

Gerçek ölçekli UASB reaktörlerde metanojenik popülasyon dinamiği

Bahar KASAPGİL İNCE^{1*}, Mustafa KOLUKIRIK^{2,3}, Orhan İNCE²

¹Boğaziçi Üniversitesi, Çevre Bilimleri Enstitüsü, 34342, Bebek, İstanbul

²İstanbul Teknik Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 34469, Maslak, İstanbul

³İstanbul Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 34469, Maslak, İstanbul

Özet

Bu çalışmada, alkol distilasyon atıksularını arıtan, kısaca IUASB, TUASB ve CUASB olarak adlandırılan üç farklı gerçek ölçekli yukarı akışlı anaerobik çamur yatağı (UASB) reaktörünün 2002-2004 yılları arasındaki işletme performansları, Metan Arke komünite yapıları ve Potansiyel Metan Üretim (PMÜ) hızları tartışılmıştır. Aynı süreçte UASB reaktörlerinden 2-12 kg KOİ/m³.gün aralığındaki organik yükleme hızlarında, %60-95 aralığında KOİ giderim verimleri elde edilmiştir. Spesifik Metan Aktivite (SMA) test sonuçları IUASB, TUASB ve CUASB reaktörlerinin PMÜ hızlarının 2002 yılında sırasıyla 321, 344 ve 256 mL CH₄/gUAKM.gün iken, 2004 yılında sırasıyla 133, 109 ve 108 mL CH₄/gUAKM.gün değerlerine düştüğünü göstermiştir. Reaktörlerden elde edilen gerçek metan üretim (GMÜ) hızları, reaktör çamurlarının PMÜ hızları ile oranlandığında elde edilen değerler, 0.1-0.4, reaktörlerin maksimum kapasitelerinin çok altında yüklendiklerini göstermektedir. Floresanlı yerinde hibritleşme (FISH) sonuçları her üç reaktörde de baskın metanojenlerin, asetoklastik bir cins olan Methanosaeta'ya ait olduğunu göstermiştir. Hidrojen kullanan metan arkelerinden Methanobacteriales TUASB ve CUASB reaktörlerinde, Methanococcales ise IUASB reaktöründe baskın halde bulunmaktadır. IUASB ve TUASB reaktörlerinin asetoklastik metan üretim kapasitelerinde meydana gelen, sırasıyla %59 ve %68'lik kayıplara paralel olarak, reaktörlerde rastlanan tek asetoklastik cins olan Methanosaeta'nın rölatif miktarında sırasıyla %25 ve %11'lik kayıplar, hidrojen kullanan metanojenlerin rölatif miktarlarında ise sırasıyla %20 ve %24'lük bir artış meydana gelmiştir. CUASB reaktöründeki metanojenik komünite yapısı zaman içerisinde stabil kalmıştır.

Anahtar Kelimeler: Floresanlı yerinde hibritleşme, spesifik metan aktivite testi, metanojenler, UASB reaktör, alkollü içki endüstrisi atıksuları.

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Bahar KASAPGİL İNCE. bahar.ince@boun.edu.tr; Tel: (212) 359 70 16.

Makale metni 02.04.2007 tarihinde dergiye ulaşılmış, 11.06.2007 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 30.10.2007 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

Methanogenic population dynamics in full-scale UASB reactors

Extended abstract

A prerequisite for stable performance in an anaerobic treatment system is maintenance of active methanogenic populations in the system. However, there are few published studies available that assess performance of a full-scale anaerobic reactor in relation to the make up of reactor biomass in terms of qualitative and quantitative measures of methanogenic species and their activities. This study was undertaken to assess changes in performance of three full-scale upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors, namely IUASB, TUASB and CUASB, at wastewater treatment plants of Istanbul Alcohol (Raki), Tekirdag Alcohol (Raki) and Canakkale Alcohol (Cognac) distilleries in relation to qualitative and quantitative measures of the relevant archaeal methanogenic populations. Composition and quantity of archaeal methanogens were determined using fluorescent in situ hybridization (FISH) combined with epifluorescence microscopy. Specific methanogenic activity (SMA) test was used to determine the potential methane production (PMP) rates of the anaerobic sludges.

The IUASB reactor performed well achieving COD removal efficiencies of no lower than 80% at a range of OLRs from 6-11 kg COD m⁻³ day⁻¹ in years between 2001 and 2004. The TUASB reactor also performed well achieving COD removal efficiencies between 70% and 85% at OLRs in a range of 2-12 kg COD m⁻³ day⁻¹ between 2001 and 2004. COD removal efficiency of the TUASB reactor varied between 60% and 80% at OLRs in a range of 2.5-12 kg COD m⁻³ day⁻¹ between 2002 and 2004.

According to the SMA tests results PMP rates of the IUASB, TUASB and CUASB sludges were 321, 344 and 256 mL CH₄gVSS⁻¹ day⁻¹ respectively in the year 2002 and decreased to 133, 109 and 108 CH₄gVSS⁻¹ day⁻¹ respectively after two years of operation. When the PMP rates were compared with actual methane production (AMP) rates obtained from the three UASB reactors, AMP/PMP ratios were evaluated to be between 0.1 and 0.4. These results can be interpreted that the three UASB reactors were under loaded compared to their potential acetoclastic methanogenic capacities. This could have been due to retaining high amount of granular sludges within the UASB reactors resulting in F/M (food to microorganisms) ratios in a range of 0.02-0.07 gCOD

gTVS⁻¹ day⁻¹ which is much lower than the typical values reported for similar reactors in literature. Since all other operational parameters such as pH, temperature, alkalinity, nutrients etc. have been maintained within their typical ranges, it was concluded that the prolonged operation of the three UASB reactors under very low F/M ratios might have lead to the significant decreases in the PMP rates of the reactor sludges.

FISH results revealed that the relative abundance of archaeal cells within the IUASB, TUASB and CUASB sludges were in range of 14-18%, 15-17% and 14-15% respectively. Methanosaeta spp. were the predominant methanogen in all of the anaerobic sludges. However, over time the relative abundance of acetoclastic Methanosaeta in the IUASB and TUASB reactors reduced from 83% ± 1.6 and 90% ± 1.2 to 58% ± 2.1 and 79% ± 1.4 of the archaeal population respectively. These decreases coincided with 59% and 68% decreases in the acetoclastic methanogenic capacities and 20% and 24% increases in the relative abundance of hydrogenotrophic methanogens in the archaeal population of the IUASB and TUASB sludges respectively. Although a 58% decrease in the acetoclastic methanogenic capacity of the CUASB sludge was detected, the reactor sludge had stable archaeal community structure. Among the hydrogenotrophic methanogens, Methanococcales followed by Methanobacteriales were dominant methanogens within the IUASB reactor. This study is the first that reports dominance of Methanococcales among the hydrogenotrophic methanogens within UASB reactors. Methanobacteriales was the predominant hydrogenotrophic methanogen within the both TUASB and CUASB reactors.

In this study the significant decreases in the activity of methanogens was detected at an early stage by using the SMA test so that process conditions can be changed, and collapse of the reactors can be avoided. The SMA test and FISH results showed that the reduction of acetoclastic methanogenic activity in IUASB and TUASB reactors is related to loss of Methanosaeta spp. However, acetoclastic methanogenic activity losses in the CUASB reactor were not reflected in the archaeal community structure of the reactor sludge.

Keywords: Fluorescence in situ hybridization, specific methanogenic activity, methanogens, UASB reactor, alcohol distillery effluents.

Giriş

Alkollü içki endüstrisi atıksuları orta şiddetteki seviyelerin üzerinde organik kirletici içeren atıksulardır. Bu tip atıksuların arıtımında yüksek biyokütle içeriğine ve zengin mikrobiyal çeşitliğe sahip olan yukarı akışlı anaerobik çamur yatağı (UASB) reaktörü yaygın olarak kullanılmaktadır. Anaerobik proseslerin başarısı arıtılan atıksu tipine ve proses parametrelerinin doğru seçimine bağlıdır. Bunlara ek olarak, istenilen KOİ giderim verimini elde edebilmek ve sistem stabilitesinin sürekliliğini sağlayabilmek için, reaktörde yeterli miktarda aktif metan arke popülasyonları tutulmalıdır. Bu nedenle, anaerobik reaktörlerin işletilmesi sırasında metan *Arke*'nin sayısında, türlerinde ve aktivitelerinde meydana gelebilecek değişimleri floresanli *yerinde* hibritleşme (FISH), mikroskopik sayım, en muhtemel sayı (MPN), adenozin üç fosfat (ATP), koenzim F₄₂₀, dehidrojen aktivite ve spesifik metan aktivite (SMA) testi gibi mevcut yöntemleri kullanarak belirlemek önemlidir (Jawed ve Tare, 1999; Hofman-Bang vd., 2003). Anaerobik çamurun asetoklastik metan kapasitesini ölçmek için kullanılan SMA testi, reaktör işletmeye alma dönemlerinde sistemde tutulması gereken uçucu askıda katı madde (UAKM) miktarının belirlenmesini ve sisteme uygulanabilecek optimum organik yüklemenin hesaplanmasını sağlayarak, bu tür sistemlerin işletmeye alma sürecini kısaltmaktadır (İnce vd., 1995). Ayrıca işletme sırasında, olumsuz işletme şartları nedeniyle asetoklastik metan *Arke* türlerinin aktivitesinde meydana gelen değişimleri belirleyerek, sistem performansının artırılmasında ve sistem stabilitesinin sürekliliğinin sağlanmasında bir kontrol parametresi olarak kullanılabilir (İnce vd., 2005).

Biyolojik çamur numunelerindeki asetoklastik metan *Arke*'yi gözlemek ve saymak rutin kültür ekimine dayalı yöntemlerle mümkün olmamaktadır. Çünkü, metan *Arke*'nin saf kültürlerinin elde edilmesi ve çoğaltılması laboratuvar şartlarında çok zor gerçekleştirilmektedir (Hofman-Bang vd., 2003). Bu tür kısıtlamaları olmayan moleküler teknikler ise geleneksel yöntemlerin bu eksikliklerini tamamlamış ve mikrobiyal ekolojiye yeni bir boyut kazandırmıştır.

Spesifik mikrobiyal türlerin kendi doğal ortamlarında saptanması ve sayımı amacıyla kullanılan, kültürden bağımsız bir moleküler yöntem olan floresanli *yerinde* hibritleşme (FISH) ile anaerobik biyolojik çamur numunelerindeki aktif mikrobiyal toplulukların tanımlanması başarı ile yapılabilmektedir (Wagner vd., 2003).

Bu çalışmada, üç farklı Tekel içki fabrikasına ait atıksuları arıtan gerçek ölçekli UASB reaktörlerinin 2002-2004 yılları arasındaki işletme performansları ile reaktörlerden bu süreç içerisinde alınan biyolojik çamur örneklerinin mikrobiyal komünite yapıları ve potansiyel metan üretim (PMÜ) hızları tartışılmıştır. PMÜ hızlarını belirleyebilmek için SMA test düzeneği kullanılmıştır. Biyolojik çamur örneklerinin mikrobiyal komünite yapısı FISH tekniği kullanılarak belirlenmiştir. UASB reaktörlerinin performansları, metan aktiviteleri ve mikrobiyal kompozisyonları birbirleriyle ilişkilendirilerek, bu tip sistemlerin stabilitesinin uzun vadeli korunmasına yönelik öneriler getirilmiştir.

Materyal ve yöntem

Yukarı akışlı çamur yatağı reaktörlerinin özellikleri

İstanbul UASB (IUASB), Çanakkale UASB (CUASB) ve Tekirdağ UASB (TUASB) reaktörleri sırasıyla Tekel İstanbul, Çanakkale ve Tekirdağ İçki Fabrikalarının iki aşamalı anaerobik-aerobik biyolojik arıtma sistemlerinin anaerobik safhalarında kullanılmaktadır. IUASB, CUASB, TUASB reaktörlerinin hacimleri sırasıyla 143, 190 ve 476 m³'tür. Reaktörlerdeki sıcaklık, pH ve KOİ:N:P oranı sırasıyla 35-37°C, 6.4-7.5 ve 400:5:1 değerlerinde tutulmaktadır. IUASB, CUASB, TUASB reaktörlerindeki alkalinite sırasıyla 1300-1700, 1400-1700 ve 1200-1500 mgCaCO₃/L CaCO₃ değerlerinde, reaktörlere uygulanan besin/biyokütle (F/M) oranları ise sırasıyla 0.04-0.06, 0.02-0.07 ve 0.02-0.03 gKOİ/ gUAKM.gün değerlerinde tutulmaktadır. Reaktörlere uygulanan F/M oranı UASB reaktörlerine uygulanan tipik F/M oranlarının bir hayli altında kalmaktadır (0.5-1 gKOİ/g.UAKM.gün) (Driessen, 1994; Baier ve Delavy, 2005; Ince vd., 2005).

Tablo 1. Atıksu özellikleri

Parametre	Tekirdağ (Rakı)	Çanakkale (Konyak)	İstanbul (Rakı)
KOİ, mg/L	27 000-32 000	11 000-23 000	25 000-33 000
BOİ ₅ , mg/L	13 000-15 000	6 000-12 500	12 000-16 000
TKN, mg/L	500-700	300-350	350-450
SO ₄ , mg/L	-	-	50-100
Toplam-P, mg/L	120-150	150-200	150-250
Ca ⁺⁺ , mg/L	-	-	170-240
pH	4.0-6.0	6.5-7.0	5.5-6.0

Atıksu özellikleri

Rakı ve konyak üretiminin yapıldığı Tekel İstanbul, Çanakkale ve Tekirdağ İçki Fabrikaları'ndan kaynaklanan atıksuların özellikleri Tablo 1'de verilmektedir. Türkiye'de içki üretimi genel olarak rakı, konyak, şarap, bira ve likör ürünleri üzerine yoğunlaşmıştır. Kuru üzümün ve anason tohumlarının ham madde olarak kullanıldığı rakı, suma ve rakı üretimi olmak üzere iki ana üretim aşaması ile ürün olarak ortaya çıkmaktadır. Suma üretimi aşamasında, kuru üzümler küçük parçalara ayrılarak su eklendikten sonra 45 ila 56 saat arasında fermentasyon işlemine tabi tutulmaktadır. Fermente edilmiş ara ürün, suyun ve uçucu maddelerin uzaklaştırıldığı distilasyon kolonuna alınmaktadır. Rektifikasyon ünitesinde, alkolün derecesi %93.5-95'e yükseltilmektedir. Suma üretiminin son aşamasında, soğutma ve dinlendirme işlemleri yapılarak ve aynı zamanda şeker eklenerek alkolün derecesi %45-50'ye düşürülmektedir. Rakı üretimi aşamasında, suma 1-4 ay arasında olgunlaştırma, yumuşatma ve yaşlandırma işlemlerinin yapılması için bir tanka alınmaktadır. Ayrıca bu tanka aromatik tadı sağlamak için anason tohumları da eklenir. Konyak üretimi için kullanılan distilasyon işlemi çifte distilasyon olarak adlandırılmaktadır. Düşük alkol içerikli şaraplar, %28'lik alkol oranını yakalamak için ilk distilasyon işleminde kullanılmaktadır. İlk distilasyon işlemi konyağı daha aromatik hale getirmektedir. İkinci distilasyon aşamasında, ham konyak özü 12 saat süresince

distile edilmektedir. Bu özün alkol oranı yaklaşık %69 ile %72 arasında olup, meşe varillerde 3 ila 25 yıl arasında olgunlaştırılmaktadır. Ol-

gunlaştırma işlemi sırasında, her yıl konyağın %2-4'ü buharlaşarak, alkol oranı yaklaşık %40'a düşürülmektedir.

Analitik metodlar

UASB reaktörlerinin işletilmesi sırasında sıcaklık, pH, KOİ ve biyogaz üretimi parametreleri ve reaktör çamurlarının askıda katı madde (AKM), uçucu askıda katı madde (UAKM), toplam katı madde (TKM) ve toplam uçucu katı madde (TUKM) konsantrasyonları izlenmiştir. Gaz kompozisyonu, HP 6850 model termal kondaktivite detektörlü bir gaz kromatografi (HP Plot Q Kolon 30 m x 0.53 mm) kullanılarak belirlenmiştir. Tüm analizler Standart Metoda göre yapılmıştır (APHA, 1997).

Spesifik metan aktivite test düzeneği

Bu çalışmada PMÜ hızlarını belirleyebilmek için SMA test düzeneği kullanılmıştır (Monteggia, 1991; Ince vd., 1995). SMA test ünitesi 8 adet 1 litre hacimli anaerobik reaktörden oluşmaktadır. Bu anaerobik reaktörler, sıcaklığı otomatik olarak kontrol edilen bir su banyosunun içerisine yerleştirilmiştir. Reaktörleri belirli bir sabit hızda karıştıracak manyetik bir sistem mevcuttur. DAS 800 Model data işlem kartı içeren bir bilgisayar (Metrabyte Corporation, UK) reaktörlerden çıkan gazı sürekli olarak kaydetmek amacıyla kullanılmıştır. Reaktörlerden çıkan biyogaz üç kollu vanalar kullanılarak kontrol edilmektedir. Bu vanaları kontrol eden ve gelen sinyalleri bilgisayara gönderen bir vana kontrol ünitesi de mevcuttur. SMA test düzeneğinin detayları ve deneysel prosedürü daha önce yayımlanan bir makalede verilmiştir (Ince vd., 1995).

Spesifik metan aktivitesinin hesaplanması

Potansiyel metan üretimi;

$$\text{SMA (mL CH}_4\text{/gUAKM.gün)} = \frac{(A \times B \times C \times 24)}{(D \times E)} \quad (1)$$

formülü ile hesaplanabilmektedir. Burada;

A: 1 saatteki biyogaz üretimi

B: biyogazın metan içeriği

C: vana faktörü

D: SMA test reaktörünün aktif hacmi

E: SMA test reaktöründeki biyokütle konsantrasyonu (gUAKM/L)

olarak verilmektedir.

Aşı çamuru ve besleme çözeltisi

CUASB ve TUASB reaktörleri sırasıyla 1997 ve 1998 yıllarında işletmeye alınmış ve her iki reaktör de IUASB reaktöründen alınan granüler çamur ile aşılanmıştır. IUASB, TUASB ve CUASB reaktör çamurlarının Toplam Katı Madde (TKM) ve toplam uçucu katı madde (TUKM) konsantrasyonları Tablo 2’de verilmektedir. SMA test reaktörleri IUASB, CUASB ve TUASB reaktörlerinden alınan çamurlar ile aşılanmıştır. Aşı çamurları SMA test reaktörlerinde UAKM konsantrasyonu 2000 mg/L olacak şekilde mineral stok çözeltisi (2500 mg/L KH_2PO_4 , 1000 mg/L K_2HPO_4 , 1000 mg/L NH_4Cl , 100 mg/L MgCl_2 , 100 mg/L $\text{Na}_2\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200 mg/L Maya özü) ile seyreltilmişlerdir.

Tablo 2. Reaktör çamurlarının TKM ve TUKM konsantrasyonları

	TKM (mg/L)	TUKM (mg/L)
IUASB	154000-159000	142000-145000
TUASB	130000-150000	100000-130000
CUASB	51000-56000	45000-47000

Kompleks süstratın anaerobik ayrışması sırasında oluşan metan gazının yaklaşık %72’sinin asetik asitten gelmesi nedeniyle SMA testinde besleme çözeltisi olarak asetat kullanılmıştır (Zinder, 1993). SMA testinde maksimum metan üretim hızının elde edildiği asetat konsantrasyonunu bulmak için öncelikle 2000-5000

mg/L asetat konsantrasyonları denenmiş ve 3000 mg/L asetat konsantrasyonu optimum bulunmuştur.

Mikrobiyolojik çalışmalar için numune alımı ve numunelerin fiksasyonu

Her bir reaktörden 3’er numune alınmıştır. Numuneler alınır alınmaz %98’lik etanol (1:1, h/h) eklenmiştir. Örnekler laboratuvara soğuk zincirde ($\leq 4^\circ\text{C}$) saklanarak götürülmüştür ve aynı gün içerisinde fiksasyon işlemi gerçekleştirilerek -20°C ’de muhafaza edilmiştir. Numunelerin fiksasyonu %4 paraformaldehit (PFA) ile yapılmıştır. Fiksasyondan sonra hücreler fosfat tampon çözeltisi (PBS) (130 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7.2) ile yıkayıp PBS-Etanol (1:1, h/h) karışımı içerisinde -20°C ’de saklanmıştır (Harmsen vd, 1996).

Toplam hücre sayımı

Görüntü alanı başına 50-200 hücre düşecek miktarda (10-30 μL) fikslenmiş hücre jelatinle kaplanmış mikroskop lamı üzerine konmuş ve hava ile kurutulmuştur. Hücrelerin artan etanol konsantrasyonlarında (%50, %80, %100) dehidrasyonları yapılmıştır. Dehidrasyondan sonra 13 μL PBS ve 2 μL SYBR Green I (10000x) DNA boyası eklenmiş ve 30 dk oda sıcaklığında hücreler inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler PBS ile iki defa yıkanmışlardır. Bir damla citifluor (Citifluor Ltd., İngiltere) eklendikten sonra preparatların üzeri lamelle kapatılmıştır. Görüntüler, CCD (charged coupled device) Spot RT kamera ve özel bir yazılıma sahip floresan atışmanlı, 100 W’lık yüksek basınçlı civa lambalı Olympus BX 50 model epifloresan mikroskobu kullanılarak elde edilmiştir. Her boyama için 10 rastgele görüntü alınmıştır. Hücre sayımları Image-Pro Plus 5.1 analiz programı (Media Cybernetics, U.S.A.) kullanılarak yapılmış ve sayım sonuçlarının ortalaması ile standart sapmaları hesaplanmıştır.

Floresanlı yerinde hibritleşme yöntemi

UASB reaktör çamurlarındaki toplam *Arke* popülasyonları ve metan *Arke* topluluklarının rölatif miktarlarının belirlenmesi için FISH tekniği kullanılmıştır. Bu çalışmada MC1109 (*Methanococcales*), MB310 (*Methanobacteriales*), MG1200 (*Methanogenium* akrabalari),

MX825 (*Methanosaeta türleri*), MS821 (*Methanosarcina türleri*), MS1414 (*Methanosarcina* + akrabaları) (Raskin vd., 1994) problemleri reaktör ç amurlarındaki metanojenlerin yüzdelerinin belirlenmesi için kullanılmış tır. ARC915 (Stahl vd., 1988) ve UNIV1392 (Pace vd., 1986) problemleri reaktör ç amurlarındaki sırasıyla *Arke* hücrelerinin ve toplam mikrobiyal hücrelerin miktarlarının belirlenmesi amacıyla kullanılmış tır. Tüm problemler Cy3 (5') ile işaretli olup, ticari olarak elde edilmiştir (Qiagen Corp., Almanya).

Görüntü alanı başına 50-200 hücre düşecek miktarda (10-30 µL) fikslenmiş hücre jelatinle kaplanmış mikroskop lamı üzerine konmuş ve hava ile kurutulmuştur. Hücrelerin artan etanol konsantrasyonlarında (%50, %80, %100) susuzlaştırılmaları yapılmıştır. Hücreler hibritleşme tamponu (0.9M NaCl, 2 mg/mL Ficoll, 2 mg/mL Bovine Serum Albumen, 2 mg/mL polivinil pirolidon, 5mM EDTA, pH 8.0, 25 mM NaH₂PO₄, pH 7.0, %0.1 SDS, %10-35 deiyonize formamit, 2.5 ng/µL hibritleşme probu) içerisinde, 46 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir (Amann vd., 1990; Manz vd., 1992). İnkübasyondan sonra, hücreler 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.01% SDS, 0-5 mM EDTA ve Lathe'nin (1985) formülüne göre ayarlanmış konsantrasyonlarda NaCl içeren yıkama çözeltisi ile iki defa 48 °C'de yıkanmışlardır (Manz vd., 1992). Bir damla citifluor (Citifluor Ltd., United Kingdom) eklendikten sonra, preparatların üzeri lamelle kapatılmış tır. Görüntüler, CCD (charged coupled device) Spot RT kamera ve özel bir yazılıma sahip floresan ataşmanlı, 100 W'lık yüksek basınçlı civa lambalı Olympus BX 50 model epifloresan mikroskobu kullanılarak elde edilmiştir. Her hibridizasyon için 10 rastgele görüntü alınmıştır. Hücre sayımları Image-Pro Plus 5.1 analiz programı (Media Cybernetics, U.S.A.) kullanılarak yapılmış ve sayım sonuçlarının ortalaması ile standart sapmaları hesaplanmıştır.

Deneysel çalışma sonuçları

Yukarı akışlı anaerobik ç amur yatağı reaktörlerinin performansı

2001 ile 2004 yılları arasında UASB reaktörlerinden elde edilen KOİ giderim verimleri ile reaktörlere uygulanan organik yükleme değerleri

Şekil 1-3'te verilmektedir. IUASB reaktörü 6-11 kg KOİ/m³.gün aralığında organik yüklemelerde çalıştırılmış ve reaktörden %80'in üzerinde KOİ giderim verimi elde edilmiştir (Şekil 1). TUASB reaktörü 2.5-12 kg KOİ/m³.gün organik yüklemede çalıştırılmış ve reaktörden %60-80 aralığında KOİ giderim verimi elde edilmiştir (Şekil 2). CUASB reaktörü 2-12 kg KOİ/m³.gün organik yüklemede çalıştırılmış ve reaktörden %70-85 aralığında KOİ giderim verimi elde edilmiştir (Şekil 3).

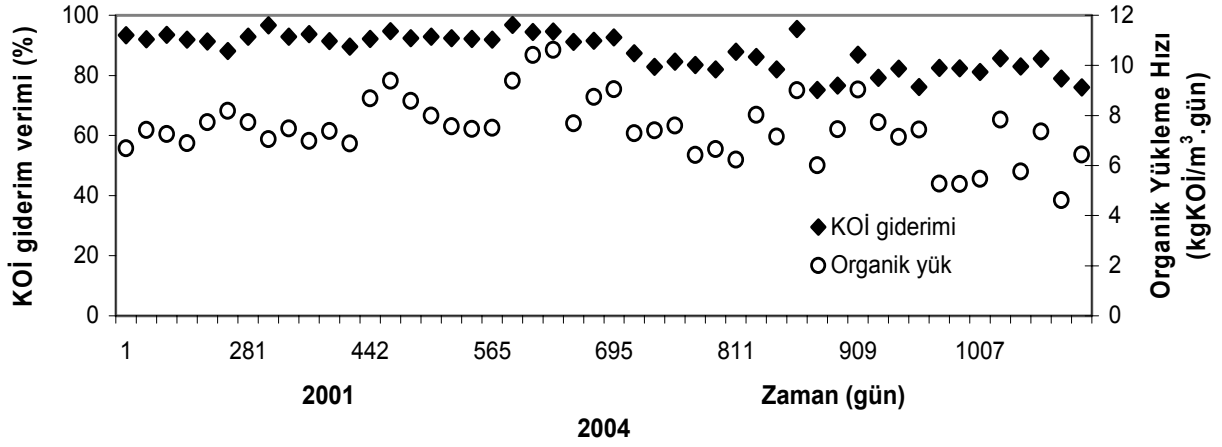
Alkol endüstrisi atıksularını arıtan UASB reaktörlerinden 10 ile 20 kg KOİ/m³.gün aralığındaki organik yüklemelerde, %65 ile 95 aralığında KOİ giderim verimleri elde edilebilmektedir (Driessen vd., 1994). Bu çalışmanın konusu olan UASB reaktörlere uygulanan organik yüklemeler (≤ 12 kg KOİ/m³.gün) bu aralığın alt sınırı içerisinde kalmakta ve her bir reaktörden iyi düzeyde KOİ giderim performansı (%60-95) elde edilmektedir.

Spesifik metan aktivite test sonuçları

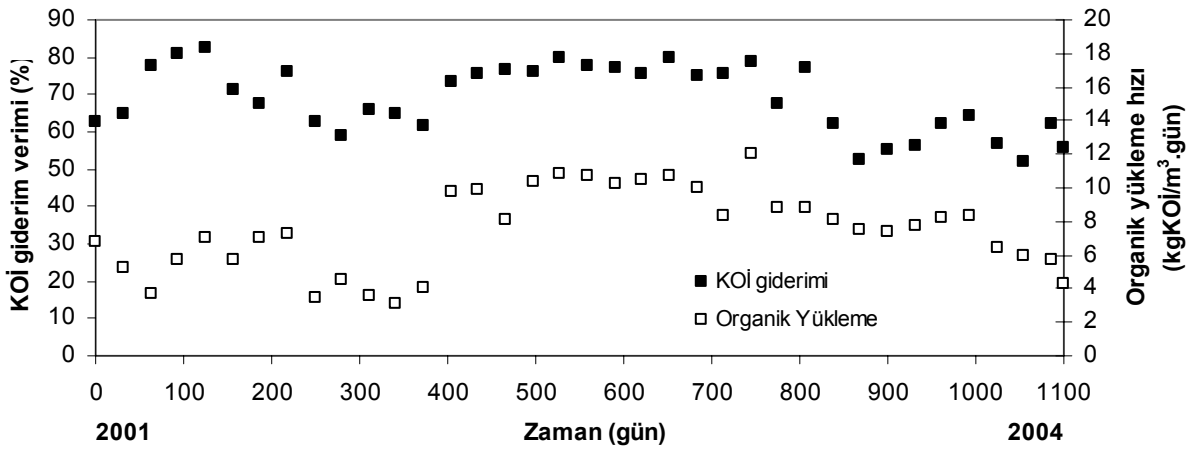
IUASB, TUASB ve CUASB reaktörlerinin SMA test sonuçları sırasıyla Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6'da verilmektedir. Reaktörlerden elde edilen gerçek metan üretim (GMÜ) hızları ve reaktör ç amurlarının PMÜ hızları Tablo 3'te verilmektedir.

IUASB, TUASB ve CUASB reaktör ç amurlarının 2002-2004 yılları arasında PMÜ hızlarında sırasıyla %59, %68 ve %58'lik kayıplar meydana gelmiştir (Tablo 3). Bu durum sistem performanslarına yansımamıştır. Reaktörlerin GMÜ/PMÜ oranları bu çalışmanın konusu olan UASB reaktörlerinin maksimum kapasitelerinin çok altında yüklendiklerini göstermektedir. Literatürde anaerobik reaktörlerde stabilitenin sürekliliğinin sağlanması ve istenilen sistem performansının elde edilmesi için GMÜ/PMÜ oranı 0.6-0.7 aralığında tutulması gerektiği belirtilmiştir (İnce vd., 1995; Monteggia, 1991). Ayrıca, reaktörlere uygulanan F/M oranlarının, 0.2-0.7 gKOİ/g.UAKM.gün, UASB reaktörlerine uygulanan tipik F/M oranlarının (0.5-1 gKOİ/g.UAKM.gün) oldukça altında kalması da reaktörlerin maksimum kapasitelerinin çok altında yüklendiğini göstermektedir (Driessen, 1994; Baier ve Delavy, 2005; Ince vd., 2005).

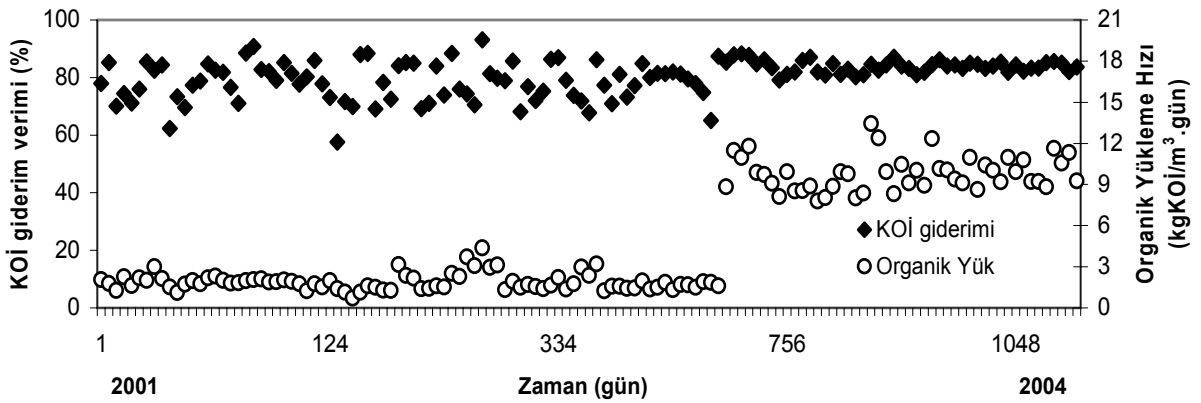
Metanojenik popülasyon dinamiği



Şekil 1. IUASB reaktörünün performansı



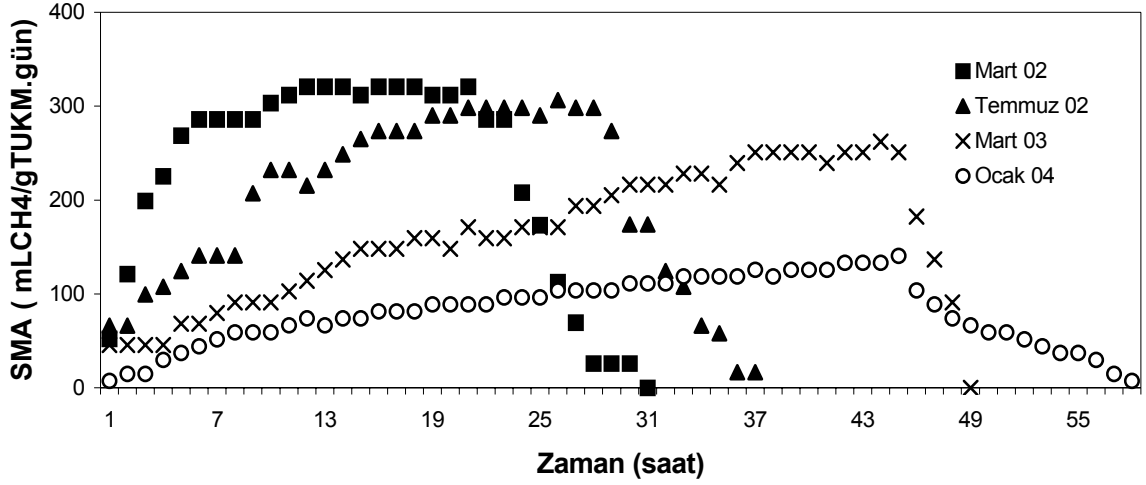
Şekil 2. TUASB reaktörünün performansı



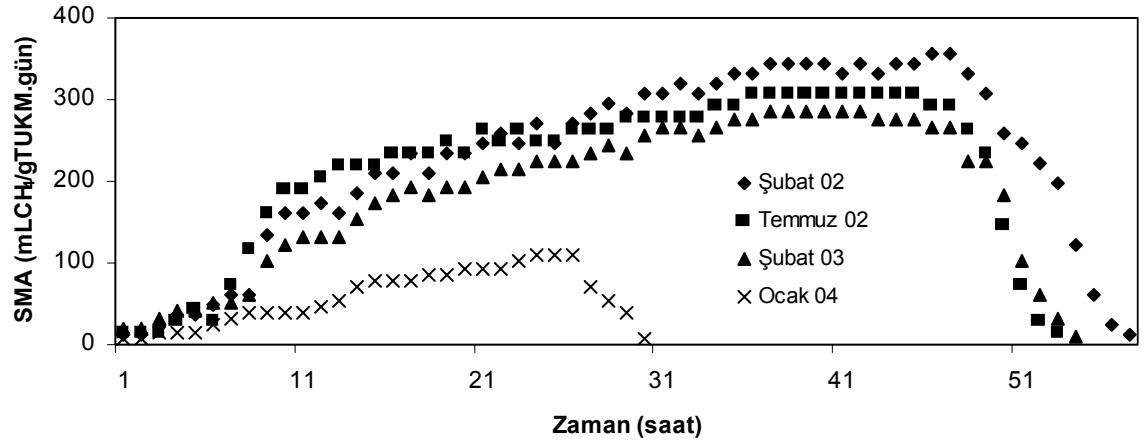
Şekil 3. CUASB reaktörünün performansı

Reaktörlere uygulanan F/M oranı dışındaki, sıcaklık (35-37 °C), pH (6.4-7.5), C:N:P (400:5:1) ve alkalinite (1200-1700 mg CaCO₃/L) gibi diğer işletme parametreleri literatürde belirtilen optimum aralıklarında (Speece, 1996) tutulduk-

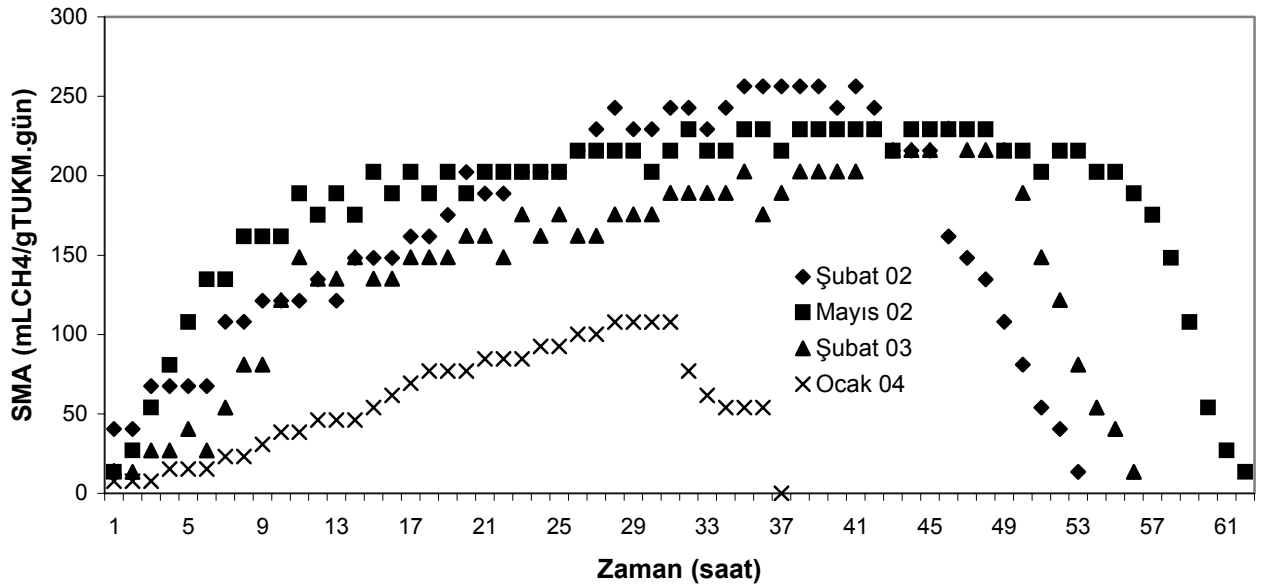
ları için, reaktör çamurlarında meydana gelen metanojenik aktivite kayıplarının, reaktörlerin kapasitelerinin çok altında organik yüklemelere maruz bırakılması nedeniyle meydana geldiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4. Spesifik metan aktivite test sonuçları (IUASB)



Şekil 5. Spesifik metan aktivite test sonuçları (TUASB)



Şekil 6. Spesifik metan aktivite test sonuçları (CUASB)

Tablo 3. Reaktörlerden elde edilen GMÜ hızları ve reaktör çamurlarının PMÜ hızları

	IUASB			TUASB			CUASB		
	mL CH ₄ /gUAKM.gün		GMÜ/ PMÜ	mL CH ₄ /gUAKM.gün		GMÜ/ PMÜ	mL CH ₄ /gUAKM.gün		GMÜ/ PMÜ
	PMÜ	GMÜ		PMÜ	GMÜ		PMÜ	GMÜ	
Şubat 2002			0.15	344	42	0.12	256	49	0.19
Mart 2002	321	48							
Mayıs 2002							229	48	0.21
Temmuz 2002	298	48	0.16	307	47	0.15			
Şubat 2003				286	38	0.13	216	44	0.20
Mart 2003	251	36	0.14						
Ocak 2004	133	27	0.20	109	37	0.34	108	45	0.42

Düşük F/M oranlarında sübstrat kısıtlı olacağı için hücreler elde ettikleri enerjinin büyük bir kısmını hücre bakımı için kullandıklarından yeni hücre üretimi azalmaktadır. Bunun sonucunda anaerobik reaktörde tutulan aktif olmayan hücrelerin zamanla miktarı artabilmektedir. Bu nedenle yaşanan aktivite kayıplarından dolayı sistemden istenilen performans elde edilememektedir. İnce ve diğerleri (2005) düşük F/M oranlarında çalıştırılan gerçek ölçekli anaerobik reaktörlerde zamanla önemli miktarlarda asetoklastik metan aktivite kayıplarının meydana geldiğini SMA testini kullanarak tespit etmişlerdir. Düşük F/M oranlarında çalıştırılan anaerobik reaktörlerde F/M oranını arttırmanın metanojenik aktivite (Sponza vd., 2002) ve KOİ giderim verimi (Baier ve Delavy, 2005) üzerinde olumlu etkileri olduğu da, daha önce rapor edilmiştir. Olası aktivite kayıplarından dolayı ileride sistem performansında bir düşüş yaşamamak için IUASB, TUASB ve CUASB reaktörlerine uygulanan F/M oranları yükseltilmelidir. F/M oranlarını arttırmak için, sistemin potansiyeli göz önünde tutularak (GMÜ/PMÜ oranı 0.6-0.7) reaktörlerden daha fazla çamur çekilmeli veya OYH yükseltilmelidir (İnce vd., 1994, 1995; Monteggia, 1991).

Floresanlı yerinde hibritleşme (FISH) sonuçları

FISH tekniği, UASB reaktörlerinde mevcut metan arkelerinin miktarlarının belirlenmesi amacıyla, reaktör çamurlarına uygulanmıştır. Sonuçlar Tablo 4'te verilmektedir.

IUASB çamurunda *Methanosarcina türleri.*, *Methanosarcina* akrabaları ve *Methanogenium* akrabalarına, TUASB ve CUASB çamurlarında ise *Methanosarcina türleri.*, *Methanosarcina* akrabaları, *Methanococcales* ve *Methanogenium* akrabalarına rastlanmamıştır.

Günümüze kadar tanımlanan metan *Arke*'lerinden sadece *Methanosaeta* ve *Methanosarcina* cinslerinin asetati sübstrat olarak kullanabildiği bilinmektedir (Zinder, 1993). Bu çalışmada, reaktörlerin hiç birinde *Methanosarcina* cinsine rastlanmamıştır. *Methanosaeta* türleri her üç reaktörde de saptanmakla beraber, reaktörlerde saptanan diğer metan *Arke* türlerine göre de baskın halde bulunmaktadır. Anaerobik reaktörlerde *Methanosaeta*'nın diğer metanojenlere göre sayısal üstünlüğü daha önce de rapor edilmiştir (Angenent vd., 2004). *Methanosaeta*'nın granülasyonu arttırdığı ve daha stabil reaktör performansına neden olduğu düşünülmektedir (MacLeod vd., 1990).

Hidrojen kullanan metan *Arke*'lerinden *Methanobacteriales* TUASB ve CUASB reaktörlerinde, *Methanococcales* ise IUASB reaktöründe baskın halde bulunmaktadır. Daha önceki çalışmalarda *Methanobacteriales*'in UASB reaktörlerinde baskın olan hidrojenotrofik metan arke türü olduğu rapor edilmiş ve şu ana kadar hiçbir UASB reaktöründe *Methanococcales*'e önemli seviyelerde rastlanmamıştır (Hofman-Bang vd., 2003). İlk defa bu çalışmada *Methanococcales*'in bir UASB reaktöründe diğer

Tablo 4. UASB reaktör ç amurlarında Arke'lerin (Arke) toplam komünite içerisindeki röl atif miktarı, ve *Methanosaeta* türleri (*M.saet*), *Methanobacteriales* (*M.bac*) ve *Methanococcales*'in (*M.coc*) arkeyal komünite içerisindeki röl atif miktarları

	IUASB (%)				TUASB (%)			CUASB (%)		
	Arke	<i>M.saet</i>	<i>M.coc</i>	<i>M.bac</i>	Arke	<i>M.saet</i>	<i>M.Bac</i>	Arke	<i>M.saet</i>	<i>M.bac</i>
Ş ubat 2002					17.2±1.2	90±1.2	0	15.4±1.3	59±2.6	43±2.6
Mart 2002	18.3±0.2	83±1.6	13±0.5	7±1.1						
Mayıs 2002								15.1±2.1	59±2.8	40±1.3
Temmuz 2002	15 ± 0.4	73±4.7	15±0.7	11±1.3	17.1±1.8	88±1.8	0			
Ş ubat 2003					16.9±1.8	89±1.8	0	15±2.8	55±1.7	38±1.3
Mart 2003	15.2±0.3	55±2	26±1.3	16±1.3						
Ocak 2004	14.2±0.3	58±2.1	30±0.7	10±0.7	15.0±0.7	79±1.4	24±0.7	14.6±0.7	53±0.7	39±0.7

H₂ kullanan metan arke türlerine sayısal baskınlığı rapor edilmiştir. Fakat bu durumu açıklamak mevcut bilgiler ışığında oldukça zordur. Çünkü, hidrojenotrofik metan *Arke*'lerinin birbirleriyle H₂ ve format için yarışları ve bu sübstratlar üzerindeki kinetik sabitleri, asetoklastik metan *Arke*'lerinin asetat için yarışları ve asetat üzerindeki kinetiği gibi yeterince çalışılmamıştır (Stahms vd., 2003; Karadagli ve Ritmann, 2005).

IUASB ve TUASB reaktörlerinin asetoklastik metan üretim kapasitelerinde sırasıyla %59 ve %68'lik meydana gelen kayıplara paralel olarak, reaktörlerde rastlanan tek asetoklastik cins olan *Methanosaeta*'nın röl atif miktarında sırasıyla %25 ve %11'lik kayıplar meydana gelmiştir. Aynı süreç içerisinde, IUASB ve TUASB ç amurlarında mevcut hidrojen kullanan metan *Arke* türlerinin röl atif miktarlarında sırasıyla %20 ve %24'lük bir artış meydana gelmiştir. Bu durum bize zamanla, anaerobik reaktörlerde asettan metan üretiminde, asetatın CO₂'ye sülfat indirgeyici bakteriler tarafından dönüştürülmesi ve daha sonra üretilen CO₂'nin hidrojenotrofik metanojenler tarafından CH₄'e dönüştürülmesi prosesinin, asetoklastik metan *Arke*'leri tarafından doğrudan metan üretimi prosesine göre baskın hale geldiğini göstermektedir. Bu alternatif asettan metan üretim prosesinin önemli ölçüde gerçekleştiği bir çok anaerobik reaktör rapor edilmiştir (Delbe's vd., 2001, Angenent vd., 2002). Bu alternatif metan üretim yolu daha çok stres altındaki anaerobik sistemlerde gözlemlenmektedir (Schnurer vd., 1994; Petersen ve

Ahring, 1992). Bu çalışmada ise anaerobik reaktörlere uygulanan F/M oranı dışında bütün işletme koşulları uygun aralıklarında tutuldukları için, sistemdeki stresin sebebi reaktörlerin düşük F/M oranlarında çalıştırılmaları ile izah edilebilmektedir.

Konyak üretim atıksularını arıtan CUASB reaktöründeki metanojenik komünite yapısı, rakı üretim atıksularını arıtan IUASB ve TUASB reaktörlerindeki metanojenik komünite yapılarının aksine, zaman içerisinde stabil kalmıştır. *Methanosaeta* türlerinin CUASB reaktör ç amurundaki röl atif miktarı değişmemesine rağmen, bu süreç içerisinde reaktör ç amurunun asetoklastik metan üretim kapasitesinde %58'lik bir kayıp meydana gelmiştir. Bu kayıp CUASB reaktöründe tutulan *Methanosaeta* türlerinin miktarında değil, fizyolojik durumunda meydana gelen bir değişim sonucu yaşanmış olabilir. Ayrıca, değişim *Methanosaeta* popülasyonunun toplam miktarında değil de, popülasyondaki türlerin röl atif miktarlarında gerçekleşmiş olabilir ve bu değişim, bu çalışmada kullanılan cins spesifik MX825 probuyla saptanamamış olabilir.

Sonuçlar

İki senelik izleme sürecinde UASB reaktörlerinin performanslarında bir değişim gözlenmemesine rağmen, aynı süreç içerisinde reaktörlerin PMÜ hızlarında meydana gelen önemli kayıplar SMA testi ile tespit edilebilmiştir. GMÜ/PMÜ ve F/M oranları UASB reaktörlerine uygulanan tipik değerlerin bir hayli altında kalmaktadır.

Reaktörlere uygulanan diğer işletme parametreleri literatürde belirtilen tipik değer aralıklarında tutuldukları için, reaktör çamurlarında meydana gelen metanojenik aktivite kayıplarının, reaktörlerin kapasitelerinin çok altında organik yüklemelere maruz bırakılması nedeniyle meydana gelmiş olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, metan aktivite kayıplarından dolayı ileride sistem performansında bir düşüş yaşamamak için reaktörlere uygulanan F/M oranlarının, sistemin potansiyeli göz önünde tutularak artırılması önerilmiştir.

IUASB ve TUASB reaktör çamurları için FISH sonuçları SMA sonuçlarıyla uyum göstermiş, reaktörlerdeki asetoklastik metan aktivite kayıplarına paralel olarak asetat kullanan *Methanosaeta* cinsinin metan *Arke* topluluğu içerisindeki rölatif miktarı azalmış, hidrojen kullanan metanojenlerin metan *Arke* topluluğu içerisindeki rölatif miktarları artmıştır. CUASB reaktöründe yaşanan önemli metan aktivite kayıplarına rağmen, reaktörün metanojenik komünite yapısı zaman içerisinde stabil kalmıştır.

Teşekkür

Orhan İnce ve Bahar Kasapgil İnce sırasıyla 844 ve 30696 kodlu İTÜ ve 04Y105 ve 02Y103D kodlu BÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen projelere teşekkür eder. Ayrıca Tekel A.Ş. (Mey Gıda San. Tic. Ltd. Şti.)'ye gösterdikleri işbirliği için teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 1919-1925.

Angenent, L.T., Sung, S., Raskin, L. (2004). Formation of granules and *Methanosaeta* fibres in an anaerobic migrating blanket reactor (AMBR), *Environmental Microbiology*, **6**, 315-322.

Angenent, L.T., Sung, S., Raskin, L. (2002). Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste, *Water Resources*, **36**, 4648-4654.

APHA, AWWA, WPCF. (1997). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed., American Public Health Association, Washington, DC 20005.

Baier, U., Delavy, P. (2005). UASB treatment of liquid residues from grass bioraffination, *Water Science and Technology*, **52**, 405-411.

Delbe's, C., Moletta, R. Godon, J.J. (2001). Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem, *FEMS Microbiology Ecology*, **35**, 19-26.

Driessen, W.J.B.M. (1994). Experience on anaerobic treatment of distillery effluent with the UASB process, *Water Science and Technology*, **30**, 193-201.

Harmsen, H. J. M., Kengen, H. M. P., Akkermans, A. D. L., Stams, A. J. M. ve de Vos, W. M. (1996). Detection and localization of syntrophic propionate-oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes, *Applied Environmental Microbiology*, **62**, 1656-1663.

Hofman-Bang, J., Zheng, D., Westermann, P., Ahring, B.K., Raskin, L. (2003). Molecular Ecology of Anaerobic Reactor Systems, *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, **81**, 151-203.

Ince, O., Anderson, G.K., Kasapgil, B. (1994). Use of the specific methanogenic activity test for controlling the stability and performance in anaerobic digestion of brewery wastewater. In Proc. 49th Purdue Industrial Waste Conference, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA.

Ince, O., Anderson, G.K., Kasapgil, B. (1995). Control of organic loading rate using the specific methanogenic activity test during start-up of an anaerobic digestion system, *Water Resources*, **29**, 349-355.

Ince O., Kolukırık M., Ayman N., Ince B. (2005). Comparative evaluation of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters in terms of performance and methanogenic activity. *Journal of chemical technology and biotechnology*, **80**, 138-144.

Jawed M., Tare V. (1999). Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests, *Water SA*, **25**, 345-350.

Karadagli, F., Rittmann, B.E. (2005). Kinetic characterization of *Methanobacterium bryantii* M.o.H, *Environmental Science and Technology*, **39**, 4900-4904.

- Lathe, R. (1985). Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations, *Journal of Molecular Biology*, **183**,1-12.
- MacLeod, F.A., Guiot, S.R., Costerton, J.W. (1990). Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor, *Applied Environmental Microbiology*, **56**, 1598-1607.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K-H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions, *Systematic and Applied Microbiology*, **15**, 593-600.
- Monteggia, L. (1991). The Use of a Specific Methanogenic Activity Test Controlling Anaerobic Reactors Doktora Tezi, The University of Newcastle upon Tyne.
- Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences, *Advances in Microbiology and Ecology*, **9**, 1-55.
- Petersen, S.P. ve Ahring, B.K. (1992). The influence of sulfate on substrate utilization in a thermophilic sewage sludge digester, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**, 805-814.
- Raskin L., Stromley J.M., Rittmann B.E., Stahl D.A. (1994). Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens, *Applied Environmental Microbiology*, **60**, 1232-1240.
- Schnurer, A., Houwen, F.P., and Svensson, B.H. (1994). Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation by a triculture at high ammonia concentration, *Archives of Microbiology*, **162**, 70-73.
- Speece R.E. (1996). *Anaerobic Biotechnology*, Archæe Press.
- Sponza, Delia Teresa (2002). Tetrachloroethylene (TCE) removal during anaerobic granulation in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, **37**, 213-236.
- Stahl, D. A., Flesher, B., Mansfield, H. R., Montgomery, L. (1988). Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology, *Applied Environmental Microbiology*, **54**, 1079-1084.
- Stahms, A.J.M, Elferink, S.J.W.H.O., Westerman, P. (2003). Metabolic Interactions Between Methanogenic Consortia and Anaerobic Respiring Bacteria, *Advances in Biochemical Engineering*, **81**, 31-56.
- Wagner, M., Horn, M., Daims, H. (2003). Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes, *Curr Opin Microbiology*, **6**, 302-309.
- Zinder, S. H. (1993). Physiological ecology of methanogens, p. 128-206. In J. G. Ferry (ed.), *Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry and genetics*, Chapman & Hall, NewYork, N.Y.