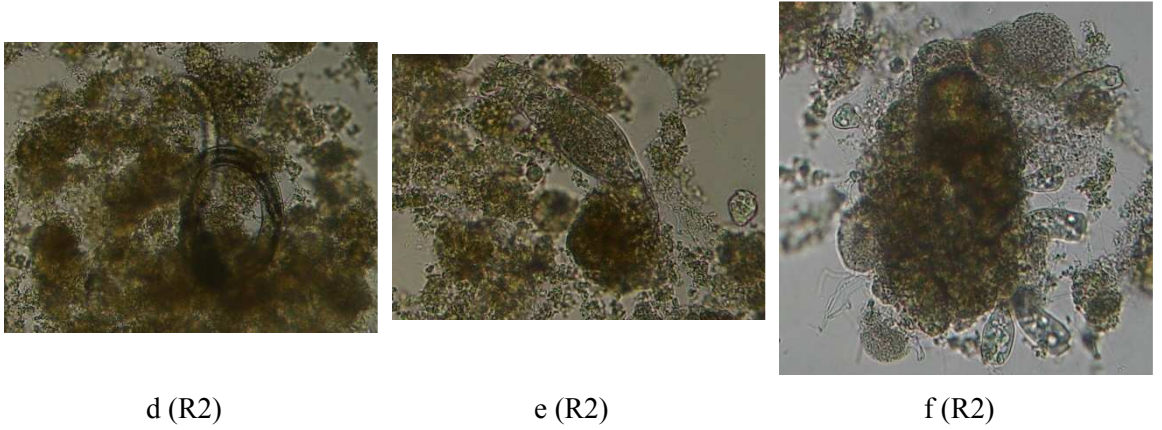
Çöktürme süresinin 2 dakikaya ayarlandığı 8. gün alınan görüntülerde floc morfolojisinde henüz bir değişim olmadığı gözlenmektedir (Şekil 4.5). 8. gün ayrıntılı incelemelerde (100x) R1'de çok hücreli canlılardan rotifere ve floklar etrafında çok sayıda sesil siliata rastlanmıştır (Şekil 4.6 (a), (b), (c)). R2'de ise çok hücreli canlılardan rotifer ve nematoda, R1'e kıyasla floklar etrafında daha az sayıda siliata rastlanmıştır (Şekil 4.6 (d), (e), (f)).



Şekil 4.5 Işık mikroskobu görüntüsü (8. gün, 40x)

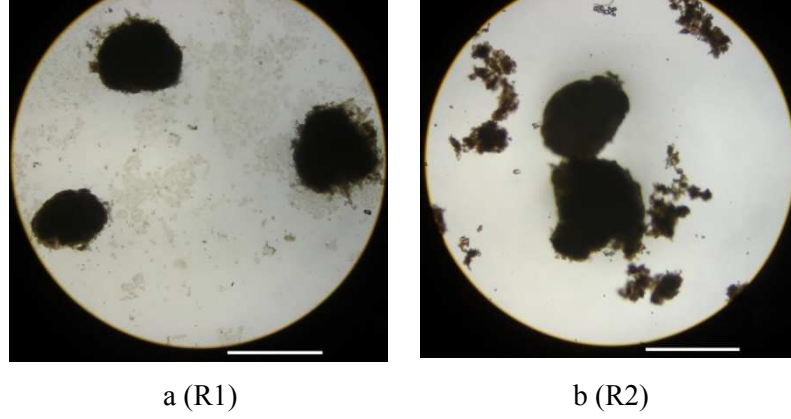


Şekil 4.6 Işık mikroskobu görüntüsü (8. gün, 100x)



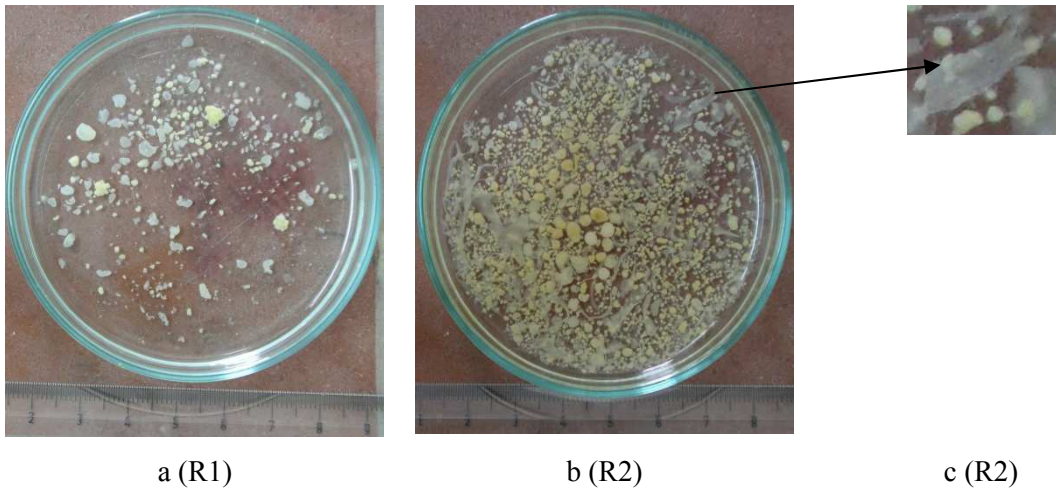
Şekil 4.6 (devamı) Işık mikroskobu görüntüsü (8. gün, 100x)

Çöktürme süresi 2 dakika olarak seçildikten sonra AKM konsantrasyonu her iki reaktörde de oldukça düşmüştür. 17. gün alınan görüntüler ($AKM_{R1}=127$ mg/L, $AKM_{R2}=335$ mg/L) her iki reaktörde de AKM konsantrasyonunun ani düşüşüyle yavaş çöken flokların sistemden yıkandığını kompakt flokların boyutlarının büyüdüğünü göstermektedir (Şekil 4.7). R1’de kompakt floklar etrafında gözlenen filamentli, parmak şeklinde dışarı uzanan yapıların R2’de gözlenmediğine dikkat edilmelidir.



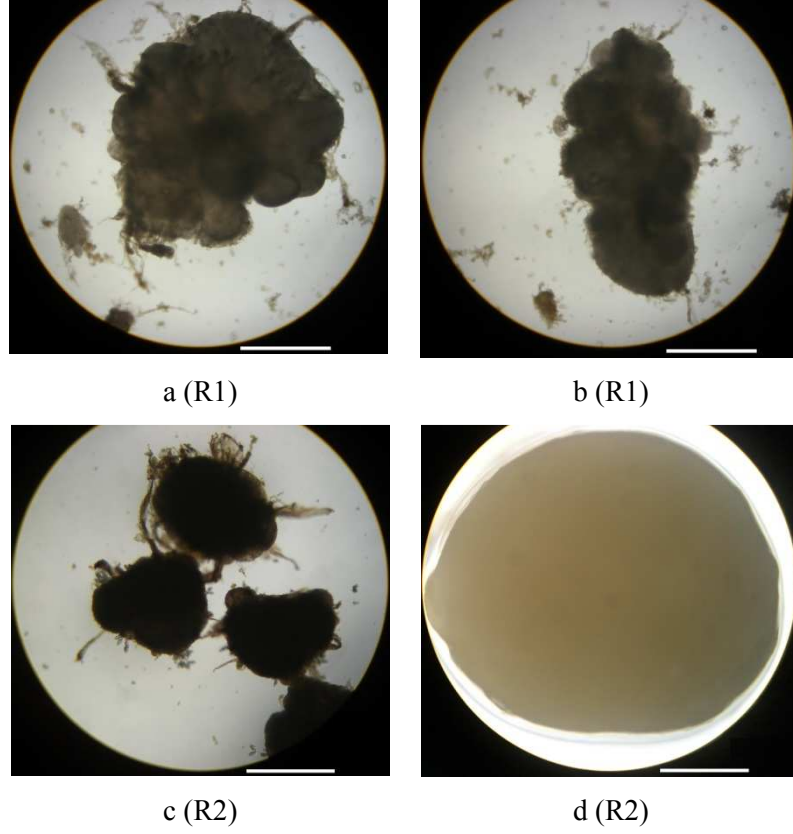
Şekil 4.7 Işık mikroskobu görüntüsü (17. gün, 40x)

20. gün alınan görüntülerde R1’de oluşan granüller beyaz-açık sarı renge sahipken R2’de oluşan granüller sarı renktedir (Şekil 4.8). R2’de AKM konsantrasyonu daha hızlı bir artış göstermektedir ($AKM_{R1}=95$ mg/L, $AKM_{R2}=540$ mg/L). R2’de granül oluşumuyla birlikte ipliksi düzensiz yapılar da oluşmuştur (Şekil 4.8 (c)). Elektron mikroskobuyla yapılan ayrıntılı incelemeler ve kimyasal analizler bu yapıların granül yapısıyla benzer olduğunu kanıtlamıştır.



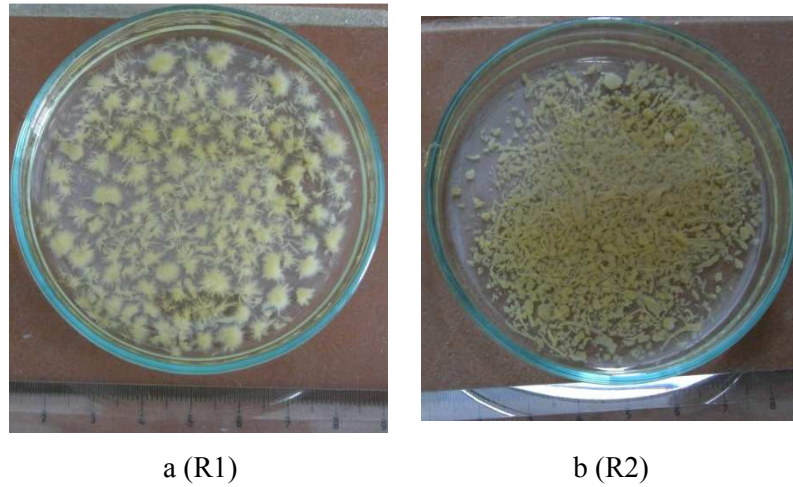
Şekil 4.8 Granüllerin genel görüntüsü (20.gün)

Şekil 4.9 22. gün R1 ve R2’den alınan ışık mikroskobu görüntüleridir. R1’de flok etrafında dışarı doğru uzanan ipliksi yapılar bulunurken R2’de oluşan granüllerin etrafı oldukça düzgündür. 22. gün R1’de granül oluşumu gözlenmesine rağmen AKM konsantrasyonu oldukça düşüktür ($AKM_{R1}=100$ mg/L, $AKM_{R2}=575$ mg/L).



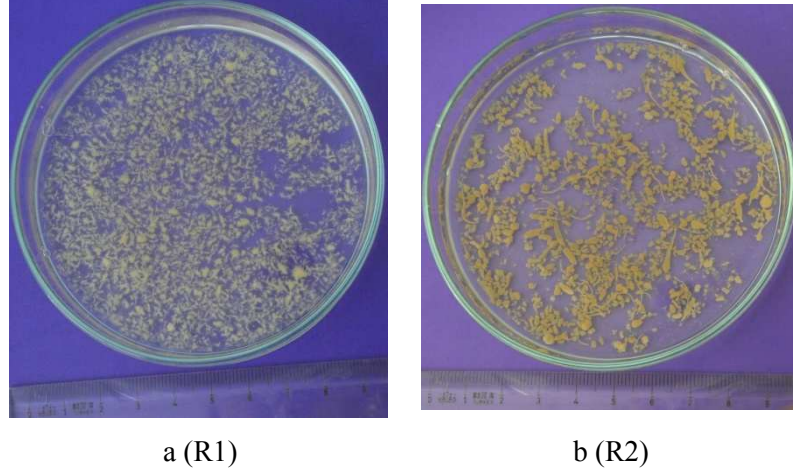
Şekil 4.9 Işık mikroskobu görüntüsü (22. gün, 40x)

48. gün alınan görüntüler (Şekil 4.10) R1’de oluşan granüllerin boyutlarının büyüdüğünü ancak granüllerin filamentli bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Her iki reaktörde partiküler KOİ’yi temsil eden nişasta içeren atıksu ile beslenmiştir ancak R2’de beklenen filamentli yapı gözlenmemiştir. 20. gün gözlenen ipliksi düzensiz yapılar oluşan granüllerin rengini kazanmış, kompaktlaşmıştır ve sayıca azalmıştır.



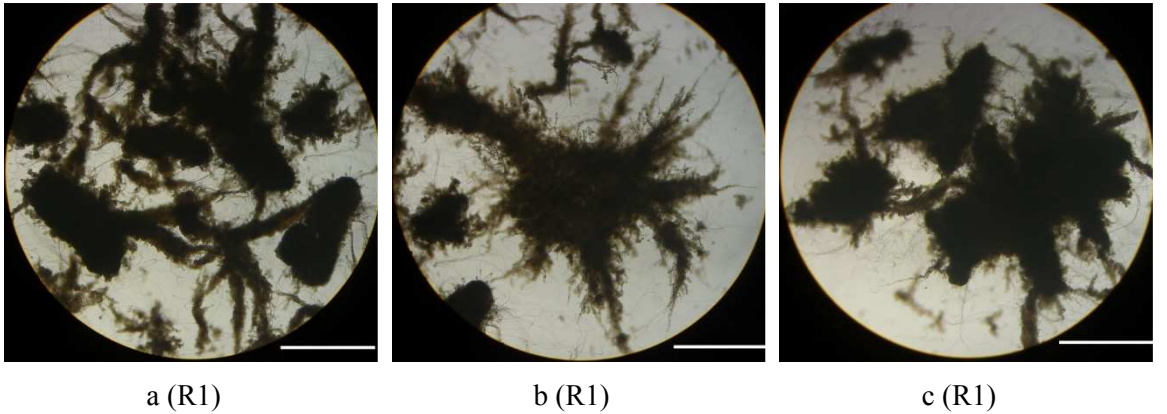
Şekil 4.10 Granüllerin genel görüntüsü (48. gün)

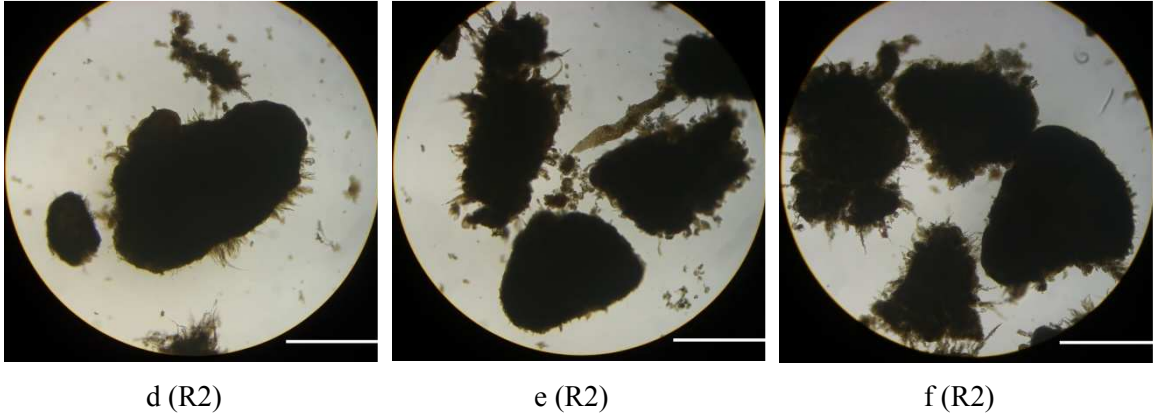
64. gün alınan görüntüler (Şekil 4.11) R1’de oluşan granüllerin stabil olmadığını ve parçalandığını göstermektedir. R2’de iplikçi düzensiz yapıların sayısı oldukça azalmıştır. Granül miktarının artışına paralel, iplikçi yapıların miktarındaki azalış bu yapıların granül yapısını kazandığını işaret etmektedir.



Şekil 4.11 Granüllerin genel görüntüsü (64. gün)

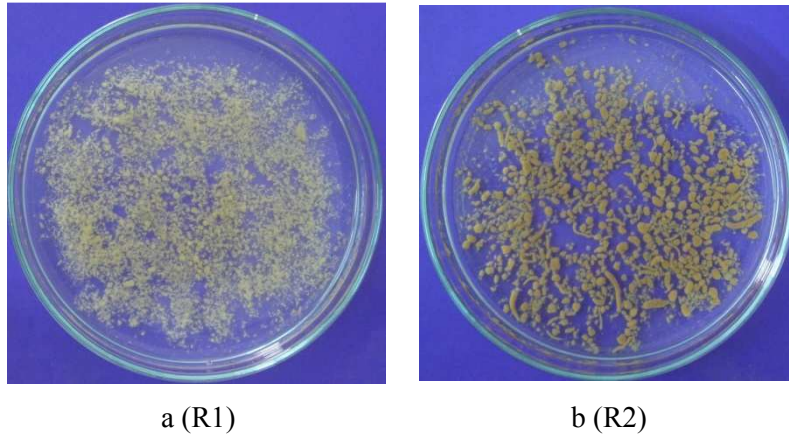
Şekil 4.12’de 80. gün ışık mikroskopuyla alınan görüntüler verilmiştir. R1’de filamentli yapılar oluşan granüller arasında uzanmakta ve granülleri birbirine bağlamaktadır. Granüller etrafındaki bu filamentli çoğalma çamurun çökeltme özelliğini olumsuz etkilememiştir. Bu bağlantının substrat alışverişine ve granüllerin hızlı çökmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. R2’de granüller etrafında gözlenen filamentli yapılar R1’e kıyasla oldukça kısadır.





Şekil 4.12 Işık mikroskobu görüntüsü (80. gün, 40x)

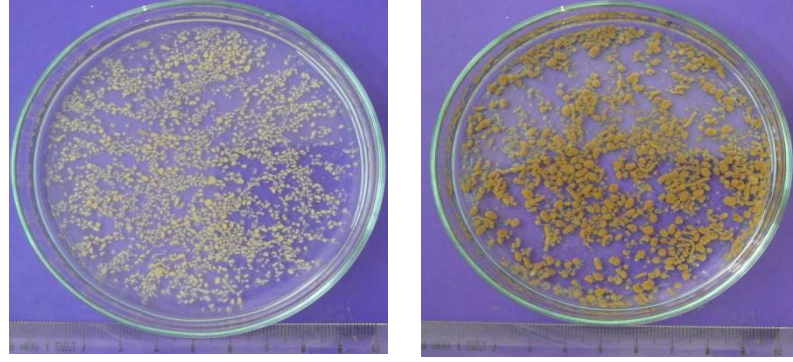
Şekil 4.13'te 85. gün alınan görüntüler verilmiştir. R1'de, bir önceki görüntüleme sonrası geçen süre zarfında AKM konsantrasyonu artmaya devam etmiştir ($AKM_{R1}=2225$ mg/L). Boyutta önemli bir artış ve granül morfolojisinde bir değişim gözlenmemiştir. Öte yandan R2'de granül boyutu artmış ipliksi yapıların miktarı önemli ölçüde azalmıştır. R1 ve R2'de oluşan granüllerin renklerindeki fark dikkat çekicidir. Bu renk farkı R2'de oluşan granüllerin Fe^{2+} içermesindedir. R2'de oluşan granüllerin Fe^{2+} akümüle ettiği kimyasal analizler ile de kanıtlanmıştır. Şekil 4.13'te daha önce oluşan filamentli yapıların granüle geçişi açıkça görülmektedir.



Şekil 4.13 Granüllerin genel görüntüsü (85. gün)

Şekil 4.14'de 99. gün alınan görüntüler verilmiştir. R1 granülleri düzgün, dairesel bir yapı kazanmıştır. Bu dönemde de AKM konsantrasyonundaki artış devam etmektedir ($AKM_{R1}=1460$ mg/L, $AKM_{R2}=3240$ mg/L). 48. gün R1'de çapı 5 mm'ye yakın granüller gözlenmiştir ancak bu yapılar parçalanmıştır. Öte yandan R2'de granül

boyutundaki artış R1'e kıyasla yavaş olsa da oluşan yapılar stabildir. Aynı gün alınan ışık mikroskobu görüntüleri R1 granüllerinin yüzeyindeki filamentli çoğalmayı göstermektedir. R2'de granül yüzeyinde filamentli çoğalmanın görülmemesi demirin filamentli çoğalmayı baskılaması ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 4.15). 99.gün R2'de rotifer patlaması görülmüştür (Şekil 4.15 (f)).



a (R1)

b (R2)

Şekil 4.14 Granüllerin genel görüntüsü (99. gün)



a (R1)

b (R1)

c (R1)

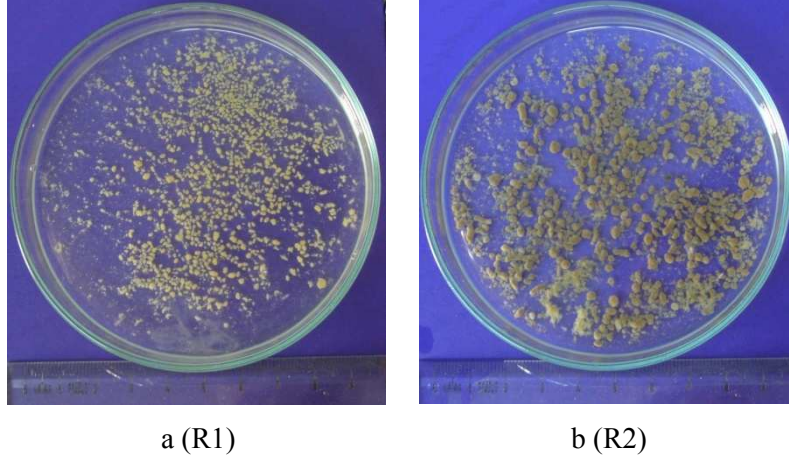
d (R2)

e (R2)

f (R2)

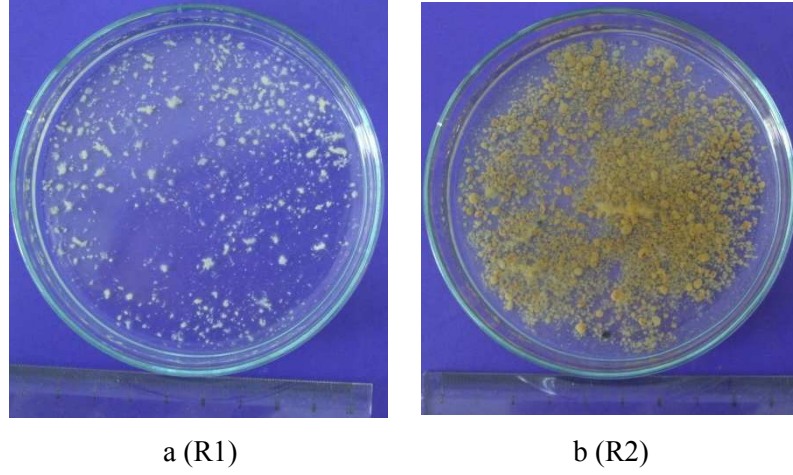
Şekil 4.15 Işık mikroskobu görüntüsü (99. gün, a, b, c, d, e 40x, f 100x)

111. gün R1 granülleri 99. güne kıyasla daha dairesel ve düzgün bir yüzey kazanmıştır. R2’de 111. gün ipliksi yapılar gözlenmemiştir. R1’de AKM konsantrasyonunda artış gözlenmemesine rağmen ($AKM_{R1}=1380$) R2’de AKM 4215 mg/L’ye ulaşmış, ipliksi yapılar tamamen kaybolarak yassı granül görünümünü almıştır (Şekil 4.16).

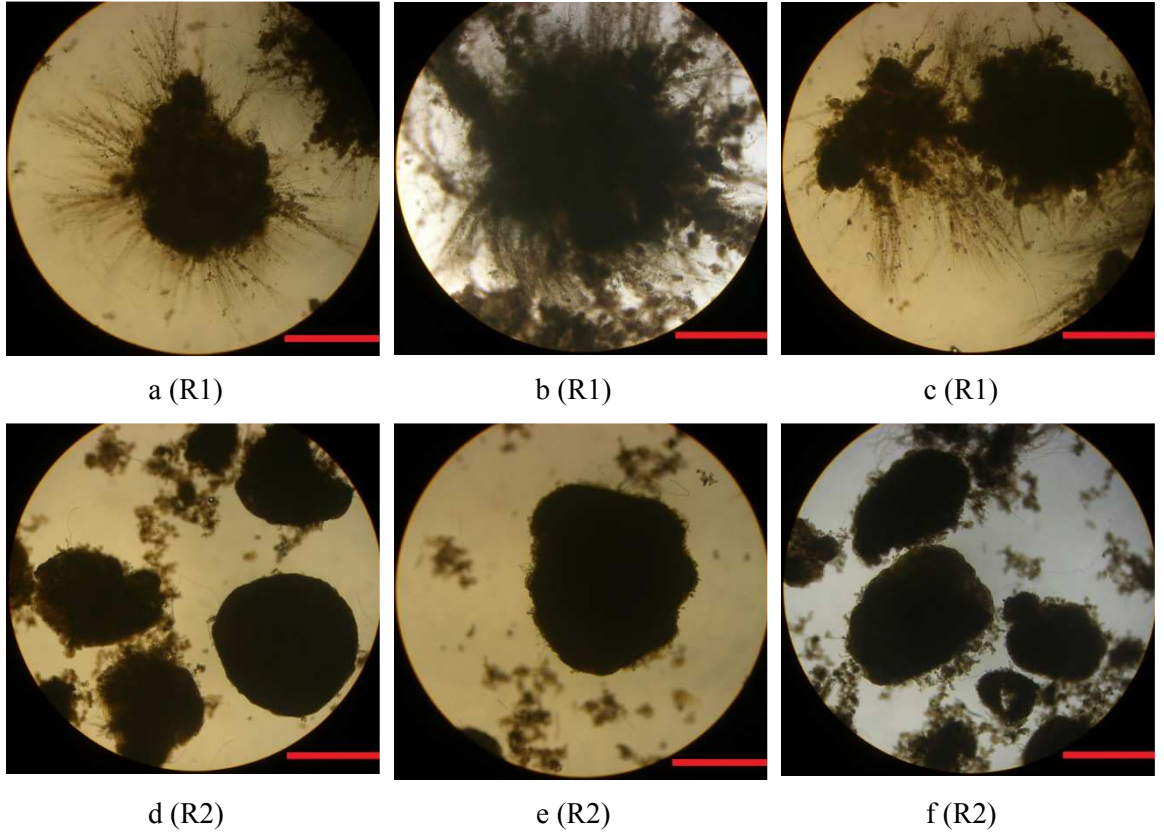


Şekil 4.16 Granüllerin genel görüntüsü (111. gün)

148. gün alınan görüntüler her iki de de granül yapısının bozulduğunu göstermektedir (Şekil 4.17). 148. gün R1’de ölçülen AKM konsantrasyonu oldukça düşüktür (360 mg/L). R1’de granül yüzeyindeki uzun, bir granülden diğerine uzanan filamentli yapılar hala mevcuttur (Şekil 4.18 (a, b, c)). Işık mikroskobu görüntüleri R2’de granül yapısının bozulmasıyla kompakt olmayan yapıların sistemde bulunduğunu göstermektedir (Şekil 4.18 (d, e, f)). Ancak bu dönemde gerçekleşen bozulma R2’de çamurun çökeltme özelliğini bozmamıştır. $\text{CHI}_5/\text{CHI}_{30}$ oranı 1’dir. Öte yandan R1’de bu oran 1 olmasına rağmen CHI 138 mL/g ölçülmüştür.



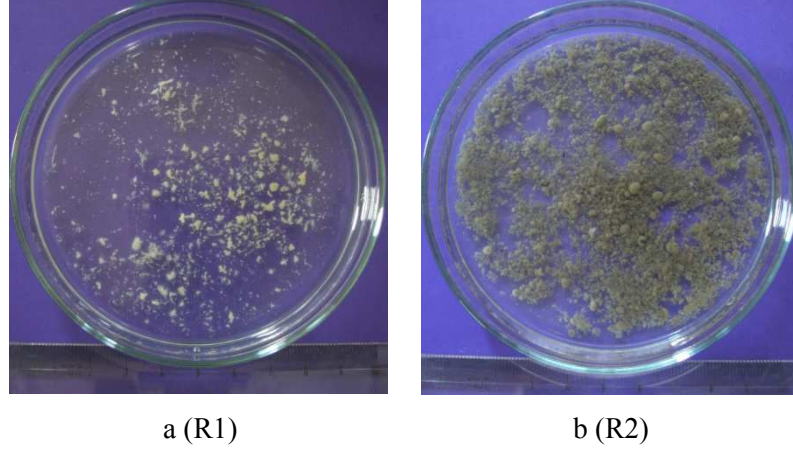
Şekil 4.17 Granüllerin genel görüntüsü (148. gün)



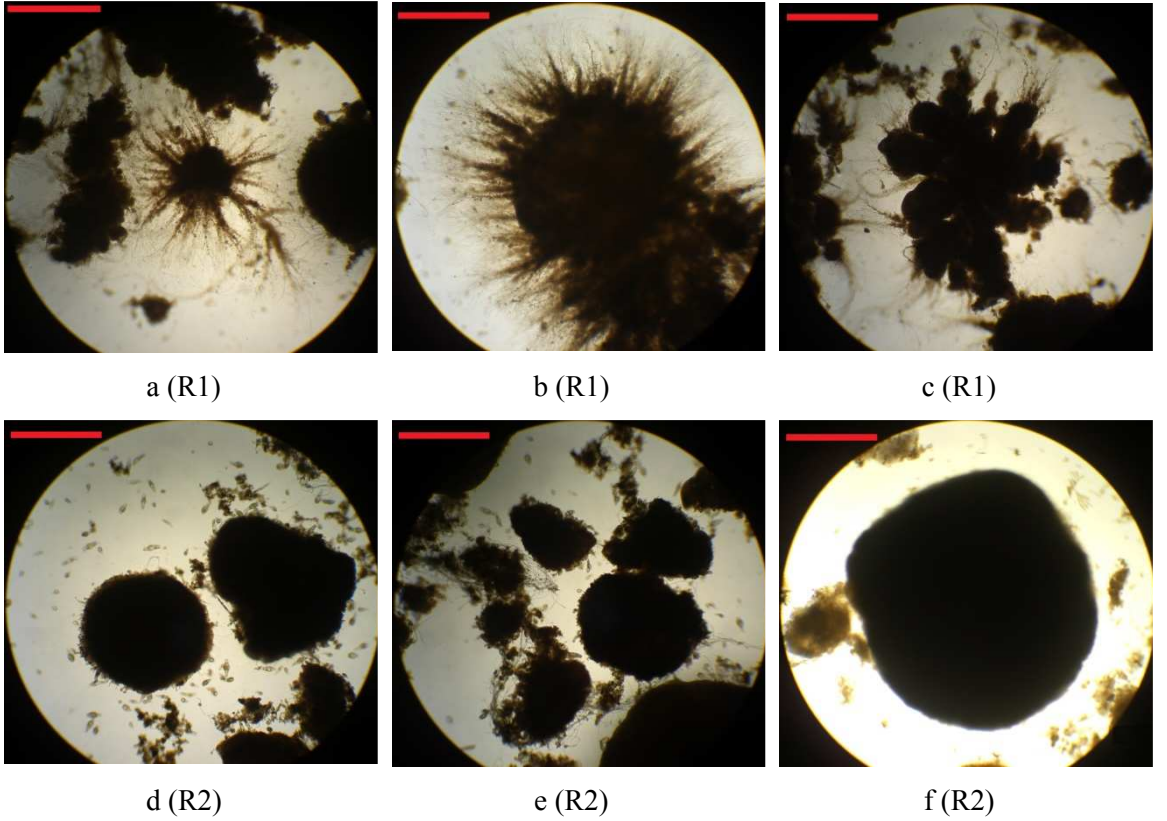
Şekil 4.18 Işık mikroskobu görüntüsü (148. gün, 40x)

158. gün her iki reaktörden de alınan görüntüler granül yapısında düzelmenin olmadığını granül çapının küçüldüğünü, düzensiz yapıda flokların sayısının arttığını göstermektedir (Şekil 4.19, Şekil 4.20). Bu bozulma döneminde her iki reaktörde de

AKM konsantrasyonunda düşüş kaydedilmiştir. 157. gün R1 ve R2’de ölçülen AKM konsantrasyonları sırasıyla 265 ve 2490 mg/L’dir.

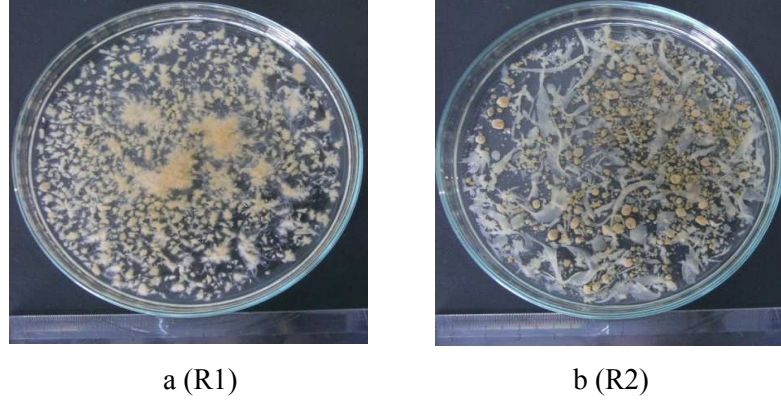


Şekil 4.19 Granüllerin genel görüntüsü (158. gün)

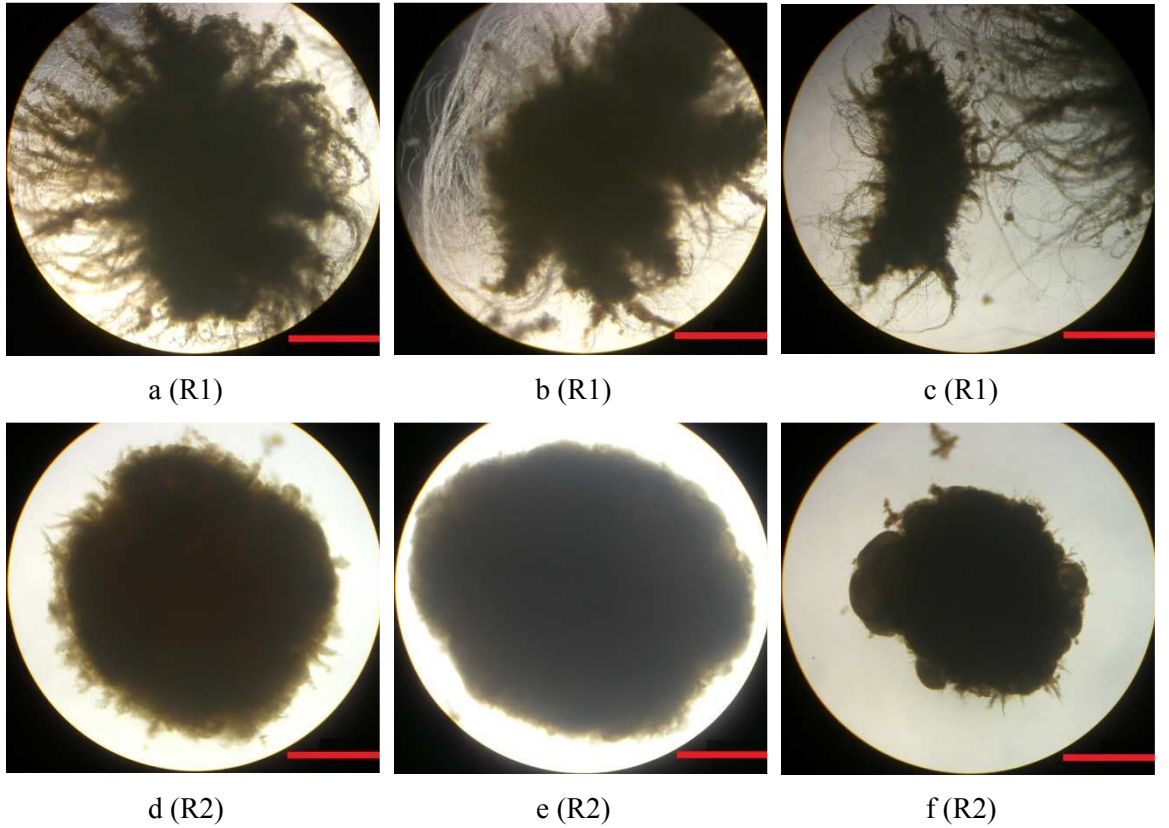


Şekil 4.20 Işık mikroskobu görüntüsü (158. gün, 40x)

R2'de granül yapısının bozulmasının akabinde işletmeye alma döneminde gözlenen ancak granül oluşumuyla daha sonra gözlenmeyen iplikçi yapılar tekrar oluşmuştur (192.gün) (Şekil 4.21 (b)). Şekil 4.22'da bu döneme ait ışık mikroskobu görüntüleri verilmiştir.

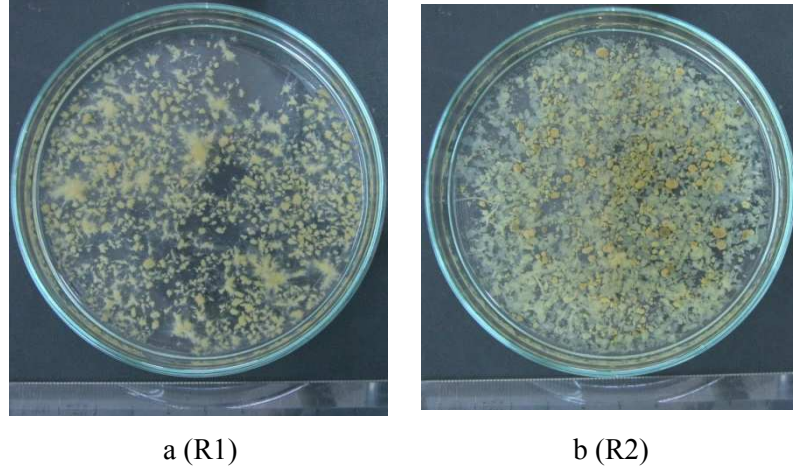


Şekil 4.21 Granüllerin genel görüntüsü (192. gün)

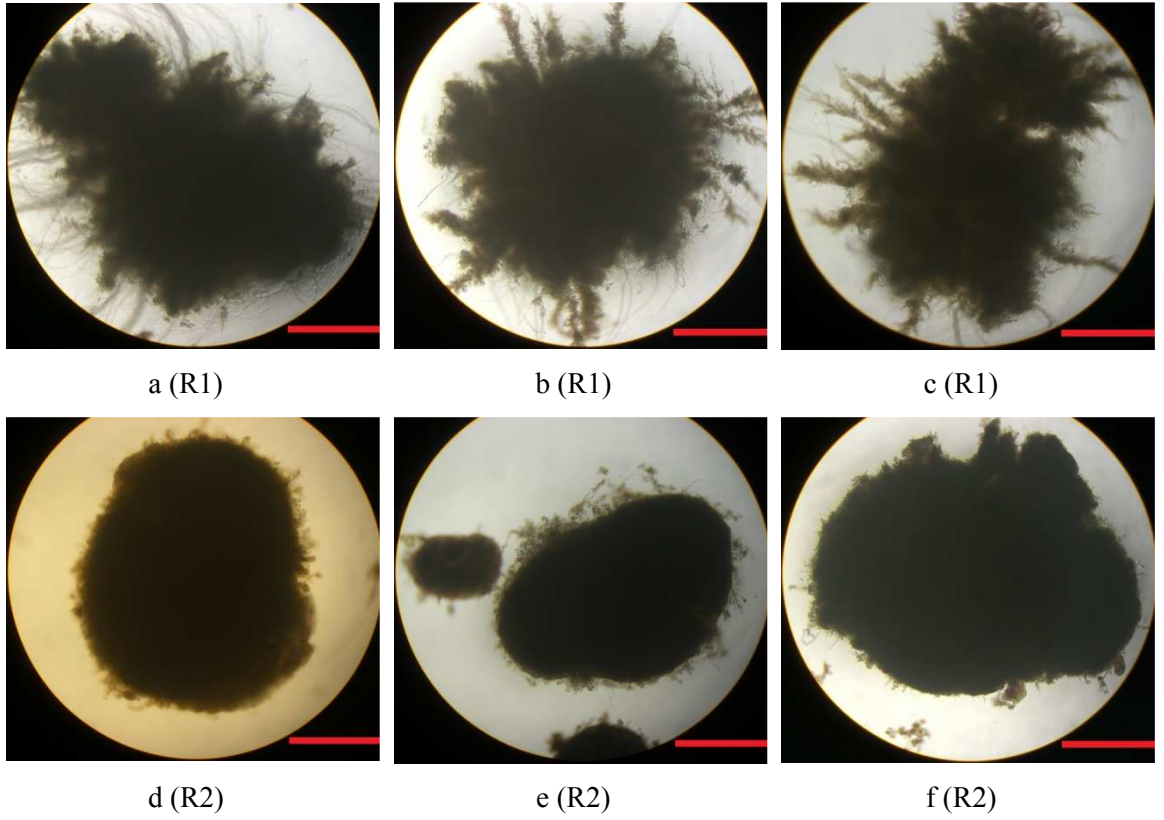


Şekil 4.22 Işık mikroskobu görüntüsü (192. gün, 40x)

Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'te 203. güne ait granüllerin genel görüntüleri ve ışık mikroskobu görüntüleri verilmiştir.



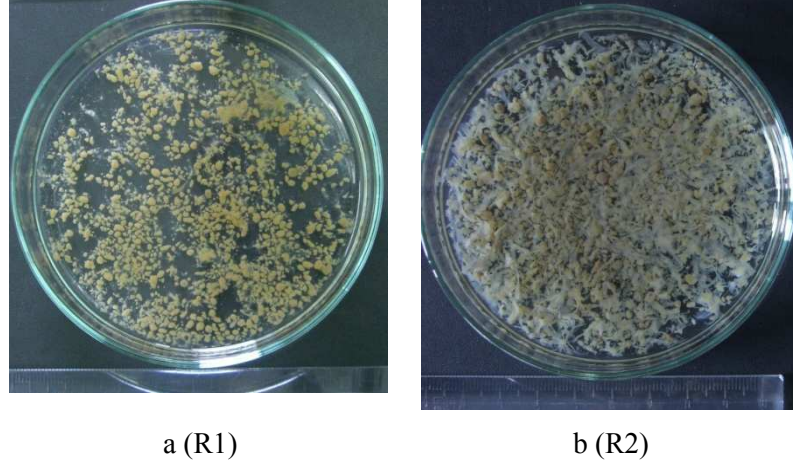
Şekil 4.23 Granüllerin genel görüntüsü (203. gün)



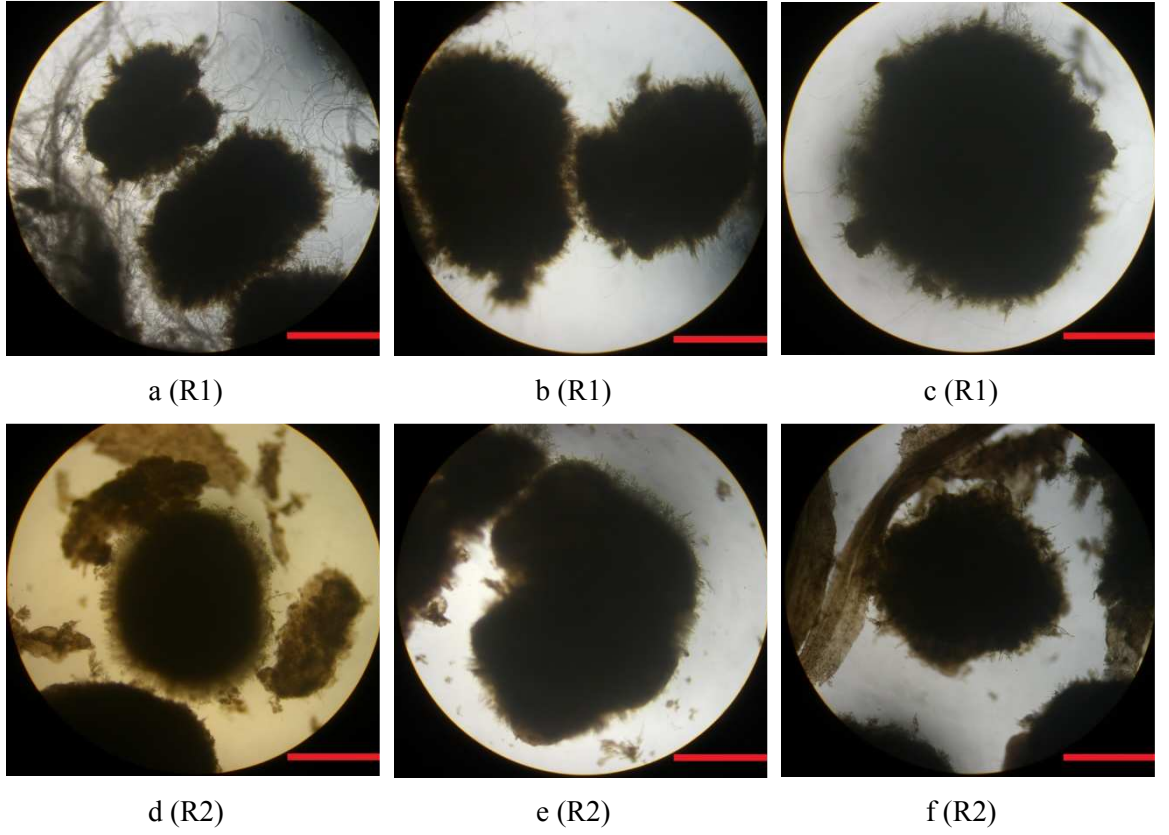
Şekil 4.24 Işık mikroskobu görüntüsü (203. gün, 40x)

İşletmenin 195. gününde R1 Fe^{2+} konsantrasyonu 1 mg/L olan atıksu ile beslenmeye başlamıştır. Atıksuya Fe^{2+} ilavesinden 3 hafta sonra 217. gün alınan görüntüler atıksu kompozisyonundaki bu değişimin R1 granüllerinin dairesel, kompakt bir yapı

kazanmasını sağladığını göstermektedir (Şekil 4.25). Ancak ışık mikroskobu görüntüleri granül yüzeyindeki filamentli çoğalmanın devam ettiğini göstermektedir (Şekil 4.26).

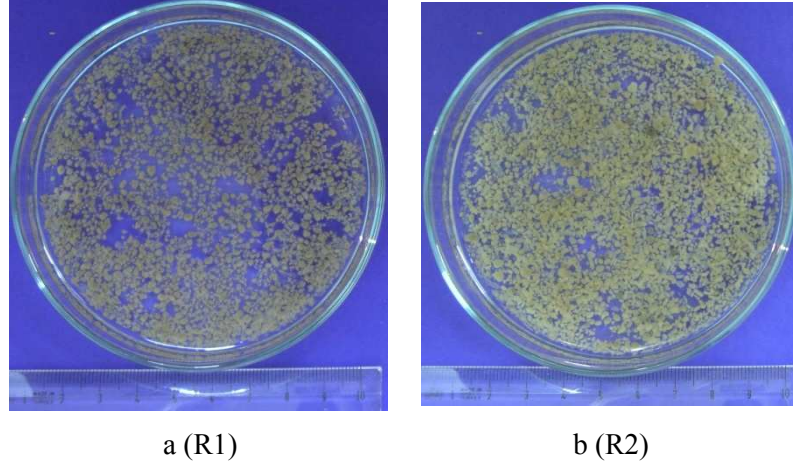


Şekil 4.25 Granüllerin genel görüntüsü (217. gün)

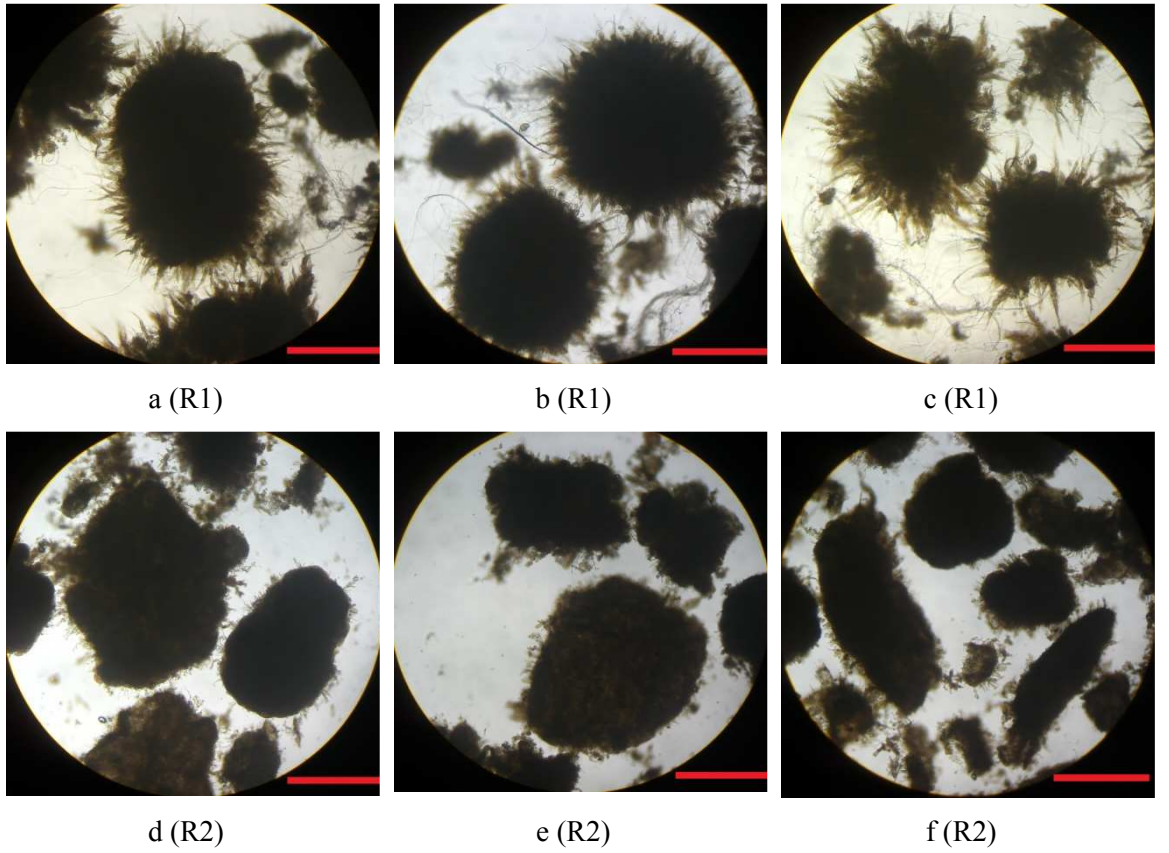


Şekil 4.26 Işık mikroskobu görüntüsü (217. gün, 40x)

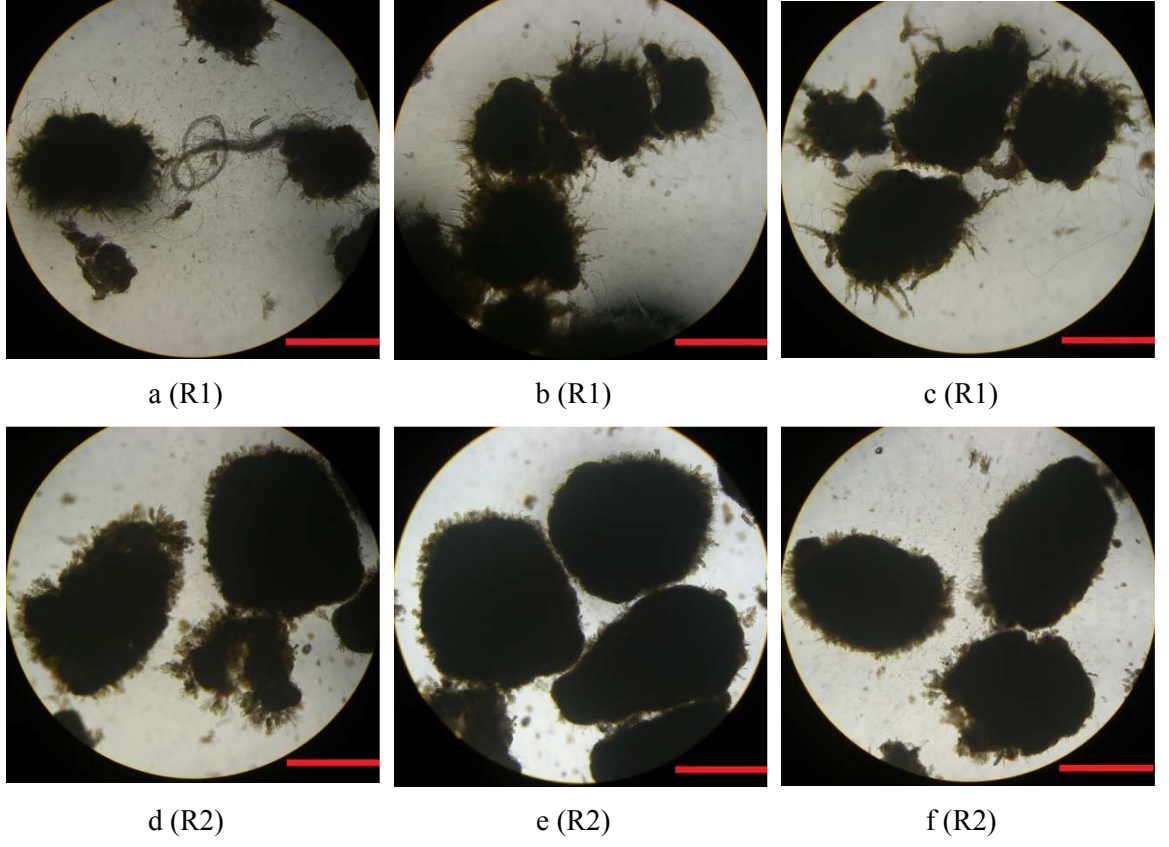
Şekil 4.27 ve Şekil 4.30 sırasıyla 233. ve 267. gün alınan genel görüntüler verilmiştir. Şekil 4.28, Şekil 4.29 ve Şekil 4.31'de sırasıyla 233., 248. ve 267. gün alınan ışık mikroskobu görüntüleri verilmiştir.



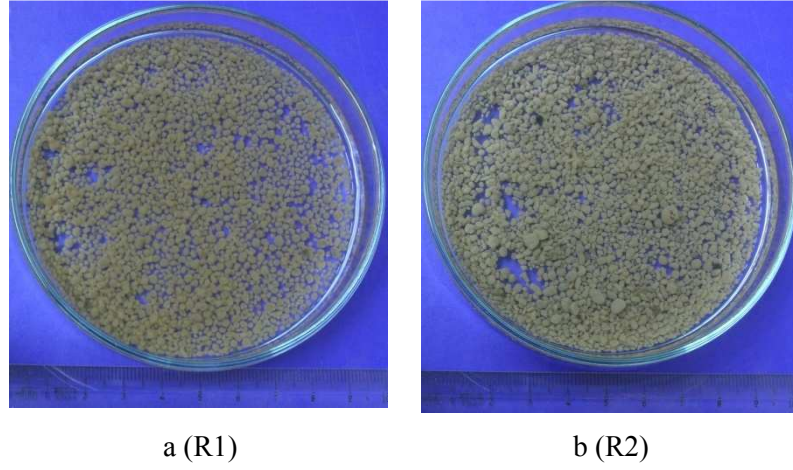
Şekil 4.27 Granüllerin genel görüntüsü (233. gün)



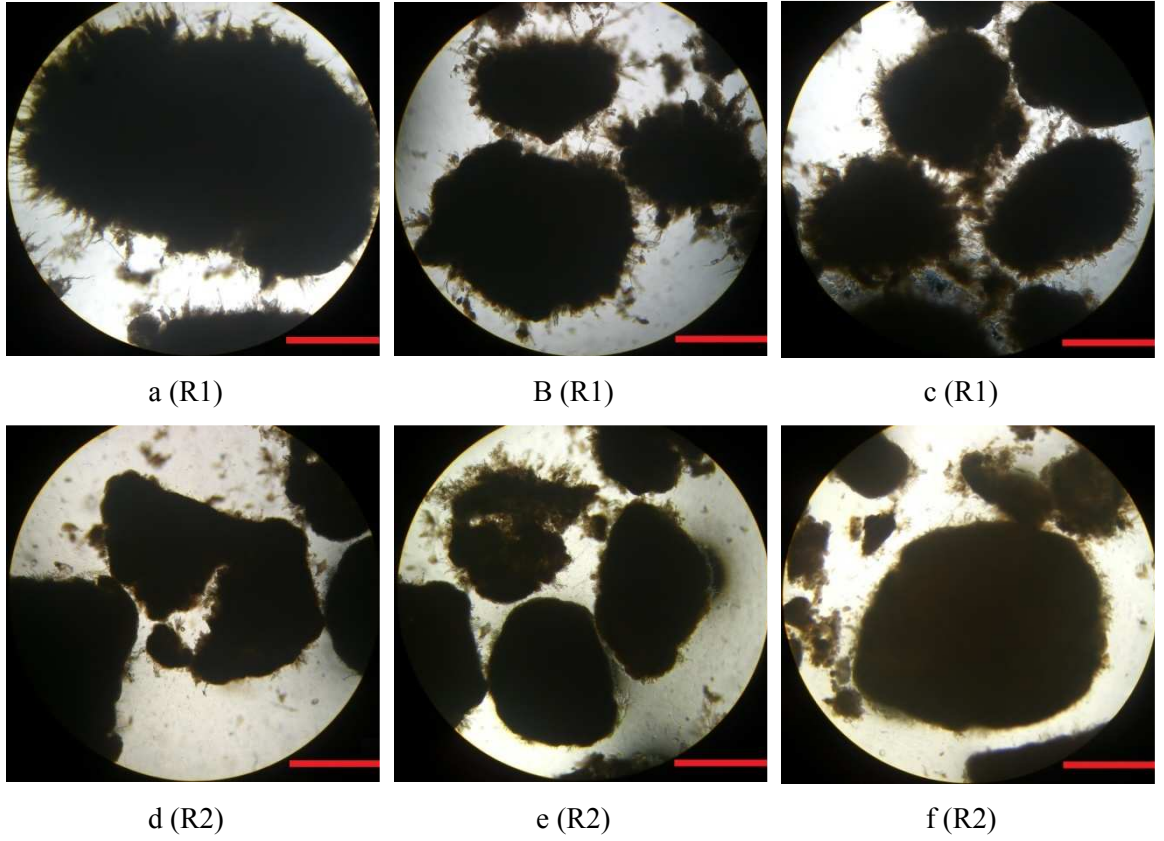
Şekil 4.28 Işık mikroskobu görüntüsü (233. gün, 40x)



Şekil 4.29 Işık mikroskobu görüntüsü (248. gün, 40x)



Şekil 4.30 Granüllerin genel görüntüsü (267. gün)



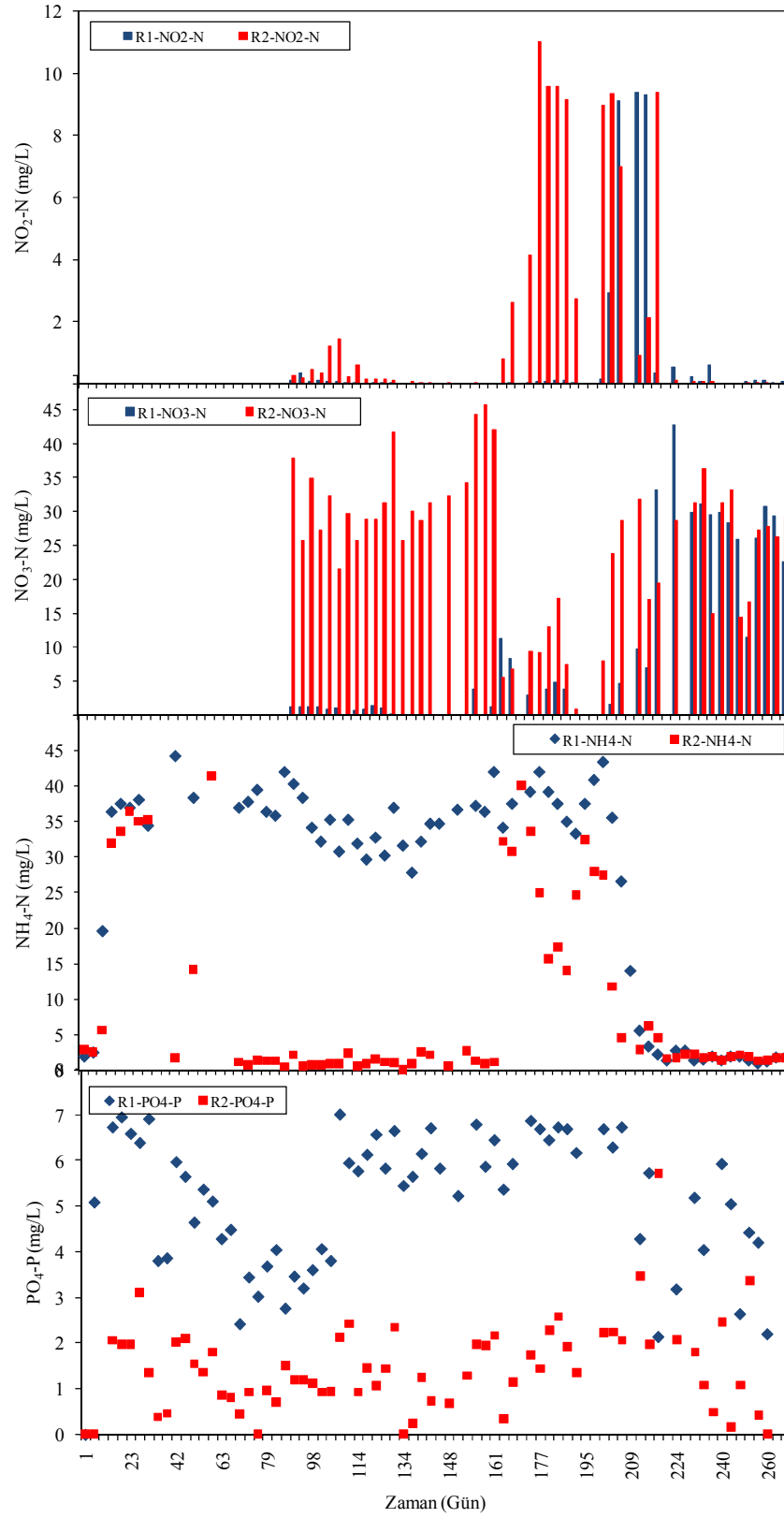
Şekil 4.31 Işık mikroskobu görüntüsü (267. gün, 40x)

Fe^{2+} ilave edilmeyen reaktör, R1 ve Fe^{2+} ilave edilen reaktör, R2’de oluşan granüller granül yapısı ve stabilite (granül boyutu, $\text{CHI}_5/\text{CHI}_{30}$, mikroskobik gözlemler) açısından karşılaştırıldığında; R1’deki granüllerin gevşek görümlü, filamentli bir yapıya sahip olduğu ve oluşan granüllerin oldukça büyümesine rağmen belirli bir boyuta geldikten sonra parçalandığı, ve bu nedenle R1’de stabil granül elde edilemediği görülmüştür. R1’e $1 \text{ mgFe}^{2+}/\text{L Fe}^{2+}$ ilave edildikten sonra, granül dış yüzeyi düzelmiş ve sabilesi artmış, ve mikroskobik gözlemlerde daha kısa filamentli bakteriler gözlenmiştir. Bununla beraber, R2’de kompakt, düzgün dış yüzeye sahip stabil granül çamur elde edilmiştir. Burada, 10 mg/L Fe^{2+} ilavesinin filamentli bakteri oluşumunu baskıladığı (Oikonomidis vd., 2010) ya da granül çamur oluşumu aşamasında granül yapı içine tam entegre olduğu söylenebilir.

4.1.3. Nutrient Gideriminin İncelenmesi

R1 ve R2’de çalışma boyunca reaktör çıkışında ölçülen $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ ve $\text{PO}_4\text{-P}$ konsantrasyonları Şekil 4.32’de verilmiştir.

Fe^{2+} eklenmeyen ve eklenen reaktörlerde $\text{NH}_4\text{-N}$ ve $\text{PO}_4\text{-P}$ gideriminde farklılıklar bulunmaktadır. Fe^{2+} eklenmeyen reaktör R1’de nitrifikasyon gözlenmemiştir. Fe^{2+} eklenmeyen dönemde (0-195. günler) çıkış $\text{NH}_4\text{-N}$ konsantrasyonu $36,3\pm 3,6$ mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ olarak ölçülmüştür. Çıkış suyunda $\text{NO}_2\text{-N}$ ve $\text{NO}_3\text{-N}$ ’a rastlanmaması da azotun sadece biyolojik çoğalma için kullanıldığını, nitrifikasyon prosesinin gerçekleşmediğini göstermektedir. R1’de 0-195. günler çıkış $\text{PO}_4\text{-P}$ konsantrasyonu $5,4\pm 1,3$ mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ olarak ölçülmüştür. R1 reaktöründe fosfor gideriminin de biyolojik çoğalma için kullanılan kadar olduğu söylenebilir. Fe^{2+} ’in besleme atıksuyuna eklenmeye başladığı 195. günden yaklaşık bir hafta sonra çıkış $\text{NH}_4\text{-N}$ konsantrasyonu hızla azalmaya başlamış ve ikinci hafta $1,5\text{-}2$ mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ seviyelerine ulaşmış ve çalışmanın sonuna kadar 1 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ ’nin altında kalmıştır. Nitfirikasyonun kazanılması ile bir dönem $\text{NO}_2\text{-N}$ birikmesi gözlenmiş, bir süre sonra tam nitrifikasyonla $\text{NO}_3\text{-N}$ konsantrasyonu artmıştır. 1 mg Fe^{2+}/L Fe^{2+} ilavesinden sonra fosforun kimyasal olarak bir miktar çökmesine bağlı olarak $4,1\pm 1,3$ mg $\text{PO}_4\text{-P /L}$ ölçülmüştür.



Şekil 4.32 R1 ve R2’de reaktör çıkışında ölçülen NH₄-N, NO₃-N, NO₂-N ve PO₄-P konsantrasyonları

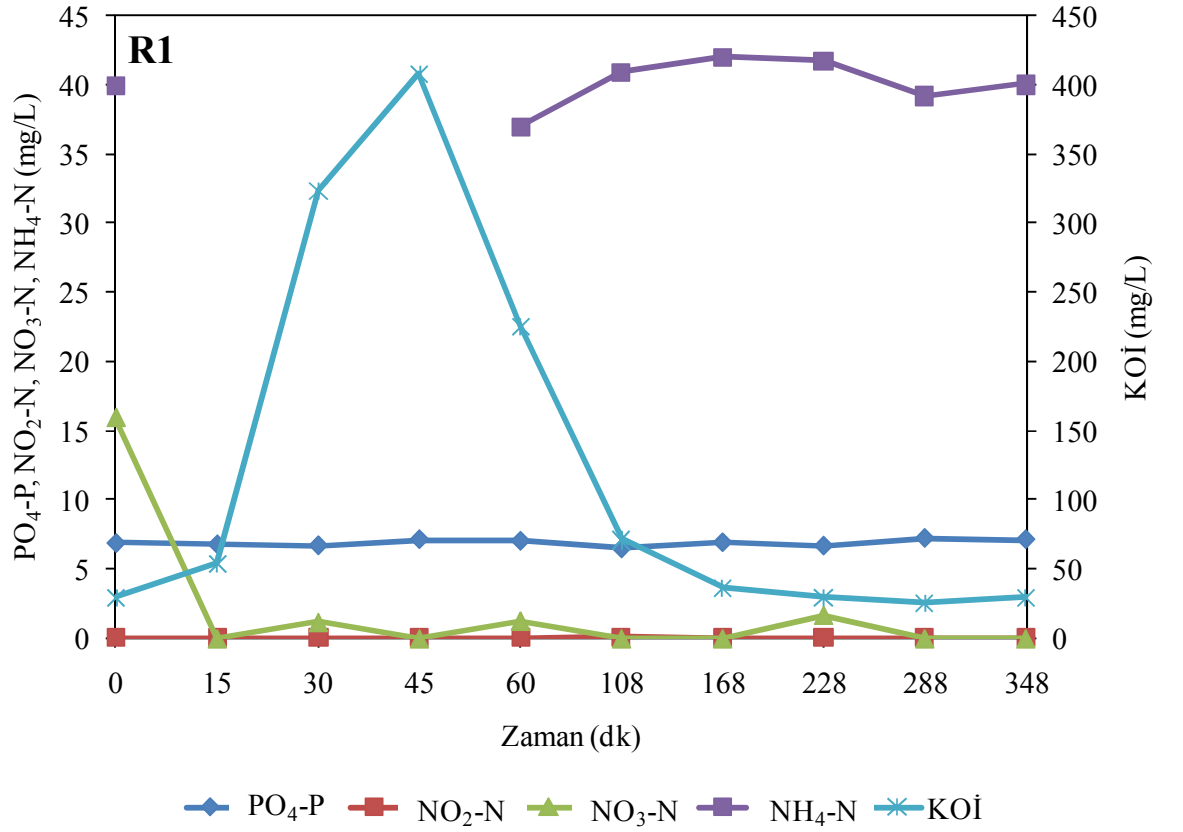
Fe^{2+} eklenen reaktör, R2’de çalışmanın ilk 42 gününde NH_4-N giderimi sadece biyolojik çoğalma kadar gerçekleşmiştir. 42. gün NH_4-N konsantrasyonu 1,7 mg NH_4-N/L değerine düşmüş ancak bunu izleyen günlerde tekrar yükselerek 58. günde 41,5 mg/L NH_4-N ölçülmüştür. 70. günde çıkış NH_4-N konsantrasyonu tekrar 1 mg/L NH_4-N değerine düşmüş ve 160. güne kadar $1,15 \pm 0,69$ mg NH_4-N/L ölçülmüştür. Reaktörlerde yüksek kesme kuvveti uygulandığından çözünmüş oksijen konsantrasyonu doyumluk değerine yakındır ve bu nedenle 90-160. günler arasında tam nitrifikasyon gerçekleşmiştir. Giderilen NH_4-N ’in tamamı NO_3-N ’e oksitlenmiştir. Çıkış PO_4-P konsantrasyonu granül stabilitesinin arttığı dönemde biraz daha düşük olmakla beraber, çalışma boyunca $1,44 \pm 0,76$ mg PO_4-P/L olarak ölçülmüştür.

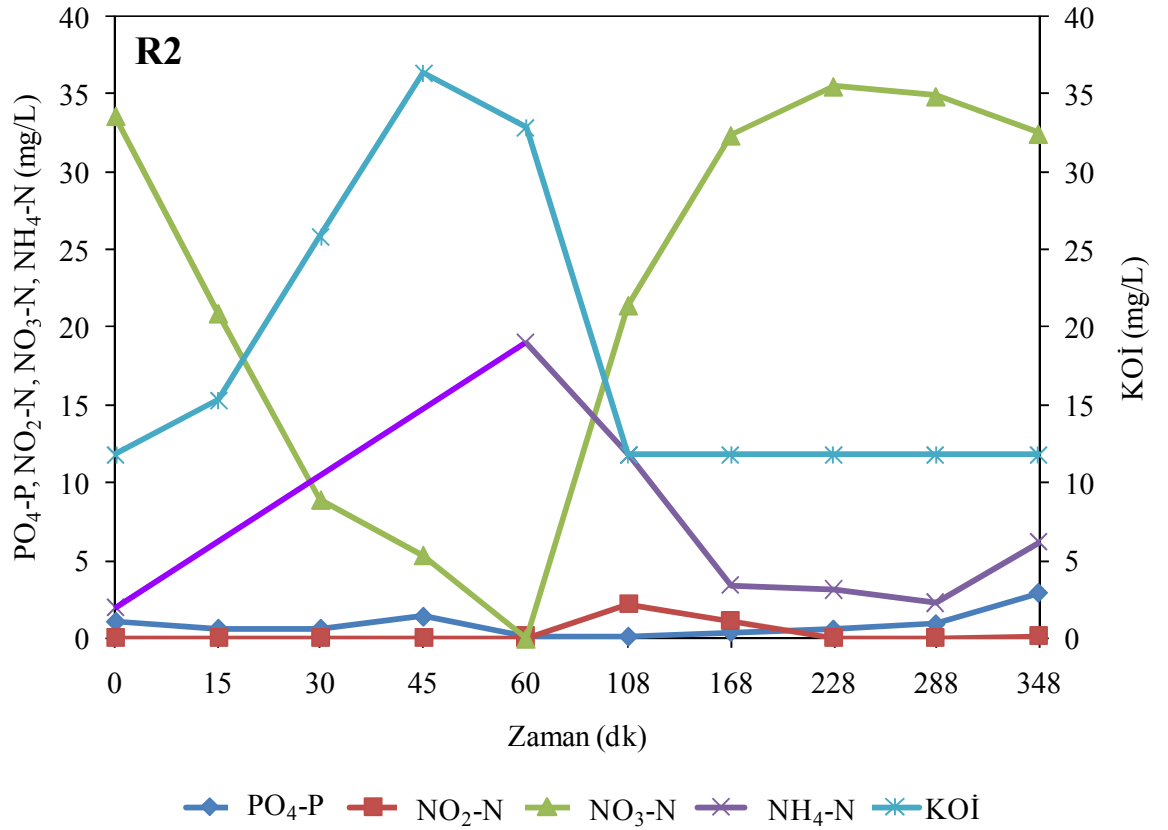
111-211. günler arasında, Fe^{2+} ilavesi ayrı bir hat ile doğrudan reaktör içine, anoksik besleme süresince yapılmıştır. Bir döngü boyunca pH 6,5-8,3 arasında değişirken, Fe^{2+} ilavesinin reaktör içine yapılması ile pH değeri aerobik periyot sonunda zaman içinde kademeli olarak azalarak 161.günde 5,8 değerine düşmüştür. Bu tarihe kadar reaktör pH’sı izlenmiş fakat kontrol edilmemiştir. Aerobik granüllerin bozulması ile birlikte nitrifikasyon kabiliyetinde de ani bir bozulma meydana gelmiştir. Reaktör içinde pH kontrolü 161-191. günler arasında yapılmış, bu dönem içerisinde granül boyutu büyüyüp AKM konsantrasyonu artmaya başlamasına rağmen nitrifikasyon kapasitesi tamamen geri kazanılamamıştır. 205.günde çıkış NH_4-N konsantrasyonu 5 mg/L civarına düşmüştür. 211. günde Fe^{2+} ilavesi tekrar besleme tankına alınmış ve bu tarihten sonra sistemde daha önce elde edilen çıkış NH_4-N konsantrasyonu 1 mg/L civarına düşmüş ve çalışmanın sonuna kadar böyle devam etmiştir.

Şekil 4.33’te R1 ve R2’de tipik bir döngü çalışması verilmektedir. Her iki reaktörde de statik besleme yapıldığından, anoksik-anaerobik besleme süresince ölçülen değerler sistemin tamamını yansıtmamaktadır.

Döngü çalışmasına göre, R1’de KOI ’nin anaerobik besleme sonunda kalan yaklaşık 200 mg/L KOI ’nin aerobik periyotta oksitlendiği görülmektedir. Reaktörde organik madde giderimi dışında azot ve fosfor gideriminin olmadığı görülmektedir.

R2'de organik madde, anoksik-anaerobik besleme periyodunda denitrifikasyon ve adsorpsiyonla giderilmekte; aerobik periyoda harici KOİ kalmamaktadır. Nitrifikasyonla $\text{NH}_4\text{-N}$ ilk iki saatte giderilirken, $\text{NO}_3\text{-N}$ oluşmaktadır. Fosfor biyolojik çoğalma dışında muhtemelen FeSO_4 ile çökeltme sonucu giderilmektedir.



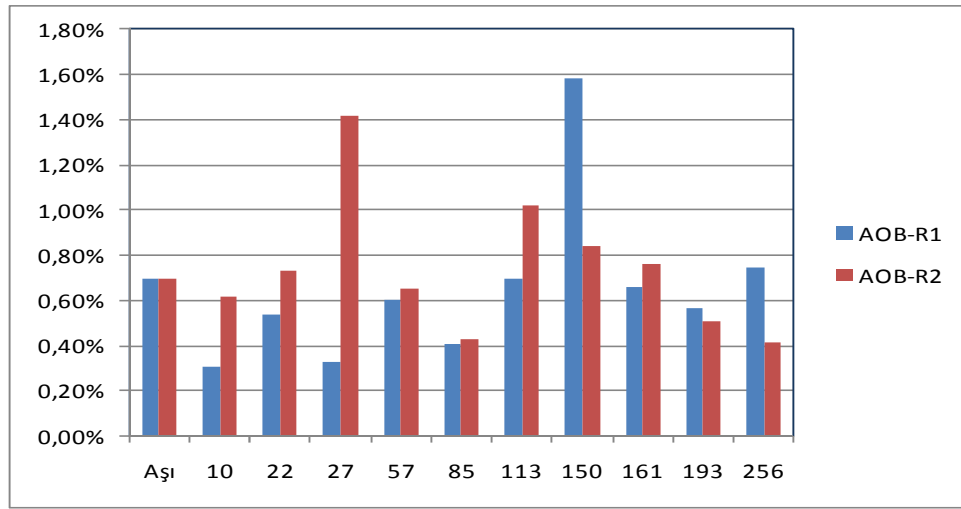


Şekil 4.33 R1 ve R2’de tipik bir döngü çalışması

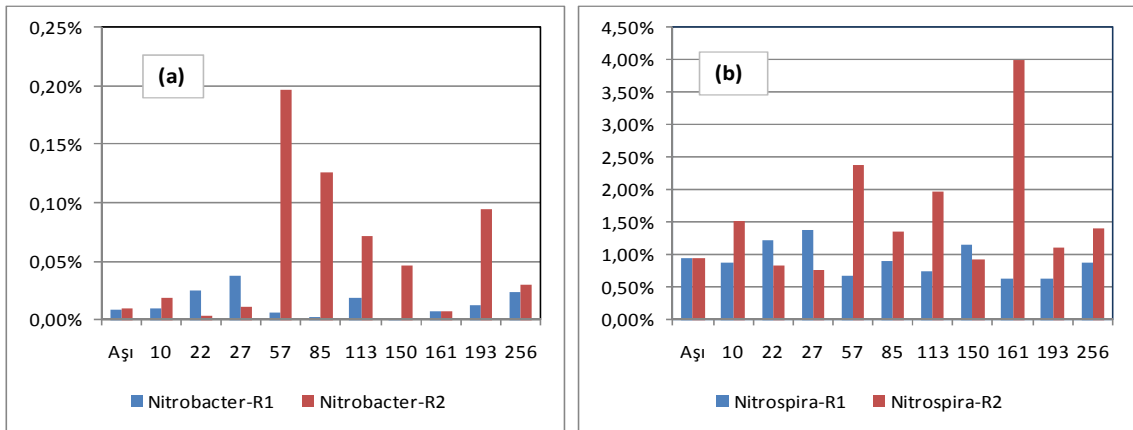
Bu çalışma, Fe^{2+} ilavesinin nitrifikasyon için önemini açıkça göstermiştir. Fe^{2+} ilave edilmeyen reaktörde, R1’de hiçbir koşulda nitrifikasyon gerçekleşmemesine rağmen; Fe^{2+} ’nin 1 mg Fe^{2+} /L konsantrasyonda eklenmeye başlandığı tarihten sonra nitrifikasyonun başlaması, Fe^{2+} olmadan nitrifikasyon bakterilerinin aktif hale geçmediğini göstermiştir. Fe^{2+} hücre içindeki redoks reaksiyonlarına katılan önemli bir molekül olduğundan yaşamsal bir elementtir (Freitas ve Meneghini, 2001). Meiklejohn (1953), çok düşük miktarda Fe^{2+} ’in amonyum ve nitrit oksidasyonunu hızlandırdığını rapor etmiştir. Buna göre, Fe^{2+} ’in minimum konsantrasyonu *Nitrosomonas europaea* için 0,1 mg Fe^{2+} /L ve *Nitrobacter winogradsky* için 0,3 mg Fe^{2+} /L olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda, R1’de sentetik atıksuyun Fe^{2+} içeriği çok daha düşük (<0,02mg/L) olduğundan, amonyum ve nitrit oksidasyonu inhibe olmuş olabilir. Meiklejohn (1953), her iki tür için optimum Fe^{2+} miktarını 6 mg Fe^{2+} /L bulmuştur. Çalışmamızda, 10 mg Fe^{2+} /L Fe^{2+} ilave edilen reaktör, R2’de 70. günden itibaren tam nitrifikasyon gerçekleşmiştir. 70. günden sonra nitrifikasyonun gerçekleşmesi, Fe^{2+} açısından limitasyon olmamasına

rağmen; -karbon ve azot giderimini birlikte yapan sistemlerde nitrifikasyon bakterilerinin toplam bakteriye oranının düşük olması nedeniyle-, reaktör AKM'sinin artışına bağlı olarak nitrifikasyon bakterilerinin miktarının artarak tam nitrifikasyon gerçekleştirebilir hale gelmesinden kaynaklandığı söylenebilir.

R1 ve R2'den çalışma boyunca alınan numunelerde amonyak oksitleyen bakteriler (AOB), nitrit oksitleyen türler (*Nitrobacter* ve *Nitrospira*) ve fosfor depolayan türler (*Accumulibacter* ve *Actinobacter*) real-time PCR yöntemi ile ölçülmüştür. Amonyak oksitleyen bakterilerin değişimi Şekil 4.34'de, nitrit oksitleyen türlerin değişimi Şekil 4.35 a ve b'de ve fosfor depolayan türlerin değişimi Şekil 4.36 a ve b'de verilmiştir.

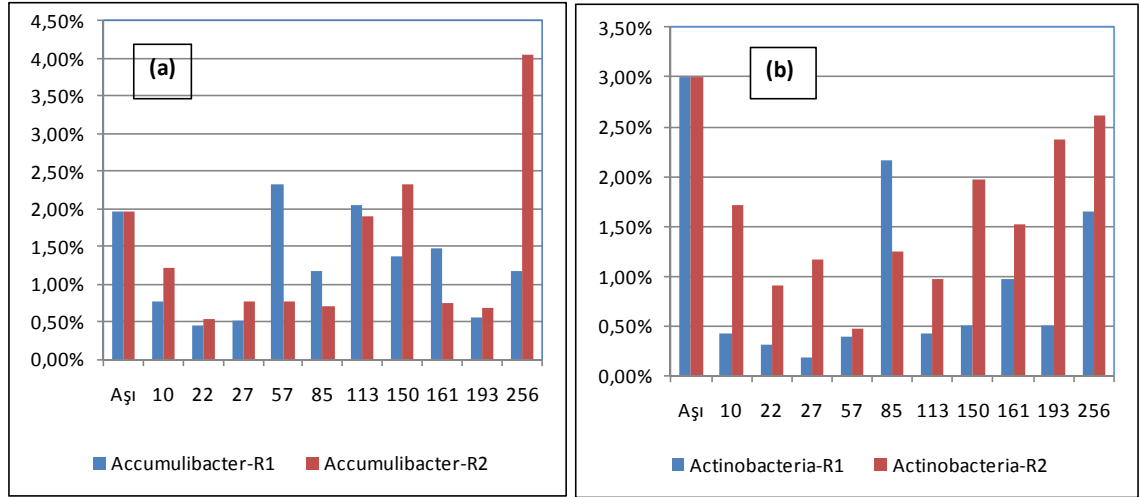


Şekil 4.34 R1 ve R2'de real time PCR ile ölçülen AOB'ler



Şekil 4.35 R1 ve R2'de real time PCR ile ölçülen NOB'ler

(a) *Nitrobacter*, (b) *Nitrospira*



Şekil 4.36 R1 ve R2’de real time PCR ile ölçülen fosfor depolayan bakteriler

(a) *Accumulibacter*, (b) *Actinobacter*

Real-time PCR sonuçlarına göre nitrifikasyon türleri incelendiğinde, AOB ve NOB’lerin aşı çamurundan başlayarak çalışma boyunca çamur içinde bulduklarını göstermektedir. AOB’ler ortalama R1’de $0,65 \pm 0,34$ ve R2’de ise $0,74 \pm 0,29$ bulunmuştur. Literatürde ise bu veriler (*amoA/16S* rRNA oranı) atıksu arıtma tesislerinde geniş bir aralıkta değişmektedir. Araki v.d (2004) yaptıkları çalışmada amonyak oksitleyen türlerin yüzdesel oranlarını %13,8 olarak bulmuş, Daims vd. (2001) ise aktif çamur sistemlerinde FISH ve Confocal laser scanning microscopy ile yaptıkları çalışmalarda, amonyak oksitleyen bakteri türlerinin toplam bakterilere oranının %8,4 olduğunu gözlemlemiştir. Bununla birlikte Juretschko vd. (2002), *Nitrosococcus mobilis* türlerinin endüstriyel bir arıtma tesisinde toplam bakterilere oranla %7 civarında olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamız, her iki reaktörde amonyak oksitleyen türlerin literatüre göre az miktarda bulunduğunu göstermektedir. Diğer taraftan baskın NOB türü her iki reaktörde de *Nitrospira* olarak tespit edilmiştir. Burada da AOB türleri gibi, R2’de (ortalama $1,56 \pm 0,95$) R1’e (ortalama $0,91 \pm 0,25$) göre *Nitrospira* daha yoğun oranda ölçülmüştür. *Nitrobacter* heriki reaktörde de *Nitrospira*’ya göre eser miktarda ölçülmüştür (R1 için $0,01 \pm 0,01$ ve R2 için $0,06 \pm 0,06$). Çalışmamız, heriki reaktörde de hem AOB hem de NOB’lerin çalışma boyunca çamur içinde belirli bir oranda bulunduğunu göstermiştir. Ancak R1 de demir eklenmeden amonyak ve nitrit oksidasyonu gözlenmemiştir. Bu da, daha önceki bulgulara ek olarak, nitrifikasyonun Fe nedeniyle inhibe olduğunu doğrulamıştır. R2’de nitrifikasyonun 70.günden itibaren

tam olarak gerçekleşmesi de, reaktördeki AKM konsantrasyonunun artışına bağlı olarak sistemin nitrifikasyon gerçekleştirilebilir hale geldiğini göstermektedir.

Reaktörlerden çalışma boyunca çamur atılmamıştır. Çamur yaşı, çökeltme periyodu sonunda reaktörlerden arıtılan su ile atılan çamurda hesaplanmıştır. Çamur yaşı her iki reaktörde de çalışma boyunca 2,5-13 gün arasında kalmıştır. 2,5 günlük çamur yaşı AOB ve NOB'lerin sistemde kalması için yeterlidir (ikilenme süresi sırasıyla yaklaşık olarak 1 gün ve 1,5 gün). Lücker v.d (2010), *Nitrospira* türünün organik madde kullanabildiğini göstermiştir. Bu, *Nitrospira*'nın her iki reaktörde de nitrit oksidasyonu yapmadan bulunmasını açıklamaktadır. Ayrıca, AOB'lerin de reaktörlerde amonyak oksidasyonu yapmadan uzun süre çamur içinde varlığını sürdürmesi, AOB'ler için de böyle bir mekanizma olma ihtimalini kuvvetlendirmektedir. Ayrıca, granüllerin stabil kaldığı sürece çamur yaşının sonsuz olması, granül yapısı içinde granül yüzeyinden yaklaşık 70-100µm içerde AOB ve NOB'lere rastlanması (Tay v.d, 2003a ve b) da AOB ve NOB'lerin sistemde kalmalarına olanak sağlamış olabilir. R2'de granüllerin parçalandığı dönemde nitrifikasyon kapasitesinin geri dönüşümlü olarak kaybedilmesi de bu düşüncüyü desteklemektedir. Nitrit oksidasyonunda *Nitrobacter* atıksu arıtma tesislerinde ve diğer ortamlarda en çok çalışılan tür olmasına rağmen; *Nitrispira*, FISH ve CLSM kullanılarak yapılan ölçümlerde, nitrifikasyon yapan biyofilm ve aktif çamur örneklerinde sıklıkla tespit edilmiştir (Coşkuner ve Curtis, 2002; Daims v.d, 2001); ve bazen atıksu ortamlarında bulunan dominant NOB türüdür. Bizim çalışmamızda da *Nitrispira*, *Nitrobacter*'e göre önemli ölçüde fazla tespit edilmiştir.

Fosfor depolayan organizmaların (PAO) izlenmesi sonucunda ise "*Candidatus Accumulibacter*" filogenetik kimliği altında toplanmış türlerin (%1,25±%0,65) *Actinobacter* türlerine (%0,96±%0,92) oranla R1'de biraz daha fazla gözlemlenmiştir. R2'de ise *Actinobacter* türleri *Accumulibacter*'e göre biraz fazla gözlemlenmiştir (*Actinobacter* için 1,64±%0,79; *Accumulibacter* için %1,42±%1,07). Diğer taraftan literatürdeki yüzdelerle kıyaslandığında PAO türlerinin he iki reaktörde de yeteri kadar bulunmadığı anlaşılmıştır. He vd. (2007) yaptıkları çalışmada A²O, VIP gibi birçok biyolojik fosfor giderimi yapılan atıksu arıtma tesislerinde "*Candidatus Accumulibacter*" türlerinin yüzdelerini araştırmış ve %4,4-%24 arasında değişen oranlarda PAO türleri tespit etmiştir. Bu çalışmalar aynı zamanda FISH tekniği ile de

doğrulanmıştır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise fosfor depolayan bakteri türlerinin sistemdeki kütsel oranının %9 ile %34 arasında değiştii ortaya konmuştur (Tunçal ve ark., 2008).

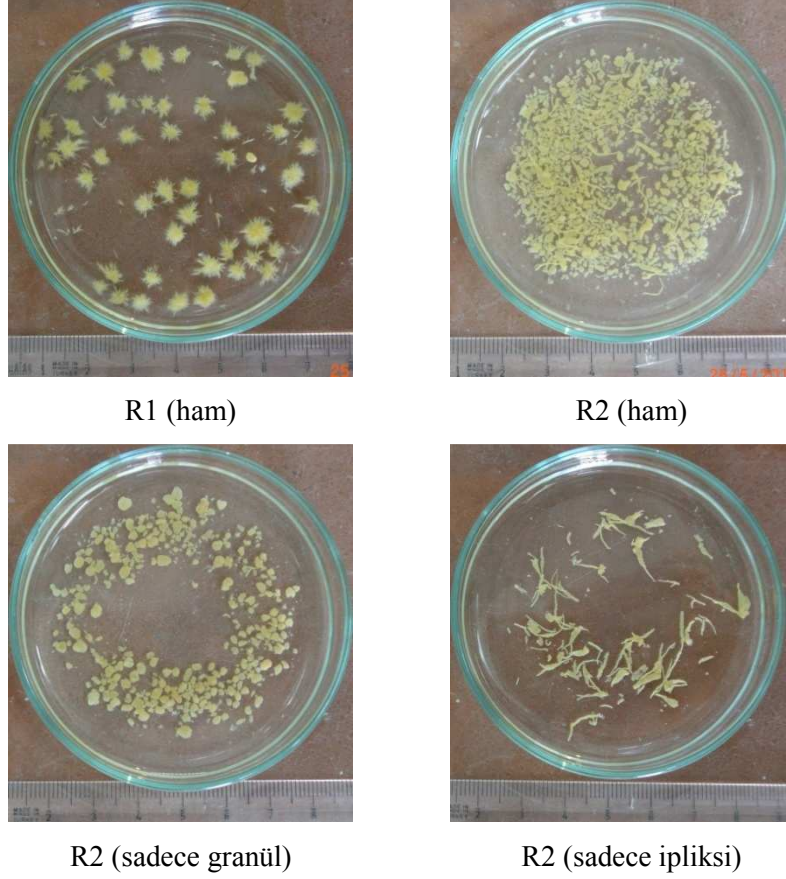
Fe⁺² ilave edilen reaktör, R2’de stabil granül oluşturulmuş (111. gün Şekil 4.16) olmakla beraber, 148. (Şekil 4.18) ve 158. (Şekil 4.20) günlerdeki mikroskobik incelemede, büyük granüllerin parçalandığı görülmesine rağmen, bunun granülasyon prosesinin doğal süreci olduğu düşünölmüştür. 161. günde pH’nın aerobik periyod sonunda 5.8 civarına düşmesi ile granüllerin parçalanmasının yanında nitrifikasyonun da bozulması sonucu, pH 6.5-8.5 aralığında kontrol edilmiş ve belirli bir süre sonunda nitrifikasyon geri kazanılmıştır. Aktif çamur sistemlerinde Fe⁺²/Fe⁺³ ün nitrifikasyon prosesine etkisini inceleyen çalışmalar bulunmaktadır (Philips vd., 2003; Banu vd., 2008; Oikonomidis vd., 2010). Demir sülfatın doğrudan aerobik tanka ilave edildiği aktif çamur sisteminde, TP konsantrasyonu 5.5-8.5 mgP/L ve Fe/P molar oranı 2.1’de nitrifikasyonun etkilenmediği belirtilmiştir (Banu v.d, 2008). Oikonomidis v.d. (2010), Fe⁺²,nin aerobik floklarda birikmesi sonucu inorganik içeriğın □%35 olması durumunda, kütle transfer limitasyonu (oksijen ve/veya substrat) nedeniyle flokların parçalanarak nitrifikasyon bakterilerinin sistemden yıkanarak nitrifikasyonun bozulduğunu rapor etmişlerdir. Diğer bir çalışmada, anoksik koşullarda Fe⁺² ve nitrit/nitrat arasındaki kimyasal ya da birleşik biyolojik/kimyasal reaksiyonların, özellikle nitrifikasyon bakterileri için toksik olan nitrik oksit (NO) oluşumuna neden olduğu bulunmuştur (abiotik nitrit indirgenmesi) (Moragha ve Buresh, 1977; Brons vd., 1991; Philips vd., 2003). Bizim çalışmamızda, uygulanan Fe dozajı ve Fe:P molar oranı 0,7 ile literatürde bahsedilen granüllerin parçalanmasına ve nitrifikasyonun bozulmasına neden olacak değerlerin altındadır. Çalışma süresince, UAKM/AKM oranı %72’nin altına düşmemiş olması ve ayrıca olgun granüllerde ESEM görüntülerinde aerobik granülün kütle transferini yapan kanalların bulunması, inorganik madde birikimine bağlı kütle transfer limitasyonundan dolayı bozulmanın meydana gelmediğini göstermektedir. Granüllerde parçalanma ve nitrifikasyonun inhibe olması 161. günde sistemin aerobik döngü sonunda pH’nın 5.8 civarına düşmesi ile fark edilmiş olmasına rağmen; bundan önce sistemde yapılan bazı değişikliklerin de etkisi olabileceği düşünölmüştür. 111.günden 211.gün arası hariç sisteme Fe²⁺ besleme tankından verilmiştir. Fe’in besleme tankına verildiği dönemde, reaktör pH’sı tüm döngü boyunca 6,5-8,5 arasında

kalmış ve sistemde herhangi bir bozulma meydana gelmemiştir. Fe^{2+} 'in ayrı bir hatla doğrudan reaktöre verildiği dönemde (111-211.günler arası) granüllerin parçalanması ve nitrifikasyonun inhibe olması ile meydana gelen bozulma, yukarıda bahsedildiği gibi iki şekilde oluşmuş olabilir. Birinci durum, Fe^{2+} 'in anoksik koşullarda nitrit/nitrat ile reaksiyonu sonucu NO oluşumuna bağlı inhibisyon etkisidir. İkinci durum, Fe^{2+} 'in doğrudan ilavesi ile pH'nın tüm döngü boyunca, daha önceki döneme göre düşük kalarak, döngü sonunda 5,8 gibi nitrifikasyon bakterilerinin inhibe olabileceği değerlere düşerek, granül yapısı içindeki entegrasyonun bozularak granülün parçalanması ve nitrifikasyon bakterilerinin reaktörden kısmen yıkanması olabilir. Bu iki durumun bir arada da etkili olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

4.1.4. Granüllerin Yapısının İncelenmesi

4.1.4.1. Metal İçeriğinin Belirlenmesi

Çalışmanın 56. gününde, R1 ve R2'de gelişen aerobik granüllerin morfolojik yapısındaki farklılıkların granülün yapısındaki Fe içeriğinden kaynaklanıp kaynaklanmadığını görmek hem de R2'de oluşan ipliksi yapıların organik ya da inorganik yapıda mı olduğunu belirlemek amacıyla bir seri deney yapılmıştır. Granül ve ipliksi yapıların farklılığını ortaya koymak amacıyla, R2 numunesinde granül ve ipliksi yapılar pastör pipeti ile seçilerek iki ayrı falkon tüpüne alınmıştır. Numuneler 3 kez distile su ile yıkanıp ultra turax kullanılarak homojenleştirildikten sonra numunelerde Fe, toplam fosfor (TP) ve AKM analizi yapılmıştır. Fe ve TP analizi için numuneler, numune/ HNO_3 1:1 (v:v) oranında karıştırılıp kaynatılarak parçalanmıştır. Analiz edilen numunelerin homojenizasyondan önceki görüntüsü Şekil 4.37'de ve analiz sonucu Tablo 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.37 R1 ve R2'den 56.günde alınarak analizi yapılan numunelerin homojenizasyondan önceki görüntüsü

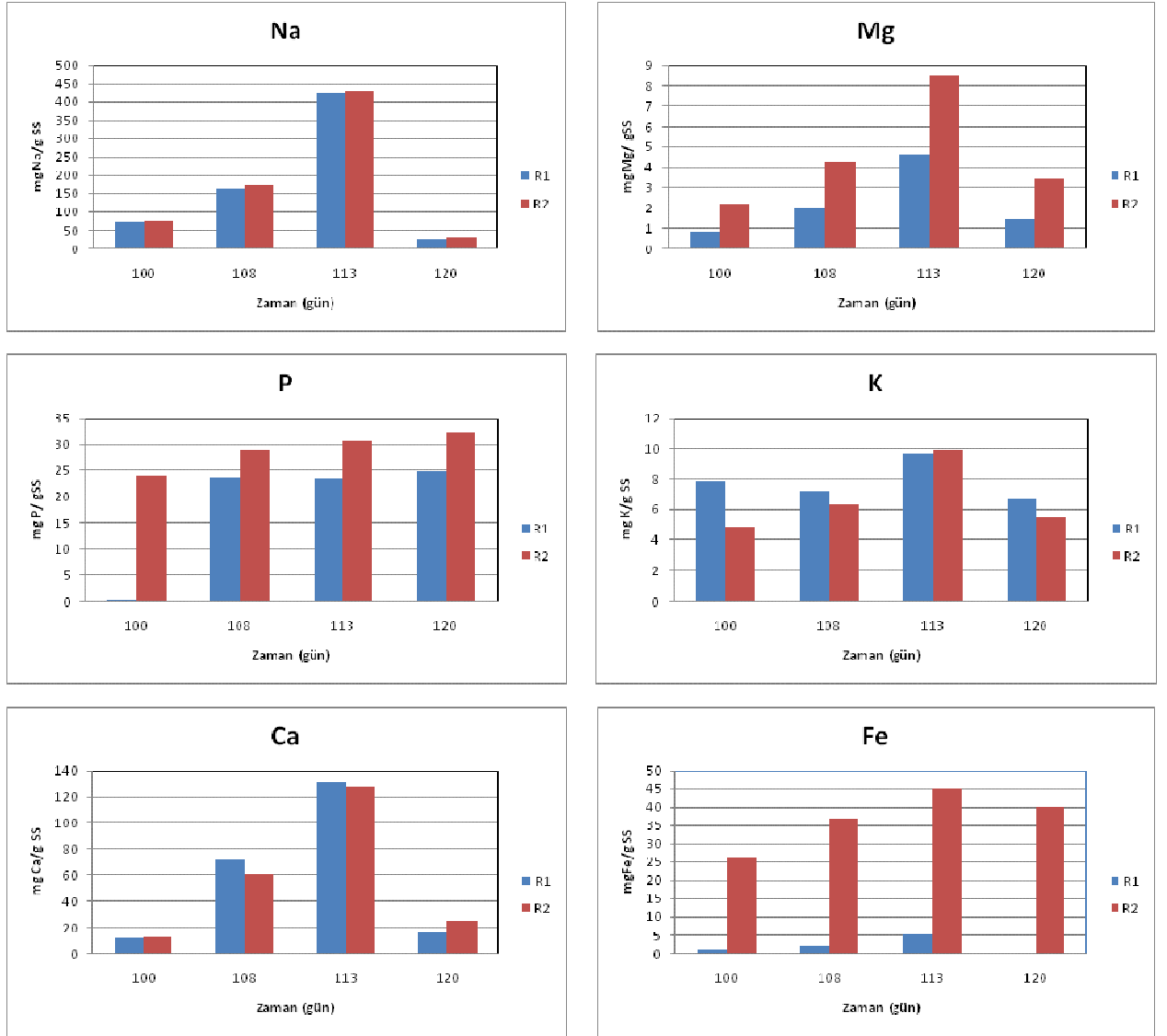
Tablo 4.1 R1 ve R2'den 56.günde alınan numunelerin analiz sonucu

Numune	Besleme Atıksuyu (mg Fe/L)	UAKM/AKM (%)	Toplam P (mg P/ gAKM)	Fe (mgFe/ gAKM)
R1 (ham)	< 0,002	96	11	2
R2 (ham)	6,5	91	19	15
R2 (granül)		93	34	15
R2 (ipliksi)		96	20	12

R1 ve R2 reaktörlerindeki biyokütlenin Fe içeriği, sırasıyla 2 ve 15 mgFe/gAKM; fosfor içeriği, sırasıyla 11 ve 19 mgP/gAKM olarak bulunmuştur. Fe eklenmeyen reaktördeki (R1) aerobik granüllerin yapısında Fe ve P içeriği, Fe eklenen reaktöründekine (R2) göre düşüktür. R2'nin tüm numunelerinde Fe içeriği uyumlu iken, sadece granül olan numunenin fosfor içeriği diğerlerine göre yüksektir. R2 numunesinden seçilen granül ve ipliksi yapılarda analiz edilen Fe ve P içeriğinin ve UAKM/AKM oranının ham

numuneninki ile uyumlu çıkması, ipliksi yapıların da biyolojik yapıda olduğunu göstermiştir.

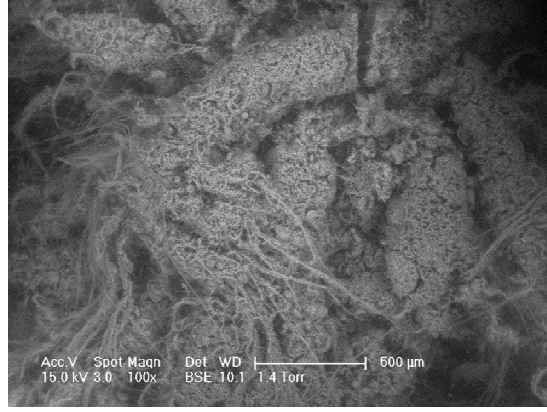
R1 ve R2'den alınan aerobik granüllerde Na, Mg, P, K, Ca ve Fe analizleri yapılmıştır (Şekil 4.38). Analiz sonucuna göre, genel olarak granül yapısındaki Na, K ve Ca miktarlarının R1 ve R2'de benzerlik gösterdiği söylenebilir. R2'deki Mg, granüllerin izlendiği dönemde, R1'dekinin yaklaşık iki katıdır. P, 100.günde R1'de eser miktarda ölçülmüş, bunu izleyen üç hafta içinde ortalama 22 mgP/gAKM'de kalmıştır. R2'deki P, ölçüm yapılan haftalar içinde, 24 mgP/gAKM'den 32mgP/gAKM'ye yavaş bir artış göstermiştir. R1'de ölçülen Fe miktarı eser miktarlarda (1-5 mgFe/ gAKM) olmasına rağmen; R2'deki Fe miktarı (25-45 mgFe/ gAKM) R1'dekinden önemli ölçüde yüksek ölçülmüştür.



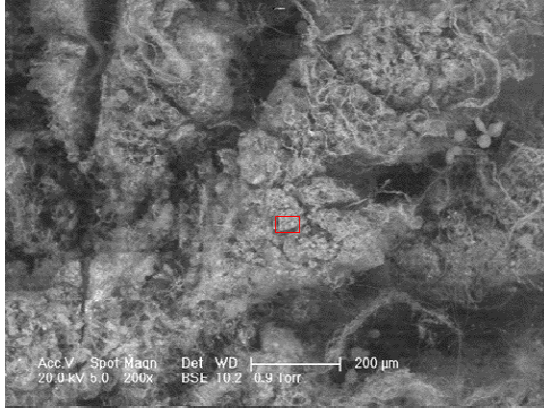
Şekil 4.38 R1 ve R2'den alınan aerobik granüllerde Na, Mg, P, K, Ca ve Fe analizleri (ICP kullanılarak ölçülmüştür)

4.1.4.2. Granül Yapısının ESEM ve EDX ile İncelenmesi

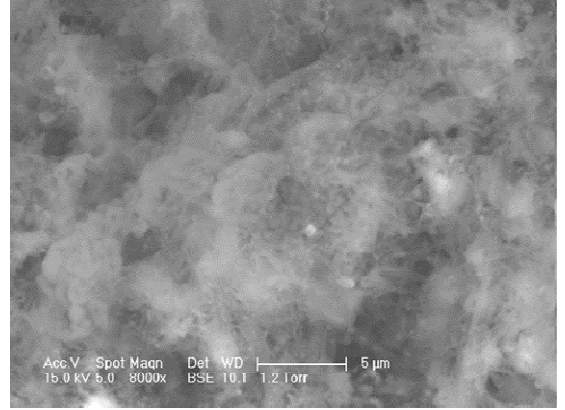
64.günde R1 ve R2'den alınan numunelerde ESEM ve EDX analizleri yapılmıştır. Şekil 4.39'da R1'den alınan aerobik granüllerin ESEM'de çekilen görüntüleri verilmiştir. Şekil 4.39 incelendiğinde, aerobik granülün yüzeyinde hem EPS yapısı (c ve e) hem de yoğun şekilde filamentli bakterilerle (a ve d) sarılı olduğu görülmektedir.



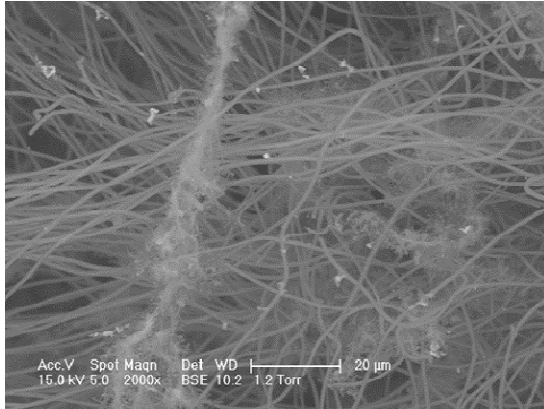
(a)



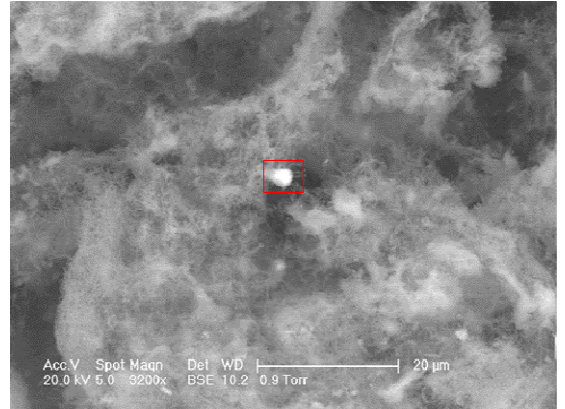
(b)



(c)



(d)



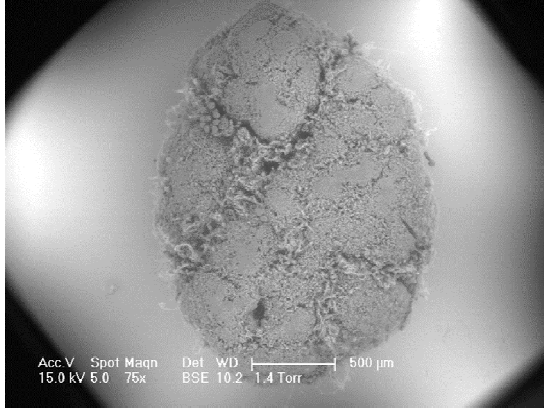
(e)

Şekil 4.39 64.günde R1'den alınan granül numunesinin ESEM görüntüleri

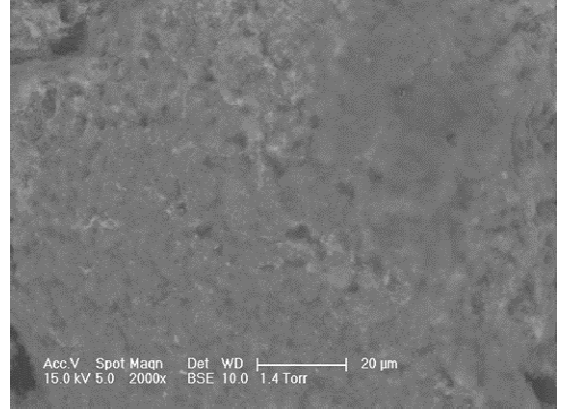
(a) genel görünüm 100x, (b) kesit1 200x, (c) kesit2 8000x, (d) kesit3 2000x, (e) kesit4 3200x.

R2'den alınan aerobik granül ve ipliksi yapıların ESEM'de çekilen görüntüleri Şekil 4.40 ve Şekil 4.41'de verilmiştir. Aerobik granülün yüzeyi, R1'deki granül yüzeyine

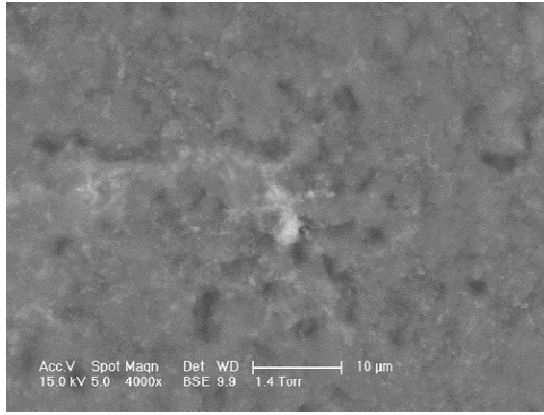
göre daha düzgün EPS yapısı ile kaplı olup, filamentli bakteriler gözlenmemiştir. Özellikle granülün oksijen ve substrat transferinin yapıldığı çukur bölgelerinde çok sayıda bağlı protozoon ve az sayıda filamentli bakteriler gözlenmiştir (Şekil 4.40 (e) ve (f)).



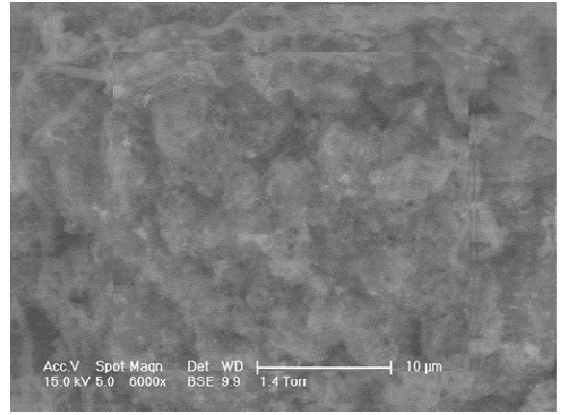
(a)



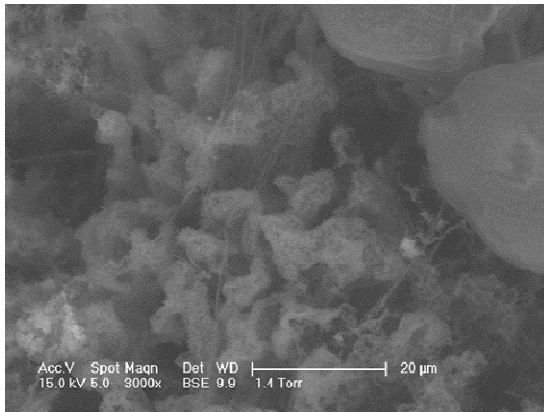
(b)



(c)



(d)



(e)

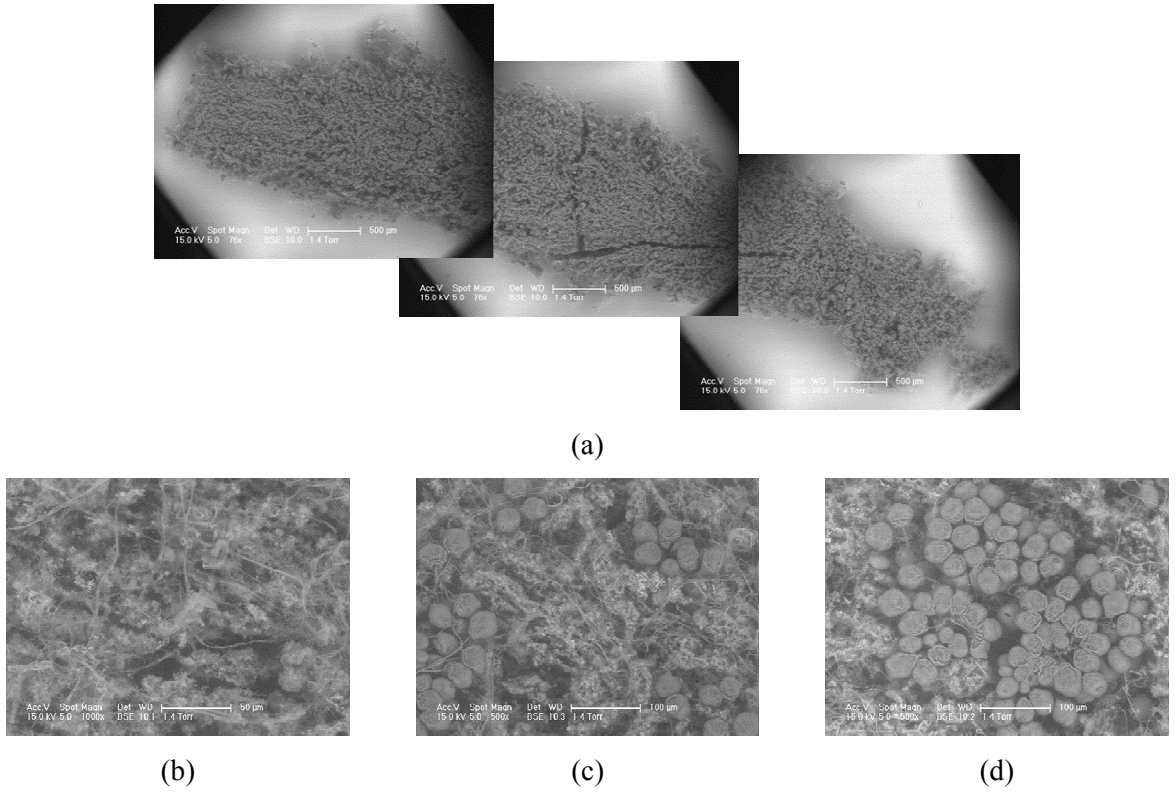


(f)

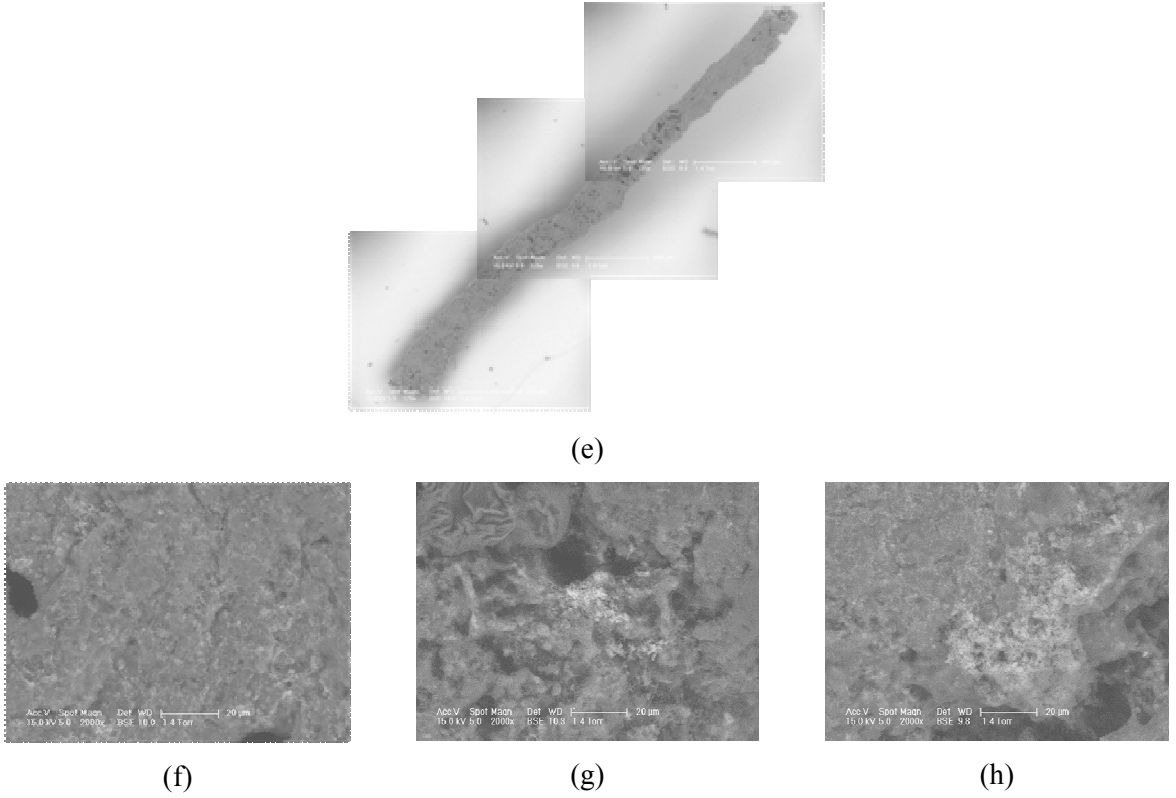
Şekil 4.40 64.günde R2'den alınan granül numunesinin ESEM görüntüleri

(a) genel görünüm 75x, (b) kesit1 2000x, (c) kesit2 4000x, (d) kesit3 6000x, (e) kesit4 3000x, (f) ışık mikroskopu, 10x.

R2’de yoğun olarak işletmeye alma döneminde oluşarak stabil granüllerin sayısının artması ile kaybolan çubuksu biyolojik yapılar da ESEM’de incelenmiştir (Şekil 4.41). İki ayrı boyutta çubuksu yapı seçilmiştir. İncelenen birinci yapı, yaklaşık 6-7 mm uzunluğunda ve 1-2 mm genişliğindedir (Şekil 4.41 (a)). Kesitler incelendiğinde bu yapının aslında, filamentli bakterilerin EPS yapısı ile kaplanması ve yoğun şekilde bağlı protozoonlarla sarılması ile oluşmuş biyolojik yapılar olduğu görülmüştür (Şekil 4.41 (b), (c), (d)). İkinci yapı, 3-4 mm uzunluğunda ve 200 μ m genişliğindedir (Şekil 4.41 (e)). İkinci yapının birincisine göre daha küçük ve yüzeyinin düzgün bir EPS tabakası ile kaplı, az sayıda protozoon ile sarılı olduğu görülmektedir (Şekil 4.41 (f), (g), (h)). Her iki yapıda da, aerobik granüllerde olduğu gibi kütle transferinin yapıldığı çatlak ve çukurların olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.41 64.günde R2’den alınan filament numunesinin ESEM görüntüleri



Şekil 4.41 (devamı) 64.günde R2'den alınan filament numunesinin ESEM görüntüleri

(a) 1. Filament genel görünüm 75x, (b) kesit1 1000x, (c) kesit2 500x, (d) kesit3 500x, (e) 2. Filament genel görünüm 125x, (f) kesit4 2000x, (g) kesit5 2000x, (h) kesit6 2000x.

64.günde R1 ve R2'den alınan granüllerin ESEM kesitlerinde yapılan EDX analiz sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir. R1 reaktöründen alınan aerobik granülün değişik kesitlerinde yapılan EDX analizlerinin ortalama ve standart sapma değerleri, granülün yüzey yapısındaki farklılığın (EPS ve filamentli bölgeler) seçilen elementlerin ağırlık yüzdelere yansımadığını göstermektedir (Tablo 4.2). Yani granül üzerinde analizi yapılan kesit ne olursa olsun elementin ağırlık yüzdesi yakın çıkmıştır. Buna göre, R1'deki aerobik granülün dış yüzeyinde Ca ve P en fazla bulunan elementlerdir. Granülasyonda önemli bir etkiye sahip olduğu bilinen Mg'un ağırlık yüzdesi, Ca ve P'a göre düşüktür. R1 reaktörüne beslenen sentetik atıksuya eklenmemesine rağmen, musluk suyu ve ilave edilen kimyasal maddelerden gelmesi muhtemel olan eser miktarda ($<0,002$ mgFe/L) Fe'de granülün dış yüzeyinde ağırlıkça %3 oranında tespit edilmiştir.

R2 reaktöründe hem aerobik granül hem de filament yapılarında EDX analizi yapılmıştır (Tablo 4.2). Aerobik granülün dış yüzeyinde ağırlık yüzdesi olarak en fazla, sırasıyla Na<Ca<Mg ölçülmüştür. Bu elementlerden sonra en fazla bulunan element %10 ile Fe'dir. R2'de granül yüzeyindeki Fe yüzdesi artarken; R1'deki aerobik granülün yapısındaki Ca'un yerini R2'de Na ve Mg'un aldığı söylenebilir. Granül topluluk yapısındaki bakteriler ve EPS negatif yüklü bileşenler olduğu için, katyonlar biyoflokulasyonda ve granül çamur oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Sonuçlar göstermiştir ki, R2 atıksuyundaki Fe, EPS yapısındaki negatif yüklü gruplar arasında köprü oluştururken, iyon değişim etkisi ile Ca'un yerini de almış ayrıca, diğer monovalent ve divalent katyonların (Na ve Mg) da EPS içindeki oranının artmasına neden olmuştur.

R2'de incelenen iki filamentte analiz edilen bölgeye göre element yüzdeleri önemli farklılıklar göstermiştir. Küçük filamentin yüzeyi büyük filamentte göre daha düzgün bir EPS yapısı ile kaplı ve yapısı R2'deki granül ile hemen hemen aynıdır. Büyük filamentte Fe oranı artarken, Ca, Mg ve Na ile yer değiştirdiği, P'un da miktarının arttığı görülmektedir. Bu da filament yapısının oluşumunda Fe-P çökeleklerinin etkisinin olabileceğini göstermektedir. Katyonların anyonik gruplarla bileşik oluşturmada ilgileri $Na^+ < K^+ < Mg^{2+} < Ca^{2+} < Fe^{2+}$ olarak artmaktadır. R1'de bu kural sağlanırken; R2'de Na^+ 'un en yüksek katyon olması ilginçtir.

Tablo 4.2 64.günde R1 ve R2'den alınan granüllerin ESEM kesitlerinde yapılan EDX analiz sonuçları (Wt%)

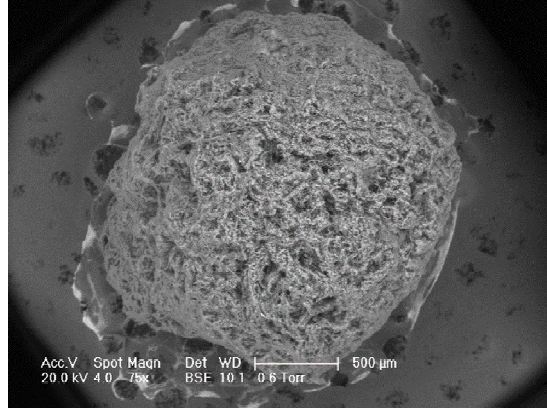
Numune		NaK	MgK	PK	KK	CaK	FeK
R1	Kesit 1	9	6	31	4	49	1
	Kesit 2	4	3	31	6	52	5
	Kesit 3	5	4	24	9	55	4
	Kesit 4	5	3	28	3	59	2
	ORTALAMA	6	4	29	6	54	3
	STD SAPMA	2	1	3	3	4	2
	Kesit 1	42	20	4	2	27	6
	Kesit 2	40	18	6	3	26	8

R2 (granül)	Kesit 3	36	16	7	3	26	12
	Kesit 4	35	12	8	3	28	14
	Kesit 5	33	15	9	5	28	11
	ORTALAMA	37	16	7	3	27	10
	STD SAPMA	3	3	2	1	1	3
R2 (filament)	Kesit 1	23	11	21	3	20	23
	Kesit 2	17	8	20	7	20	28
	Kesit 3	18	9	23	6	18	26
	Kesit 4*	42	21	2	3	28	4
	Kesit 5	21	9	20	4	19	27
	Kesit 6*	41	21	2	3	27	6
	ORTALAMA	20	9	21	5	19	26
	STDSAPMA	3	1	1	2	1	2

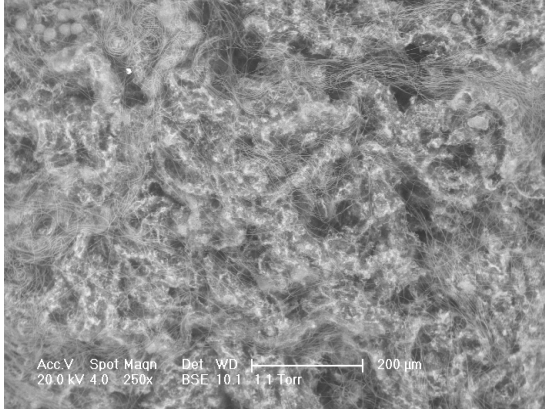
*Kesit 4 ve 6 ortalama ve standart sapmaya katılmamıştır.

210.günde R1 ve R2'den alınan aerobik granüllerin dış ve iç yüzeyinden alınan ESEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.42 ve Şekil 4.3'te verilmiştir.

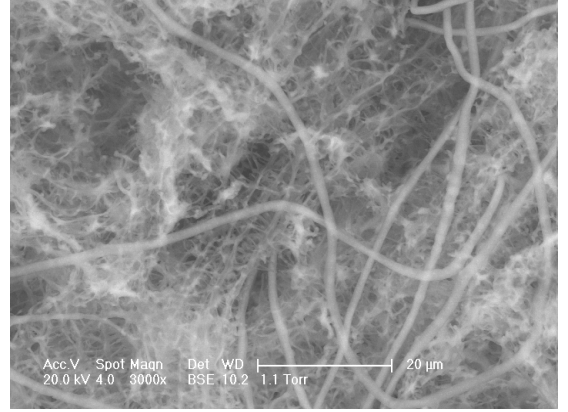
R1 ve R2'den alınan aerobik granüller birbirinden farklıdır. R1'deki granüller düzgün yuvarlak yapıdadır. R2'deki granüller daha çok böbrek görüntüsündedir. R1'den alınan görüntüler, granülün dış ((Şekil 4.42 (a), (b), (c)) ve içinin (Şekil 4.42 (d), (e)) benzer yapıda olduğunu göstermiştir. Her iki yüzeyde yoğun şekilde filamentlerle sarılmıştır. Filamentler açık şekilde görülmektedir. R2'den alınan granüllerin dış ve iç yapısında filamentli yapıya fazla rastlanmamıştır. R2'de granül yapısı katmanlardan oluşmaktadır.



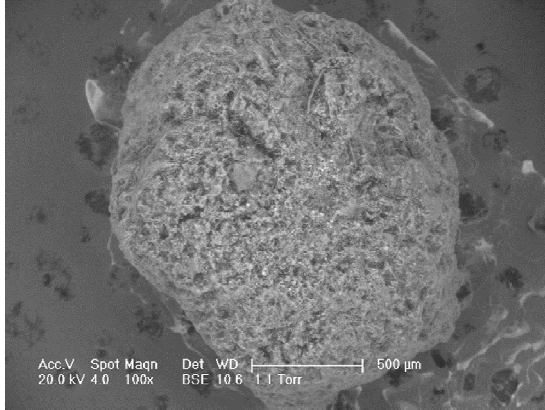
(a)



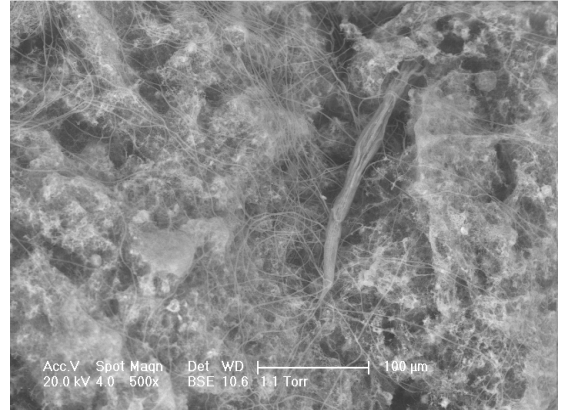
(b)



(c)



(d)



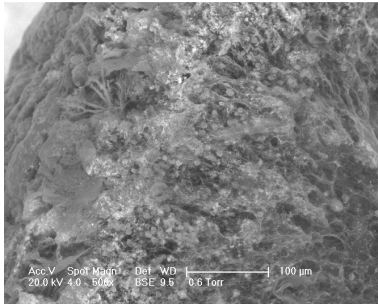
(e)

Şekil 4.42 210.günde R1'den alınan aerobik granülün dış ve iç yüzeyinden alınan ESEM görüntüleri

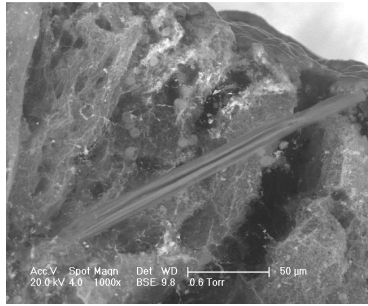
(a) granül dış yüzey 75x, (b) granül dış yüzey kesiti 250x, (c) granül dış yüzey kesiti 3000x, (d) granül iç yüzey 100x, (e) granül iç yüzey kesiti 500x.



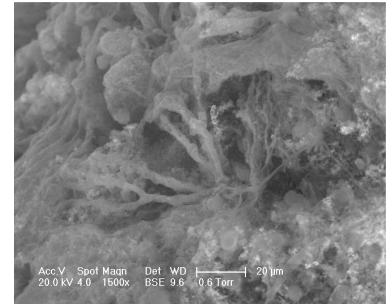
(a)



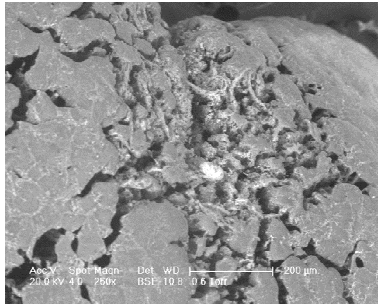
(b)



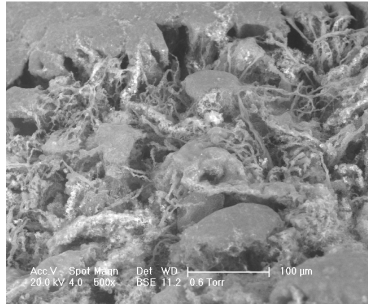
(c)



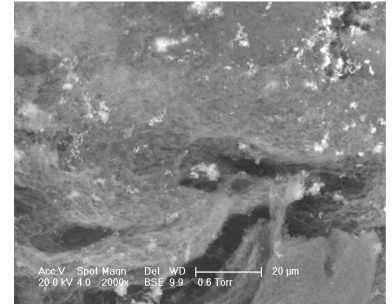
(d)



(e)



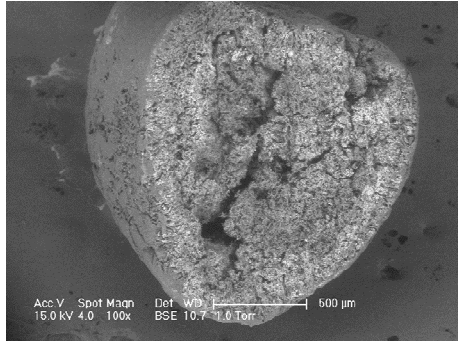
(f)



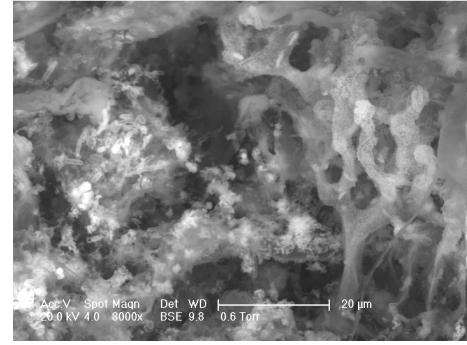
(g)

Şekil 4.43 210 günde R2'den alınan aerobik granüllerin dış ve iç yüzeyinden alınan ESEM görüntüleri

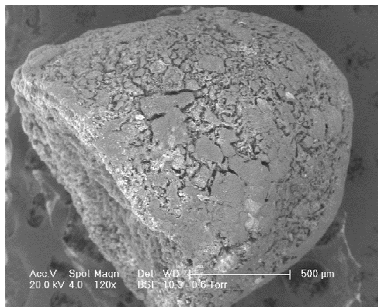
(a) büyük granül iç yüzey 75x, (b) büyük granül iç yüzey kesiti 500x, (c) büyük granül iç yüzey kesiti 1000x, (d) büyük granül iç yüzey kesiti 1500x (e) büyük granül dış yüzey kesiti 250x, (f) büyük granül dış yüzey kesiti 500x, (g) büyük granül dış yüzey kesiti 2000x



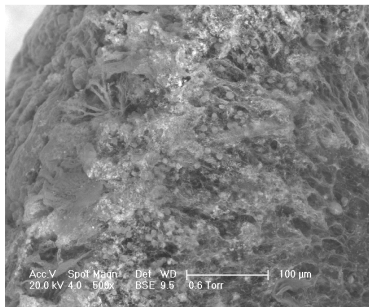
(h)



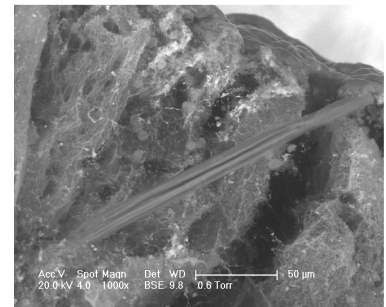
(i)



(j)



(k)



(l)

Şekil 4.43 (devamı) 210 günde R2'den alınan aerobik granüllerin dış ve iç yüzeyinden alınan ESEM görüntüleri

(h) küçük granül iç yüzey 100x, (i) küçük granül iç yüzey kesiti 8000x, (j) küçük granül dış yüzey 120x, (k) küçük granül dış yüzey kesiti 500x, (l) küçük granül dış yüzey kesiti 1000x.

Şekil 4.42 ve Şekil 4.43'te verilen granüllerin dış ve iç yüzeyinde EDX yapılmıştır (Tablo 4.3). R1'de ESEM görüntülerini doğrular şekilde, granülün iç ve dışında ölçülen elementlerin ağırlık yüzdeleri arasında fark gözlenmemiştir. Ancak, R2'den alınan granüllerin içinde dışından daha fazla Fe ölçülmüştür. Diğer elementlerin yüzdeleri arasında fark olmadığı söylenebilir.

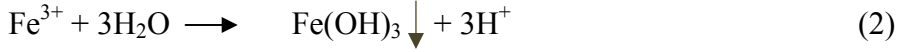
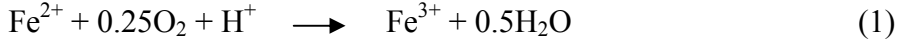
Tablo 4.3 R1 ve R2 granüllerinin iç ve dış yüzeylerinde yapılan EDX analizleri

Numune		NaK	MgK	PK	KK	CaK	FeK
R1	Dış	9	12	34	19	19	6
	İç	11	12	37	17	20	3
R2	Büyük Granül Dış	8	8	33	4	12	35
	Büyük Granül İç	6	3	27	5	14	45
	Küçük Granül Dış	5	6	33	6	12	39
	Küçük Granül İç	5	3	14	3	12	62

Kalsiyum (Ren vd., 2008), ve kalsiyum ve demir (Juang vd., 2010) gibi kimyasal çökeleklerin yoğun olarak aerobik granül çamurun iç bölgesinde yer aldığı saptanmıştır. Bizim çalışmamızda, 210.günde yapılan EDX analizinde, R1'deki aerobik granüllerin iç ve dış yapısında belirgin bir farklılık dikkati çekmezken; R2'deki aerobik granüllerin içinde dışından daha fazla Fe çökeleği saptanmıştır. 64. günde R2'de yapılan EDX analizinde, filamentli yapıların dış yüzeyinde granüllerinkinden daha fazla Fe'e rastlanmıştır. İlerleyen dönemde filamentler ortadan kaybolmuş ve granüle dönüşmüştür. 210.günde yapılan EDX analizinde ise, granüllerin içinde dışından daha fazla Fe ölçülmüştür. Bütün bu analizler, özellikle Fe'in R2'de granül oluşumunda etkili olduğunu bir kez daha kanıtlamaktadır.

Fe'in biyoflokülasyon/ granülasyon prosesindeki rolü, Bölüm 2.1.2 Şekil 2.3'de şematik olarak verilmiştir. Buna göre, Fe²⁺ eklendiğinde oksidasyon/hidroliz reaksiyonları başlamadan önce ya da çok kısa bir süre sonra; Fe²⁺ EPS'deki negatif yüklü gruplarla etkileşmektedir. Bu etkileşimlere katılan Fe türleri Fe⁺², monomerik ya da polimerik Fe²⁺ /Fe³⁺ hidroliz ürünleri veya Fe-P-OH kompleksleridir. Flok yüzeyindeki anyonik kimyasal gruplarla pozitif yüklü Fe türleri köprü oluşturarak, çok değerlikli katyon köprü teorisi (multivalent cation bridging theory)'ne göre biyoflokülasyonu desteklemektedir. Fe³⁺ eklendiğinde, havalandırma tankındaki pH koşullarında hızlıca Fe(OH)₃ oluşumu meydana gelmektedir. Fe(OH)₃ muhtemelen flok yüzeyine çok küçük boyutta koloidal partiküller olarak yerleşmektedirler. Fe(OH)₃ düşük nötralizasyon kapasitesine sahip olduğundan EPS yapısının anyonik adsorbsiyon bölgeleri ile iletişimi yeterli olmamaktadır. Bu da flok yapısıyla çökeltme ürünlerinin entegrasyonunu

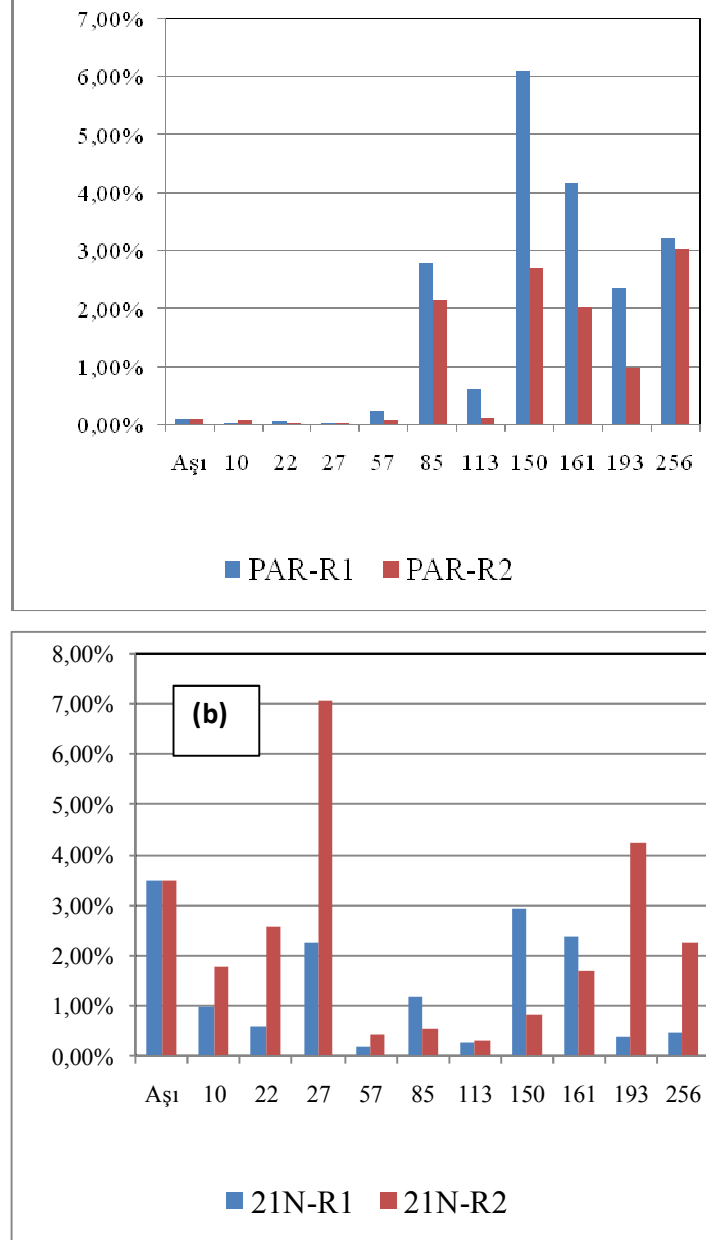
sınırlayarak daha açık flok yapısının oluşmasına neden olmaktadır (Şekil 2.3). Fe^{2+} eklendiğinde aşağıdaki reaksiyonlar meydana gelmektedir:



Çalışmamızda Fe , $Fe(SO)_4$ olarak atıksuda 10 mgFe/L olacak şekilde besleme tankına eklenmiştir. Besleme tankına ilave edilen Fe^{2+} Denklem (1)'e göre Fe^{3+} 'e oksitlenecektir ($0.15 \text{ gO}_2/\text{gFe}^{2+}$). Sentetik atıksuyun pH değerinde (7.2) ve KH_2PO_4/K_2HPO_4 ile sağlanan tampon kapasitesinde, monomerik ya da polimerik Fe^{2+}/Fe^{3+} hidroliz ürünleri ve ya $Fe\text{-P-OH}$ ile $Fe(OH)_3$ oluşumu beklenebilir. Granülasyon prosesinin başında ve granüllerin bozulmasından sonra gözlenen iplikli yapıların yukarıda bahsedilen açık floklar olma ihtimali yüksektir. Filamentli bakterilerin açıkça gözlenmeyip, açık flok-granül yapısı içinde gözlenmesi de, Fe 'in aerobik granülasyon prosesindeki pozitif etkisine bağlanabilir. Oluşan açık flokların, reaktöre verilen yüksek kesme kuvveti etkisi ile zamanla granül çamura dönüştüğü mikroskopla yapılan gözlemlerde açıkça görülmektedir. R1'deki granüller yuvarlak iken, R2'de gözlenen granüllerin bazılarının böbrek şeklinde ya da düz olması buna bağlı olabilir (Şekil 4.13).

Filamentli bakteriler arasından seçilen iki tür real-time PCR yöntemi ile ölçülmüştür (Şekil 4.44). Heriki reaktörde de *Microthrix parvicella* türünün aşı çamurundan başlayarak çalışmanın 57.gününe kadar çok az oranda bulunmasına rağmen, bu dönemde *Eikelboom type 021N* türünün yoğun oranda bulunduğu gözlenmiştir. 150.günden itibaren *Microthrix parvicella* türü baskın hale gelirken; *Eikelboom type 021N* göreceli olarak azalmıştır. 57 ve 113.günler heriki reaktörde de heriki türün oranı belirgin şekilde azalmıştır. R1 ve R2 karşılaştırıldığında, R1'de *Microthrix parvicella* baskın türken; R2'de *Eikelboom type 021N*'ün baskın olduğu söylenebilir. R2'de de filamentli bakterilerin özellikle *Eikelboom type 021N*'ün real-time PCR'da tespit edilmesine rağmen ışık mikroskobu ve ESEM'de fazla görüntülenememesi, Fe 'in

etkisine ve filamentli yapıların granül yapı içine entegrasyonu ile açıklanabilir. SEM görüntülerinde de, özellikle granül çamur oluşumu aşamasında gözlenen açık flokların filamentli bakterilerin EPS, protozoa ile sarılması ile oluşmuş yapılar olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, real-time PCR sonuçları ile uyumludur.

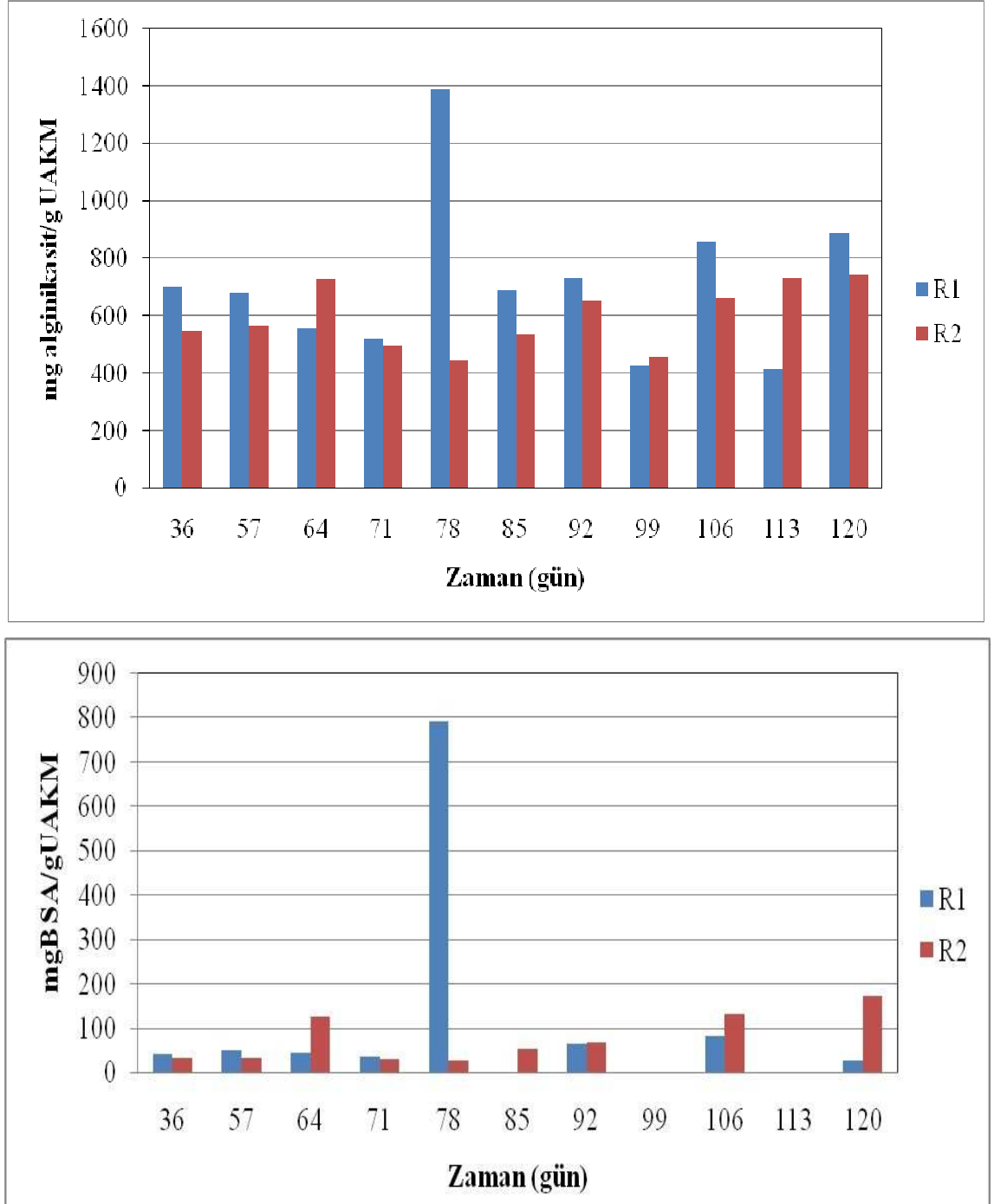


Şekil 4.44 Real-time PCR ile ölçülen filamentli türlerin değişimi

(a) *Microthrix parvicella*, (b) *Eikelboom type 021N*

4.1.4.3 Aerobik Granüllerin EPS'nin İncelenmesi

R1 ve R2'den alınan aerobik granül numuneleri, Dowex katyon değiştirici reçine ile ekstre edildikten sonra, karbonhidrat ve protein konsantrasyonları belirlenmiştir. R1 ve R2'nin EPS'inde ölçülen polisakkarit (PS) ve protein (PN) miktarları Şekil 4.45'de verilmiştir.

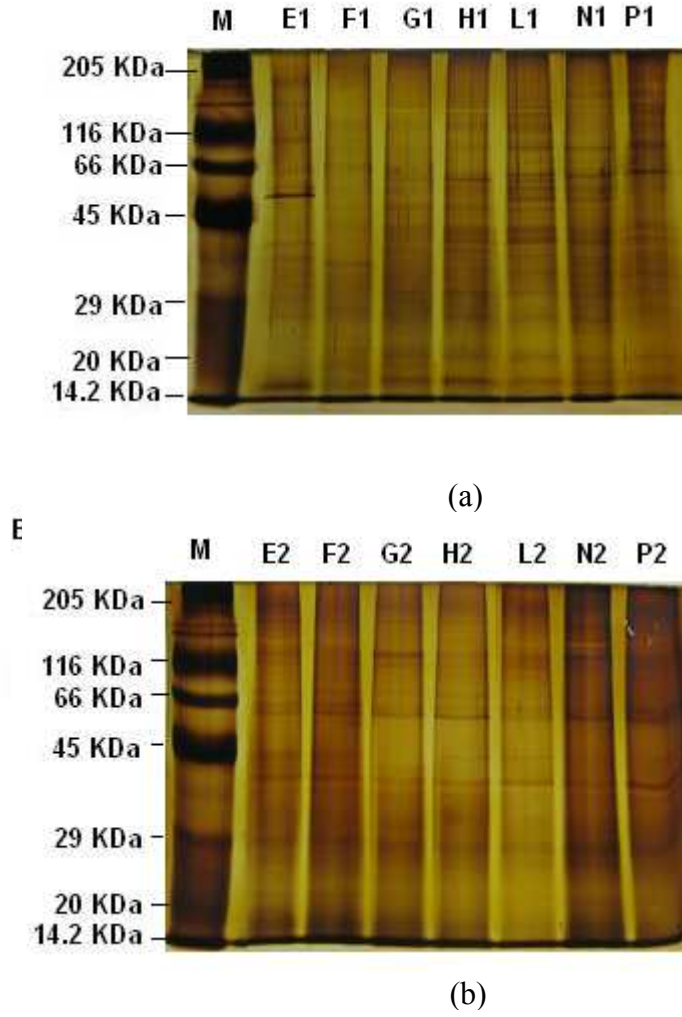


Şekil 4.45 R1 ve R2'nin EPS'inde ölçülen karbonhidrat ve protein miktarları.

Şekil 4.45 incelendiğinde, R1 ve R2'nin EPS'nin PS ve PN arasında belirgin bir ilişki kurulamamıştır. 78.günde R1'in hem PS hem de PN'inde ani bir artış gözlenmiş ancak nedeni anlaşılamamıştır. Bu değer çıkarılarak R1 ve R2'de ortalama PS miktarı sırasıyla, 648 ± 164 mg alginik asit/gUAKM ve 598 ± 112 mg alginik asit/gUAKM; PN miktarı sırasıyla 34 ± 28 mgBSA/gUAKM ve 61 ± 57 mgBSA/gUAKM'dir. Buna göre, R1 ve R2'de PS/PN oranı sırasıyla, 19 ve 10 olarak hesaplanmıştır.

Aerobik granül çamura, Ca ilavesinin EPS yapısındaki polisakkarit miktarını; Mg ilavesinin ise EPS'deki protein miktarını artırdığı rapor edilmiştir (Jiang v.d,2003). Çalışmamızda, diğer tüm katyonlar sabit tutulmuş, bir reaktöre Fe ilavesi yapılmıştır. R1 ve R2'de oluşan granüllerin iç ve dışında EDX analizleri ile farklı katyon yüzdeleri elde edilirken; granül çamurun tamamını temsil eden ICP analizinde, R1 ve R2'deki granüllerin Mg ve Fe miktarında farklılık gözlenmiştir. EPS'in PS miktarının PN'den fazla olmasının nedeninin, azot (Durmaz ve Sanin, 2001) ve fosfor (Liu vd., 2006; Bura vd., 1998; Hoa vd., 2003)'un karbona göre sınırlı olması dışında, Ca'un etkisi (Jiang v.d,2003) olduğu söylenebilir. R1 ve R2'deki PN karşılaştırıldığında; R2'deki PN'nin R1'dekinden yüksek olması, Mg dışında Fe'in etkisi olabilir. Ayrıca, Mg'nin enzimler üzerinde etkili bir rol oynayarak enzim reaksiyonlarını hücre senteziyle birlikte canlandırması (Brdjanovic vd,1996) yanında, çalışmamızda Fe'nin de özellikle nitrifikasyon prosesinde rol oynayarak biyolojik faaliyetleri artırdığı görülmüştür. R1 ve R2'de ölçülen oksijen tüketim hızları (OUR) sırasıyla 14,4 ve 29,8 mgO₂/g UAKM saat olarak ölçülmesi de, reaktörlerdeki biyolojik faaliyetlerin farklılığını ortaya koymaktadır.

Fe çalışmasında ekstrakte edilen proteinlerin SDS-PAGE ile analizi sonucunda elde edilen bant profilleri ise Şekil 4.46'da verilmiştir. Jeldeki bantların molekül ağırlıkları, molekül ağırlığı bilinen standart proteinler (Color Marker, Sigma) yardımıyla belirlenmiştir.



Şekil 4.46 (a) Fe içermeyen deney grubuna ait örneklerin suda çözünebilir protein profilleri.

(b) Fe içeren deney grubuna ait örneklerin suda çözünebilir protein profilleri

SDS-PAGE ile ayrıştırılan ve önce Coomassie boyama ile daha sonra Gümüş nitrat ile boyanan jelle ait görüntü. [M: Marker protein karışımı, E:36.gün, F:57.gün, G: 64.gün, H:71gün, L:92.gün, N:106.gün, P:120.gün alınan numuneler.]

Şekil 4.46'da Fe çalışmasına ait EPS numunelerinin protein profilleri karşılaştırılmıştır. Şekil 4.45 (a)'da Fe içermeyen reaktörden farklı zamanlarda alınan örnekler, Şekil 4.45 (b)'de ise 10 mg/L konsantrasyonda Fe içeren reaktörden farklı zamanlarda alınan örnekler birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Jel sonuçlarına göre Fe içermeyen reaktörden farklı zamanlarda alınan örneklerde, özellikle 29 KDa - 45 KDa molekül ağırlığına sahip proteinlerde belirgin farklılıklar görülmüştür. R1'in 36. gününü temsil eden numunede yaklaşık 55 KDa ağırlığındaki bir proteinin ekspresyonunun çok arttığı

görülmüştür. Ayrıca 120. gün ekstrakte edilen numunede yaklaşık molekül ağırlığı 150 KDa olan farklı bir protein saptanmıştır.

10 mg/L konsantrasyonda Fe içeren reaktörden alınan örnekler kendi içinde değerlendirildiğinde, molekül ağırlığı 45 KDa-66 KDa aralığında olan proteinlerde ekspresyon düzeyinde bazı farklılıklar görülmüştür. Fe içermeyen ve içeren örnekler birbirleri ile karşılaştırıldığında ise, 29 KDa -66 KDa aralığındaki proteinlerin Fe içermeyen grupta daha baskın olarak bulunduğu saptanmıştır.

4.1.4.4. Aerobik Granüllerde Kimyasal Çökelmenin Belirlenmesi

Aerobik granüllerde kimyasal çökelmenin etkisini görmek amacıyla cold PCA metodu (de Haas v.d., 2000) ve oluşan kimyasal çökeleklerin türlerinin (Uhlmann vd., 1990) belirlenmesi amacıyla bir seri deney yapılmıştır.

Tablo 4.4, R1 ve R2’de cold PCA metoduna göre belirlenen kimyasal çökeltme yüzdeleri verilmiştir. Tüm sonuçlar numunenin Toplam P’sinin yüzdesi olarak verilmiştir. Bu yöntem, fosforun reaktörlerde hangi yolla giderildiği konusunda da bilgi verebilmektedir. Öncelikle supernatanttaki fosfor, çıkıştaki fosfor ve santrifüjle granülden ayrılabilen zayıf bağlı fosforu yansıtmaktadır. Supernatanttaki PO₄-P %’si, R1’de numunenin Toplam P’sinin %11’i iken, R2’de %3 olarak ölçülmüştür. Bu değerler reaktör çıkışında ölçülen PO₄-P değerleri ile uyumludur. Ayrıca, R1 ve R2 reaktörlerinde biyolojik fosfor giderimi olmadığından, kimyasal çökeltme ayrıldıktan sonra kalan biyoküttelede ölçülen Toplam P yüzdesi, heriki reaktörde de %38 olarak ölçülmüştür. Granül yapısında çökeltmek kimyasal olarak uzaklaştırılan P, R1’de %36 iken R2’de %45 ölçülmüştür. Her iki reaktörün besleme atıksuyunda Fe hariç diğer katyonların miktarı aynı olduğu için, oluşan bu farkın Fe-P çökeleği olarak düşünülebilir.

Tablo 4.4 Cold PCA metoduna göre R1 ve R2’de kimyasal çökelmenin belirlenmesi (de Haas vd., 2000).

Numune	PO ₄ -P (numunenin toplam P %’si)	Toplam P (numunenin toplam P %’si)	Kompleks P (Toplam P - Orto-P) (numunenin toplam P %’si)
R1 (n=4)			
Supernatant	%11 (4)	%15	%5 (2)
PCA	%36 (5)	%47	%11 (3)
Kalıntı	-	%38 (5)	-
Geri kazanım	-	% 100 (4)	-
R2 (n=4)			
Supernatant	%3 (1)	%5	%3 (1)
PCA	%45 (5)	%53	%8 (6)
Kalıntı	-	%38 (3)	-
Geri Kazanım	-	%96 (4)	-

Tablo 4.5 R1 ve R2’de, Uhlmann v.d (1990) tarafından önerilen metoda göre belirlenen kimyasal çökeleklerin yüzdesi verilmiştir. Bu metoda göre, distile su (DS) ile ekstrakte edilip PO₄-P ölçülen kısım, zayıf bağlı yada adsorblanan fosforu; bikarbonat–dithionat (BD) ile ekstrakte edilip PO₄-P ölçülen kısım, genel olarak redoksa duyarlı Fe-hidroksitlere (*FePO₄(Al)*, *Fe(OH)₃-P*, *Mn(OH)₄-P*) bağlı fosforu; NaOH ile ekstrakte edilip PO₄-P ölçülen kısım, NaOH’den gelen OH⁻ iyonları ile iyonlarını değiştiren Fe-oksit/hidroksitlerle bağlı fosforu; HCl ile ekstrakte edilip PO₄-P ölçülen kısım, karbonat ve apatit (Ca-P) bağlı fosforu göstermektedir. Toplam fosfor ile orto-P arasındaki fark, her bir adımda ekstrakte edilen organik bağlı fosfor fraksiyonunu vermektedir.

Distile suda ekstrakte edilen zayıf bağlı fosfor, bu çalışmada supernatant ile karıştırılarak ölçüldüğünden R1’de yüksek çıkmıştır (%13). Supernatanttan gelen kısım çıkarılırsa, bu fraksiyon %1’in altında çıkmaktadır. R2’de supernatanttan gelen fosfor düşük olduğundan, zayıf bağlı fosforun fraksiyonu %1 ölçülmesine rağmen ihmal edilebilecek kadar düşük olduğu düşünülmelidir.

R1 ve R2’de BD ile ekstrakte edilen fosfor fraksiyonlarının birbirine yakın olduğu görülmektedir. Yani 3 değerlikli metal oksitlerin fosfat bağları her iki sitemde de benzerdir. Burada, en dikkat çeken NaOH ile ekstrakte edilen fosfor fraksiyonudur. İki değerlikli metal oksitlerin fosfor bağları R1’de düşük olmasına rağmen R2’de önemli bir oranı oluşturmaktadır. HCl ile ekstrakte edilen Ca bağlı fosfor fraksiyonu, R1 ve R2’de birbirine yakındır. Bu metod da, R2’de kimyasal çökelmenin %81’nin iki değerlikli metal oksitlerin fosfor bağları olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.5 R1 ve R2'de kimyasal çökeleklerin türünün belirlenmesi (Uhlmann vd., 1990).

Numune	PO ₄ -P (numunenin toplam P %'si)	Toplam P (numunenin toplam P %'si)	Kompleks P (Toplam P - Orto-P) (numunenin toplam P %'si)
R1 (n=3)			
DS	%13 (4)	%17 (7)	%4 (4)
BD	%14 (9)	%24 (11)	%10 (2)
NaOH	%4 (3)	%50 (4)	%47 (6)
HCl	%4 (7)	%7 (8)	%3 (1)
Kalıntı	-	%1 (2)	-
Geri kazanım	%34 (7)	%99 (1)	%65 (7)
R2 (n=3)			
Distile Su	%1 (1)	%3 (0)	%1 (1)
BD	%9 (0)	%12 (0)	%4 (0)
NaOH	%56 (8)	%81 (3)	%25 (8)
HCl	%3 (2)	%5 (4)	%2 (1)
Kalıntı	-	%0 (0)	-
Geri kazanım	%69 (8)	%101 (2)	%32 (9)

Reaktörlerde fosfor biyolojik çoğalmanın dışında, reaktör içinde ve EPS yapısında fizikokimyasal çökeltme/bağlanma ile uzaklaştırılmaktadır. Kimyasal bağlı fosforu belirlemek için uygulanan her iki metot da, R2'de R1'den daha fazla fosforun kimyasal çökeltme ve EPS yapısına bağlanarak uzaklaştırıldığını göstermiştir. NaOH ile ekstraksiyonda, R2'de R1'den tamamen farklı olarak; çözülmüş bağlı fosforun kompleks (organik) bağlı fosfordan yüksek çıkması; fosforun demir ilavesi ile çöktüğünü göstermiştir (Choi vd., 2009).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ca ve Mg gibi iki değerlikli katyonların aerobik granüler çamur oluşumunu hızlandırdığı ve aerobik granül çamur yapısını kuvvetlendirdiği (Yu vd. 2001, Jiang v.d. 2003, Ren v.d. 2008, Liu v.d. 2010); Fe ve Mg gibi iki değerlikli katyonların anaerobik granülasyonda polisakkarit üretimini artırarak granülasyonu desteklediği (Shen v.d. 1993, Veiga v.d. 1997, Yu vd. 2000) rapor edilmesine rağmen; Fe'in aerobik granülasyona etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada literatürdeki eksiklikleri tamamlayacak şekilde, aerobik granül çamur oluşumu ve stabilitesi üzerine Fe^{2+} 'nin etkisi, biri Fe^{2+} içermeyen diğeri 10mgFe/L Fe^{2+} içeren iki reaktörde incelenerek ve sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir:

- Fe^{2+} ilave edilmeyen aerobik granül çamur ile Fe^{2+} ilave edilen aerobik granül çamurun oluşumu aynı gün meydana gelmiştir. Bu sonuç, Ca^{2+} 'un aerobik granül çamur oluşumuna etkisinin incelendiği çalışmayla farklılık göstermektedir. Ca^{2+} 'nin aerobik granül çamur oluşumunu kısalttığı belirtilmiştir (Jiang vd.,2003).
- Aerobik granül oluşumu her iki reaktörde de aynı zamanda gerçekleşmesine rağmen, oluşan granüllerin boyutunda ve morfolojisinde belirgin farklılıklar gözlenmiştir. Fe^{2+} ilave edilen reaktörde olgun granüller 50. günde elde edilmiş ve işletme koşullarının değişimine bağlı bozulma dışında, stabil olarak kalmıştır. Fe^{2+} ilave edilmeyen reaktörde, aerobik granüller elde edilmesine rağmen; granül çamur filamentli ve gevşek yapısından dolayı belirli sürelerde bozularak tekrar büyüme eğilimi göstermiştir. Fe^{2+} ile beslenen granüller, Fe^{2+} eklenmeyen granüllerden daha iyi fiziksel özellikler, daha iyi çökebilme ve sıkışma özelliği ve daha kompakt bir yapı sergilemiştir. Çalışmamızda elde edilen granüller, R1'de açık sarı renkte, yuvarlak olmasına rağmen uçucu gevşek görümlü filamentli granüllerdir. Fe^{2+} ilave edilen reaktörde, koyu sarı-kahverengi renkte, düzgün yüzeyli, filamentli olmayan granüller elde edilmiştir. Bu bağlamda, Fe^{2+} 'in aerobik granül çamurun oluşumundan çok stabilitesi üzerinde pozitif etkiye sahip olduğu söylenebilir.
- Fe^{2+} ilave edilen granüllerin yüzeyi kesin hatlarla belirlenmiş, düzgün ve pürüzsüzdür. Düzgün ve stabil granüller Fe^{2+} ilavesinin, filamentli bakteri

oluşumunu baskılamasından kaynaklanmaktadır (Li, 2005; Oikonomidis v.d., 2010). Ancak, Fe^{2+} dozajının çok arttırıldığı floküler aktif çamurla yapılan çalışmalar, filamentlerin çok fazla baskılanmasının flok yapısı parçalanmasına sebep olduğunu göstermiştir (Oikonomidis v.d., 2010). Çalışmamızda kullanılan demir dozajı çok yüksek olmadığından böyle bir problemle karşılaşılmamıştır.

- Reaktöre Fe^{2+} ilavesinin aerobik granüllerin oluşumundaki etkisi bu çalışma ile ortaya koyulmuştur. Aktif çamura Fe^{2+} ve Fe^{3+} eklendiğinde, Fe iyonları ile biyofloklar arasındaki ilişki Oikonomidis vd. (2010) tarafından açıklanmıştır. Bizim çalışmamızda, aerobik granülasyonun başlangıcında ve granüllerin bozulup tekrar oluşumu döneminde gözlenen iplikli yapıların, $Fe(OH)_3$ 'ün zayıf flokülasyon etkisiyle oluşmuş açık floklar olduğu ve bunların zaman içinde granül çamura dönüştüğü; granül çamur ve iplikli yapılarda ışık mikroskobu ve ESEM de görüntüleme ile Fe ve TP ve ESEM-EDX analizleri ile kanıtlanmıştır. Fe^{+2} ilave edilmeyen granülün iç ve dış yapısında belirgin bir fark gözlenmezken; Fe^{2+} ilave edilen reaktörlerde elde edilen granüllerin iç yapısında dışına göre daha fazla Fe bulunması da, bu oluşum yaklaşımını doğrulamaktadır.
- Aerobik granül yapısındaki kimyasal çökeleklerin varlığı ESEM-EDX analizleri yanında, cold PCA metodu (de Haas v.d, 2000) ve Uhlmann v.d (1991) tarafından önerilen prosedür ile gösterilmiştir. Cold PCA metoduna göre, Fe^{+2} ilave edilen aerobik granüllerde edilmeyene göre daha fazla kimyasal bağlı fosfor bulunmuştur. Uhlmann prosedürüne göre de, Fe^{2+} ilave edilen granüllerde oluşan bu kimyasal çökeleklerin yarıdan fazlasının iki değerlikli metal oksitlerle bağlı fosfor olduğu belirlenmiştir.
- Fe^{2+} ilave edilen ve edilmeyen reaktörlerin her ikisinde de, ekstrakte edilen EPS yapısında polisakkarit miktarı protein miktarından çok daha yüksek çıkmıştır. EPS'deki polisakkarit miktarını, katyonların özellikle Ca^{2+} 'un (Jiang vd.,2003) ve nütrient eksikliğinin (Durmaz ve Sanin, 2001; Liu v.d, 2006; Bura v.d, 1998; Hoa v.d, 2003) arttırdığı belirtilmiştir. Her iki reaktöre beslenen sentetik atıksuyun Fe^{2+} hariç diğer bileşenlerinin aynı olması, polisakkarit miktarının iki reaktörde birbirine yakın çıkmasını açıklamaktadır. Bunun yanında, Fe^{2+} 'in EPS'deki protein miktarını arttırdığı bu çalışma ile gösterilmiştir.

- EPS'deki proteinlerin farklılığını ortaya koymak amacıyla SDS-PAGE yapılmıştır. SDS-PAGE'ye göre, Fe²⁺ ilave edilmeyen reaktörde 29 KDa - 66 KDa molekül ağırlığındaki proteinler fazla iken; Fe²⁺ ilave edilende molekül ağırlığı 66 KDa'dan büyük proteinler fazladır.
- Fe²⁺ ilave edilmeyen reaktörde hiçbir koşulda nitrifikasyon gerçekleşmemesine rağmen; Fe²⁺ ilave edilen reaktörde 42. günde nitrifikasyon başlamış, ancak 70. günden itibaren tam nitrifikasyon gerçekleşmiştir. Nitrifikasyon gözlenmeyen reaktöre, 1 mgFe/L Fe²⁺ ilavesinden bir hafta sonra, bu reaktörde de nitrifikasyon gerçekleşmiştir. Minimum Fe konsantrasyonu, *Nitrosomonas europaea* için 0,1 mgFe/L ve *Nitrobacter winogradsky* için 0,3 mgFe/L olarak belirlenmiştir (Meiklejohn, 1953). Nitrifikasyonun Fe ilavesiz reaktörde 195gün boyunca gerçekleşmemesi, Fe'in AOB ve NOB'ler için gerekli bir element olduğunu ortaya koymuştur.
- Fe²⁺ ilavesi nitrifikasyon yanında, kimyasal yolla fosfor gideriminde de olumlu etkiye sahip olmuştur. Fe²⁺ ilave edilmeyen reaktörde çıkış fosfor konsantrasyonu 5,4±1,3 mgPO₄-P/L ve 1mgFe/L Fe²⁺ ilavesi ile 4,1±1,3 mgPO₄-P/L iken; 10 mgFe/L Fe²⁺ ilave edilen reaktörde 1,44±0.76 mgPO₄-P/L elde edilmiştir.
- Sonuç olarak, çalışmada denenen 10 mgFe/L Fe²⁺ ilavesi aerobik granüllerin daha kompakt ve stabil olmasına ilave olarak; nitrifikasyonda ters etkiye sebep olmadan, fosfor giderimini arttırarak sistemde nutrient giderimine destek olmuştur. Bu nedenle, aktif çamur/ aerobik granül çamurla teknolojisi kullanılan sistemlerde hem biyoflok/granül yapısını güçlendirmede hem de nutrient gideriminde düşük dozlarda Fe ilavesi biyolojik fosfor giderimine alternatif olabileceği görülmektedir.
- Bu çalışma aerobik granül çamurun oluşumu, yapısı ve stabilitesine Fe ilavesinin etkisi laboratuvar koşullarında evsel atıksu karakterizasyonunu yansıtan sentetik atıksu kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, aerobik granül çamur teknolojisinin tam ölçekli tesislere uygulanmadan önce, gerçek evsel ve endüstriyel atıksu kullanılarak pilot ölçekli çalışmalarla yerinde artırılması önerilmektedir. Böylece aerobik granül çamur teknolojisinin tam

ölçekli sistemlere uygulanabilirliği gösterilmiş ve bu yeni teknolojiye olan güven arttırılmış olacaktır.

KAYNAKLAR

- ARAKI N., YAMAGUCHI T., YAMAZAKI S., HARADA H., 2004, Quantification of *amoA* Gene Abundance and Their *amoA* mRNA Levels in Activated Sludge by Real-time PCR, *Water Sci. Technol.*, 50(8), 1-8.
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K., 1989, Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, USA.
- BANU J. RAJESH, DO KHAC-UAN, YEOM ICK-TAE, 2008, Effect of Ferrous Sulphate on Nitrification During Simultaneous Phosphorus Removal From Domestic Wastewater Using A Laboratory Scale Anoxic/Oxic Reactor, *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 2981-2986.
- BLOOM, H., BEIER, H., GROSS, H. S., 1987, Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis*, 8: 93-99.
- BRDJANOVIC D, C.M. HOOIJMANS, M.C.M. VAN LOOSDRECHT, G.J. ALAERTS, J.J. HEIJNEN, 1996, The Dynamic Effects of Potassium Limitation on Biological Phosphorus Removal, *Wat. Res.*, 30, 2323-2328
- BRONS H.J., HAGEN W.R., ZEHNDER A.J.B., 1991, Ferrous Iron Dependent Nitric Oxide Production in Nitrate Reducing Cultures of *Escherichia coli.*, *Arch. Microbiol.*, 155, 341-347
- BRUUS JH, NIELSEN PH, KEIDING K., 1992, On the Stability of Activated Sludge Floes With Implications to Dewatering, *Water Research*, 26, 1597-1604
- BURA R., CHEUNG M., LIAO B., FINLAYSON J., LEE B.C., DROPPA I.G., LEPPARD G.G., AND LISS S.N., 1998, Composition of Extracellular Polymeric Substances in the Activated Sludge Floc Matrix. *Wat. Sci. Tech.*, 37 (4-5), 325-333.
- COUSIN CP, GANCZARCZYK JJ., 1998, Effects of Salinity on Physical Characteristics of Activated Sludge Floes, *Water Quality Research*, 33, 565-571
- DAIMS, H., NIELSEN J.L., NIELSEN P.H., SCHLEIFER K.H., WAGNER M., 2001, In Situ Characterization of Nitrospira-like Nitrite-oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5273-5284.
- DAVID C. SOBECK, MATTHEW J. HIGGINS, 2002, Examination Of Three Theories For Mechanisms of Cation-Induced Bioflocculation, *Water Research*, 36, 527-538

- DE FREITAS J. M., MENEGHINI R., 2001, Iron and Its Sensitive Balance in the Cell, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475, (1-2), 153-159.
- DE HAAS, D., WENTZEL, M.C., EKAMA, G.A., 2000, The Use of Simultaneous Chemical Precipitation in Modified Activated Sludge Systems Exhibiting Biological Excess Phosphate Removal Part 2: Method Development for Fractionation of Phosphate Compounds in Activated Sludge, *Water SA*, 26, (4), 453-465.
- DE KREUK M.K., KISHIDA N., TSUNEDA S., VAN LOOSDRECHT M.C.M., 2010, Behavior of Polymeric Substrates in an Aerobic Granular Sludge System, *Water Research*, 44, (20), 5929-5938
- DEGRANGE V., BARDIN R., 1995, Detection and Counting of Nitrobacter Populations in Soil by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2093-2098.
- DIONISI H.M., LAYTON A.C., HARMS G., GREGORY I.R., ROBINSON K.G., SAYLER G.S., 2002, Quantification of Nitrosomonas Oligotropha-like Ammonia-oxidizing Bacteria and Nitrospira spp. from Full-scale Wastewater Treatment Plants by Competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 245-253.
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F., 1956, Colorimetric Method for the Determination of Sugar and Related Substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356.
- DURMAZ B., SANIN F.D., 2001, Effect of Carbon to Nitrogen Ratio on the Composition of Microbial Extracellular Polymers in Activated Sludge. *Wat. Sci. Tech.*, 44 (1), 221-229.
- DÜLEKGÜRGEN E., 2006, Hidrolik ve/veya Metabolik-Seçme Baskıları Etkisiyle Aerobik Granülasyon Oluşumu ve Biyolojik Aşırı Fosfor Giderimindeki (BAFG) Uygulamaları, Tez (Doktora), İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- ERIKSSON L., ALM B., 1991, Study of Flocculation Mechanisms by Observing Effects of a Complexing Agent on Activated Sludge Properties, *Water Science Technology*, 24, 21-28.
- FROLUND B., PALMGREN R., KEIDING K., NIELSEN P.H., 1996, Extraction of Extracellular Polymers from Activated Sludge Using a Cation Exchange Resin, *Water research*, 30 (8), 1749-1758.

- HE S, GALL D, MCMAHON K., 2007 “*Candidatus Accumulibacter*” Population Structure in Enhanced Biological Phosphorus Removal Sludges as Revealed by Polyphosphate Kinase Genes. *Appl Environ Microbiol.*, 73: 5865–5874.
- HIGGINS M., NOVAK JT., 1997, Dewatering and Settling of Activated Sludges: the Case for Using Cation Analysis, *Water Environ. Research*, 69, 225-233
- HOA P.T., 2002, Effect of Nutrients on Extracellular Polymeric Substance Production and Sludge Characteristics. M. Sc., Asian Institute of Technology, School of Environment, Resources and Development, Thailand.
- HULLEBUSCH ERIC D. VAN GIETELING JARNO, DAELE WIM VAN, DEFRANCQ JAQUES, LENS PIET N.L., 2007, Effect of Sulfate and Iron on Physico-chemical Characteristics of Anaerobic Granular Sludge, *Biochemical Engineering Journal*, 33, 168-177.
- IOANNIS OIKONOMIDIS, LAURA J. BURROWS, CYNTHIA M. CARLIELL MARQUET, 2010, Mode of Action of Ferric and Ferrous iron Salts in Activated Sludge, *J Chem Technol Biotechnol*, 1-10.
- JIANG HE-LONG, TAY JOO-HWA, LIU YU & TIONG STEPHEN – TAY LEE, 2003, Ca²⁺ Augmentation for Enhancement of Aerobically Grown Microbial Granules in Sludge Blanket Reactors, *Biotechnology Letters*, 25, 95-99.
- JIUYI LI, 2005, Effects of Fe (III) on Floc Characteristics of Activated Sludge, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 313-319.
- JUANG Y C, SUNIL S. ADAV, DUU-JONG LEE, JOO-LIWA TAY, 2010, Stable Aerobic Granules for Continuous-flow Reactors: Precipitating Calcium and Iron Salts in Granular Interiors, *Bioresource Technology*, 101, 8051-8057
- JURETSCHKO S., TIMMERMANN G., SCHMID M., SCHLEIFER K.H., POMMERENING-ROSER A., KOOPS H.P., WAGNER M., 1998, Combined Molecular and Conventional Analyses of Nitrifying Bacterium Diversity in Activated Sludge: *Nitrosococcus Mobilis* and *Nitrospira*-like Bacteria as Dominant Populations, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3042-3051.
- KAETZKE A., JENTZSCH D., ESCHRICH K., 2005, Quantification of *Microthrix Parvicella* in Activated Sludge Bacterial Communities by Real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 40:207–211.

- KARA F., 2007 Investigation of Sodium and Potassium Ions in Relation to Bioflocculation of Mixed Culture Microorganisms, Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ Biyoteknoloji Bölümü.
- KARPUZCU M., 2004, *Çevre Kirlenmesi ve Kontrolü*, İstanbul, 975-7663-10-7
- LIN LIU, DA-WEN GAO, MIN ZHANG, YUAN FU, 2008, Comparison of Ca²⁺ and Mg²⁺ Enhancing Aerobic Granulation in SBR, *Journal of hazardous materials*.
- LIU Y, JOO-HWA TAY, 2004, State Of The Art Of Biogranulation Technology For Wastewater Treatment, *Biotechnology Advances*, 22, 533-563.
- LIU YONG-QIANG, MOY BENJAMIN, KONG YUN-HUA, TAY JOO-HWA, 2010, Formation, Physical Characteristics and Mikrobiyal Community Structure of Aerobic Granules in a Pilot-Scale Squencing Batch Reactor For Real Wastewater Treatment, *Enzyme and Mikrobial Technology*, 46, 520-525.
- LUCKERA S, WAGNERA M, MAIXNERAF, PELLETIERBE, KOCHA H, VACHERIEB B, RATTEIE T, DAMSTÉF JSS, SPIECKG E, LE PASLIERB D, DAIMSA H, A Nitrospira Metagenome Illuminates the Physiology and Evolution of Globally Important Nitrite-oxidizing Bacteria, PNAS, doi/10.1073/pnas.1003860107, 1-6, 2010.
- MAĞDEN ALEKSANYAN K., 2009, Aerobik Granül Çamurun Oluşumu ve Yapısının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi
- MEIKLEJOHN J., 1953, Iron and the Nitrifying Bacteria *J. Gen. Microbiol.* 8, 58-65.
- MURTHY SN., NOVAK JT., 2001, Influence of Cations on Activated Sludge Effluent Quality, *Water Environ. Research*, 73, 30-36
- MUYZER G, TESKE A, WİRSEN C.O., JANNASCH H.W., 1995, Phylogenetic Relationships of *Thiomicrospira* Species and Their Identification in Deepsea Hydrothermal Vent Samples by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of 16S rDNA Fragments, *Arch. Microbiol.* 164: 165–171.
- MUYZER G., WAAL E.C.D., UITTERLINDEN A.G., 1993, Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- NIELSEN PH., KEIDING K., 1998, Disintegration of Activated Sludge Flocs in Presence of Sulfide, *Water Res.*, 32, 313-320

- NOVAK JT., MULLER CD., MURTHY SN., 2001, Floc Structure and the Role of Cations, *Water Science Technology*, 44, 209-213
- OIKONOMIDIS, I, BURROW, L. J., CARLIELL-MARQUET, C. M., 2010, Mode of Action of Ferric and Ferrous Iron Salts in Activated Sludge, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*
- ÖZER, M., ORHAN, M., 2007, Lazer kırınım yöntemiyle zeminlerin tane büyüklüğü dağılımının belirlenmesi: genel ilkeler ve örnek hazırlama yöntemi, *Gazi Üni. Müh. Mim. Fak. Der.*, 22 (2), 217-226.
- PHILIPS S., RABAEY K., VERSTRAETE W., 2003, Impact of Iron Salts on Activated Sludge and Interaction with Nitrite or Nitrate, *Biosource Technology*, 88, 229-239
- ROTTTHAUWE JH, WITZEL KP, LIESACK W., 1997, The Ammonia Monooxygenase Structural Gene amoA as a Functional Marker: Molecular Fine-scale Analysis of Natural Ammonia-oxidizing Populations. *Appl Environ Microbiol* 63:4704–4712.
- SHENG GUO-PING, YU HAN-QING, LI XIAO-YAN, 2010, Extracellular Polymeric Substances (EPS) of Microbial Aggregates in Biological Wastewater Treatment Systems: A Review, *Biotechnology Advances*, 28, 882-894
- SUNIL S. ADAV, DUU-JONG LEE, KUAN YEOW SHOW, JOO-HWA TAY, 2008, Aerobic Granular Sludge: Recent Advances, *Biotechnology Advances*, 26, 411-423
- TOPALOĞLU D., DERE T., ILERI R., 2009, Eysel Atıksuyun Ardaşık Kesikli Biyoreaktör ile Arıtılması: Deneysel ve Modelleme, *SAÜ. Fen Bilimleri Dergisi*, 13, (1), 67-74.
- UHLMANN, D., ROSKE, I., HUPFER, M., OHMS, G., 1990, A Simple Method to Distinguish Between Polyphosphate and Other Phosphate Fractions of Activated Sludge, *Wat. Res.*, 24 (11), 1355-1360.
- UNIVERSITY OF CALIFORNIA MERCED, 2007, <http://imf.ucmerced.edu/>
- UYGUR A, KARGI F, BAŞKAYA H S, 2003, Ardaşık Kesikli Reaktör ile Nutrient Gideriminde Farklı Karbon Kaynaklarının Etkileri, *DEÜ Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5, (1), 9-16
- VERVAEREN H., DE WILDE K., MATTHYS J., BOON N., RASKIN L. VERSTRAETE W., 2005, Quantification of an Eikelboom type 021N Bulking Event with Fluorescence in Situ Hybridization and Real-time PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, (5): 695-704.

WALKER, J.M., 2002, *The Protein Protocols Handbook*, Second Edition, Humana Pres.

WANG Z.W., Y. LI, Y. LIU, 2007, Mechanism of Calcium Accumulation in Acetate-Fed Aerobic Granule, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74, 467-473

WANG, Z.W. LIU, Y.L., TAY, J.H., 2005, Distribution of EPS and Cell Surface Hydrophobicity in Aerobic Granules, *Applied microbiology biotechnology*, 69 (4), 469-473.

WARNECKE F., AMANN R., PERNTHALER J., 2004, *Actinobacterial* 16S rRNA Genes from Freshwater Habitats Cluster in Four Distinct Lineages. *Environ Microbiol* 6: 242–253.

WUHRMANN K., 1968, Objective Technology and Results of Nitrogen and Phosphorus Removal Processes, in *Advances in Water Quality Improvement*, ed by GLOYNA EF., ECKENFELDER EE., University of Texas, Austin, pp, 21-29

YILMAZ G, LEMAIRE R, KELLER J, YUAN Z, 2007, Simultaneous Nitrification, Denitirification and Phosphorus Removal From Nutrient-Rich Industrial Wastewater Using Granular Sludge, *Biotechnology and Bioengineering*, 100, (3),529-541

ZIRA A., HERMANSSON M., Effects of Ionic Strenght on Bacterial Adhesion and Stability of Flocs in a Wastewater Activated Sludge System, *Appl. Environmental Microbiology*, 60, (1994), 3041-3048

<http://arsiv.mmo.org.tr/pdf/10093.pdf> (Ziyaret Tarihi: 20 Kasım 2010)

<http://web.deu.edu.tr/fmd/s13/13-2.pdf> (Ziyaret Tarihi: 20 Kasım 2010)

EKLER

Ek-1

Stok BSA çözeltisi 2 mg/mL konsantrasyonda hazırlanır. Protein konsantrasyonu tayininde kullanılan standartların hazırlanması ve yapılan seyreltmeler.

Protein Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)	Stok çözelti (μL)	Destile su (μL)
0	0	500
10	2,5	498
20	5	495
50	12,5	488
100	25	475
200	50	450
500	125	375
1000	250	250

Ek-2

Karbonhidrat konsantrasyonu tayininde stok çözeltinin hazırlanması ve yapılan seyreltmeler

Karbonhidrat Konsantrasyonu ($\mu\text{g/2ml}$)	Stok çözelti (μL)
10	0,5/100 ml
20	1/100 ml
30	1,5/100 ml
40	2/100 ml
50	2,5/100 ml
60	3/100 ml
70	3,5/100 ml
80	4/100 ml

Stok çözelti hazırlamak için 0,25 g alginat tartılır ve hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanır.

ÖZGEÇMİŞ

Ümit BOZKURT 1986 yılında Tunceli’nde doğdu. İlk ve orta öğretimini Kocaeli’de Pektim İlköğretim Okulu’nda tamamladı. Lise eğitimini 2004 yılında Körfez Oruç Reis Anadolu Lisesi’nde tamamladıktan sonra aynı yıl içerisinde Çukurova Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümünü kazandı. Lisans eğitimi boyunca Kocaeli Çevre İl Müdürlüğü çevre yönetimi şube müdürlüğünde, Tüpraş İzmit Rafinerisi atıksu arıtma tesisi ve analiz laboratuvarında ve Erasmus öğrencisi olarak gittiği Yunanistan’da Zakynthos evsel atıksu arıtma tesisinde stajlarını yaptı. 2008 yılında tamamladığı lisans eğitiminin ardından 2009 yılında İstanbul Üniversitesi Çevre Mühendisliği bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı. Aynı zamanda Petnak Lojistik ve Tic. Ltd. Şti.’nde 8 ay süreyle iş sağlığı ve güvenliği sorumlusu olarak çalıştı.