

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ÇOKLU TETRASİKLİN GRUBU KARIŞIMININ
HİDROJEN VE OKSİJENE DAYALI MEMBRAN
BİYOFİLM REAKTÖRLERİNDE GİDERİMİ

Meriç YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Anabilim Dalı: Çevre Teknolojisi
Danışman: Prof. Dr. Halil HASAR

HAZİRAN-2016

**T.C.
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇOKLU TETRASİKLİN GRUBU KARIŞIMININ HİDROJEN VE
OKSİJENE DAYALI MEMBRAN BİYOFİLM
REAKTÖRLERİNDE GİDERİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Meriç YILMAZ
132112101

**Çevre Teknolojisi Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Halil HASAR**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07.06.2016

HAZİRAN-2016

T.C.
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇOKLU TETRASİKLİN GRUBU KARIŞIMININ HİDROJEN VE
OKSİJENE DAYALI MEMBRAN BİYOFİLM
REAKTÖRLERİNDE GİDERİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Meriç YILMAZ

132112101

Çevre Teknolojisi Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Halil HASAR

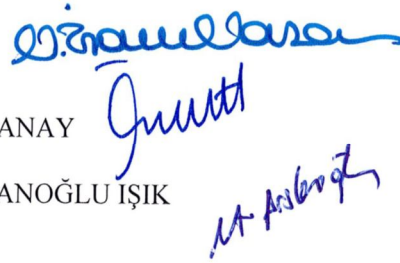
Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07 Haziran 2016

Tezin Savunulduğu Tarih : 01 Temmuz 2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Halil HASAR

Diğer Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Özge (KAYA) HANAY

Yrd. Doç. Dr. Hilal ARSLANOĞLU IŞIK



Haziran-2016

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyerek destek olan değerli hocam Prof. Dr. Halil HASAR' a içtenlikle teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmam boyunca bilgilerinden faydalandığım Yrd. Doç. Dr. Ergin TAŞKAN' a göstermiş olduğu sabır ve hoşgörü için teşekkür ederim.

Lisans döneminden bugüne kadar desteği ile her zaman yanımda hissettiğim arkadaşım Hande TÜRK' e, her koşulda yanımda olan anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, 111Y261 numaralı TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	III
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
ABSTRACT	VIII
TABLO LİSTESİ.....	IX
ŞEKİL LİSTESİ.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR	XI
1. GİRİŞ	1
2. TETRASİKLİN GRUBU ANTİBİYOTİKLERİNİN GİDERİM ÇALIŞMALARI	2
3. MEMBRAN BİYOFİLM REAKTÖRLER.....	5
3.1. Hidrojene Dayalı Membran Biyofilm Reaktörü.....	5
3.2. Oksijene Dayalı Membran Biyofilm Reaktörü	6
4. MATERYAL VE METOT	9
4.1. Membran Biyofilm Reaktörü (MBfR).....	9
4.2. Reaktörlerin İşletim Sürecine Alınması.....	10
4.3. Sentetik Besleme Suyu	10
4.4. Çoklu Antibiyotik Karışım Çözeltisi.....	12
4.5. İşletme Şartları	12
4.6. Analizler.....	12
4.6.1. Kimyasal Analizler	12
4.6.2. Moleküler Analizler.....	14
4.7. Kirlenici Akı Hesabı.....	18
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	20
5.1 Hidrojene Dayalı Membran Biyofilm Reaktör Sonuçları.....	20
5.1.1. Sistem Performansı.....	20
5.1.2. Akı Sonuçları	24
5.2. Oksijene Dayalı Membran Biyofilm Reaktör Sonuçları	27
5.2.1. Sistem Performansı.....	27
5.2.2. Akı Sonuçları	31
5.3. Moleküler Sonuçlar	33

6.	SONUÇLAR	36
	KAYNAKLAR.....	37
	ÖZGEÇMİŞ.....	42



ÖZET

Tetrasiklin antibiyotikler (TCs) yaygın olarak insan tedavisi, hayvan tedavisi ve tarımda kullanılan geniş spektrumlu antimikrobiyal bileşiklerdir. Bu çalışmada hem H_2 'ye hem de O_2 'ye dayalı MBfR'larda eş zamanlı tetrasiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin ve azotlu bileşiklerin giderimi çalışılmıştır. Hidrojene dayalı MBfR'da eş zamanlı olarak TC, OTC, CTC ve NO_3^- giderimi çalışılırken, oksijene dayalı MBfR' de eş zamanlı olarak TC, OTC, CTC ve NH_4 giderimi çalışılmıştır. Reaktörler 4 psi gaz basıncında ve 1-10 saat arasında değişen HRT' lerde işletilmiştir. Ayrıca çalışma sonuçlarına göre antibiyotik giderim verimleri, akı değerleri, hidrojen ve oksijen eşdeğer akıları hesaplanmıştır.

Çalışma sonuçlarına göre H_2 -MBfR' de 10 saatlik HRT' de antibiyotik giderim oranları TC, OTC ve CTC için sırasıyla %93, % 91 ve % 99 olarak bulunmuştur. HRT 5 saate düşürüldüğünde giderim oranları sırasıyla % 66, % 69 ve % 91 'e düşmüştür ve HRT 1 saate alındığında antibiyotik giderim oranları belirgin düşüşler göstererek TC, OTC ve CTC için sırasıyla % 14, % 24, % 42 olarak hesaplanmıştır. Akı değerleri 10 saatlik hidrolik bekleme süresinde ortalama TC akısı $2,23 \text{ mg/m}^2.\text{gün}$, ortalama OTC akısı $2,52 \text{ mg/m}^2.\text{gün}$ ve ortalama CTC akısı $2,87 \text{ mg/m}^2.\text{gün}$ olarak bulunmuştur. 1 saatlik HRT değerinde akı ve hidrojen eşdeğer akıları artış göstererek TC, OTC ve CTC ortalama akıları sırası ile $4,08 \text{ mg/m}^2.\text{gün}$, $6,72 \text{ mg/m}^2.\text{gün}$, $12,12 \text{ mg/m}^2.\text{gün}$ olarak bulunmuştur.

O_2 -MBfR' de yapılan çalışma sonuçlarına göre ortalama TC giderim verimi %53, ortalama OTC giderim verimi %55, ortalama CTC giderim verimi % 71 olarak bulunmuştur. 5 saatlik hidrolik bekleme süresinde TC, OTC ve CTC ortalama giderim verimleri sırası ile % 21, % 37 ve % 45 olarak bulunmuştur. HRT 1 saate düşürüldüğünde giderim verimleri daha da kötüleşerek % 7, % 24 ve % 32 olarak bulunmuştur. 10 saatlik hidrolik bekleme süresinde çoklu antibiyotik karışımındaki ortalama TC akısı $1,57 \text{ mg/m}^2.\text{gün}$, ortalama OTC akısı $1,61 \text{ mg/m}^2.\text{gün}$ ve ortalama CTC akısı $2,08 \text{ mg/m}^2.\text{gün}$ bulunmuştur. 1 saatlik HRT değerinde ise TC, OTC ve CTC ortalama akıları sırası ile $1,92 \text{ mg/m}^2.\text{gün}$, $7,08 \text{ mg/m}^2.\text{gün}$, $9,36 \text{ mg/m}^2.\text{gün}$ olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Membrane Biofilm Reactor, Tetrasiklin, Oksitetrasikline, Klortetrasikline, Giderim Akısı, Eşdeğer Akı

ABSTRACT

Removal of Multiple Tetracyclines Mixture in Hydrogen and Oxygen Based Membrane Biofilm Reactors

Tetracycline antibiotics are broad spectrum antimicrobial compounds used commonly in human and animal treatment and agriculture. In this study, it has been studied the simultaneous removal of triple antibiotic mixture including tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline by using either H_2 - based MBfR or O_2 -based MBfR. While H_2 - MBfR was to remove NO_3^- and TCs mixture under denitrification conditions, O_2 -MBfR was to oxidize NH_4^+ and to degrade TCs mixture under nitrification conditions. Both MBfRs were operated at gas pressure of 4 psi and HRTs between 1 and 10 hr. From experimental results, removal rates, contaminant's fluxes and hydrogen and oxygen equivalent fluxes have been computed.

After H_2 -MBfR achieved to the adaptation of microbial activities, while removal rates were obtained to be 93 % for TC, 91 % for OTC and 99 % for CTC at 10 hr, it decreased with decreasing of HRT, 66 % for TC, 69 % for OTC and 91 % for CTC at 5 hr. At HRT of 1 hr, antibiotic removals decreased dramatically to 14 %, 24 %, and 42 %, respectively. On the other hand, the fluxes of TC, OTC and CTC were respectively computed to be 2.23 mg/ $m^2.d$, 2.52 mg/ $m^2.d$ and 2.87 mg/ $m^2.d$ at 10 hr, respectively. At HRT of 1 hr, antibiotic fluxes were on average 4.08 mg TC/ $m^2.d$ for TC, 6.72 mg OTC/ $m^2.d$ for OTC and 12.12 mg CTC/ $m^2.d$ for CTC.

When O_2 -MBfR was operated at 10 hr, the removal rates were found as 53 % of TC, 55 % of OTC and 71 % of CTC. With decreasing HRT three TCs removal decreased dramatically to 21 %, 37 % and 45 % at 5 hr, and 7 %, 24 % and 32 % at 1 hr, respectively. The fluxes of TC, OTC and CTC were respectively 1.57 mg TC/ $m^2.d$, 1.61 mg OTC/ $m^2.d$ and 2.08 mg CTC/ $m^2.d$ at 10 hr. The fluxes increased with a decrease in HRT due to increasing the loading rates although the performance deteriorated dramatically. At 1 hr HRT fluxes were on average 1.92 mg TC/ $m^2.d$, 7.08 mg OTC/ $m^2.d$ and 9.36 mg CTC / $m^2.d$, respectively.

Key words: Membrane Biofilm Reactor, Tetracycline, Oxytetracycline, Chlortetracycline, Removal Flux, Equivalent Flux

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Tetrasiklinlerin pKa değerleri	2
Tablo 4.1. Membran biyofilm reaktör modülünün fiziksel özellikleri.....	10
Tablo 4.2. H ₂ -MBfR sentetik besleme suyu içeriği	11
Tablo 4.3. O ₂ -MBfR sentetik besleme suyu içeriği.....	11
Tablo 4.4. Eser mineral çözelti içeriği	11
Tablo 4.5. Hidrojene ve oksijene dayalı membran biyofilm reaktöründe işletme şartları ..	12
Tablo 4.6. HPLC cihazı için analiz değerleri.....	13
Tablo 4.7. PCR analizi için kullanılan malzemeler.....	15
Tablo 4.8. PCR işleminde kullanılan primerlerin baz dizilimleri.....	16
Tablo 5.1. Mikroorganizma sınıfları ve benzerlik oranları	34

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.1.	Membran biyofilm reaktör düzeneği	9
Şekil 4.2.	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)	13
Şekil 4.3.	Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) cihazı	15
Şekil 4.4.	Yatay Elektroforez Cihazı.....	16
Şekil 4.5.	Jel Görüntüleme Cihazı.....	17
Şekil 4.6.	DGGE cihazı	18
Şekil 5.1.	H ₂ -MBfR' de TC, OTC, CTC giriş ve çıkış konsantrasyonları	21
Şekil 5.2.	H ₂ -MBfR' de TC, OTC, CTC giderim verimleri	21
Şekil 5.3.	H ₂ -MBfR' de reaktör giriş ve çıkışındaki nitrit- nitrat değişimi	22
Şekil 5.4.	H ₂ -MBfR' de denitrifikasyon verimi.....	22
Şekil 5.5.	H ₂ -MBfR' de NO ₃ ⁻ -N yüzeysel yük ve akısı.....	24
Şekil 5.6.	H ₂ -MBfR' de NO ₃ -N eşdeğer akısı	25
Şekil 5.7.	H ₂ -MBfR' de TC, OTC, CTC yüzeysel yük ve akısı	25
Şekil 5.8.	H ₂ -MBfR' de TC, OTC, CTC eşdeğer akıları.....	26
Şekil 5.9.	O ₂ -MBfR' de TC, OTC, CTC giriş ve çıkış konsantrasyonları	29
Şekil 5.10 .	O ₂ -MBfR' de TC, OTC, CTC giderim verimleri.....	30
Şekil 5.11.	O ₂ -MBfR' de reaktör giriş ve çıkışındaki amonyum- nitrat değişimi.....	30
Şekil 5.12.	O ₂ -MBfR' de NH ₄ -N yüzeysel yük ve akısı	32
Şekil 5.13.	O ₂ -MBfR' de NH ₄ -N oksijen eşdeğeri akısı	32
Şekil 5.14.	O ₂ -MBfR' de TC, OTC, CTC yüzeysel yük ve akısı	33
Şekil 5.15.	O ₂ -MBfR' de TC, OTC, CTC oksijen eşdeğer akıları	33
Şekil 5.16.	H ₂ -MBfR ve O ₂ -MBfR sistemindeki mikroorgazma sınıfları	34

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Alan
BOİ	: Biyolojik oksijen ihtiyacı
CTC	: Klortetrasiklin
DGGE	: Denatüre gradyan jel elektroforezi
EACTC	: 4-Epi- Anhidroklortetrasiklin
EATC	: 4-Epi anhidrotetrasiklin
ECTC	: 4-Epi- Klortetrasiklin
H₂-MBfR	: Hidrojene dayalı membran biyofilm reaktör
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HRT	: Hidrolik bekleme süresi
J_s	: Akı
K_d	: Kimyasal denge sabiti
KOİ	: Kimyasal oksijen ihtiyacı
MBfR	: Membran biyofilm reaktör
ng	: Nanogram
NH₄-N	: Amonyum azotu
NO₂-N	: Nitrit azotu
NO₃-N	: Nitrat azotu
O₂-MBfR	: Oksijen esaslı membran biyofilm reaktör
OTC	: Oksitetrasiklin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PKA	: İyonlaşma Sabiti Eksi Logaritması
ppb	: Milyarda bir ölçü birimi
ppm	: Milyonda bir ölçü birimi
psi	: İnç kareye pound olarak uygulanan basınç (1psi = 0.068 atm)
Q	: Debi
S_L	: Yüzeysel yük
st	: Saat
TC	: Tetrasiklin
TCs	: Tetrasiklin antibiyotikler

1. GİRİŞ

Dünya genelinde uzun zamandan beridir insan ve hayvanlar için tedavi edici bileşikler olarak kullanılan farmasotikler, sucul ortamlarda düşük miktarda bulunmalarına rağmen, uzun dönemde sucul ve karasal organizmalar için potansiyel bir risk oluşturmaktadır. Bu farmasotikler arasında tetrasiklin grubu bileşikler, insan ve özellikle çiftlik hayvanlarının hastalıklarını önlemek ve gelişimlerini arttırmak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Günümüzde hayvan yetiştiriciliği faaliyetleri sonucunda su ortamlarında tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klortetrasiklin bileşiklerine yaygın bir şekilde rastlanmaktadır. Eser konsantrasyonlarda bile bu bileşiklerin insanlar ve hayvanlar üzerinde fizyolojik etkilerinden şüphelenilmektedir. Biyolojik parçalanmaya karşı dirençlerinden dolayı genelde klasik arıtma tesislerinden herhangi bir bozunmaya uğramadan çıkarlar. Bu durum, biyolojik evsel atıksu arıtma tesislerinden önce veya sonra tetrasiklin grubu antibiyotikleri parçalayabilecek alternatif arıtım proseslerinin araştırılmasını gerekli kılmaktadır.

İleri biyolojik arıtma sistemlerinden olan Membran Biyofilm Reaktörleri gaz substratını etkili bir şekilde difüze eden sistemlerdir. Klasik biyofilm sistemlerinin aksine gaz difüzyon membranlarının biyofilm destekleme malzemesi olarak kullanıldığı MBfR sistemlerinde gaz substratı ile kirletici madde ters yönde hareket ettiğinden biyofilm tabakası sürekli aktif kalabilmektedir. Daha önce yürütülen çalışmalarda, MBfR sisteminin tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klortetrasiklin antibiyotiklerinin tekli olarak arıtılabildikleri kanıtlanmıştır (Taşkan, 2014; Çelik, 2015; Aydın, 2015). Ancak, sucul ortamlarda çoklu antibiyotik kalıntıları söz konusu olduğundan dolayı bu tez çalışmasında, MBfR sisteminde üç tetrasiklin bileşiğinin karışımı kullanılarak çoklu antibiyotik giderimi araştırılmıştır. Bu amaçla, MBfR sisteminde elektron verici olarak H_2 ve elektron alıcı olarak da tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klorotetrasiklin karışımı kullanılmıştır. Tetrasiklin bileşiklerinin biyolojik indirgenme, parçalanma hızı, giderim akısı, eşdeğer akıları kıyaslanmış ve PCR-DGGE ileri moleküler teknikler kullanılarak reaktördeki biyofilm topluluğu tanımlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, daha önceki çalışmalarda tekli TC antibiyotiklerinin giderimlerinin kanıtlandığı H_2 ve O_2 'li MBfR sisteminde, üçlü TC antibiyotik karışımlarının giderim potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. TETRASİKLİN GRUBU ANTİBİYOTİKLERİNİN GİDERİM ÇALIŞMALARI

Tetrasiklin grubu antibiyotikler (TCs) yaygın olarak insan ve hayvan tedavisi ve tarımda kullanılan geniş spektrumlu antimikrobiyal bileşikleridir (Kim ve Carlson, 2007; Li ve diğ., 2008; Zhang ve diğ., 2011). Aynı zamanda düşük maliyetleri nedeni ile hayvanlarda büyüme hızını arttırmak için gıda katkı maddesi olarak da kullanılmaktadırlar (Lin ve diğ., 2009). TCs yüzeysel sularda 0.11-4.20 µg/L arasında değişen konsantrasyonlarda tespit edilirken atıksu arıtma tesisinde bu konsantrasyonlar tetrasiklin için 46-1300 ng/L, oksitetrasiklin için 240 ng/L, klortetrasiklin için 270-970 ng/L arasında gözlenmiştir (Gao ve diğ., 2012; Lin ve diğ. 2009; Ternes ve diğ., 2002; Stackelberg ve diğ., 2007).

Tablo 2.1. Tetrasiklinlerin pKa değerleri

TCs	pKa1	pKa2	pKa3	Kaynak
Tetrasiklin	3.57	7.49	9.88	(Figueroa ve Mackay, 2005)
Klortetrasiklin	3.3	7.7	9.7	(Figueroa ve Mackay, 2005)
Oksitetrasiklin	3.6	7.52	9.88	(Tavares ve McGuffin, 1994)

Tetrasiklin molekülü çeşitli iyonlaşabilen fonksiyonel gruplara sahiptir ve bu molekülün yükü çözelti pH'sına bağlıdır (Sarmah ve diğ., 2006) Tetrasiklinler asidik ortamda nispeten karardır ancak bazik şartlar altında kararlı değildir ve her iki ortamda tuz oluştururlar (Sorensen ve diğ.,1998). Baz ve tuz şekilleri solüsyon halde değilken stabildir ancak solüsyonları yüksek ısıda veya alkali pH'da çabuk bozunur (Özalp, 2002). Nötral pH değerlerinde sulu çözelti karardır. pH 2.5 ve 25°C'de 30 gün bekleme süresinde OTC'nin %1'i bozunurken 37°C'de 5 gün içinde aynı oranda bozunmaktadır. pH 9'a yükseltildiğinde 2 saatlik sürede OTC'nin % 2'si ve 24 saatlik zamanda % 8'i bozunmaktadır. Stabilité hem pH hem de sıcaklığın fonksiyonudur. Hidroklorürlerin sulu çözeltileri pH 1-2.5 arasında 25 °C'de 30 gün karardır. pH 3-9 arasında depolanan çözeltilerde en az 30 gün boyunca 5°C'de potansiyel kaybı gözlenmez. Tetrasiklinlerin güneş ışığı ve UV dalga boylarına maruz kaldığı durumlarda bozunduğu ve β-

deoksitetrasiklin epimeri gibi inaktif bileşenler olduğu belirtilmiştir. Ancak, ayrışma derecesi ve oranlar kanıtlanmamıştır (URL-1, 2016).

Oksitetrasiklin molekülü dünyada ve ülkemizdeki su ürünleri işletmelerinde ve bakteriyel hastalıkların tedavisinde oldukça yaygın kullanılan Tetraksiklin grubuna dahil geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Oksitetrasiklin balıklardaki bakteriyel hastalıklara karşı oldukça etkili bir antibiyotik olmasına karşın, insan kullanımı açısından çeşitli yan etkileri nedeni ile tercih edilmemiştir. Oksitetrasiklin ile tedavi edilmiş balıkların arınma süresini tamamlamadan insan tüketimine sunulması bu antibiyotığın insan vücuduna geçmesi ve böylece yan etkilerin oluşmasına neden olabilmektedir (Özak, A.A., Cengizler, İ., 2001)

Klortetrasiklin bakteriyel protein sentezini inhibe ederek etki eder ve mikroorganizmalara karşı yüksek aktivite sebebi ile insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde kullanılmaktadır (Ji ve diğ., 2012). Atıksulardan CTC giderimi için çeşitli teknolojiler geliştirilmiştir. Özellikle UV bazlı ileri oksidasyon prosesiyle %100'e yakın giderim sağlanmıştır, ancak UV lambalarının büyük ölçekli kullanımı enerji açısından büyük bir yatırım gerektirmektedir (López ve diğ., 2010, Gómez-Pacheco ve diğ., 2012, Salazar-Rábago ve diğ., 2016).

Zhang ve diğ. (2016), 6 farklı antibiyotik grubunu temsil eden 28 antibiyotığın sudan giderilmesi için toz aktif karbon performansını araştırmışlardır. Antibiyotik grupları içinde tetrasiklinler (TCs), Macrolides (MCs), Chloramphenicols (CPs), Penicillins (PNs), Sulfonamides (SAs) ve Quinolones (QNs) bulunmaktadır. Çalışma sonuçlarında toz aktif karbonun bütün antibiyotikler için üstün adsorpsiyon kapasitesinin olduğu belirlenmiştir. 20 mg/L toz aktif karbon dozunda optimum şartlarda ve 20 dk temas süresinde deiyonize su içinde giderim veriminin % 99.9 ve yüzey suyunda % 99,6 kadar olduğu görülmüştür. Yapılan çalışma su kalitesini iyileştirmek ve antibiyotik kirliliğini kontrol etmek için toz aktif karbonun uygulanabilir bir seçenek olduğunu göstermiştir.

Hanay ve Türk (2013), nano ölçekli sıfır değerlikli demir (nZVI) kullanarak TC ve OTC arasındaki etkileşimi ve giderim etkinliğini araştırmışlardır. Deneysel değişkenler olarak pH, nZVI dozajı, temas süresi, giriş konsantrasyonları ve reaksiyon sıcaklığını kullanmışlardır. Psödo'nun ikinci dereceden modelini kullanarak, denge durumundaki adsorpsiyon kinetiklerine 2 saat içinde ulaşmışlardır. Adsorpsiyon davranışının TC türüne bakılmaksızın pH değerine bağlı olduğunu belirlenmiştir. TC'nin adsorpsiyon kapasitesi OTC'den daha fazladır. LC-MS/MS sonuçlarında ana dönüşüm ürünü 4-epi-tetrasiklin olarak belirlenmiştir ve OTC için kesin bir sonuç elde edilememiştir. Çalışma sonuçlarına

göre nZVI yüzeyinin kullanılması ile TC ve OTC giderim mekanizmalarında adsorpsiyon prosesinin degradasyon proseslerinden daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Liu ve diğ. (2016), Çin'de bir endüstriyel ölçekli içme suyu arıtma tesisinin arıtma işlemi sırasında altı yapay antibiyotiğin akıbetini araştırmışlardır. Sonuçlar tüm antibiyotiklerin etkili bir ileri arıtma prosesi ile giderilebilir olduğunu göstermiştir. Altı antibiyotiğin ortalama konsantrasyonları 1-43 ng/L arasında olup giderim verimleri; amoksisilin için % 85, tetrasiklin için % 92, oksitetrasiklin için % 86, sülfametoksazol, sulfametazin ve eritromisin için yaklaşık % 100 olarak belirlenmiştir. Tesiste uygulanan arıtma sistemlerinden en etkililerinin ozonlama ve biyolojik aktif karbon olduğu tespit edilmiştir.

Heidari ve diğ. (2011) anaerobik şartlar altında OTC giderimini araştırmışlardır. Ardışık kesikli reaktörde 1 günlük hidrolik bekleme süresinde 105 mg/L OTC tamamen bozunmuştur. Maksimum KOİ giderimi, 105 mg/L OTC konsantrasyonunda % 90 olarak bulunmuştur.

Liu ve diğ. (2016), ilk kez denitrifikasyon ile sülfat giderme prosesi üzerinde tetrasiklinin etkisini incelemişlerdir. 100 mg/L'den daha yüksek TC konsantrasyonlarında sülfat giderme oranı ve S^0 birikme oranı kötüleşmiştir.

3. MEMBRAN BİYOFİLM REAKTÖRLER

3.1. Hidrojene Dayalı Membran Biyofilm Reaktörü

Reaktör içinde yüksek yoğunluklu biyokütle birikimi ve bu biyokütleyi koruyabilme yetenekleri nedeni ile biyofilm proseslerine ilgi artmıştır (Nicolella ve diğ., 2000). Mevcut biyofilm işlemleri, taş, sünger taşı, koyu plastik veya plastik köpük gibi atıl bağlanma yüzeylerine dayanmaktadır (Nerenberg, 2016). Membran Biyofilm Reaktörler (MBfR) membran ve biyofilm kombinasyonundan oluşmaktadır. Kullanılacak olan arıtma metodu, membran teknolojisinin yeni bir uygulaması olup gaz transferini etkili bir biçimde sağlamaktadır. Bu sistemde kullanılan membranlar gaz transfer membranları olup gaz substratı membranın dış yüzeyinde tutunmuş halde bulunan biyofilme doğru difüze olmaktadır (Hasar, 2009).

Hidrojene dayalı membran biyofilm reaktörü, oksitlenmiş kirleticileri biyolojik olarak indirgeme özelliğine sahiptir ve elektron verici olarak hidrojenin kullanılması sebebi ile çeşitli avantajlar bulunmaktadır. H_2 gazı, karbon kaynağı olarak inorganik karbonu kullanan ototrofik bakteri tarafından oksitlenmektedir. Ototrofik bakterilerin organik karbona ihtiyaçları yoktur bu nedenle aşırı bir biyokütle üretimi söz konusu değildir. H_2 'nin insanlara toksik hiçbir etkisi bulunmamaktadır ve elektron kaynağı olarak kullanılması durumunda atık oluşumu da söz konusu değildir (Ritmann, 2008).

Hasar ve İpek (2010), sabit H_2 basıncı ve farklı nitrat yükleme oranlarında denitrifikasyon performansını incelemek için H_2 -MBfR kullanmışlardır. Çalışma sonunda hidrolik bekleme süresi 25 dakika olduğunda nitrat gideriminin % 98 olduğu, 0.2 atm hidrojen basıncında denitrifikasyon hızının $3.5 \text{ g N/ m}^2 \text{ gün}$, H_2 akısının ise $1.24 \text{ g } H_2 / \text{m}^2$ olduğunu belirlemişlerdir.

Taşkan (2014), tetrasiklin bileşiğinin biyolojik indirgenme mekanizmasını anlamak için H_2 - MBfR sisteminde elektron verici olarak H_2 , birinci elektron alıcı olarak nitrat ve ikinci elektron alıcı olarak tetrasiklin kullanmıştır. Yapılan bu çalışmada hidrojene dayalı membran biyofilm sistemde giderme verimi üzerinde; farklı tetrasiklin yüklerinin, farklı H_2 basıncının ve farklı hidrolik bekleme sürelerinin etkileri incelenmiştir. Çalışmada elde edilen en yüksek tetrasiklin giderimi % 85, denitrifikasyon verimi ise % 99' un üzerinde bulunmuştur.

Çelik (2014), hidrojene dayalı membran biyofilm reaktörde eşzamanlı oksitetrasiklin ve NO_3^- giderimi üzerinde çalışmıştır. Çalışma süresi boyunca H_2 -MBfR, 0,4- 0,5 ppm OTC ve 20 ppm $\text{NO}_3\text{-N}$ ile beslenmiştir. Reaktördeki hidrolik bekletme süresi 5-24 saat aralığında tutulmuştur ve hidrojen gazı basınçları 2-6 psi aralığındadır. Reaktörlerde OTC akısı 0,4-10 $\text{mg/m}^2 \cdot \text{g}$ olarak, $\text{NO}_3\text{-N}$ akısı ise 17,3-568 $\text{mg/m}^2 \cdot \text{g}$ olarak elde edilmiştir. Reaktörde parçalanma ürünleri olan epi - OTC, alpha - OTC, beta - OTC sırasıyla maksimum 1, 30, 23 ppb olarak bulunmuştur.

Aydın (2015), H_2 -MBfR sistemde eşzamanlı CTC ve azotlu bileşiklerin giderimi üzerine farklı hidrolik bekleme süreleri ve farklı H_2 kısmi basıncının etkisini incelemiş ve araştırılan şartlar altında 4-Epi- Klortetrasiklin, Anhidroklortetrasiklin ve 4-Epi- Anhidroklortetrasiklin gibi CTC parçalanma ürünlerinin varlığını belirlemiştir. Ayrıca, sistemde kullanılan membran yüzey alanları dikkate alınarak kirletici yüzey akıları ve giderim akıları hesaplanmıştır. Çalışma süresince H_2 -MBfR sistemi; 0.4-0.5 ppm CTC ve 20-25 ppm $\text{NO}_3\text{-N}$ ile beslenmiş, 2 – 6 psi H_2 gaz basıncı ve 1-15 saat hidrolik bekleme sürelerinde işletilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre eş zamanlı giderilen maksimum CTC ve $\text{NO}_3\text{-N}$ verimleri sırası ile % 96 ve % 99, CTC ve $\text{NO}_3\text{-N}$ maksimum kirletici yüzeysel yükleri ve giderim akıları sırasıyla 185.04 $\text{mg/m}^2 \cdot \text{g}$, 8280 $\text{mg/m}^2 \cdot \text{g}$ olarak bulunmuştur. ECTC, ACTC ve EACTC konsantrasyonları sırasıyla 28, 6 ve 1 ppb olarak bulunmuştur.

3.2. Oksijene Dayalı Membran Biyofilm Reaktörü

Hava ya da oksijene dayalı membran biyofilm reaktörler geleneksel kabarcık havalandırma sistemine kıyasla birçok avantaj sunar (Martin ve Nerenberg, 2012). Bu avantajlar şunlardır.

- Yüksek gaz besleme basıncı veya saf oksijen kullanıldığında, yüksek oranlarda gaz transfer hızı sağlandığından daha küçük tank boyutları elde edilir.
- Yüksek gaz aktarım verimliliği önemli ölçüde enerji tasarrufu sağlayabilir.
- Eşsiz mikrobiyal yapıyı desteklediğinden eşzamanlı KOİ ve N giderimi sağlanır.

Şahinkaya ve diğ. (2011), sülfidojenik anaerobik bir reaktör çıkışında sülfid oksidasyonu ve S^0 geri kazanımını incelemek için O_2 -MBfR kullanmışlardır. Çalışmada HRT, O_2 basıncı ve sülfat yükleme oranları değiştirilerek sülfid oksidasyonu verimi ve S^0 geri kazanımı incelenmiştir. Çalışma sonunda sülfid oksidasyonu ve S^0 geri kazanım verimi

sırası ile % 37-99, % 64-89 olarak bulunmuştur. Ayrıca membran tıkanması meydana gelmiş ve membran yüzeyinde sarı-yeşil renk oluşmuştur.

Hanay ve diğ. (2014), oksijene dayalı membran biyofilm reaktörde fenol oksidasyonunu araştırmıştır. Sisteme 4.7 mg/ m².gün fenol ve 55 mg/ m².gün glukoz eklendiğinde fenol ve glukozun en yüksek oksidasyon değerleri elde edilmiştir. Bu şartlar oksijen akışının en az 46 g O₂/ m².gün' de yeterli olduğunu ortaya koymuştur. Sadece fenol ile besleme durumunda fenol yüklemesi yaklaşık 5.6 g/m².gün ve O₂ akışı 13.4 g O₂/ m².gün' den daha yüksek olduğunda MBfR' da en yüksek fenol oksidasyonu elde edilmiştir. Yüksek fenol yüklemesi yüksek oksijen basıncı ile telafi edilebilmiştir ve 2.5 saat hidrolik bekleme süresi, 0.54 atm O₂ basıncı ve 5.6 g/m².gün fenol yüklemesi yapıldığında en iyi sistem performansı sağlanmıştır.

Kim ve diğ. (2013), oksijen esaslı membran biyofilm reaktör kullanarak farmasotiklerin ayrışması konusunda elektron eşdeğer akı değerlerini araştırmışlardır. Farmasotiklerin giriş konsantrasyonları sulfamethazine 40 ppb ve sulfathiazole 85 ppb'dir. Saf oksijen, hollow fiber membranlara borularla iletilmiştir ve oksijen basıncı 13 kPa' dır. HRT 3 saat tutulmuştur. Oksijene dayalı MBfR kullanarak elde edilen bozunma oranları sulfamethazine % 77 ve sulfathiazole % 87 olarak tespit edilmiştir.

Taşkan (2014), oksijene dayalı membran biyofilm reaktörde tetrasiklin bileşiğinin oksidasyon mekanizmasını anlamak için birinci elektron verici olarak amonyum, ikinci elektron verici olarak tetrasiklin ve elektron alıcı olarak oksijen gazı kullanmıştır. Yapılan çalışmada tetrasiklin bileşiğinin O₂-MBfR' de giderme verimi üzerine farklı tetrasiklin yüklerinin etkisi, farklı O₂ basıncının etkisi ve farklı hidrolik bekleme sürelerinin etkisi araştırılmıştır. Elde edilen en yüksek tetrasiklin giderimi yaklaşık olarak % 70 ve maksimum nitrifikasyon verimi % 99 olarak bulunmuştur.

Çelik (2014), oksijene dayalı membran biyofilm reaktörde eş zamanlı oksitetrasiklin ve NH₄-N giderimi üzerinde çalışmıştır. Çalışma boyunca O₂'li reaktörler 0,1-0,4 ppm aralığında OTC ve 20 ppm NH₄ ile beslenmiştir. Reaktörün oksijen gazı basıncı 2-6 psi aralığında tutulmuş ve reaktörlerin hidrolik bekleme süreleri 7,5-24 saat aralığında tutularak işletilmiştir. OTC akısı 0,17-5 mg/m².g iken NH₄⁺-N akısı 17,4-420 mg/m².g aralığında değişmiştir. Parçalanma ürünleri olan epi - OTC, alpha - OTC, beta - OTC sırasıyla maksimum 1 ppb, 13 ppb, 4 ppb olarak bulunmuştur.

Aydın (2015), O₂-MBfR sisteminde eşzamanlı olarak CTC ve NH₄-N giderimi üzerine çalışmıştır. O₂-MBfR' de biyolojik oksidasyon için birincil elektron alıcısı olarak

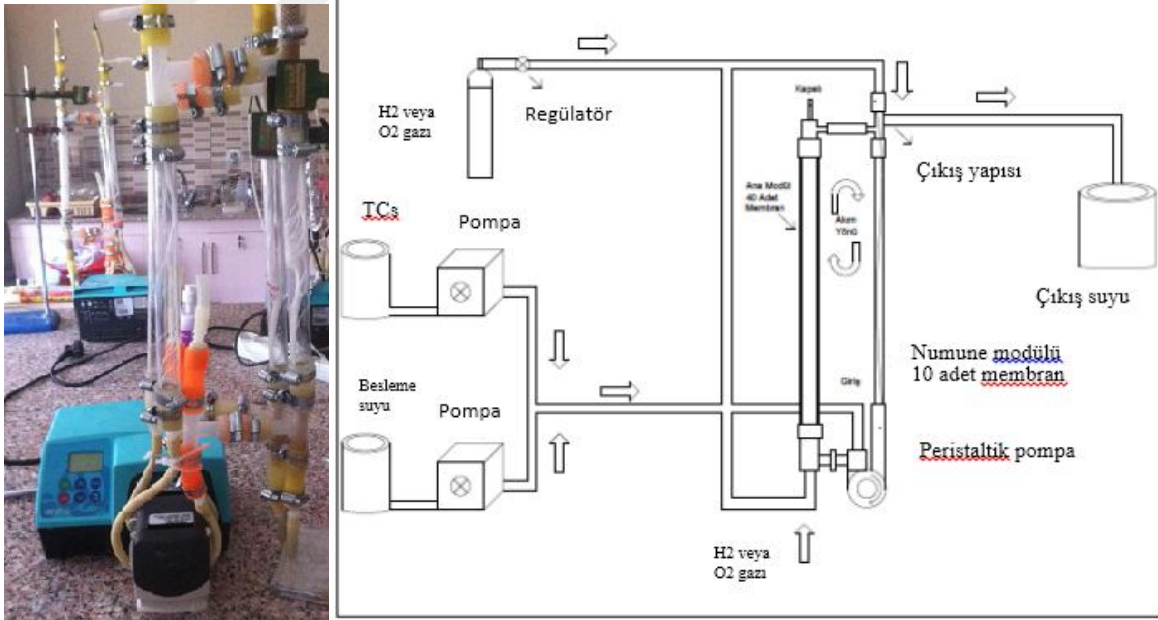
O₂ kullanılırken, birincil elektron verici olarak NH₄-N ve ikincil elektron verici olarak da CTC kullanılmıştır. Çalışma süresince O₂-MBfR sistemi 0.1-0.4 ppm CTC, 20-25 ppm NH₄-N, 2 – 6 psi O₂ gaz basıncı ve 2.5 - 18 saat arası HRT’ de işletilmiştir. Eş zamanlı giderimi gerçekleştirilen CTC ve NH₄-N verimlerinin % 70 ve % 100 olduğu belirlenmiştir. CTC ve NH₄-N kirletici yüzeysel yükleri ve giderim akıları sırasıyla 14.51, 1612,8 mg/m².g ve 3,72, 1566 mg/m².g olduğu hesaplanmıştır. İncelenen şartlar altında ECTC, ACTC ve EACTC konsantrasyonlarının 7 ppb, 4 ppb ve 1 ppb olduğu tespit edilmiştir.



4. MATERYAL VE METOT

4.1. Membran Biyofilm Reaktörü (MBfR)

Çalışmada bir adet hidrojen esaslı ve bir adet oksijen esaslı olmak üzere iki adet membran biyofilm reaktörü (MBfR) kullanılmıştır (Şekil 4.1.). Her bir MBfR biri ana ve diğeri numune alma kolonu olmak üzere birbirine sirkülasyon pompası ile bağlı 2 adet kolondan oluşmaktadır. MBfR'nın ana membran kolonunda cam tüp içerisinde 40 adet hidrofobik hollow-fiber gaz transfer membranı yerleştirilmişken ikinci kolonda biyofilm numunesi almak için kullanılan 10 adet hidrofobik gaz transfer membranı mevcuttur. Kullanılan MBfR sistemlerinin fiziksel özellikleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Kullanılan reaktörlerin birinde elektron verici olarak H_2 , birincil elektron alıcı olarak nitrat ve ikincil elektron alıcı olarak tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klorotetrasiklin karışımı kullanılmıştır. Diğer reaktörde ise elektron alıcı olarak O_2 gazı, birincil elektron verici olarak amonyum, ikincil elektron verici olarak tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klorotetrasiklin karışımı kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Membran biyofilm reaktör düzeneği

Tablo 4.1. Membran biyofilm reaktör modülünün fiziksel özellikleri

Özellikler	Değerler
Tüp Uzunluğu	22 cm
Tüp çapı	17 mm
Fiber Dış Çapı	605 μm
Ana kolon fiber adedi	40
Numune kolon fiber adedi	10
Aktif Fiber Uzunluğu	28 cm
Toplam fiberin yüzey alanı	250 cm^2
Sirkülasyon Oranı	150 Q
Hacim	150 mL

4.2. Reaktörlerin İşletim Sürecine Alınması

Her iki reaktörde gaz basınçları 4 psi (0.27 atm) değerinde sabit tutularak 10 saatlik bekleme süresinde ve 150 (Q) değerindeki sirkülasyon hızında çalıştırılmaya başlanmıştır. Bir haftalık ölü şartlarda çalıştırma ile gaz şartlandırması sağlandıktan sonra, H₂-MBfR çöktürülmüş anaerobik çamurun üst sıvısıyla ve O₂-MBfR evsel atıksu arıtma tesisinden alınan çöktürülmüş aktif çamurun üst sıvısıyla aşılanmıştır. H₂-MBfR’de elektron verici olarak H₂’i ve O₂-MBfR’da elektron alıcı olarak O₂’yi kullanan biyofilm, hidrofobik membran üzerinde gelişmeye başladıktan sonra reaktörlere tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klortetrasiklin karışımından oluşan besleme yapılmıştır. TCs beslemesine başlanmadan önce H₂-MBfR’ü nitrat ile, O₂-MBfR’ü amonyum ile beslenerek her iki reaktörde ötotrofik fakat farklı indirgeme/yükseltgeme mekanizmalarına sahip mikrobiyal topluluk oluşturulmuştur.

4.3. Sentetik Besleme Suyu

Hidrojene dayalı membran biyofilm reaktörüne tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klortetrasiklin karışımından oluşan ve nitrat içeren sentetik su ile besleme yapılırken, oksijene dayalı membran biyofilm reaktörüne tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klortetrasiklin karışımından oluşan ve amonyum içeren sentetik su ile besleme yapılmıştır. Sentetik besleme sularının hazırlanmasında distile su kullanılmıştır. Sentetik besleme sularının içeriği, H₂-MBfR için Tablo 4.2 ve O₂-MBfR için Tablo 4.3’de gösterilmiştir. Kullanılan

eser mineral çözelti içeriği ise Tablo 4.4’de verilmiştir. Besleme suları ışık geçirmeyen 2,5 L’ lik cam şişelere konulup Watson Marlow 205S marka peristaltik pompa ile reaktöre iletilmiştir.

Tablo 4.2. H₂-MBfR sentetik besleme suyu içeriği

Kimyasal	Miktarı, mg/L
NaNO ₃	120
KH ₂ PO ₄	130
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1100
MgSO ₄ .7H ₂ O	200
CaCl ₂ .2H ₂ O	1
NaHCO ₃	125
FeSO ₄ .7H ₂ O	1
Eser mineral çözelti, ml	1 mL

Tablo 4.3. O₂-MBfR sentetik besleme suyu içeriği

Kimyasal	Miktarı, mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄ , g/l	0,095
NaHCO ₃ , g/l	0,25
KH ₂ PO ₄ , g/l	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O, g/l	0,05
NaCH ₃ COOH.3H ₂ O, g/l	0,024
Eser mineral çözelti, ml	1

Tablo 4.4. Eser mineral çözelti içeriği

Kimyasal	Miktarı, mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O, µg/l	100
MnCl ₂ .4H ₂ O, µg/l	30
H ₃ BO ₃ , µg/l	300
CoCl ₂ .6H ₂ O, µg/l	200
CuCl ₂ .2H ₂ O, µg/l	10
NiCl ₂ .6H ₂ O, µg/l	10
Na ₂ SeO ₃ , µg/l	30

4.4. Çoklu Antibiyotik Karışım Çözeltisi

Çoklu antibiyotik karışımı günlük olarak hazırlanmış ve peristaltik pompa ile reaktöre verilmiştir. Ayrı ayrı hazırlanan sentetik besleme suyu ve çoklu antibiyotik karışımı reaktör girişinde karıştırılarak sisteme verilmiştir. Stok çözelti için Sigma marka ve PCBOB16 kod numaralı 0.022 mg tetrasiklin hidroklorür, Sigma marka O5875-100G kod numaralı 0.022 mg oksitetrasiklin hidroklorür ve Sigma marka 0.023 mg klortetrasiklin hidroklorür kimyasalları hassas terazide tartıldıktan sonra 1 L' lik balon joje içinde çözülmüş ve distile su kullanılarak 1 L' ye tamamlanmıştır.

4.5. İşletme Şartları

Çalışma süresince hidrojene ve oksijene dayalı MBfR sistemler farklı hidrolik bekleme sürelerinde (10, 7.5, 5, 2.5, 1 saat) işletilmiş ve bu sürelerin giderim üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Giriş amonyum ve nitrat değerleri 20 ppm, H₂ ve O₂ basıncı 4 psi' dir. TC, OTC ve CTC' den oluşan çoklu antibiyotik karışımında her bir antibiyotik konsantrasyonu 0.2 ppm olacak şekilde toplam antibiyotik konsantrasyonu 0.6 ppm olacak şekilde tutulmuştur. Reaktörlerin işletme şartları Tablo 4.5'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Hidrojene ve oksijene dayalı membran biyofilm reaktöründe işletme şartları

	H ₂ MBfR	O ₂ MBfR
HRT (saat)	1, 2.5, 5, 7.5, 10	1, 2.5, 5, 7.5, 10
Basınç (psi)	4	4
Sıcaklık (°C)	25	25
pH	7- 7.5	7- 7.5
Besleme	TC/OTC/CTC ve NO ₃ ⁻	TC/OTC/CTC ve NH ₄ ⁺

4.6. Analizler

4.6.1. Kimyasal analizler

Membran biyofilm reaktör girişinden anlık olarak ve çıkışından 2 saat süre sonunda alınan numunelerde pH, amonyum azotu (NH₄⁺-N), nitrit azotu (NO₂⁻-N), nitrat azotu (NO₃⁻-N), tetrasiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin analizleri yapılmıştır. NH₄-N, NO₂-N ve NO₃-N analizleri Standart Metotlara göre yapılmıştır (Samsunlu A.,1997). pH değerleri Thermo Scientec marka pH metre ile ölçülmüştür. TC, OTC, CTC analizleri Shimadzu

marka Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile yapılmıştır. HPLC cihazının analiz şartları Tablo 4.6’da gösterilmiştir. Deneysel süreçte kullanılan HPLC cihazı Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.6. HPLC cihazı için analiz değerleri

Analiz Şartları	Değerler
Akış hızı	1.2 ml/ dk
Kolon	Restek Allure Biph 150x 4.6 mm
Kolon sıcaklığı	25C ⁰
Max. Basınç limiti	20 mPa
Dedeksiyon	269 nm
mFA	20 mM (NH ₄)H ₂ PO ₄
mFB	HPLC saflığında asetonytril
Analiz süresi	13 dk



Şekil 4.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

4.6.2. Moleküler analizler

Hidrojen ve oksijen esaslı MBfR’lardan alınan biyofilm numunelerine biyofilmdeki DNA’ları tespit etmek ve mikrobiyal topluluğu belirlemek amacı ile DNA ekstraksiyon, polimeraz zincir reaksiyonu ve denature gradyan jel elektroforesi (DGGE) moleküler analizleri uygulanmıştır. DNA ekstraksiyon işlemi için UltraClean Soil DNA izolasyon kiti kullanılmış ve aşağıdaki adımlar izlenmiştir.

- DNA ekstraksiyon tüpü düşük hızda vorteks ile karıştırıldı.
- C1 çözeltisinin çökeldikten sonra 60 °C’ye kadar ısıtıldı.
- 60 µL C1 çözeltisi DNA ekstraksiyon tüpüne konuldu ve düşük hızda vortekslendi.
- Yatay adaptör tüp tutucu ile DNA ekstraksiyon tüpü 10 dakika maksimum hızda vortekslendi ve daha sonra oda sıcaklığında 30 saniye 10000 rpm’de santrifüjlendi.
- Santrifüjlenen tüpten yaklaşık 400-500 µL üst sıvı başka bir tüpe konuldu.
- Her bir tüpe C2 çözeltisinden 250 µL eklenerek 5 saniye vortekslendi.
- Tüpler 4 °C’de 5 dakika inkübe edildi ve oda sıcaklığında 10000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi.
- Tüp içinden en fazla 600 µL üst sıvı alınarak 2 ml’lik başka bir tüpe aktarıldı.
- 200 µL alınan C3 çözeltisi bir tüpe ilave edilir ve vortekslendi.
- Tüpler oda sıcaklığında 10000 rpm’de 1 dk santrifüjlendi.
- Tüp içindeki üst sıvı en fazla 750 µL olacak şekilde 2 ml’lik başka bir tüpe aktarıldı.
- 1200 µL C4 çözeltisi karıştırıldıktan sonra tüpe eklendi ve 5 saniye vortekslendi.
- Tüpten 675 µL alınarak spin filtreye ilave edilir ve oda sıcaklığında 1 dakika 10000 rpm’de santrifüjlendi. Spin filtreden geçen kısım uzaklaştırılarak işlem tekrarlandı.
- C5 çözeltisinden 500 µL spin filtreye eklendi ve oda sıcaklığında 10000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi. Spin filtreden geçen kısım uzaklaştırıldı.
- Spin filtre oda sıcaklığında 10000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendikten sonra 2 ml’lik başka bir tüpe yerleştirildi.
- C6 çözeltisinden 100 µL alınarak spin filtredeki membranın merkezine eklendikten sonra spin filtre oda sıcaklığında 10000 rpm’de 30 saniye santrifüjlendi.
- Santrifüj işleminden sonra tüp içerisindeki DNA numunesi PCR analizi için -20°C’de saklandı.

DNA ekstraksiyonu işleminden sonra numunelerde 16S rRNA bölgesinin çoğaltılması amacı ile TECHNE /TC-512 marka PCR cihazı kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR cihazı Şekil 4.3’de gösterilmiştir. PCR bileşenleri Tablo 4.7’de gösterilmiştir ve işlem sırasında kullanılan primerlerin dizilimi Tablo 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) cihazı

Tablo 4.7. PCR analizi için kullanılan malzemeler

Kimyasal Adı	Miktarı (µL)	Konsantrasyonu
Taq Buffer	2,5	10X
MgCl ₂	0,5	25 mM
dNTP	0,5	10 mM
Forward Primer	0,5	10mM
Reverse Primer	0,5	10 mM
Taq polimeraz	0,125	-
DNA	1	-
Nükleaz free su	19,375	-

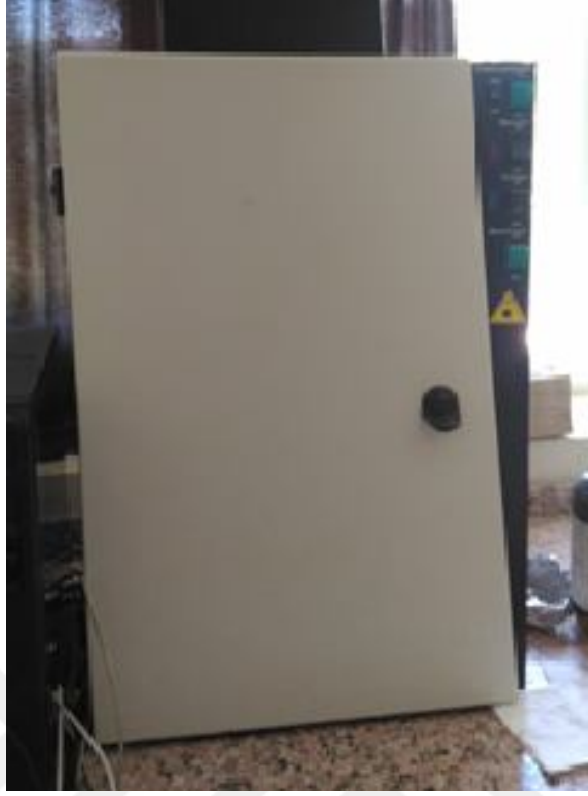
Tablo 4.8. PCR işleminde kullanılan primerlerin baz dizilimleri

Primer	Baz Dizilimi
Forward	5' – CCTACGGGAGGCAGCAG- 3'
Reverse	5'-CCGTCAATTCMTTGTGAGTTT-3'
Forward-GC	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'

PCR işleminden sonra agaroz jel elektroforez işlemi yapılmıştır. Bu işlem için Fermentas marka 10X konsantre TBE tamponu kullanılmıştır. % 1' lik agaroz jel mikrodalga fırında kaynatılmış ve agaroz jelin TBE içinde çözünmesi beklenmiştir. Bu karışıma 5 µL etidyum bromür eklenerek jel tepsisine alınmıştır. PCR işleminden sonra elde edilen üründen 5 µL ve yükleme boyasından 2 µL karıştırılarak kuyulara yükleme yapılmıştır. PCR işleminden elde edilen ürünler Şekil 4.4'de gösterilen yatay elektroforez cihazında 90 V'da 20 dakika yürütülmüştür. Bu işlemden sonra Şekil 4.5'de gösterilen Thermo marka jel görüntüleme cihazı ile hedef genin çoğalıp çoğalmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.4. Yatay Elektroforez Cihazı



Şekil 4.5. Jel Görüntüleme Cihazı

Hedef genlerin çoğaldığının belirlenmesinden sonra DGGE işlemine geçilmiştir. DGGE işlemi INGENY Phoru JL031 cihazı ile yapılmıştır ve saf DNA' lar elde edilmiştir. DGGE cihazı Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Denaturant konsantrasyonu % 40-60 aralığında jel gradyanı hazırlanmıştır. DGGE rezervuarı 1XTAE ile doldurulmuş ve DNA örnekleri 60 °C' de ve 85 V'da 16 saat süreyle yürütülmüştür. Daha sonra jel 30 dakika süre ile Invitrogen marka 1X sybr gold boyası içinde bekletilmiştir. Süre sonunda jel UV görüntüleme sistemine alınarak görüntüsü alınmıştır. Daha sonra karanlık odada UV ışığı altında her bir DNA bant steril bistüriler yardımıyla kesilerek PCR tüplerine alınmıştır. Bütün örnekler 20 µl nükleaz içermeyen su ilave edilmiştir. Saf DNA örnekleri GC klampsiz primerler kullanılarak yukarıda anlatılan PCR adımları izlenerek çoğaltılmış ve elde edilen ürünler DNA sekans analizine gönderilmiştir.



Şekil 4.6. DGGE cihazı

4.7. Kirletici Akı Hesabı

Akı, membranın birim alanından birim zamanda geçen akım miktarıdır. Yüzey yükü ve akı hesabı için aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

$$S_L = (Q \cdot S_0) / A$$

$$J_S = [Q \cdot (S_0 - S)] / A$$

$$S_L = \text{Yüzeysel yük (mg/m}^2\text{-gün)}$$

$$Q = \text{Giriş akış hızı (L/gün)}$$

$$S_0 = \text{Kirletici giriş konsantrasyonu (mg/ L)}$$

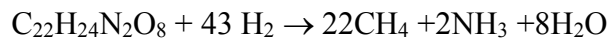
$$S = \text{Kirletici çıkış konsantrasyonu (mg/L)}$$

$$J_S = \text{Biyofilmdeki kirletici akısı (mg/ m}^2\text{-gün)}$$

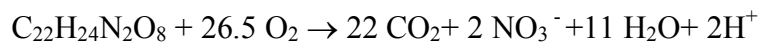
$$A = \text{Membran ve biyofilm yüzey alanı (m}^2\text{)}$$

Ayrıca TC, OTC ve CTC için H_2 ve O_2 eşdeğer akıları aşağıdaki reaksiyonlara göre hesaplanmıştır.

TC için eşdeğer akı hesabı

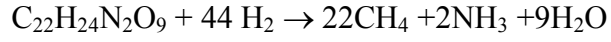


$$J_{H_2} = 0.194 J_{TC}$$



$$J_{O_2} = 1.91 J_{TC}$$

OTC için eşdeğer akı hesabı

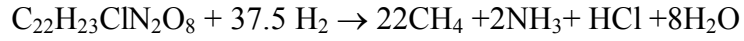


$$\text{JH}_2 = 0.191 \text{ J}_{\text{OTC}}$$



$$\text{JO}_2 = 1.81 \text{ J}_{\text{TC}}$$

CTC için eşdeğer akı hesabı

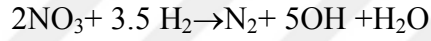


$$\text{JH}_2 = 0.187 \text{ J}_{\text{CTC}}$$



$$\text{JO}_2 = 1.74 \text{ J}_{\text{CTC}}$$

NO_3 ve NH_4 eşdeğer akı hesabı



$$\text{J}_{\text{H}_2-\text{NO}_3} = 0.357 \text{ J}_{\text{NO}_3}$$



$$\text{J}_{\text{O}_2-\text{NH}_4} = 4.57 \text{ J}_{\text{NH}_4}$$

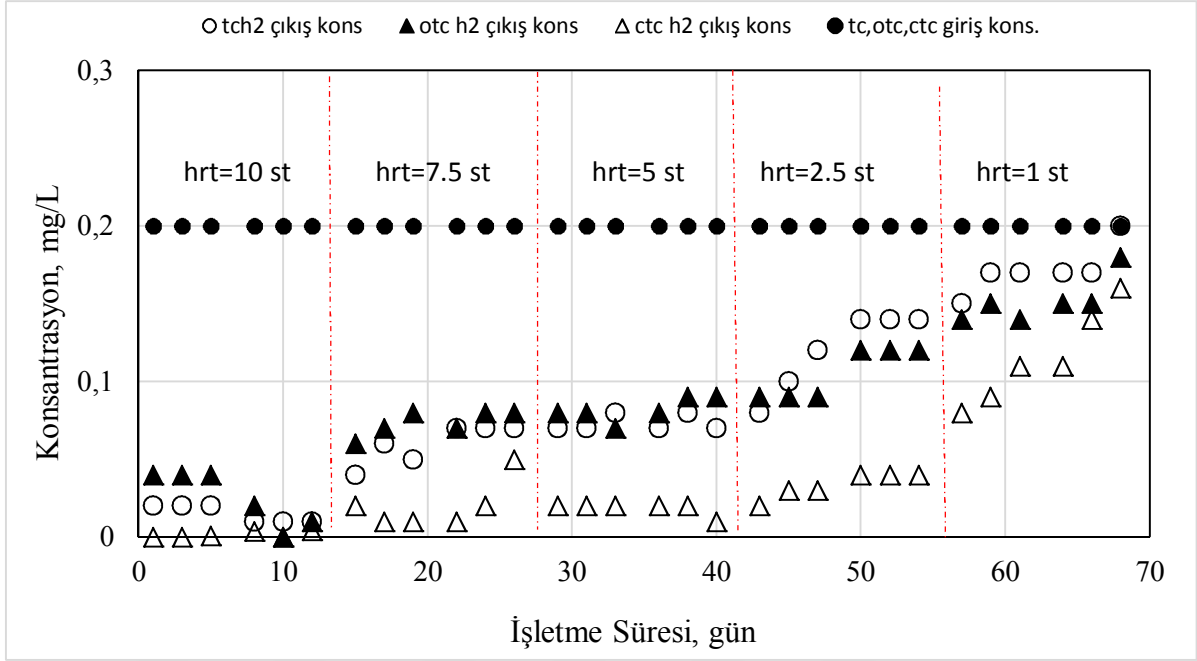
5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1 Hidrojene dayalı Membran Biyofilm Reaktör Sonuçları

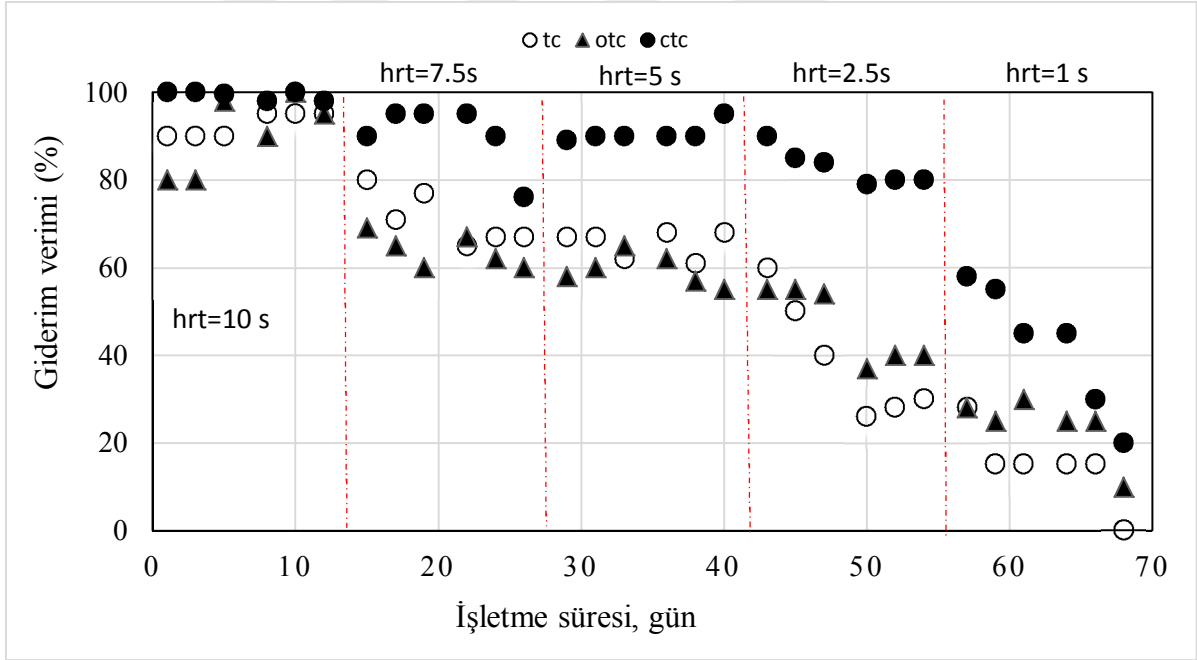
Biyofilm oluştuktan sonra hem hidrojene dayalı hem de oksijene dayalı membran biyofilm reaktör nitrat ve amonyum içerikli besleme çözeltisi ile beraber TC, OTC ve CTC' den oluşan çoklu antibiyotik karışımı ile beslenmiştir. İlk 15 gün süresince her iki sistemdeki biyofilmin bu şartlara adaptasyonu sağlanmıştır. Hidrojene dayalı membran biyofilm reaktörde elektron verici olarak H_2 gazı kullanılmıştır ve sistemde ötotrofik denitrifikasyon şartları oluşturulup TC, OTC ve CTC giderimi araştırılmıştır. Ötotrofik denitrifikasyon şartlarının oluşması için H_2 -MBfR'e nitrat içeren besleme suyu verilmiştir ve biyofilimde denitrifikasyon bakterilerinin varlığını incelemek için nitrat indirgenmesi sürekli olarak takip edilmiştir. Daha sonra sisteme her biri 0.2 ppm olarak hazırlanan TC, OTC ve CTC kimyasallarından oluşan çoklu antibiyotik karışımı reaktör girişinde besleme çözeltisi ile karıştırılarak H_2 -MBfR' ye verilmiştir. Çalışma boyunca H_2 gaz basıncı 4 psi ve farklı HRT sürelerinde işletilerek bu şartların çoklu antibiyotik giderimi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

5.1.1. Sistem Performansı

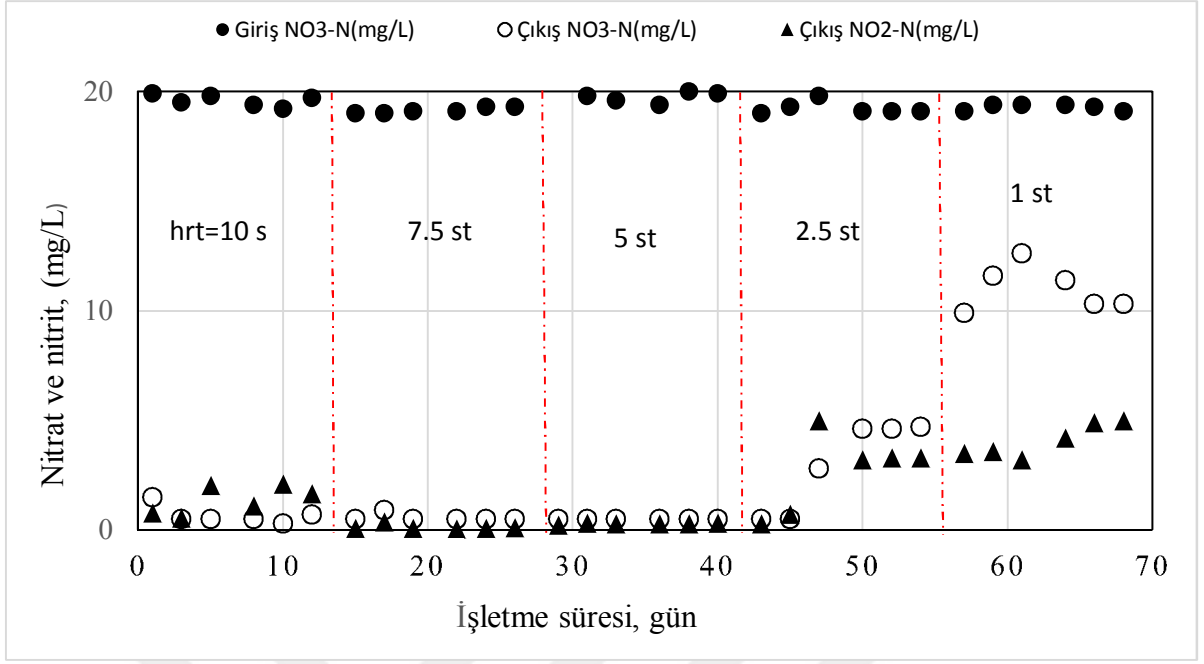
Şekil 5.1, işletim boyunca çoklu antibiyotik karışımı ile beslenen ve eşzamanlı antibiyotik ve nitrat gideriminin izlendiği reaktörde farklı HRT değerlerinde tetrasiklin grubu antibiyotiklerin giderimini, Şekil 5.2 ise giderim verimlerini göstermektedir. Diğer taraftan, Şekil 5.3 ve 5.4 ise sırasıyla nitrat/nitrit değişimini ve denitrifikasyon verimini göstermektedir.



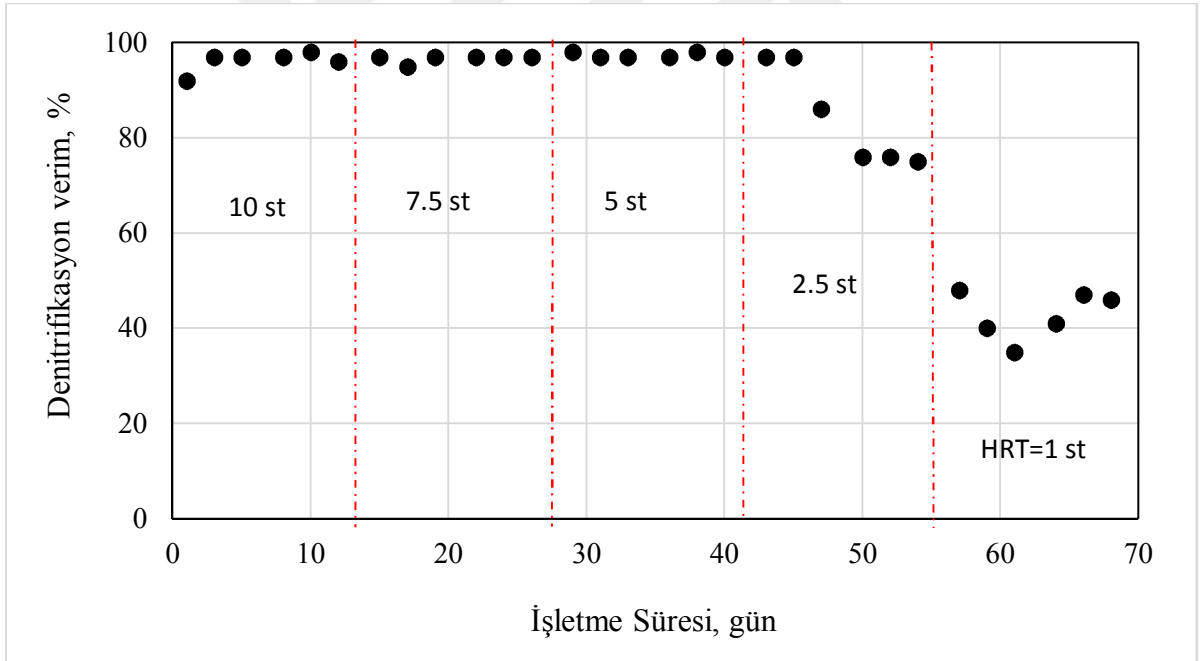
Şekil 5.1. H₂-MBfR' de TC, OTC, CTC giriş ve çıkış konsantrasyonları



Şekil 5.2. H₂-MBfR' de TC, OTC, CTC giderim verimleri



Şekil 5.3. H₂-MBfR' de reaktör giriş ve çıkışındaki nitrit- nitrat değişimi



Şekil 5.4. H₂-MBfR' de denitrifikasyon verimi

H₂-MBfR, çalışmanın başlama aşamasındaki 15 günlük adaptasyon evresinden sonra ilk olarak 4 psi basınç altında 10 saatlik hidrolik bekleme süresinde iki hafta süre ile işletilmiştir. Reaktördeki giriş nitrat konsantrasyonu 20 mg/L'dir. Bu şartlar altında ortalama denitrifikasyon verimi yaklaşık olarak % 96'dır. Çoklu antibiyotik karışımı her bir antibiyotikğin konsantrasyonu 0.2 ppm olacak şekilde hazırlanmıştır ve ortalama TC

giderim verimi % 93, ortalama OTC giderim verimi % 91, ortalama CTC giderim verimi % 99 olarak bulunmuştur.

Çalışmanın 14. gününde HRT değeri 7.5 saate düşürülmüştür. Giriş nitrat konsantrasyonu 20 mg/L olarak besleme yapılmaya devam edilmiş ve basınç 4 psi'de tutulmuştur. 7.5 saatlik bekleme süresinde ortalama denitrifikasyon verimi % 97'dir. H₂-MBfR reaktöründe antibiyotik giderim verimleri TC % 71, OTC % 63, CTC % 90 olarak gözlenmiştir. TC, OTC ve CTC giderim verimlerinde 10 saatlik hidrolik bekleme süresine kıyasla önemli bir düşüş gözlenmiştir. 7.5 saatlik hidrolik bekleme süresinde denitrifikasyon kararlı bir şekilde devam etmiştir.

Reaktör işletiminin 28. gününde hidrolik bekleme süresi 5 saate düşürülmüştür. Basınç değerinde ve giriş nitrat konsantrasyon değerinde değişiklik yapılmamıştır. Bu şartlar altında ortalama denitrifikasyon verimi bir önceki işletim periyodunda olduğu gibi % 97 seviyesinde gerçekleşmiştir. Diğer taraftan, çoklu antibiyotik durumunda TC, OTC ve CTC ortalama giderim verimleri sırası ile % 66, % 60 ve % 91 olarak bulunmuştur. TC ve OTC giderim verimleri önemli düzeyde olmasa da azalırken CTC giderim veriminde bir farklılık gözlenmemiştir. Çelik (2014) H₂-MBfR' de 5 saatlik HRT, 4 psi H₂ gazı basıncı, 0.5 ppm OTC giriş konsantrasyonu, 20-25 mg/L giriş nitrat konsantrasyonu şartları altında eşzamanlı OTC ve nitrat giderimini incelemiş ve bu şartlar altında oksitetrasiklin giderim verimini ortalama olarak % 70, nitrat giderim verimini yaklaşık olarak % 90 olarak elde etmiştir. Her iki reaktörde de benzer şartlar altında çalışılmış ve birbirine yakın giderim verimleri ve denitrifikasyon verimleri elde edilmiştir.

Çalışmanın 42. gününde hidrolik bekleme süresi 2.5 saate düşürülmüştür. Basınç değeri ve reaktöre giren nitrat değeri sabittir. Ortalama denitrifikasyon verimi % 85'e düşerken H₂-MBfR reaktöründe ilk kez nitrit birikimi gözlenmiştir. Çoklu antibiyotik ortalama giderim verimleri ise ciddi bir şekilde azalmış olup TC % 39, OTC % 47 ve CTC % 83 olarak hesaplanmıştır. TC ve OTC giderim verimleri düşmeye devam etmiştir ve CTC giderim verimi ilk kez % 90'ın altına düşmüştür.

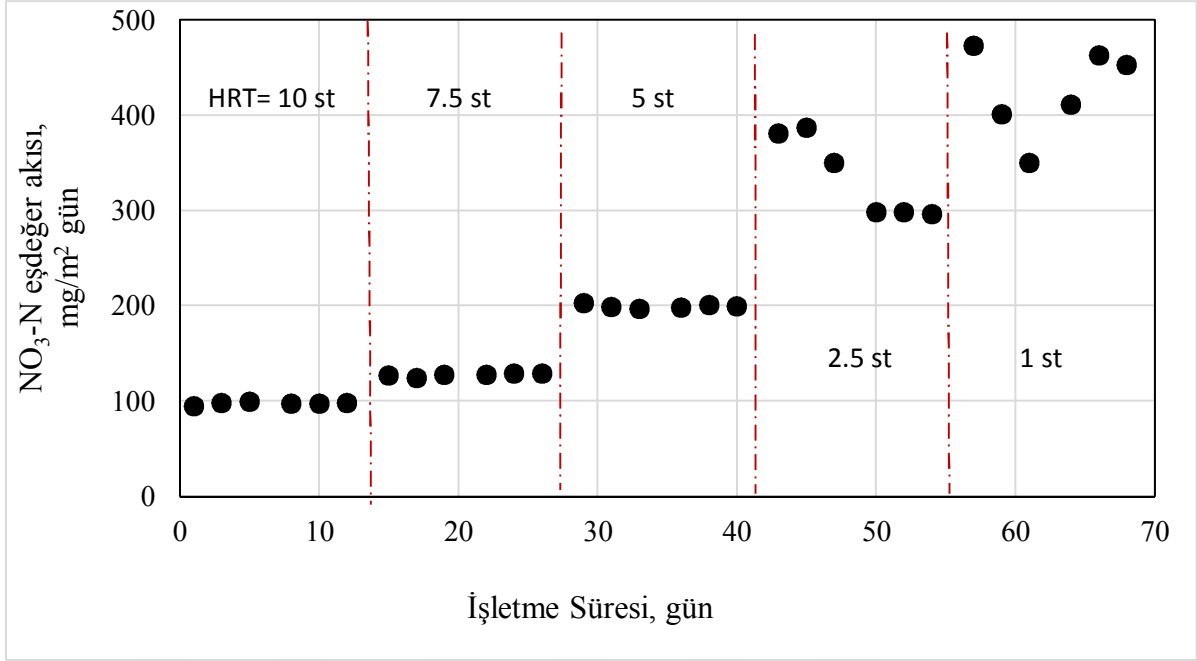
Çalışmanın 56. gününde hidrolik bekleme süresi 1 saate düşürülmüştür. Daha önce çalışılan şartlarda olduğu gibi basınç değeri ve giriş nitrat konsantrasyonu sabit tutulmuştur. Ortalama denitrifikasyon verimi % 43'e düşmüştür ve artık etkili bir denitrifikasyon gözlenmemiştir. Nitrit birikimi artarak devam etmiştir. Antibiyotik ortalama giderim verimleri ise TC % 14, OTC % 24, CTC % 42 olarak hesaplanmıştır. Yapılan son analizde TC giderimi tamamen durmuştur.

5.1.2. Akı Sonuçları

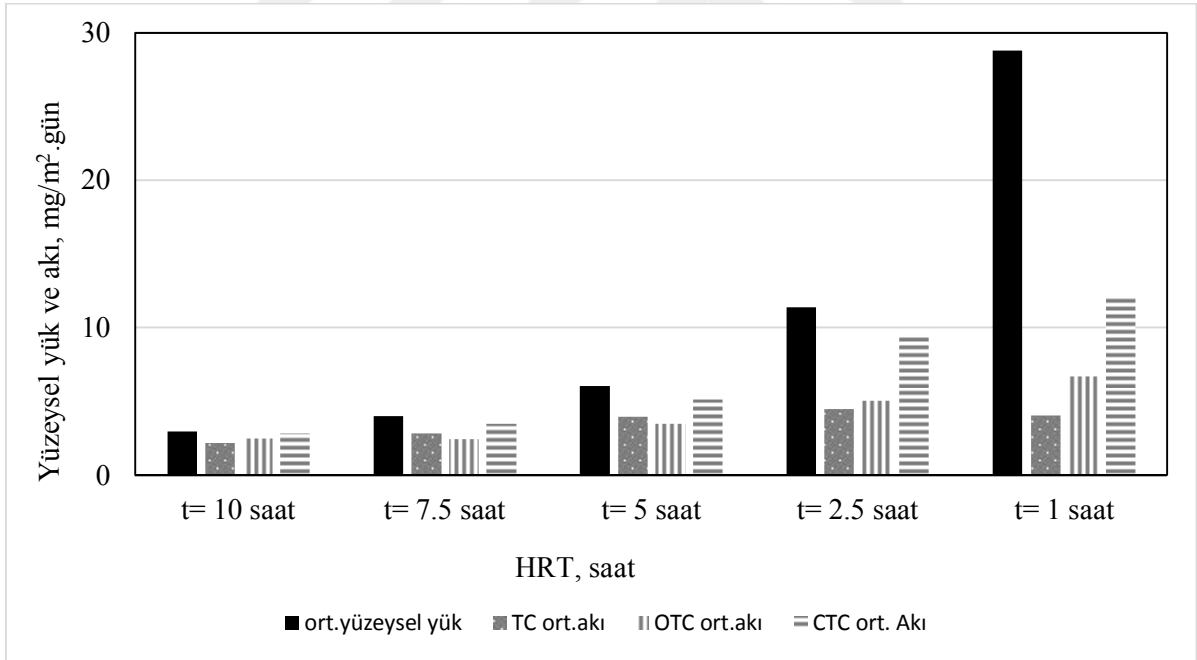
H₂-MBfR sisteminde birim zamanda membran birim yüzey alanında kirleticilerin ne oranda giderildiğini belirlemek için nitrat, TC, OTC, CTC akıları hesaplanmıştır. Ayrıca kirlotici giderimi sırasında harcanan H₂ gazı miktarını belirlemek için nitrat, TC, OTC ve CTC eşdeğer akıları hesaplanmıştır. Şekil 5.5 H₂- MBfR’de NO₃-N yüzeysel yük ve akısını, Şekil 5.6 H₂-MBfR’da NO₃-N eşdeğer akısı, Şekil 5.7 H₂-MBfR’ de TC, OTC ve CTC antibiyotiklerinin yüzeysel yükü ve akısını, Şekil 5.8 H₂-MBfR’ de TC, OTC, CTC eşdeğer akılarını göstermektedir.



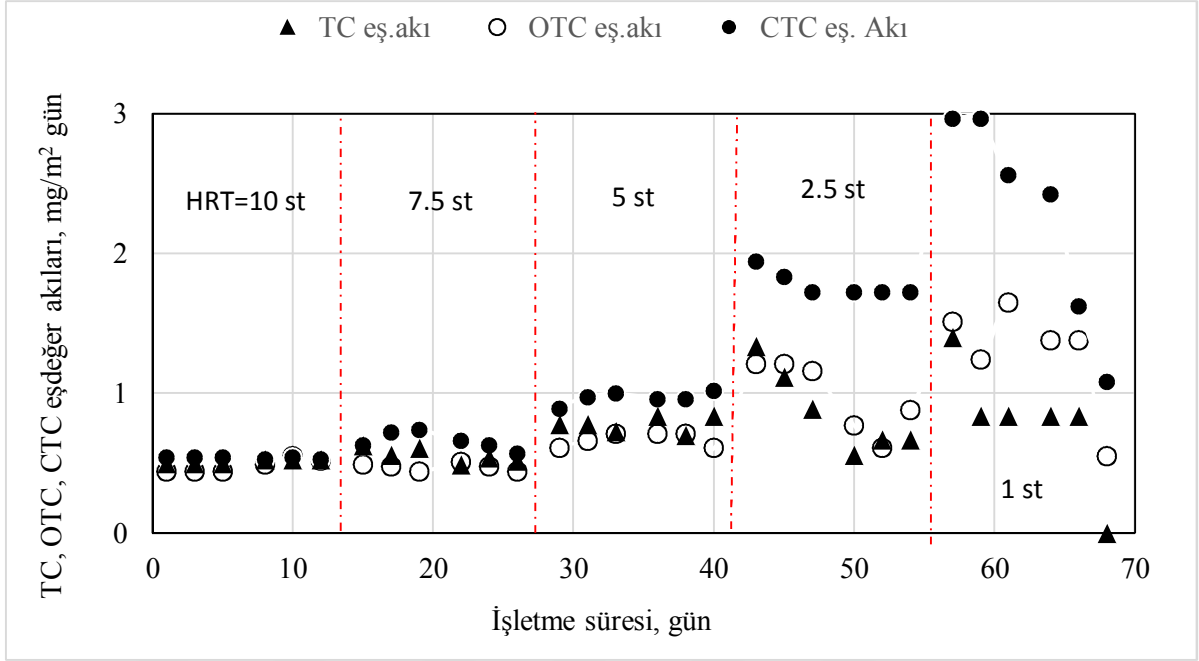
Şekil 5.5. H₂-MBfR’de NO₃⁻-N yüzeysel yük ve akı



Şekil 5.6. H₂-MBfR' de NO₃-N eşdeğer akısı



Şekil 5.7. H₂-MBfR' de TC, OTC, CTC yüzeysel yük ve akısı



Şekil 5.8. H₂-MBfR’ de TC, OTC, CTC eşdeğer akıları

Çalışmanın 1. periyodunda, 10 saatlik hidrolik bekleme süresinde NO₃⁻-N ortalama akı değeri 272,4 mg/m².gün ve NO₃-N ortalama hidrojen eşdeğer akısı 97,25 mg/m².gün olarak hesaplanmıştır. Çoklu antibiyotik karışımındaki ortalama TC akısı 2,23 mg/m².gün, ortalama OTC akısı 2,52 mg/m².gün ve ortalama CTC akısı 2,87 mg/m².gün bulunmuştur. Hidrojen eşdeğeri akılar ise TC için ortalama olarak 0,43 mg H₂/m².gün, OTC için 0,48 mg H₂/m².gün, CTC için 0,54 mg H₂/m².gün olarak bulunmuştur.

Çalışmanın 2. periyodunda, HRT 7,5 saate düşürülmüştür. NO₃⁻-N ortalama akısı 356,48 mg/m².gün ve NO₃-N ortalama hidrojen eşdeğer akısı 127,26 mg/m².gün olarak bulunmuştur. TC, OTC, CTC için ortalama akı değerleri sırası ile 2,88 mg/m².gün, 2,48 mg/m².gün, 3,52 mg/m².gün ve ortalama hidrojen eşdeğer akı değerleri sırası ile 0,56 mg H₂/m².gün, 0,47 mg H₂/m².gün ve 0,66 mg H₂/m².gün olarak bulunmuştur. Akı değerlerindeki artış HRT’ nin düşürülmesiyle birlikte artan debiden kaynaklanmaktadır ve çalışma süresince bu artış devam etmiştir.

Çalışmanın 28. gününde HRT 5 saate düşürülmüştür. NO₃-N ortalama akısı 556,32 mg/m².gün ve NO₃-N ortalama hidrojen eşdeğer akısı 199,2 mg H₂/m².gün bulunmuştur. TC, OTC ve CTC ortalama akıları sırası ile 4,01 mg/m².gün, 3,50 mg/m².gün, 5,18 mg/m².gün ve hidrojen eşdeğeri akıları sırası ile 0,78 mg/m².gün, 0,67 mg/m².gün, 0,97 mg/m².gün olarak bulunmuştur.

Çalışmanın 42. gününde HRT 2,5 saate düşürülmüştür. $\text{NO}_3\text{-N}$ ortalama akısı $937,92 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$ ve $\text{NO}_3\text{-N}$ ortalama hidrojen eşdeğer akısı $334,84 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$ bulunmuştur. TC, OTC ve CTC ortalama akıları sırası ile $4,51 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$, $5,09 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$, $9,50 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$ ve hidrojen eşdeğeri akıları sırası ile $0,87 \text{ mgH}_2/\text{m}^2\cdot\text{gün}$, $0,97 \text{ mgH}_2/\text{m}^2\cdot\text{gün}$, $1,78 \text{ mgH}_2/\text{m}^2\cdot\text{gün}$ olarak bulunmuştur. Aydın (2015) H_2 - MBfR’de 2.5 saatlik HRT, 4 psi H_2 gazı basıncı ve 0.4-0.5 ppm CTC giriş konsantrasyonu, 20-25 mg/L giriş nitrat konsantrasyonu şartları altında eşzamanlı CTC ve nitrat giderimi üzerinde çalışmış ve bu şartlar altında nitrat akısını $1075,8 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$ ve CTC akısını $22,3 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$ olarak hesaplamıştır. İki çalışmada aynı şartlarda nitrat akıları birbirine çok yakındır ancak CTC giriş ve çıkış değerlerindeki farklılık nedeniyle CTC akıları farklılık göstermiştir.

Çalışmanın 56. gününde HRT 1 saate düşürülmüştür. $\text{NO}_3\text{-N}$ ortalama akısı $1190,4 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$ ve $\text{NO}_3\text{-N}$ ortalama hidrojen eşdeğer akısı $424,97 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$ bulunmuştur. TC, OTC ve CTC ortalama akıları sırası ile $4,08 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$, $6,72 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$, $12,12 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$ ve ortalama hidrojen eşdeğer akıları sırası ile $0,79 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$, $1,28 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$, $2,27 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$ olarak bulunmuştur.

5.2. Oksijene dayalı membran biyofilm reaktör sonuçları

Oksijene dayalı membran biyofilm reaktörde elektron alıcı olarak O_2 kullanılmıştır ve sistemde ötotrofik nitrifikasyon şartları oluşturulup TC, OTC ve CTC giderimi araştırılmıştır. Ötotrofik nitrifikasyon şartlarının oluşması için O_2 -MBfR’ ye amonyum içeren besleme suyu verilmiştir ve biyofilmde nitrifikasyon bakterilerinin varlığını incelemek için amonyum indirgenmesi devamlı olarak takip edilmiştir. Daha sonra reaktöre her biri 0.2 ppm olarak hazırlanan TC, OTC ve CTC kimyasallarından oluşan çoklu antibiyotik karışımı reaktör girişinde besleme çözeltisi ile karıştırılarak O_2 -MBfR’ ye verilmiştir. Çalışma boyunca O_2 -MBfR 4 psi basınçta ve farklı HRT sürelerinde işletilerek bu şartların çoklu antibiyotik giderimi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

5.2.1. Sistem Performansı

Şekil 5.9 O_2 -MBfR’ de TC, OTC, CTC giriş ve çıkış konsantrasyonları, Şekil 5.10 O_2 -MBfR’ de TC, OTC, CTC giderim verimleri, Şekil 5.11 O_2 -MBfR’ de reaktör giriş ve çıkışındaki amonyum- nitrat değişimi gösterilmiştir.

O₂-MBfR, çalışmanın başlama aşamasındaki 15 günlük adaptasyon evresinden sonra ilk olarak 4 psi basınç altında 10 saatlik hidrolik bekleme süresinde iki hafta süre ile işletilmiştir. Reaktördeki giriş amonyum konsantrasyonu 20 mg/L' dir. Bu şartlar altında ortalama nitrifikasyon verimi yaklaşık olarak % 98' dir. Çoklu antibiyotik karışımı yaklaşık 0.2 ppm olacak şekilde hazırlanmıştır ve ortalama TC giderim verimi %53, ortalama OTC giderim verimi %55, ortalama CTC giderim verimi % 71 olarak bulunmuştur. Çelik (2014) oksijene dayalı membran biyofim reaktörde giriş amonyum konsantrasyonu 20-30 mg/l aralığında, giriş OTC konsantrasyonunun 0,2 mg/l, hidrolik bekleme süresinin 10 saat olarak tutulduğu ve O₂ gaz basıncının 4 psi olduğu şartlar altında % 98 nitrifikasyon verimi ve % 20' den daha az OTC giderimi elde etmiştir. O₂-MBfR' lerde yapılan çalışmalar kıyaslandığında çoklu antibiyotik gideriminin yapıldığı bu çalışmada, tekli antibiyotik gideriminin yapıldığı çalışmalara göre çok daha yüksek giderim verimlerine ulaşılmıştır.

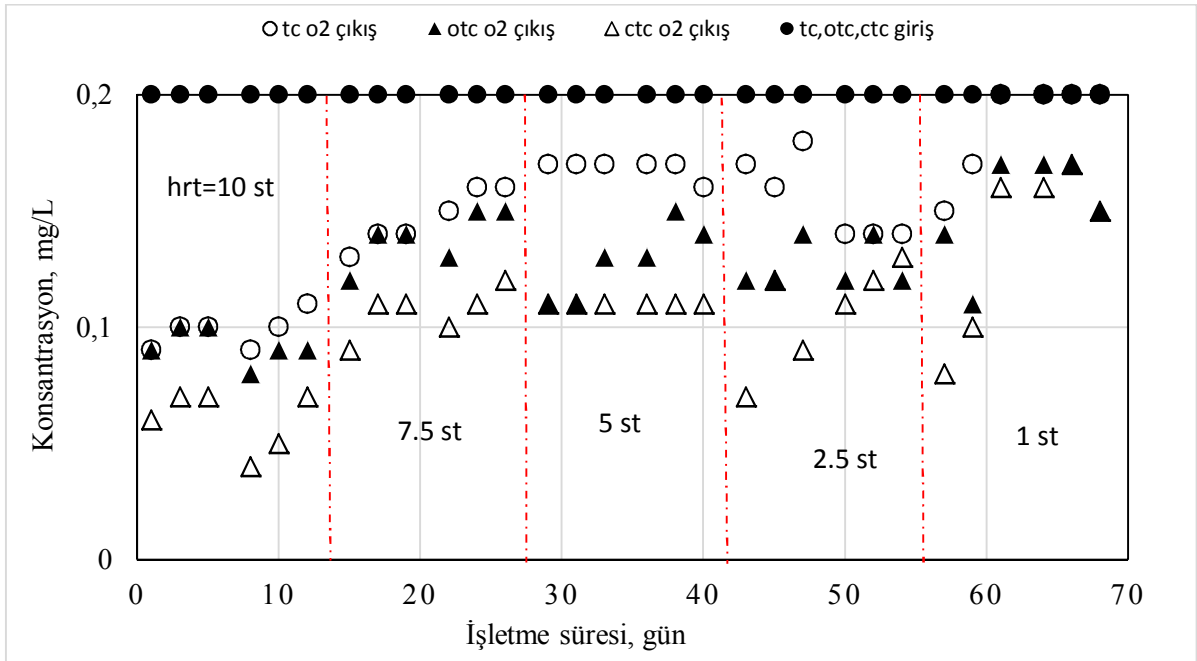
Çalışmanın 14. gününde HRT değeri 7.5 saate düşürülmüştür. Giriş amonyum konsantrasyonu 20 mg/L olarak besleme yapılmaya devam edilmiş ve basınç 4 psi' da sabit tutulmuştur. 7.5 saatlik bekleme süresinde ortalama nitrifikasyon verimi % 99' dur. Çıkış suyu amonyum ve nitrat konsantrasyonu toplamaları yaklaşık olarak giriş amonyum konsantrasyonuna eşittir ve nitrit birikimi gözlenmemiştir. Giriş konsantrasyonu 0.2 ppm olan çoklu antibiyotik karışımında ortalama giderim verimleri ise TC % 30, OTC % 32, CTC % 48 olarak hesaplanmıştır. TC, OTC ve CTC giderim verimlerinde 10 saatlik hidrolik bekleme süresine kıyasla bir düşüş gözlenmiştir.

Reaktör işletiminin 28. gününde hidrolik bekleme süresi 5 saate düşürülmüştür. Basınç değerinde ve giriş amonyum konsantrasyon değerinde değişiklik yapılmamıştır. Bu şartlar altında ortalama nitrifikasyon verimi %99' dur. TC, OTC ve CTC ortalama giderim verimleri sırası ile % 21, % 37 ve % 45 olarak bulunmuştur. Aydın, (2015) oksijene dayalı membran biyofim reaktörde giriş amonyum konsantrasyonu 20 mg/l, giriş CTC konsantrasyonunun 0,3- 0,4 mg/l, hidrolik bekleme süresinin 5 saat ve O₂ gaz basıncının 4 psi olduğu şartlar altında nitrifikasyon verimini % 97 ve CTC giderim verimini % 22' den daha az olarak elde etmiştir.

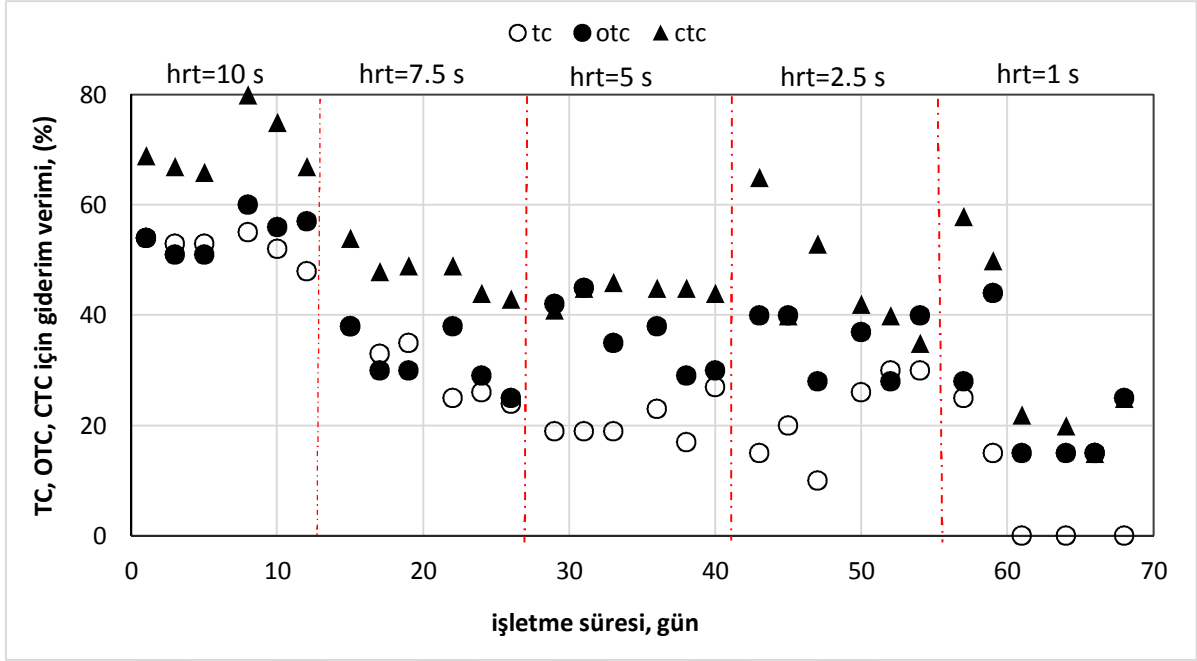
Çalışmanın 42. gününde hidrolik bekleme süresi 2.5 saate düşürülmüştür. Basınç değeri ve reaktöre giren amonyum değeri sabittir. Ortalama nitrifikasyon verimi % 99' dur. Çalışmanın ilk aşamasından itibaren nitrifikasyonun kararlı bir şekilde devam ettiği

gözlenmiştir. Çoklu antibiyotik ortalama giderim verimleri ise TC % 21, OTC % 36 ve CTC % 45 olarak hesaplanmıştır. HRT 5 saatten 2.5 saate düşürüldüğünde tetrasiklin bileşiklerinin verimi bu düşüşten etkilenmemiştir, giderim verimlerinin 5 saatlik HRT değerleriyle neredeyse aynı olduğu görülmüştür.

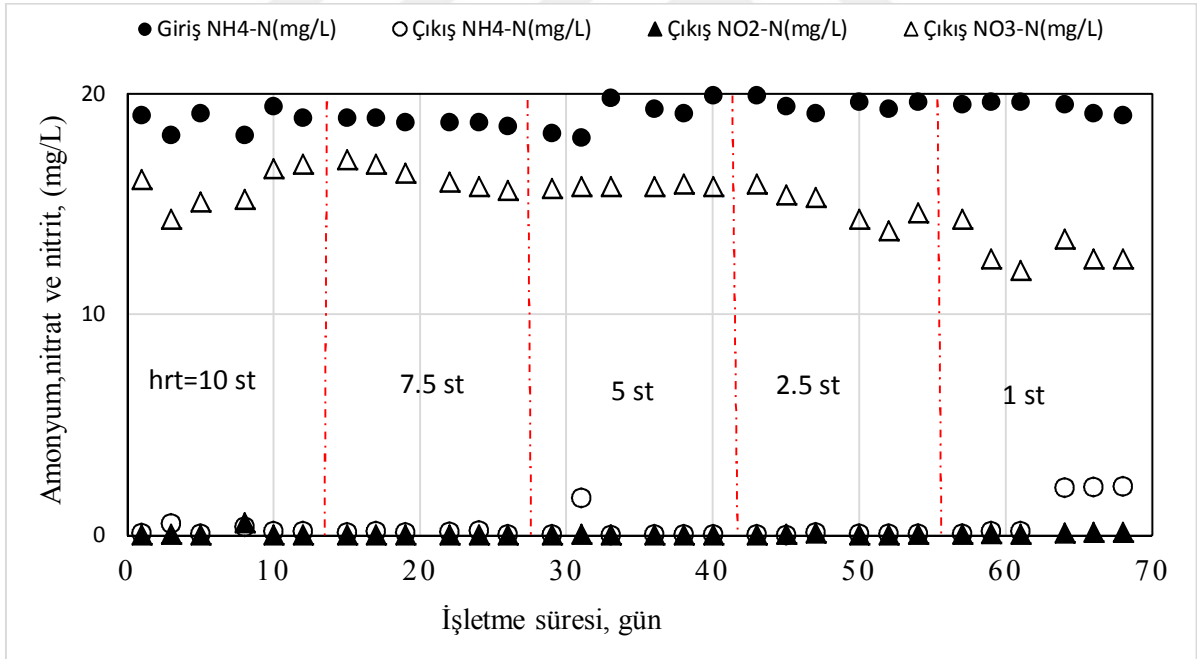
Çalışmanın 56. gününde hidrolik bekleme süresi 1 saate düşürülmüştür. Daha önce çalışılan şartlarda olduğu gibi basınç değeri ve giriş amonyum konsantrasyonu sabit tutulmuştur. Çalışmanın ilk aşamasından itibaren % 99 olan nitrifikasyon verimi %92' ye düşmüştür. Antibiyotik ortalama giderim verimleri ise TC % 7, OTC % 24, CTC % 32 olarak hesaplanmıştır. Yapılan son analizde TC giderimi tamamen durmuştur.



Şekil 5.9. O₂-MBfR' de TC, OTC, CTC giriş ve çıkış konsantrasyonları



Şekil 5.10 . O₂-MBfR’ de TC, OTC, CTC giderim verimleri



Şekil 5.11. O₂-MBfR’ de reaktör giriş ve çıkışındaki amonyum- nitrat değişimi

5.2.2. Akı Sonuçları

O₂-MBfR sisteminde birim zamanda membran birim yüzey alanında kirleticilerin hangi oranda giderildiğini belirlemek için NH₄-N, TC, OTC, CTC akıları hesaplanmıştır. Ayrıca kirleticiler giderimi sırasında harcanan O₂ gazı miktarını belirlemek için NH₄-N, TC, OTC ve CTC oksijen eşdeğer akıları hesaplanmıştır. Şekil 5.12 O₂-MBfR' de NH₄-N yüzeysel yük ve akısı, Şekil 5.13 O₂-MBfR' de NH₄-N eşdeğer akısı, Şekil 5.14 O₂-MBfR' de TC, OTC ve CTC antibiyotiklerinin yüzeysel yük ve akısı ve Şekil 5.15 O₂-MBfR' de TC, OTC, CTC eşdeğer akıları gösterilmiştir.

10 saatlik hidrolik bekleme süresinde NH₄-N ortalama akı değeri 266,98 mg/ m² gün ve NH₄-N ortalama oksijen eşdeğer akısı 1012,45 mgO₂/m².gün olarak hesaplanmıştır. Çoklu antibiyotik karışımındaki ortalama TC akısı 1,57 mg/ m².gün, ortalama OTC akısı 1,61 mg/ m².gün ve ortalama CTC akısı 2,08 mg/m².gün bulunmuştur. Oksijen eşdeğeri akılar ise TC için ortalama olarak 3,00 mgO₂/m².gün, OTC için 2,91 mgO₂/ m².gün, CTC için 3,62 mgO₂/ m².gün olarak bulunmuştur.

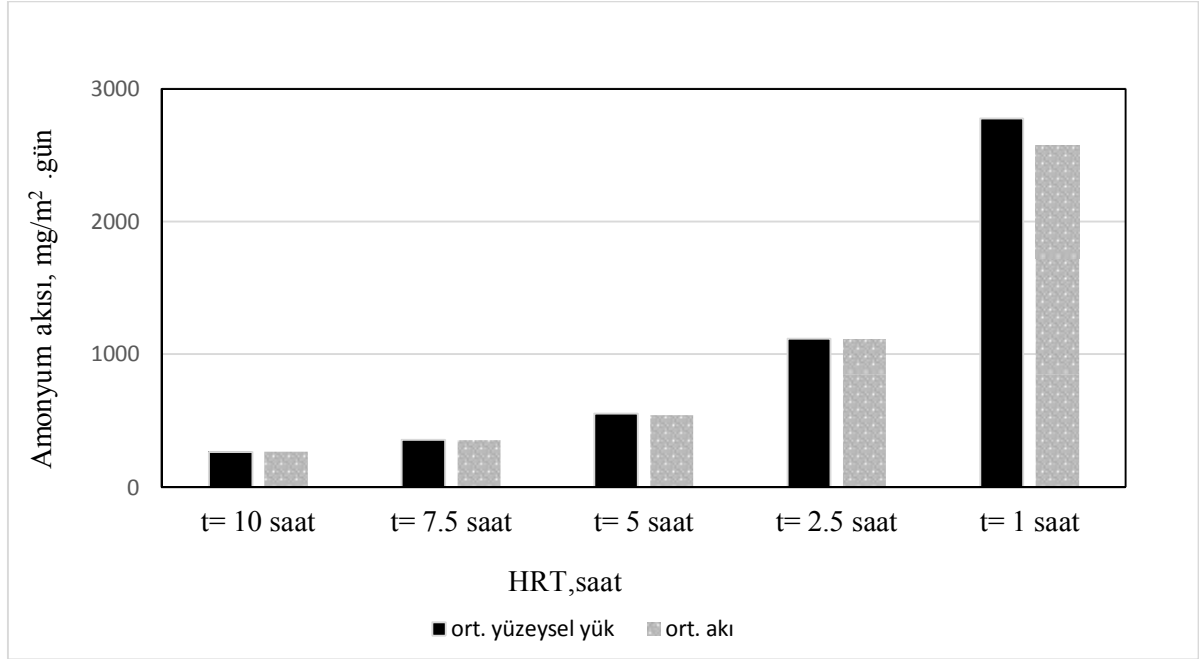
Çalışmanın 14. gününde HRT 7,5 saate düşürülmüştür. NH₄-N ortalama akısı 355,27 mg/m².gün ve NH₄-N ortalama oksijen eşdeğer akısı 1623,6 mg/ m².gün olarak bulunmuştur. TC, OTC, CTC için ortalama akı değerleri sırası ile 1,22 mg/m².gün, 1,23 mg/m².gün, 1,86 mg/m².gün ve ortalama oksijen eşdeğeri akı değerleri sırası ile 2,33 mg O₂/m².gün, 2,23 mg O₂/m².gün ve 3,24 mg O₂/m².gün olarak bulunmuştur.

Çalışmanın 28. Gününde HRT 5 saate düşürülmüştür. NH₄-N ortalama akısı 544,85 mg/m².gün ve NH₄-N ortalama oksijen eşdeğer akısı 2489,96 mg/m².gün bulunmuştur. TC, OTC ve CTC ortalama akıları sırası ile 1,27 mg/m².gün, 2,11 mg/m².gün, 2,52 mg/m².gün ve oksijen eşdeğer akıları sırası ile 2,43 mgO₂/m².gün, 3,82 mgO₂/m².gün, 4,38 mgO₂/m².gün olarak bulunmuştur. HRT 7,5 saate düşürüldüğünde TC, OTC, CTC akılarında bir miktar düşüş gözlenmiş ancak HRT 5 saate düşürüldüğünde akı değerleri artmaya devam etmiştir.

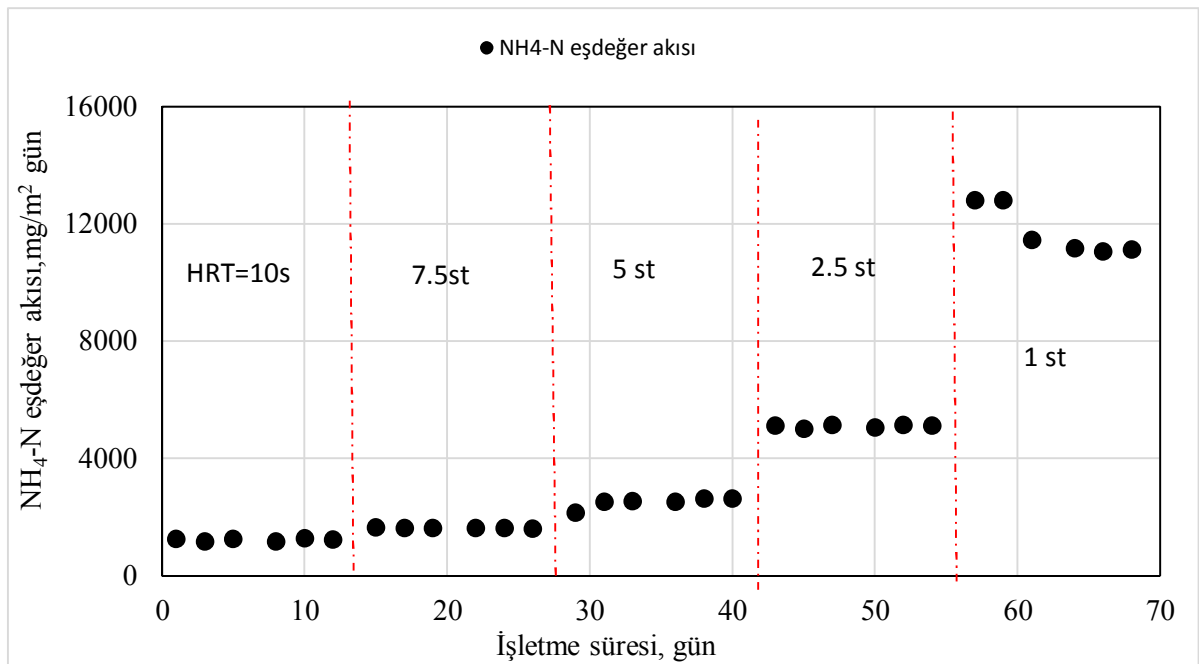
Çalışmanın 42. gününde HRT 2,5 saate düşürülmüştür. NH₄-N ortalama akısı 1114,56 mg/m².gün ve NH₄-N ortalama eşdeğer akısı 5093,56 mg/m².gün bulunmuştur. TC, OTC ve CTC ortalama akıları sırası ile 2,50 mg/m².gün, 4,27 mg/m².gün, 5,28 mg/m².gün ve eşdeğer akıları sırası ile 4,78 mgO₂/m².gün, 7,73 mgO₂/m².gün, 9,19 mgO₂/m².gün olarak bulunmuştur.

Çalışmanın 56. gününde HRT 1 saate düşürülmüştür. NH₄-N ortalama akısı 2575,98 mg/m².gün ve NH₄-N ortalama eşdeğer akısı 11714,92 mg/m².gün bulunmuştur.

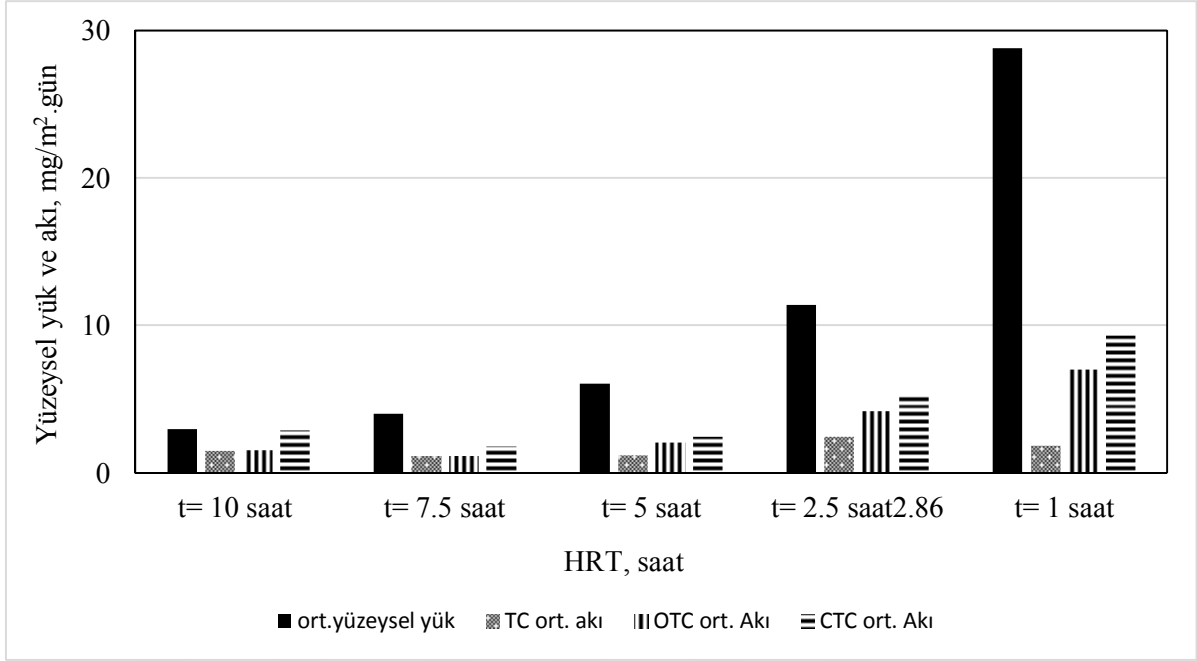
TC, OTC ve CTC ortalama akıları sırası ile $1,92 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$, $7,08 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$, $9,36 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$ ve ortalama oksijen eşdeğer akıları sırası ile $3,67 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$, $12,81 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$, $16,29 \text{ mg/m}^2\cdot\text{gün}$ olarak bulunmuştur. Akı değerlerinde gözlenen artış debinin artmasından kaynaklanmaktadır.



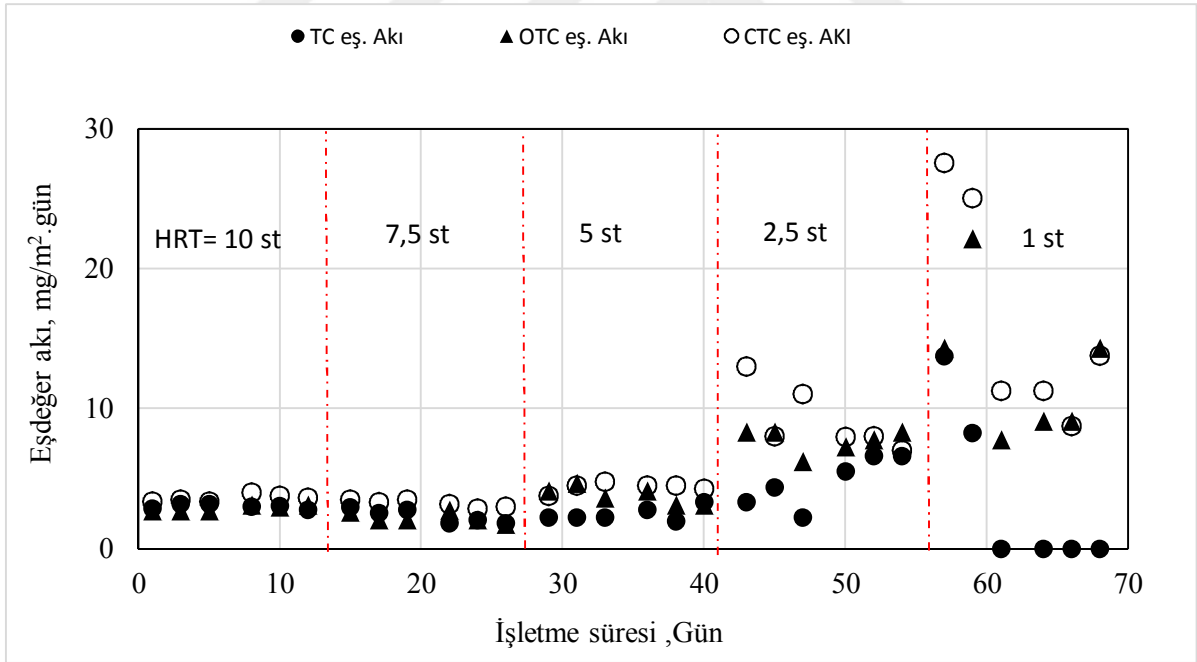
Şekil 5.12: O₂-MBfR’ de NH₄-N yüzeysel yük ve akısı



Şekil 5.13. O₂-MBfR’ de NH₄-N oksijen eşdeğeri akısı



Şekil 5.14: O₂-MBfR’ de TC, OTC, CTC yüzeysel yük ve akısı

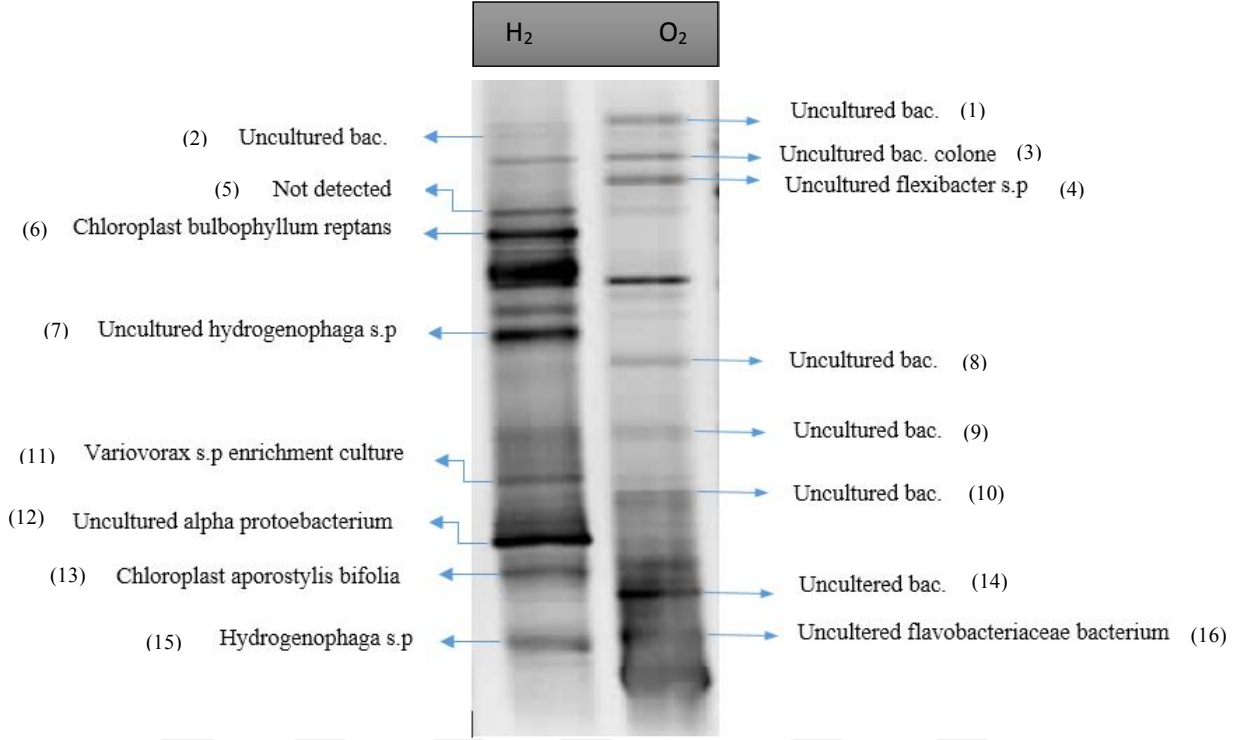


Şekil 5.15. O₂-MBfR’ de TC, OTC, CTC oksijen eşdeğer akıları

5.3. Moleküler sonuçlar

H₂-MBfR ve O₂-MBfR sistemlerinde DGGE bantların kesme işlemi bittikten sonra yapılan dizi analizi sonuçları, sekans dizilimlerinin gen bankası erişim numaraları ile eşleştirilmiştir. Şekil 5.16’ da H₂-MBfR ve O₂-MBfR sistemindeki mikroorganizma

sınıfları numaralandırılmıştır. Tablo 5.1’ de mikroorganizma sınıfları ve benzerlik oranları gösterilmiştir.



Şekil 5.16. H₂-MBfR ve O₂-MBfR sistemindeki mikroorgaizma sınıfları

Tablo 5.1. Mikroorganizma sınıfları ve benzerlik oranları

No	Tanınma Numarası	Kimlik	Benzerlik (%)	Kaynak
1	GQ396808	<i>uncultured bacterium</i>	99	Sattin, ve diğ., 2009
2	KM185673	<i>uncultured bacterium</i>	93	Elser ve diğ., Unpublished
3	<u>GQ059707</u>	<u>Uncultured bacterium clone</u>	96	-
4	GQ421009	<i>uncultured Flexibacter sp.</i>	92	Pradhan, ve diğ., 2010
5		<i>Not detected</i>		
6	JN005379	<i>chloroplast Bulbophyllum reptans</i>	44	Parveen ve diğ., Unpublished
7	GU560177	<i>uncultured Hydrogenophaga sp.</i>	99	Xu ve diğ., Unpublished
8	KM151179	<i>uncultured bacterium</i>	88	Elser ve diğ., Unpublished
9	JN391952	<i>uncultured bacterium</i>	99	Feng ve diğ., Unpublished
10	AB658739	<i>uncultured bacterium</i>	96	Itoh ve diğ., 2013
11	KT630101	<i>Variovorax sp. enrichment culture</i>	96	Huang ve diğ., Unpublished
12	JQ919486	<i>uncultured alpha proteobacterium</i>	92	Penet ve diğ., Unpublished
13	AY381109	<i>chloroplast Aporostylis bifolia</i>	16	Cameron, 2004
14	KM171252	<i>uncultured bacterium</i>	99	Elser ve diğ., Unpublished
15	<u>LT009510</u>	<u>Hydrogenophaga sp.</u>	97	-
16	EF419409	<i>uncultured Flavobacteriaceae bacterium</i>	97	Gao ve diğ., 2008

Hidrojene dayalı membran biyofilm reaktörde *Chloroplast bulbophyllum reptans*, Uncultured *hydrogenophaga* s.p, *Variovorax* s.p enrichment culture, Uncultured *alpha protoebacterium*, *Chloroplast aporostylis bifolia*, *Hydrogenophaga* s.p türleri tespit edilmiştir. Xu ve diğ., (unpublished) atıksudaki farmasotiklerin giderimi ile ilgili olarak biyofilmlerdeki mikrobiyal topluluğu tespit etmişlerdir. Çoklu tetrasiklin grubu antibiyotik gideriminin yapıldığı bu çalışma ile Xu vd., (unpublished) yaptığı çalışmada % 99 benzerlik oranına sahip uncultured *hydrogenophaga* s.p ortak olarak tespit edilmiştir.

Oksijene dayalı membran biyofilm reaktörde bulunan mikroorganizma topluluğunda Uncultured bac. Colone, Uncultured *flexibacter* s.p, Uncultured *flavobacteriaceae bacterium* türleri tespit edilmiştir ancak reaktörlerde mikrobiyal türleri temsil eden mikroorganizma sınıflarının önemli bir yüzdesinin *Uncultured bacterium* olduğu belirlenmiştir. Feng ve diğ., (unpublished) azot ve fosfor giderimi için hibrit bir biyofilm-aktif çamur sistemindeki mikrobiyal topluluğu belirlemiş ve bu tez çalışmasında da bulunan *uncultured bacterium*' u tespit etmişlerdir.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada hidrojene ve oksijene dayalı membran biyofilm reaktörde eşzamanlı olarak TC, OTC, CTC' den oluşan çoklu antibiyotik karışımı ile birlikte azot bileşiklerinin giderimi incelenmiştir. Hidrojene dayalı membran biyofilm reaktörde eşzamanlı olarak TC, OTC, CTC ve $\text{NO}_3\text{-N}$ giderimi çalışılırken oksijene dayalı membran biyofilm reaktörde eşzamanlı olarak TC, OTC, CTC ve $\text{NH}_4\text{-N}$ giderimi çalışılmıştır.

Hidrojene dayalı membran biyofim sistemde 4 psi hidrojen basıncı altında 10, 7.5, 5, 2.5, 1 saat olarak farklı hidrolik bekleme sürelerinde çalışıldı ve HRT 2.5 saate düşürülene kadar denitrifikasyon verimi % 96' nın üzerinde gerçekleşmiştir. 2.5 saatlik hidrolik bekleme süresinde nitrit birikimi ve nitrat çıkış konsantrasyonunun yükselmesine bağlı olarak denitrifikasyon veriminde bir düşüş gözlemlendi ancak HRT 1 saate düşürüldüğünde nitrit birikiminde artışlar devam ederek denitrifikasyon verimi % 50' nin altına düşmüştür. Bu sistemde en iyi çoklu antibiyotik giderimi 10 saatlik hidrolik bekleme süresinde gerçekleşmiştir ve giderim oranları TC, OTC, CTC için sırasıyla ortalama olarak % 93, % 91, % 99 olarak bulunmuştur. $\text{H}_2\text{-MBfR}$ ' de bulunan mikroorganizma topluluğunda *Chloroplast bulbophyllum reptans*, Uncultured *hydrogenophaga* s.p, *Variovorax* s.p enrichment culture, Uncultured *alpha protoebacterium*, *Chloroplast aporostylis bifolia*, *Hydrogenophaga* s.p türleri bulunmuştur.

Oksijene dayalı membran biyofilm sisteminde 4 psi hidrojen basıncı altında 10, 7.5, 5, 2.5, 1 saat olarak farklı hidrolik bekleme sürelerinde çalışılmış ve bu sürelerde % 99 olan nitrifikasyon veriminde önemli bir düşüş gözlenmemiştir. Bu sistemde en iyi çoklu antibiyotik giderimi 10 saatlik hidrolik bekleme süresinde gerçekleşmiştir ve giderim oranları TC, OTC, CTC için sırasıyla ortalama olarak % 52,5, % 54,8, % 70,6 olarak bulunmuştur. Hidrolik bekleme süresinin düşüşüne bağlı olarak çoklu antibiyotik giderim verimleri sürekli düşüş göstermiş ve 1 saatlik HRT' de TC giderimi tamamen durmuştur. Hidrojene dayalı membran biyofilm reaktörde, oksijene dayalı membran biyofilm reaktörden daha yüksek çoklu antibiyotik giderim oranları elde edilmiştir. $\text{O}_2\text{-MBfR}$ ' de bulunan mikroorganizma topluluğunda Uncultured bac. Colone, Uncultured *flexibacter* s.p, Uncultured *flavobacteriaceae bacterium* türleri tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Aydın E.**, (2015). Hidrojene Ve Oksijene Dayalı Membran Biyofilm Reaktörlerinde Klortetrasiklin Giderimi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi
- Cameron, K.M.**, (2004) Utility of plastid psab gene sequences for investigating intrafamilial relationships within Orchidaceae, *Mol. Phylogenet. Evol.* 31 (3), 1157-1180
- Çelik A.**, (2014). Membran-biyofilm hibrit sisteminde oksitetrasiklin Giderim mekanizması, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi
- Elser,J., Bastidas,M., Corman,J.R., Emick,H., Kellom,M., Laspoumadere,C., Lee,Z., Poret-Peterson,A., Balseiro,E. and Modenutti,B.**, Opportunistic sampling reveals unique microbial communities and substantial biogeochemical impact of life on floating pumice , Unpublished
- Feng,C., Chen,S., Wang,S. and Fang,F.**, Investigation of microbial community structure in a hybrid biofilm-activated sludge system with nitrogen & phosphorus removal, Unpublished
- Figueroa, R.A., Mackay, A.A.**, (2005). Sorption of oxytetracycline to iron oxides and iron oxide-rich soils, *Environmental Science and Technology*, 39, 6664-6671.
- Gao, Y., Li, Y., Zhang, L., Huang, H., Hu, J., Shah, S.M., Su, X.**,(2012). Adsorption and removal of tetracycline antibiotics from aqueous solution by graphene oxide. *J. Colloid Interface Sci.* 368, 540-6.
- Gao,Z., Tseng,C.H., Strober,B.E., Pei,Z. and Blaser,M.J.**, (2008) Substantial alterations of the cutaneous bacterial biota in psoriatic lesions ,*Plos one* 3 (7), E2719
- Gómez-Pacheco, C. V., Sánchez-Polo,M., Rivera-Utrilla, M., López-Peñalver, J.J.**, (2012) Tetracycline degradation in aqueous phase by ultraviolet radiation, *Chem. Eng. J.* 187,89–95.
- Hanay, Ö., Türk H.**, (2013). Comprehensive evaluation of adsorption and degradation of tetracycline and oxytetracycline by nanoscale zero- valent iron, *Desalination and water treatment*. Volume 10,pages 1080.
- Hanay,Ö., Taşkan,E., Yıldız,B., Hasar,H., Casey,E.**, (2014). Gas/Substrate Fluxes and Microbial Community in Phenol Biodegradation Using an O₂-Based Membrane

Biofilm Reactor, Clean – Soil, Air, Water Volume 42, Issue 1, pages 36–42, January 2014

- Hasar, H.** (2009). Su ve Atıksu Arıtımında Kabarcıksız Gaz-Difüzyon Membranları. Membran Teknolojileri ve Uygulamaları Sempozyumu. 109-112.
- Hasar, H. And İpek, U.,**(2010). Gas permeable –membrane for hydrogenotrophic denitrification, Clean: Soil, air, water. Volume 38, pages 23-26
- Heidari, M., Saffari Khouzani, H., Amin, M.M., Ghasemian, M., Taherian, E. Attari, L. et al.,**(2011). Inhibition Effect of Antibiotics Ciprofloxacin and Ofloxacin and Hormone β -stradiol 17 Valerat on the Methanogenic Activity of Anaerobic Biomass, Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering, 4 (2), 1-12.
- Huang, X.,** One-stage partial nitrification and anammox in membrane bioreactor, Unpublished
- Itoh, H., Ishii, S., Shiratori, Y., Oshima, K., Otsuka, S., Hattori, M., and Senoo, K.**(2013). Seasonal transition of active bacterial and archaeal communities in relation to water management in paddy soils, Microbes Environ. 28 (3), 370-380
- Ji K., Kim, S., Han, S., Seo, J., Lee, S., Park, Y., Choi, K., Kho, Y.L., Kim, P.G., Park, J.,** (2012). Risk assessment of chlortetracycline, oxytetracycline, sulfamethazine, sulfathiazole, and erythromycin in aquatic environment: are the current environmental concentrations safe Ecotoxicology, 21, pp. 2031–2050
- Kim, S.C., Carlson, K.,** (2007). Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices. Environ Sci. Technol. 41, 50–57.
- Kim, J., Suk, J., Nam, D., Ha, K., & Choung, Y.,** (2013). The study of electron equivalent fluxes about decomposition of sulfamethazine and sulfathiazole using oxygen-based membrane biofilm reactor, Desalination and Water Treatment ISSN: 1944-3994 (Print) 1944-3986
- Li, D., Yang, M., Hu, J., Ren, L., Zhang, Y., Li, K.,** (2008). Determination and fate of oxytetracycline and related compounds in oxytetracycline production wastewater and the receiving river. Environ. Toxicol. Chem. 27, 80–86.
- Lin, A.Y., Yu, T., Lateef, S.K.,** (2009). Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. J. Hazard. Mater. 167, 1163-69.

- Liu, C., Xu, J., Lee, D.J., Yu, D., Liu, L.,** (2016). Denitrifying sulfide removal process on high-tetracycline wastewater, *Bioresource Technology* 205, 254–257
- Liu,J., Sun,Q., Zhang,C., Li,H., Song,W., Zhang,N., & Jia,X.,** (2016). Removal of typical antibiotics in the advanced treatment process of productive drinking water, *Desalination and Water Treatment*, 57:24, 11386-11391,
- López-Peñalver,J.J., Sánchez-Polo,M., Gómez-Pacheco,C.V., Rivera-Utrilla,J.,** (2010). Photodegradation of tetracyclines in aqueous solution by using UV and UV/ H₂O₂ oxidation processes, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85 (2010) 1325–1333
- Martin, K.J., Nerenberg, R.,** 2012. The membrane biofilm reactor (MBfR) for water and wastewater treatment: Principles, applications, and recent developments, *Bioresource Technology*, pp. 83–94
- Nerenberg,R.,** (2016). The membrane-biofilm reactor (MBfR) as a counter-diffusional biofilm process. *Current Opinion in Biotechnology* Volume 38, April 2016, Pages 131–136
- Nicolella C, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ**(2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *J Biotechnol*, 80:1-33.
- Özak, A.A., Cengizler, İ.,** (2001) Tilapia (*Oreochromis Niloticus*)’larda Oksitetrasiklin (Otc)’nin Farmakokinetik Araştırmaları, Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi 01330 Balcalı, Adana
- Özalp Dural, E.A.,** (2002). Farmakoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, Nobel Matbaacılık, 603, 798s. İstanbul.
- Parveen,I., Singh,H.K., Raghuvanshi,S. and Babbar,S.B.,**DNA barcoding of orchids, Unpublished
- Penet,S., Guermazi,S., Marchal,R., Le Paslier,D., Pelletier,E., Monot,F. and Sghir,A.** Molecular diversity analysis of an adapted soil microflora with high potential for comercial diesel oil degradation, Unpublished.
- Pradhan,S., Srinivas,T.N., Pindi,P.K., Kishore,K.H., Begum,Z., Singh,P.K., Singh,A.K., Pratibha,M.S., Yasala,A.K., Reddy,G.S. and Shivaji,S.,**(2010).Bacterial biodiversity from Roopkund Glacier, Himalayan mountain ranges, India, *Extremophiles* 14 (4), 377-395
- Rittmann, B.E.,** (2008). *Environmental Science and Technology*, in press.
- Salazar-Rábago,J.J., Sánchez-Polo,M., Rivera-Utrilla,J., Leyva-Ramos,R., Ocampo**

- Pérez,R.,** (2016). Role of [O₂] in chlortetracycline degradation by solar radiation assisted by ruthenium metal complexes , Chemical Engineering Journal 284, 896–904
- Samsunlu,A.,** (1997). Çevre mühendisliği kimyası, Birsen yayınevi
- Sarmah, A.K., Meyer, M.R., Boxall, A.B.A.**(2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment, Chemosphere, 65, 725-759.
- Sattin, S.R., Cleveland, C.C., Hood, E., Reed,S.C., King, A.J., Schmidt, S.K., Robeson, M.S., Ascarrunz,N. and Nemergut, D.R.**(2009). Functional shifts in unvegetated, perhumid, recently-deglaciated soils do not correlate with shifts in soil bacterial community Composition, J. Microbiol. 47 (6), 673-681.
- Sorensen, H.B., Nielsen, N.S., Lanzky, PF., Ingerslev, F., Holten Luzthoft, HC., Jorgensen SE.,**(1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- a review, Chemosphere, 36:357-393.
- Stackelberg, P.E., Gibs, J., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Lippincott, R.L.,** (2007). Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds. Sci. Total Environ. 377, 255-72
- Şahinkaya, E., Hasar, H., Kaksonen, A.H., Ritmann, B.E.,**(2011).performance of a sulfide –oxidizing, sülfür- prociding membrane biofilm reactortreating sulfide-containing bioreactor effluent, Env. Science and technology. Volume 45, pages 4080-4087.
- Taşkan B.** (2014). Membran biyofilm reaktöründe tetrasiklin giderimi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi
- Ternes, T.A., Meisenheimer, M., McDowell, D., Sacher, F., Brauch, H., Haist-Gulde, B., Preuss, G., Wilme, U., Zulei-Seibert, N.**(2002). Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. Environ. Sci. Technol. 36, 3855-63
- URL 1:** (http://www.fda.gov/cvm/FOI/038-439_EA.pdf)
- Xu,H., Leong,J.M. and Liu,Y.,** The Biodiversity of Biofilms Treating Pharmaceutical Wastewater, Unpublished
- Yang, S., Cha, J., Carlson, K.**(2005). Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic

wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1097, 40-53.

Zhang, D., Lin, L., Luo, Z., Yan, C., Zhang, X.(2011). Occurrence of selected antibiotics in Jiulongjiang River in various seasons, South China. *J. Environ. Monit.* 13,1953–1960.

Zhang,X., Guo,W., Ngo,H.H., Wen,H., Li,N., Wu,W., (2016). Performance evaluation of powdered activated carbon for removing 28 types of antibiotics from water, *Journal of Environmental Management* 172 (2016) 193-200



ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Elazığ’ da doğdum. İlk ve orta öğretimimi Elazığ’ da tamamladım. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümüne girmeye hak kazandım. Çift Anadal programı kapsamında 2011 yılında Mühendislik Fakültesi İnşaat mühendisliği Bölümüne başladım. 2013 yılında çevre mühendisliği bölümünde lisans eğitimimi tamamladıktan sonra yüksek lisans eğitimime başladım. 2014 yılında inşaat mühendisliği bölümünden mezun oldum.

