OKSİJENE DAYALI MEMBRAN BİYOFİLM REAKTÖRÜNDE GAZ BASINCININ VE AMONYUM YÜKÜNÜN NİTRİFİKASYONA ETKİSİ

Mehmet PALTA

Yüksek Lisans Tezi

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Halil HASAR

EYLÜL-2012

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKSİJENE DAYALI MEMBRAN BİYOFİLM REAKTÖRÜNDE GAZ BASINCININ VE AMONYUM YÜKÜNÜN NİTRİFİKASYONA ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet PALTA

101112102

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07.09.2012

Tezin Savunulduğu Tarih : 01.10.2012

Tez Danışmanı :	Prof. Dr. Halil HASAR
Diğer Jüri Üyeleri :	Prof. Dr. Ubeyde İPEK
	Prof. Dr. H. Soner ALTUNDOĞAN

EYLÜL-2012

ÖNSÖZ

Bu tez, Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında yapılmıştır.

Bu çalışmada, oksijene dayalı membran biyofilm reaktörde gaz basıncının ve amonyum yükünün nitrifikasyona etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma kapsamında hazırlanan reaktörün çıkışından alınan su örneklerinde standart metodlar kullanılarak analizler yapılmıştır. Alınan sonuçlar değerlendirilerek amonyum, nitrit ve nitrat bileşiklerinin zamanla değişimi incelenmiştir. Yapılan çalışmada amonyum yükünün nitrifikasyona etkisini gerçekleştiren mikroorganizmaların türü tespit edilmiştir.

Yüksek lisans tezimin tamamlanması için tüm aşamalarında akademik tecrübesi, bilgisi ve yeni fikirlere açık oluşu ile her satırında emeği olan danışmanım Prof. Dr. Halil HASAR'a,

Bana her türlü anlayışı gösteren, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme, teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışma TÜBİTAK'ın 111Y005 nolu projesi kapsamında yürütülmüştür. Maddi desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Mehmet PALTA

ELAZIĞ 2012

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... **i**
İÇİNDEKİLER ..... **ii**
ÖZET ..... **iv**
SUMMARY ..... **v**
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **vi**
TABLOLAR LİSTESİ ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. Azot formları ve Nitrifikasyon Süreci 4
2.2. Nitrifikasyon 6
2.3. Denitrifikasyon 8
2.4. Nitritasyon-Denitritasyon 8
2.5. Nitrifikasyona Etki Eden Faktörler 9
2.5.1. pH 9
2.5.2. Sıcaklığın etkisi 11
2.5.3. Çözünmüş oksijenin etkisi 12
2.5.4. Substrat konsantrasyonu 13
2.5.5. Toksik ve inhibitör bileşiklerin etkisi 13
2.5.6. Katı alıkonma süresi 14
2.5.7. Biyolojik Oksijen İhtiyacı / Toplam Kjeldahl Azotu Oranı (BOİ/TKN) 16
2.5.8. Diğer etkiler 17
2.6. Biyofilm Prosesi 18
2.6.1. Membran Biyofilm Reaktörleri 23
2.6.2. Litaratür Özeti 24
3. MATERYAL VE METOT **29**
3.1. Membran Biyofilm Reaktörü 29
3.2. İşletim Süreci 30
3.3. Moleküler Tanımlama 30
3.3.1. DNA Ekstraksiyonu 31
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 33
3.3.3. Denatüre Gradyan Jel Elektroforezi (DGGE) 34

4. BULGULAR 36
4.1. Membran Biyofilm Reaktöründe Oksijen Difüzyon katsayısı (ODH)..... 36
4.2. Membran Biyofilm Reaktöründe Biyofilm Oluşması..... 38
4.2.1. Membran Biyofilm Reaktöründe Amonyum, Nitrit ve Nitrat Analizleri..... 40
4.2.1.1. Amonyum Analizi..... 40
4.2.1.2. Nitrit Analizi..... 41
4.2.1.3. Nitrat Analizi..... 41
4.3. Membran Biyofilm Reaktöründe Nitrifikasyon Süreci..... 42
4.4. Amonyum Yükü ve Nitrifikasyon Hız Değişimi..... 45
4.5. Oksijen Akı Değişimi..... 48
4.6. Organik Maddenin Etkisi..... 49
4.6.1. Membran Biyofilm Reaktöründe Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Analizi 51
4.7. Membran Biyofilm Reaktöründe Mikrobiyal Popülasyon..... 52
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 59
KAYNAKLAR 61
ÖZGEÇMİŞ..... 65

ÖZET

Nehirlere veya göllere yüksek azot deşarjı, aşırı alg büyümesine yol açtığından dolayı su kalitesinde bozunmalara yol açmaktadır. Düşük arıtma maliyetinden dolayı biyolojik azot giderimi temel olarak iki aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşama, amonyumun nitrat ve nitrite oksidasyonunu kapsayan nitrifikasyon prosesidir. BOİ oksidasyonu/nitrifikasyon prosesinde hetetrof ve ötotrof bakteriler arasındaki rekabet, hetetrofların büyüme hızlarının daha yüksek olmasından dolayı nitrifiyeleri olumsuz etkilenmektedir. Daha iyi bir azot giderimi için, denitrifikasyon öncesinde nitrifikasyon prosesinin başarılı bir şekilde gerçekleşmesi gerekmektedir.

Hidrofobik gaz transfer membranlarının kullanıldığı membran biyofilm reaktörü (MBfR)'nde, kabarcıksız gaz difüzyonundan dolayı, oksijen elektron alıcı olarak biyofilmdeki nitrifiyeler tarafından etkili bir şekilde kullanılmıştır. Bu çalışmada, oksijene dayalı MBfR reaktöründe farklı oksijen basıncı ve amonyum yükleri altında nitrifikasyon prosesi detaylı olarak incelenmiştir. Bu amaçla sistemde, biyofilm oluştuktan sonra oksijen basıncı 6 psi'den 0,5 psi'ye kadar kademeli olarak indirilmiştir. Diğer taraftan hidrolik bekleme süresi de 1-7,5 saat aralığında değiştirilmiştir. 0,5 psi'de optimum bekleme süresi 2,5 saat olarak belirlenmiştir. Amonyum yükü 4,4 g N/m^2-gün olduğunda tam nitrifikasyon gerçekleşmiştir. Bu durumda nitrifikasyon hızı ortalama 3,98 g N/m^2-gün ve oksijen akısı 9,2 g O_2/m^2-gün olarak belirlenmiştir. PCR-DGGE teknikleri ile sistemdeki etkin mikroorganizma türleri de belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Membran Biyofilm Reaktörü, Nitrifikasyon, Mikrobiyal Ekoloji

SUMMARY

Effect of Gas Pressure And Ammonium Loading on Nitrication in O_2 – Based Membrane Biofilm Reactor

Discharge of high nitrogen loading to rivers and lakes causes a severe reduction in water quality due to the excess algae growth. Biological nitrogen removal processes(BNR) has advantages due to its lower cost. BNR take places basically at two steps. First step is nitrification including oxidation of ammonium to nitrite and nitrate. Second step is also denitrification process including reduction of oxidized nitrogen to nitrogen gas. In the BOD oxidation/Nitrification process, the competition between heterotrophic and autotrophic bacteria affects adverse nitrifies because the specific growth rate for autotrophic bacteria is lower than that for heterotrophic bacteria. For beter nitrogen removal, nitrification process prior to denitrification is required to be performed successfully.

Providing that hydrophobic gas transfer membranes were used as a biofilm supporting material, the gas (oxygen) as electron acceptor is utilized completely by microorganisms because it reached to biofilm with bubble-less gas diffusion in the membran biofilm reactor (MBfR). In this study, nitrification process was investigated on detailed under different oxygen pressures and ammonium loadings. For this purpose, the oxygen pressure was gradually decreased from 6 to 0.5 psi after biofilm formed in the system. The hidrolic retention time was also varied in the range of 1.0-7.5 h. at the O_2 pressure of 0.5 psi, the hydrolic retentaion time was found to be 2.5 h. A complete nitrification occured in the case of 4.4 g N/m^2-d. In this case, nitrification rate and oxygen flux were 3.98 g N/m^2-d and 9.2 g O_2/m^2-d, respectively. In addition, the microbial ecology was defined using PCR-DGGE technique.

Key words: Membrane Biofilm Reactor, Nitrification, Microbial Ecology

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Serbest amonyak ve nitroz asiti konsantrasyonlarının nitrifikasyon üzerindeki etkisi.....10
Şekil 2.2. Sabit sıcaklıkta pH' ın nitrifikasyon sürecine etkisi.....11
Şekil 2.3. Sabit pH 'da sıcaklığın nitrifikasyon süreci üzerindeki etkisi.....12
Şekil 2.4. Katı alıkonma süresinin çıkış suyu amonyak konsantrasyonu ve nitrifikasyon verimi üzerindeki etkisi. 15
Şekil 2.5. Sıcaklıkla nitrifikasyon için çamur yasının ve *Nitrosomonas* için gelisme hızının değişimi. 16
Şekil 2.6. Yüzeylerde biyofilm oluşumunu gösteren şematik diyagram.....22
Şekil 2.7. Biyofilm tabakasının gelişimi ve biyolojisine etki eden bazı faktörler 23
Şekil 2.8. MBfR'ın çalışma mekanizması 24
Şekil 2.9. Membran ve Klasik Biyofilm Sistemlerinin Çalışma Prensibi 26
Şekil 3.1. Deney düzeneği ve şematik gösterimi 29
Şekil 3.2. Mikroorganizmaların belirlenmesi amacıyla yürütülen moleküler analiz yöntem basamakları 31
Şekil 3.3. A) Soğutmalı Mikrosantrifüj B) Numune Saklama Bölmesi.....33
Şekil 3.4. A) DNA çoğaltma işlemi için kullanılan TECHNE /TC-512, B) agaroz jel elektroforezi.....33
Şekil 3.5. A) DGGE için kullanılan INGENY phor L-2, B) Jel Görüntüleme Cihazı.....35
Şekil 4.1. Membran Biyofilm Reaktöründe Farklı Basınçlar Altında Oksijen Transfer Katsayıları 37
Şekil 4.2. Membran Biyofilm Reaktöründe Uygulanan Oksijen Basınçlarına göre A) Oksijen Transfer Katsayısı ve B) Difüzyon Katsayısının Davranışı.....38
Şekil 4.3. Nitrifikasyon Kararlı Hale Gelinceye Kadar Basınç ve Oksijene Bağlı Amonyum, Nitrit ve Nitrat Miktarı 39
Şekil 4.4. Oksijen Basıncı ve Hidrolik Bekletme Süresine Bağlı Amonyum Değişimi 43
Şekil 4.5. Oksijen Basıncı ve Hidrolik Bekletme Süresine Bağlı Nitrit Değişimi.....43
Şekil 4.6. Oksijen Basıncı ve Hidrolik Bekletme Süresine Bağlı Nitrat Değişimi.....44
Şekil 4.7. Amonyum yükü ve nitrifikasyon hız değişimi 47
Şekil 4.8. Oksijen akısının değişimi 49

Şekil 4.9. KOİ 20 mg/l'de MBfR Performansı 50
Şekil 4.10. KOİ 50 mg/l'deMBfR Performansı 50
Şekil 4.11. DGGE ile Yürütülen Poliakrilamid Jel Üzerindeki DNA Bantları 53
Şekil 4.12. Mikroorganizmaların Filogenetik Ağaçtaki Yeri 58

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Çözünmüş oksijen konsantrasyonunun maksimum çoğalma hızı üzerine etkisi 13
Tablo 3.1. MBfR sisteminde kullanılan membranların fiziksel özellikleri 29
Tablo 4.1. Sekans Analiz Sonuçları 54

1. GİRİŞ

Evsel atıksu arıtımında kullanılan membran biyofilm reaktörün daha iyi anlaşılabilmesi için çok çeşitli modeller önerilmiştir. Önerilen biyolojik modeller, membran biyofilm reaktördeki yüksek biyokütle konsantrasyonunda gerçekleşen nitrifikasyon ve denitrifikasyon proseslerini açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Bunun ötesinde, membran biyofilm reaktörlerin eşzamanlı nitrifikasyon ve denitrifikasyon kapasitesi de henüz tam açıklanabilmiş değildir. Dinamik modelleme ile kalibre edilmiş modellerin membran biyofilm reaktörler için adapte edilip uygulanması ileride önem verilmesi gereken bir husustur.

Azot, karbonlu organik maddelerin biyolojik arıtımı sonucu üretilen biyokütlenin önemli bir bileşenidir. Bütün biyolojik atıksu arıtma sistemlerinde oluşan çamurların bünyesinde belli miktar azot bulunur. Organik azot, birçok atıksu içerisinde bulunabilen ve bir kısmı biyolojik olarak parçalanabilen partiküler bileşendir. Evsel atıklarda proteinler, üre ve ürik asit en önemli azot bileşikleridir (Karslıoğlu, 2004).

Atıksulardan azot giderimi amacıyla fiziksel ve kimyasal çeşitli arıtma teknolojileri (hava ile sıyırma, iyon değişimi, kırılma noktası klorlaması) kullanılıyorsa da bu arıtma teknolojilerinin kimisinin ekonomik olmaması kimisinin ise kirleticiyi yok etmekten çok sadece bir fazdan başka bir faza taşıması biyolojik arıtma (nitrifikasyon-denitrifikasyon) alternatifini ön plana çıkarmaktadır. Biyolojik nütrient giderimi, hem evsel hem de endüstriyel atıksu arıtımında, giderek yaygınlaşmaktadır ve gün geçtikçe biyolojik arıtma sistemleri en çok kullanılan sistemler haline gelmiştir (Wang, 2000). Biyolojik arıtmanın daha çok tercih edilmesinin sebebi, hem daha ucuz olması hem de istenmeyen yan ürünlerin oluşumuna sebebiyet vermemesidir (Rostron, 2000). Son yıllarda gerçekleştirilen membran biyofilm sisteminde klasik biyofilm sistemlerinden farklı olarak, elektron alıcı ve elektron vericilerin zıt yöndeki hareketi nedeniyle biyofilm kopmalarını azaltmakta ve daha etkin bir biyofilm sistemi oluşmaktadır.

Bu tez çalışmasında, azot gideriminde anahtar rol oynayan nitrifikasyon prosesinin MBfR sistemindeki mekanizması detaylandırılmıştır. Bu amaçla, farklı oksijen basıncında farklı amonyum konsantrasyonları ve hidrolik bekletme sürelerinde nitrifikasyon kapasitesi

izlenmiştir. Organik madde varlığında ve yokluğunda nitrifikasyon kapasitesi yanında oksijen akısı, nitrifikasyon hızı, biyofilmdeki mikrobiyal tür tanımlaması yapılmıştır.

Bu tez TÜBİTAK 111Y005 nolu proje kapsamında gerçekleşmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Canlıların büyüme ve gelişmeleri için ihtiyaç duydukları elementler doğada döngü halinde bulunurlar. Bu elementlerden denizde bulunan azot bileşikleri amonyak, nitrit, nitrat gibi bazı inorganik olanları partiküller halinde mikroorganizmalarda devamlı döngü halindedir.

Gerek canlı bünyesinde, gerek besin maddelerinde ve ölü organizmalarda bulunan azot, bazı oksidasyon aşamalarından geçer. Burada amaç, organik azot bileşiklerinin çeşitli mikroorganizmalar tarafından kullanılabilir hale getirilmesidir. Çevrimdeki aşamalar moleküler azotun bağlanması, amonyaklaşma, nitrifikasyon ve denitirifikasyon şeklindedir. Moleküler azotun bağlanması atmosferdeki azotun kullanılması şeklinde olur. Amonyaklaşma süreci içinde oluşan amonyum iyonları bir yandan bitki besin maddesi olarak tüketilir, öte yandan oksijen ve diğer parametrelerce optimum şartların sağlandığı ortamlarda belirli kemolithototrof organizmalar tarafından nitrit ve sonrasında nitrata yükseltgenirler. Bu olay azot döngüsünün en önemli aşaması olan nitrifikasyondur. Dönüşümde azotun büyük bir kısmı fitoplanktonlarca asimile edilerek tekrar organik azot bileşiklerine dönüştürülür. Nitrifikasyon olayından sorumlu hem karasal hem sucul bakterilerin hepsi *Nitrobacteraceae* familyasına aittir.

Nitrobacteraceae familyası ile ilgili çalışmalar Schloesing ve Muntz'un nitrifikasyon bakterilerinin varlığını nitrifikasyona olan katkılarını bulmaları ile başlamıştır. Helene ve Sergei Winogradsky bu bakterileri saf kültür halinde ilk defa izole etmişler ve taksonomik olarak sınıflandırılmışlardır. Alexander ve arkadaşları nitrifikasyon bakterilerinin fizyolojik ve biyokimyasal karakteristikleri, mekanizmadaki işlevleri, hücre görünümleri hakkında oldukça ayrıntılı bilgiler vermişlerdir. Yoshida özellikle denizsel nitrifikasyondan sorumlu bakteriler üzerine çalışmalar yapmıştır. Daha sonra Watson bu bakterileri taxonomik olarak *Nitrobacter, Nitrosococcus, Nitrospina, Nitrosolobus, Nitrosomonas, Nitrococcus, Nitrosospina* şeklinde 7 genus altında toplamıştır.

Nitrifikasyon olayı esnasında ortaya çıkan enerji oldukça düşüktür. Bu nedenle Nitrosococcus ve Nitrobacter oldukça yavaş büyürler. Jenerasyon süreçleri 8-12 saattir. İnkübasyon ise ancak 40-45 günde tamamlanır. Bu süre nitrifikasyon bakterilerinin gelişmelerinin en yüksek noktaya ulaştığı periyottur.

Yüzeysel sularda azot değişim süreci mikrobiyolojik olduğu kadar bir dizi abiyotik faktörlerce de etkilenir. Bunların en önemlileri; su sıcaklığı, çözünmüş oksijen, nitrat, nitirit, ortofosfat gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin artması veya azalması durumda ortamda ve besin piramidinde çeşitli değişiklikler olabilir.

2.1. Azot formları ve Nitrifikasyon Süreci

Genellikle *Nitrobacter* grubunun spesifik büyüme katsayısının *Nitrosomonas* grubunkinden daha büyük olduğu kabuledilir. Bu nedenle de sistemde nitrit birikimi pek gözlenmez ve *Nitrosomonas* grubunun büyümehızı toplam reaksiyonu kontrol eder yani hız belirleyici asama amonyumun nitrite dönüşümüdür (Eckenfelder, 1989).

Nitrifikasyon bakterileri, *Nitrosomonas* ve *Nitrobacter*ler, karbondioksiti karbon kaynağı olarak kullanan, enerjiyi NH_4^+ ve NO_2 oksitlenmesinden sağlayan aerobik ve kemootrofik mikroorganizmalardır (Filibeli, 1988). Heterotroflara göre çok yavaş çoğalırlar ve ayrıca toksik maddeler ve çevresel şartlara karsı oldukça hassastırlar (Coşkuner, 2004). Nitrifikasyon olayı esnasında ortaya çıkan enerji oldukça düşüktür. Bu nedenle *Nitrosococcus* ve *Nitrobacter* oldukça yavaş büyürler. Jenerasyon süreçleri 8-12 saattir. İnkübasyon ise ancak 40-45 günde tamamlanır. Bu süre nitrifikasyon bakterilerinin gelişmelerinin en yüksek noktaya ulaştığı periyottur. Yüzeysel sularda azot değişim süreci mikrobiyolojik olduğu kadar bazı abiyotik faktörlerden de etkilenir. Bunların en önemlileri; su sıcaklığı, çözünmüş oksijen, nitrat, nitrit, ortofosfat gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin artması veya azalması durumda ortamda ve besin piramidinde çeşitli değişiklikler olabilir.

Sıcaklık, ekosistemde var olan organizmalar ve suda meydana gelen ekolojik döngüler için sınırlayıcı bir faktördür. Biyolojik olaylar ılık sularda hızlanırken, düşük su sıcaklığında yavaşlar. Su sıcaklığındaki ani değişiklikler ortamda yaşayan organizmalar üzerine olumsuz bir etki yapar. Sıcaklık faktörünün tek başına olduğu zamanki etkisiyle, diğer parametrelerle birlikte olduğundaki etkileri çok farklıdır. Sıcaklığın özellikle sudaki çözünmüş oksijen değeri ile olan ters orantısı, yaz aylarında artan sıcaklık karşısında oksijen değerinin düşüşü ile kendini gösterir. Diğer birçok parametre ile birlikte sıcaklık nitrifikasyon bakterileri açısından da büyük önem taşır. Nitrifikasyon bakterilerinin inkübasyonu için en uygun sıcaklık 27-28 ^oC'dir.

Diğer önemli faktör su ortamındaki çözünmüş oksijen konsantrasyonudur. Bu gazın deniz suyundaki miktarı, ortamda oluşan fotosentez olayına, akıntı ve rüzgarların etkisine bağlı olarak arttığı halde, bitkisel ve hayvansal organizmaların solunumu ile biyokimyasal oksidasyon olayları sonucu azalır. Oksijenin en önemli özelliği; suda bulunan organik kökenli maddelerin mikroorganizmalarca aerobik ortamda parçalanarak tekrar kullanılabilir bitki besin maddesi haline gelmesini sağlamaktır. Nitrifikasyon olayını en çok etkileyen ve varlığı olmadan yürümeyen en önemli etken oksijendir.

Atmosferin % 78' ini oluşturan azot, pasif bir element olduğu için, çok zor reaksiyona girer ve azot bağlayan bakterilerle, simbiyotik biçimde azot bağlayan bakteriler dışındaki canlılar, moleküler azottan yararlanamazlar. Azot bağlayan organizmalar dışındaki canlılar, azotu nitrat iyonları veya amonyum iyonları halinde ya da aminoasitler şeklinde dışarıdan almak zorundadırlar. Belirli mikroorganizmalar, moleküler azotu indirgeyerek, protein sentezinde kullanabilirler. İnsanlar, hayvanlar ve birçok mikroorganizmalar, azot ihtiyaçlarını organik azot bileşiklerinden karşılamaktadırlar. Bu sebeple bu canlılar azot bağlayan mikroorganizmalara bağımlıdırlar. Moleküler azotun, amonyak şeklinde indirgenmesi azot bağlanması olarak tanımlanmaktadır. Azot bağlanmasında iş gören enzime, nitrogenaz enzimi denir. Bütün bakterilerdeki nitrogenaz sistemi oksijene karşı büyük ölçüde duyarlıdır. Atmosferdeki azotun hücre proteinine bağlanması mavi - yeşil algler ve birkaç bakteri türü tarafından yapılır. Bu bakteriler; aerobik *Azotobakter*, *Nocardin, Nostoc, Aıuabaena, anaerob Clostridium* türleri, simbiyoz *Rhisobium* türleri, fakültatif *Clebsiella* ve *Achranobacter*' dir.

Amonyak oksitleyen bakteriler, organik karbondan yoksun su ortamlarında yaşarlar. Bu sebeple de amonyak oksidasyonu ancak karbonlu madde oksidasyonunu tamamlandıktan sonra gerçekleşir. Nitrosomonas grubu bakteriler aerobik ve ototrof olup, optimum yaşam şartları pH= 7,8-9,2, sıcaklık 25 - 30 °C' dir (Arceivala, 2002). Nitrit oksitleyen bakteriler ise, organik karbonun bulunmadığı ortamlarda yaşayabilmektedirler ve faaliyete geçebilmeleri için de ortamda amonyum iyonlarının bulunmaması gerekir. Aksi takdirde, amonyum tuzlarının bulunduğu basit şartlarda yaşamlarını sürdüremezler. Optimum yaşam şartları pH = 7,6 - 8,6; sıcaklık ise 25 - 28°C arasındadır (WPCF,1983). Aerobik süreçler çerçevesinde ortaya çıkan kimyasal enerji, azot bakterileri tarafından CO_2 asimilasyonunda kullanılır. Nitrifikasyon sırasında oluşan enerji, oldukça düşüktür. Bunun

sonucu olarak da azot bakterileri, çok yavaş büyürler. Nitrifikasyon bakterileri, ortamın sıcaklığına, pH'sına ve çözünmüş oksijen miktarına bağlı olarak, sudaki aktivitelerini artırırlar (Hanhan, 1999). Nitrifikasyon bakterilerinin populasyonunun büyüme hızı, heterotrofik bakterilere kıyasla oldukça düşüktür. Bakteri büyüme hız sabiti düşük olduğundan atıksularda nitrifikasyon reaksiyonlarının başlangıcı oldukça geçtir (Hanhan, 1999). Ayrıca, nehirlerde ve tasfiye tesislerinde, nitrifikasyonun meydana gelebilmesi için ilave oksijene ihtiyaç vardır.

Amonyum iyonları, suda yaşayan organizmalar için önemli ölçüde toksik etkiye sahip değildir. Amonyak ise, düşük konsantrasyonlarda dahi toksik etki yapmaktadır. Amonyak içeren atıksular, alıcı ortama verildiği takdirde, suda yaşayan canlılar özellikle alabalıklar üzerinde olumsuz etki yapar. Nitrit amonyum ve nitrata kıyasla sularda daha düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Bunun sebebi ise, nitrit iyonlarının nitrat iyonlarına dönüşümünün, amonyum iyonlarının nitrit iyonlarına dönüşüm oranlarına göre daha hızlı olmasıdır (Garchow,1990) . Nitrit, indirgenme - yükseltgenme reaksiyonlarının ara ürünü olup, kararsız bir bileşiktir. Ayrıca tam nitrifikasyona uğramamış atıksuların, alıcı ortama verilmesi durumunda ortamda nitrit konsantrasyonu artmakta ve bu durumda nitrit iyonları sudaki canlılar için toksik etki yapmaktadır (Barnes ve Bliss,1983).

2.2. Nitrifikasyon

Nitrifikasyon tam olarak ölen canlıların proteinlerinin oksijenli ortamda mantar ve bakteri faaliyetleri ile amonyum iyonu, su ve karbondioksite kadar giden bir dizi ara basamakla yıkılması, ayrıca amonyumun *nitrosomonas* bakterilerince nitrite ve nitritin de *nitrobakter* bakterilerince nitrat iyonlarına kadar okside olmasıdır.

1. Nitrifikasyon, amonyumun nitrata dönüştürülmesi işlemidir. İki basamakta gerçekleşir: amonyumun nitrite dönüşümü ve nitritin de nitrata dönüşümü.

2. Amonyumun nitrite dönüştürülmesinde *Nitrosamonas* türleri görev alır. Ayrıca, *Nitrosococcus* ve *Nitrosolobus* diğer amonyum oksitleyen türlerdir.

$$NH_4+ + 3/2O_2 \longrightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O \quad (1)$$

3. Amonyum oksitleyen bakteriler (AOB), seçici büyüme ortamı kullanılarak EMS yöntemi ile ölçülebilir. Ayrıca, moleküler biyolojik yöntemlerde bu iş için

kullanılabilir. İkinci yöntem daha iyi olup, bu yöntem AOB'lerin, protobakter grubunun α, β, γ alt grubuna ait olduğunu göstermiştir.

4. Nitritin nitrata oksidasyonu ise nitrit oksitleyen bakteriler (NOB) tarafından gerçekleştirilir. En önemli bakteri ise *α-protobakteri* grubuna ait ve zorunlu ototroftur. Fakat *Nitrobacter* asetat, format ve purivat varlığında heterotrof olarak büyüyebilir. Nitrobacter nitriti aşağıdaki şekilde oksitler;

   Nitrit Oksitleyiciler

   $$NO_2^- + \frac{1}{2} O_2 \longrightarrow NO_3^- \quad (2)$$

5. Diğer kemolitotrofik nitrit oksitleyen bakteriler *Nitrospina, Nitrospira* ve *Nitrococcus*'dur. Nitrobakter atıksu arıtma tesislerinde en çok çalışılan NOB olmasına rağmen, FISH çalışmaları *Nitrospira*'nın nitrit oksitleyen biyofilm ve aktif çamur tesislerinde en sık rastlanan tur olduğunu göstermiştir.

6. Amonyumun, nitrit ve nitrata oksidasyonu enerji üreten bir reaksiyon olup, üretilen enerji sayesinde CO_2 alınarak hücre teşkili için kullanılır.

7. Nitrifikasyondan sorumlu bakteriler, karbon ihtiyaçlarını inorganik karbondan karşılar. Bu amaçla karbondioksit, bikarbonat ve karbonat kullanılır. Nitrifikasyon işlemi yeterli oksijen ve bikarbonat olması durumunda gerçekleşir. Nitrifikasyon sırasında asit üretilmekte olup, oluşan asidin nötralizasyonu gerekmektedir.

8. Nitrobakter için optimum pH 7.2-7.8 arasıdır.

2.3. Denitrifikasyon

Denitrifikasyon ise biyosferde nitrat iyononun bakteri faaliyeti ile canlılar için kullanılamaz şekli olan moleküler azota indirgenmesi olayıdır.

1. Azot, alıcı ortamlarda oksijeni tüketir. Bu nedenle deşarjdan önce giderilmesi gerekir. Nitrifikasyon işleminde azot sadece form değiştirerek, nitrata dönüşür ve azot ancak denitrifikasyon yolu ile giderilir.

2. Denitrifikasyon, oksijensiz ortamda nitratın (NO_3), azot gazına (N_2) dönüştürülmesidir. Burada, nitrat elektron alıcı olarak davranır. Bazı aerobik heterotrofik ve ototrofik organizmalar, oksijensiz ortamda nitratı elektron alıcı olarak kullanarak denitrifikasyon işlemini gerçekleştirirler.

3. Denitrifikasyon, aşağıdaki basamaklarla gerçekleşir.

$$NO_3 \longrightarrow NO_2 \longrightarrow NO \longrightarrow N_2O \longrightarrow N_2 \qquad (3)$$

4. Pseudomonas, Bacillus, Spirillum, Acinetobacter, Rhizobium ve Agrobacterium gibi birçok tur denitrifikasyon yapabilmektedir.

5. Oksijen ve organik madde yokluğunda, bazı ototrofik amonyak oksitleyiciler, Amonyumu elektron verici nitriti de elektron alıcı olarak kullanır ve denitrifikasyon gerçekleştirir.

$$NH_4 + NO_2 \longrightarrow N_2 + 2H_2O \qquad (4)$$

2.4. Nitritasyon-Denitritasyon

Nitritasyon–Denitritasyon ile nitrifikasyonda gerekli oksijen, denitrifikasyonda ise gerekli organik madde miktarı azaltılmakta ve süreçte elde edilen çamur miktarı daha düşük olmaktadır (Ciudad, 2005). Nitritasyonda, amonyum oksitleyen bakterilerin aktiviteleri etkilenmeden nitrit oksitleyen bakterilerin aktiviteleri azaltılmaktadır. Bu yöntem, katı atık depolama alanlarında oluşan sızıntı suyu, çamur susuzlaştırma çıkış suyu ve bazı endüstri atıksuları gibi azotça zengin ancak düşük organik madde içeren suların arıtımında da oldukça uygun görülmektedir (Bernet ve diğ., 1996). Klasik biyolojik azot giderim süreçleriyle karşılaştırıldığında nitrit birikimi ile işletimin olumlu tarafları;

1. Nitrifikasyonda % 25 oksijen gereksinimi azalmakta
2. Denitrifikasyonda % 40 daha az organik madde gerekmekte
3. Yüksek denitrifikasyon hızı
4. Daha düşük biyokütle üretimi olarak sıralanmaktadır (Bernet ve diğ., 2001).

Düşük oksijen derişimlerinde nitrit birikimi yüksek sıcaklıklarda (>25^{0}C) çalışılmasına rağmen (Ciudad ve diğ., 2005; Ruiz ve diğ., 2003; Jenicek ve diğ., 2004), optimum sıcaklık olarak tanımlanan sıcaklıktan daha düşük seviyelerde yapılmış çalışma sayısı oldukça sınırlıdır.

2.5. Nitrifikasyona Etki Eden Faktörler

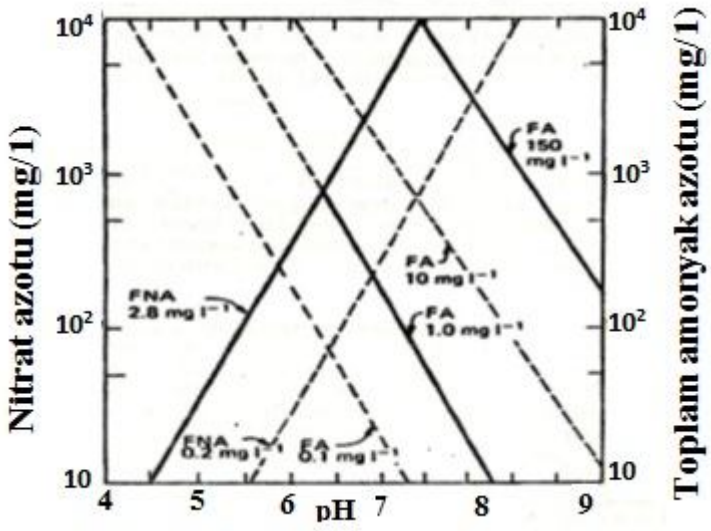
2.5.1. pH

Reaktörün pH koşulları, nitrifikasyonun hızı üzerinde iki önemli etkiye sahiptir. İlki nitrifikasyonun, alkaliniteyi elimine etmesi ve pH' da şiddetli bir düşüş potansiyelinin ortaya çıkması, diğeri ise nitrifikasyon bakterilerinin pH' a karşı çok hassas olmalarıdır (Grady, 1980). Deneysel çalışmalar çoğalma için optimum pH aralığının 7,5–8,6 (WPCF, 1983) olduğunu, 9,5' a kadar nitrifikasyon hızında çok önemli bir azalma olmadığını (USEPA, 1975) ancak 6,3' ün altında tamamen durduğunu (Hall, 1974) göstermektedir. Bununla beraber çeşitli araştırmacılar optimum pH aralığını farklı tanımlamışlardır. Bunlardan bazıları nitrifikasyon için optimum pH aralığının 7-8 olduğunu gözlemlemişlerdir (Jones ve diğ., 1982; Painter ve Loveless, 1983; Antoniou ve diğ., 1990). Shammas (1986) ise, optimum pH aralığını 8–9 olarak vermiştir. Bunların yanında nitrifikasyon veriminin kararlılığı için bazik tarafta (pH=7,2) kalınmasının uygun olduğu vurgulanmaktadır (WPCF, 1983). Optimum pH aralığını *Nitrosomonas* ve *Nitrobacter* grubu organizmalar için farklı verenler de vardır. Örneğin Alleman, 1984'de yaptığı bir çalışmada *Nitrosomonas* için optimum pH değerini 7,9-8,2 aralığında verirken, *Nitrobacter* için aralık 7,2 ile 7,6 arasında değişmiştir. Yapılan başka çalışmalarda *Nitrosomonas* için optimum pH aralığı 8,5-8,8 ve *Nitrobacter* için 8,3-9,3 olarak belirlenmiştir. Bazı araştırmacılar ise her iki organizma için pH-aktivite eğrilerini inceleyerek *Nitrosomonas* ve amonyak oksidasyonu için optimum pH=8,3 olduğunu ve pH=9,6' da oksidasyon hızının sıfır olduğunu gözlemlemişler ve *Nitrobacter* tarafından nitrit oksidasyonu için optimum pH'ı 7,7 olarak belirlemişlerdir. Literatürde ise *Nitrosomonas*lar için optimum pH

aralığının 7,8–9,2 olduğu, *Nitrobacter*ler için ise bu aralığın 8,5–9,2 olduğu kabul edilmektedir (Arceivala, 2002).

Wild ve arkadaşları (1971) da pH= 8,4'ün optimum değer olduğunu; pH=7,8 ile 8,9 arasında maksimum hızın %90'ına ulaşıldığını bulmuşlardır. Painter ve diğ. (1983), nitrifikasyon hızının pH=6,3–6,7'de azaldığını, pH=5,0-5,5 aralığında ise nitrifikasyon olmadığını belirlemiştir. Ruiz ve diğ. (2003) ise pH 6,45-8,95 aralığında nitrifikasyonda nitrata dönüşümün tam olarak sağlandığını, 6,45 'den daha düşük ve 8,95'den daha yüksek pH değerlerinde nitrifikasyon inhibisyonunun meydana geldiğini gözlemlemişlerdir.

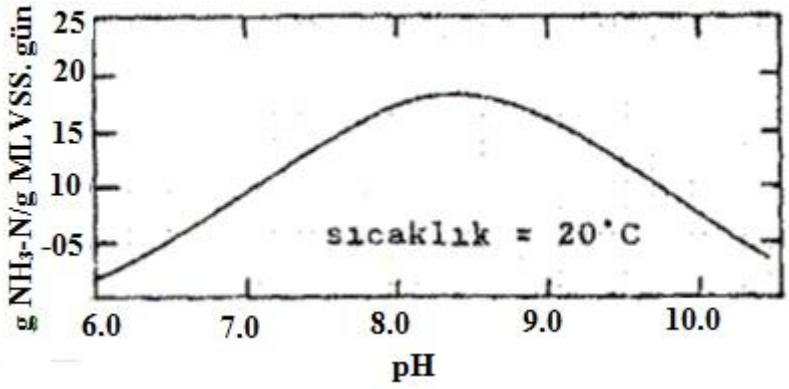
Ani pH değişimlerinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada pH değişiminin sistemi sadece inhibe ettiği, toksik etki yaratmadığı gözlenmiştir (USEPA, 1975). pH' ı etkileyen faktörlerden biri substrat azotunun iyonlaşmamış formları olan serbest amonyak ve serbest nitroz asidi konsantrasyonlarıdır. Şekil 2.1, serbest amonyak ve nitroz asidi konsantrasyonlarının nitrifikasyon üzerindeki inhibisyon etkisini göstermektedir (Barnes ve Bliss, 1983). Şekil 2.2'de ise sabit sıcaklıkta pH' ın nitrifikasyon sürecine etkisi gösterilmektedir (Toprak, 1996).



Şekil 2.1. Serbest amonyak ve nitroz asiti konsantrasyonlarının nitrifikasyon üzerindeki etkisi (Barnes ve Bliss, 1983)

pH ile ilgili diğer bir sorun da nitrifikasyon sürecinde 1 mol amonyak azotunun yükseltgenmesi sonuncu 2 mol H+ iyonu açığa çıkması ve 2 mol alkalinite tüketilmesidir. Bu durumda pH-alkalinite dengesi etkilenmekte, atıksuda yeterli alkalinite olmaması

durumunda pH düşmekte ve nitrifikasyon hızı yavaşlamaktadır. Nitrifikasyonun tam olarak gerçekleşmesi için dışarıdan alkalinite ilavesi gerekebilmektedir. Bir gram amonyum azotu için suda bulunması gereken alkalinite $CaCO_3$ cinsinden 7,07 gramdır (Çelikbaş ve Kılıç, 1997).



Şekil 2.2. Sabit sıcaklıkta pH' ın nitrifikasyon sürecine etkisi (Toprak, 1996)

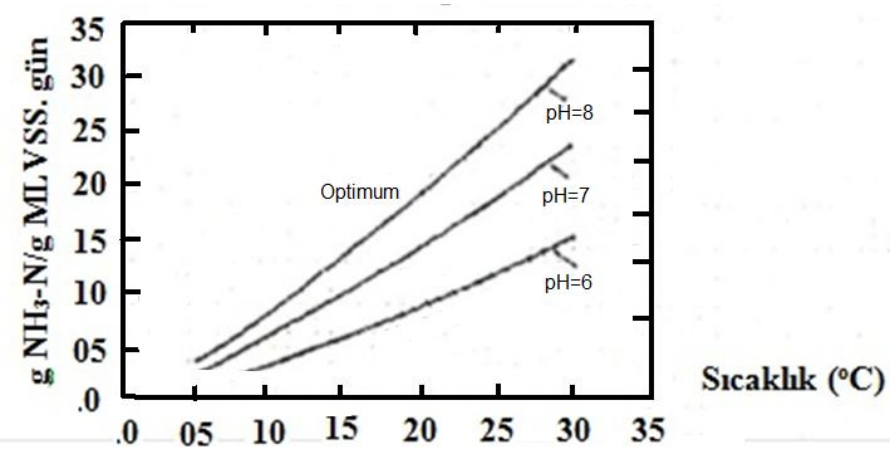
2.5.2. Sıcaklığın etkisi

Sıcaklık tüm biyokimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi nitrifikasyon sürecinde de önemli rol oynamaktadır. Araştırmalar 7 ile 30 ºC' ler arasında çoğalma hızının Arhenius bağıntısına uyduğunu göstermekte, bu aralığın dışında mutlaka pilot ölçekli çalışmalar yapılması gerektiği vurgulanmaktadır. Bu nedenle çalışılacak atıksu tipi ve sıcaklık için deneysel çalışmaların tekrarlanması, değerlendirilmesi açısından oldukça önemlidir (Sözen, 1995).

Literatürde nitrifikasyon için optimum sıcaklık 25-32º C olarak kabul edilmiştir (Arceivala, 2002).

Neufeld ve diğ. (1996), elde ettikleri laboratuvar verilerini kullanarak yaptıkları hesaplamalarda nitrifikasyon kinetiklerinin yüksek sıcaklıklara karşı çok duyarlı olduğunu, maksimum 30 ºC' ye kadar nitrifikasyon hızının artığını, bunun üzerindeki sıcaklıklarda enzimlerin tahribatından ötürü hızın düştüğünü hatta nitrifikasyonun durduğunu belirlemişlerdir.

Şekil 2.3'te sabit pH'da sıcaklığın nitrifikasyon süreci üzerindeki etkisi gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Sabit pH 'da sıcaklığın nitrifikasyon süreci üzerindeki etkisi (Toprak, 1999).

2.5.3. Çözünmüş oksijenin etkisi

Çözünmüş oksijen, nitrifikasyon için çok önemli bir parametredir ve bir çok araştırmacı tarafından nitrifikasyon üzerine etkisi araştırılmıştır. Genelde, ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu düştükçe, bu parametrenin hız sınırlayıcı substrat olmaya başladığı kabul edilmektedir. Nitrifikasyon hızının 3-4 mg/L oksijen konsantrasyonuna kadar arttığı bilinmektedir (Tchobanoglous ve dig., 2003). Wiesmann (1994), oksijen afinitesini amonyak okside edenler için 0.3 mgO_2/L, nitrit okside edenler için 1.1 mgO_2/L olarak kaydetmiştir (Campos ve diğ., 1999).

Maier ve Krauth (1988) nitrifikasyonda herhangi bir kısıtlamanın olmaması için 2 mg/L çözünmüş oksijen konsantrasyonun yeterli olduğunu, ancak yüzeysel mekanik havalandırıcıların kullanılması halinde yüzeyde ölçülen konsantrasyonun 2,5 mg/L olması gerektiğini vurgulamaktadırlar (Çelikbaş ve Kılıç, 1997). Barness ve Bliss (1983) de, düşük akışta çözünmüş oksijen düzeyinin 1,0 mg/L'den büyük olması gerektiğini belirtmişlerdir. Nitrifikasyon hızlarının önemli ölçüde düştüğü düşük çözünmüş oksijen konsantrasyonlarında (<0.5 mg/L) *Nitrobacter* grubunun, *Nitrosomonas* grubuna göre daha fazla etkilendiği görülmüştür (Tchobanoglous ve diğ., 2003).

Tablo 2.1, sabit sıcaklıkta çözünmüş oksijen konsantrasyonunun *Nitrosomonas* ve *Nitrobacter*lerin maksimum çoğalma hızları üzerindeki etkisini göstermektedir (Knowles ve diğ.,1965).

Tablo 2.1. Çözünmüş oksijen konsantrasyonunun maksimum çoğalma hızı üzerine etkisi (T=18,8°C) (Knowles ve dig.,1965).

Oksijen konsantrasyonu mg / l	Maksimum çoğalma hızı 1/gün	
	Nitrosomonas	Nitrobacter
8,4	0,7	0,9
4,7	0,7	1,1
3,4	0,7	0,8
2,0	0,7	0,9
1,4	0,6	0,67
0,6	0,5	0,6

2.5.4. Substrat konsantrasyonu

Düşük konsantrasyonlarda azotun büyümeye sınırlayıcı etkisi oldugu kadar Nitrosomanas ve *Nitrobacter*ler kendi substrat konsantrasyonlarına da çok duyarlıdırlar. 100 mg/L' den az inorganik azot konsantrasyonundaki kentsel atıksularda bu kaynaktan dolayı nitrifikasyon inhibisyonu olmaz. Bununla beraber hayvan atıkları arıtan sistemlerde yüksek amonyak azotu konsantrasyonunun nitrifikasyonu inhibe etmesi beklenmelidir. Yüksek konsantrasyonda NH_4^+/NH_3 ihtiva eden atıklarda *Nitrobacter* inhibisyonu nitrit birikimine neden olmaktadır. Serbest amonyak ve serbest nitroz asidi konsantrasyonları üzerindeki etkilerinden dolayı pH ve sıcaklık nitrifikasyon inhibisyonunda önemli bir etkiye sahiptir. (Larry ve diğ., 1973).

2.5.5. Toksik ve inhibitör bileşiklerin etkisi

Nitrifikasyon organizmaları, birçok organik ve inorganik bileşiğe karsı heterotrof organizmalara göre çok daha duyarlıdırlar (Metcalf ve Eddy, 2003). Bu bileşenlerin birçoğu *Nitrobacter*e göre *Nitrosomonas* grubunu daha fazla etkilemektedir. Potasyum klorat, sodyum azid ve sodyum siyanat gibi bazı bileşikler ise *Nitrosomonas*a göre *Nitrobacter*e daha fazla toksik etki yapmaktadırlar (Barnes ve Bliss, 1983). Birçok durumda nitrifikasyon bakterileri inhibe oldukları halde nitrifikasyon, çok daha düşük hızlarda olmak kaydı ile devam etmektedir. Bazı durumlarda ise toksisite o kadar yüksektir ki nitrifikasyon bakterilerini öldürebilir. Toksik organik bileşikler arasında solventler,

benzen, alkoller, eterler, siyanatlar, aminler, proteinler, klorlu organik bileşikler ve fenolik bileşikler sayılabilir (Metcalf ve Eddy, 2003).

Ayrıca ağır metaller (gümüş, civa, nikel, krom, bakır, kursun, çinko vb.) çok düşük konsantrasyonlarda dahi toksik etki yapabilmektedir. 0.25 mg/L nikel, 0.25 mg/L krom ve 0.1 mg/L bakır amonyum oksidasyonunu tamamen inhibe edebilmektedir (Tchobanoglous ve diğ., 2003). Barnes ve Bliss (1983), nitrifikasyonu inhibe eden ağır metal (Cu, Zn, Cd, Ni, Pb, Cr) konsantrasyonunun genel olarak < 5 mg/L olması gerektiğini vurgulamışlardır.

İnhibitörler arasında bilinen en belli başlı örnekler standart BOİ deneyinde kullanılan aliltioüre ve 2-kloro-6 (triklorometil) purindir. Aliltioürenin 10 mg/L konsantrasyonu ve 10 dk' lık reaksiyon süresinin *Nitrosomonas* inhibisyonu için yeterli olduğu, 30 mg/L' ye kadar uygulanan konsantrasyonlarında *Nitrobacter*leri (ve hetetrofları) etkilemediği belirtilmektedir. Her iki organizma türü için de sodyum kloratın oldukça etkili bir inhibitör olduğu vurgulanmaktadır (Nowak ve diğ., 1994).

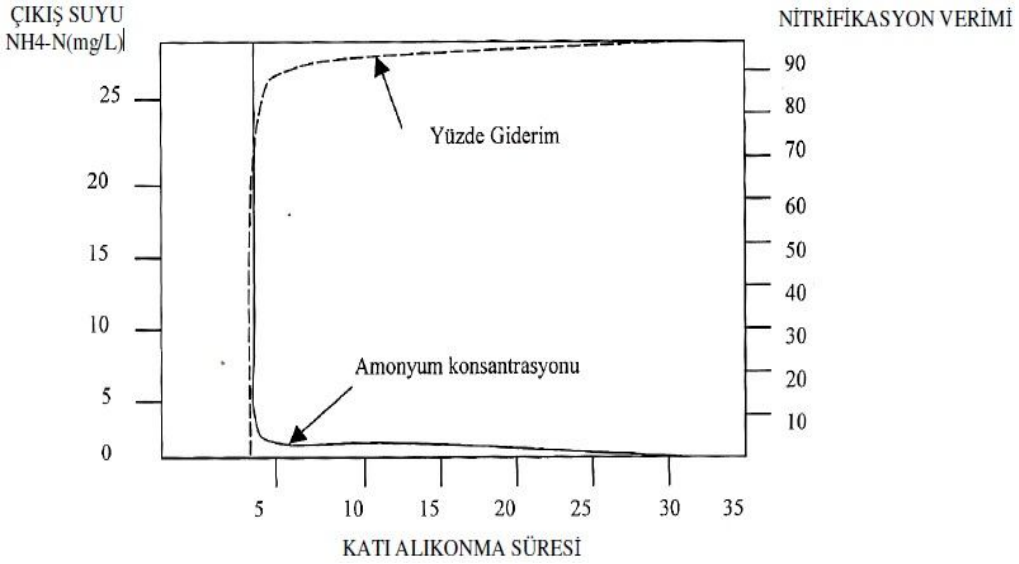
Nitrifikasyon ayrıca iyonize olmamış veya serbest amonyak (NH_3) ve nitroz asit (HNO_2) tarafından da inhibe edilir (Metcalf ve Eddy, 2003). Serbest amonyağın düşük konsantrasyonları bile *Nitrobacter*leri inhibe edebilmektedir. İnhibisyonun başladığı konsantrasyon *Nitrobacter*ler için 0,1-1 mg/L arasında değişirken, *Nitrosomonas*lar için 10-150 mg/L olarak verilmektedir.

Nitroz asit (HNO_2) inhibisyonu ise 0,22-2,8 mg/L aralığında görülmektedir (Anthonisen ve diğ.,1976). Antoniou ve diğ. (1990) tarafından yürütülen bir çalışmada *Nitrosomonas*lar üzerinde inhibisyon etkisi göstermeyen maksimum serbest amonyak konsantrasyonu 8,2 mg/L olarak belirtilmektedir (Çelikbaş ve diğ., 1997). İnhibisyon etkisi sıcaklık, pH ve azot türlerinin toplam konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. Örneğin 20°C ve pH 7'de 100 ve 20 mg/L NH_4-N sırasıyla NH_4-N ve NO_2-N oksidasyonunu inhibe eder. Ayrıca 280 mg/L NO_2-N kendi oksidasyonunu inhibe edebilir (Metcalf ve Eddy, 2003).

2.5.6. Katı alıkonma süresi

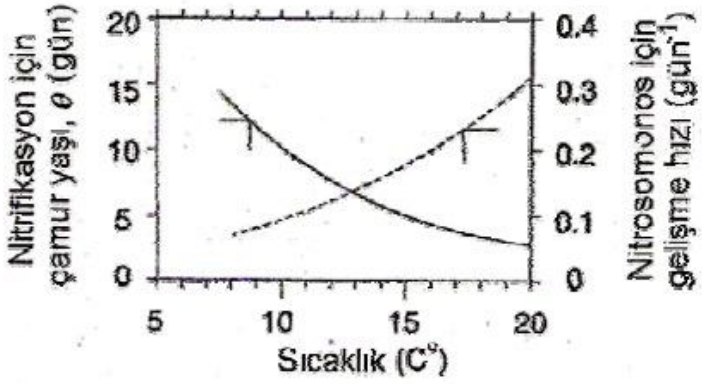
Nitrifikasyon bakterileri evsel atıksularda bulunur. Bununla beraber, aktif çamur süreçlerinde birçok atıksu sistemi karbonlu maddelerin giderimini sağlayan organizmaların hızlı büyümesine göre tasarımlandığından dolayı nitrifiye edilemez. Katı alıkonma sürelerinin arttırılması ile nitrifikasyon gerçekleşir. Yüksek katı alıkonma süresi,

nitrifikasyon bakterilerinin belirli bir sayıda bulunmasını sağlar (Toprak, 1999). Şekil 2.4, katı alıkonma süresinin çıkış amonyak konsantrasyonu ve nitrifikasyon üzerindeki etkisini göstermektedir.



Şekil 2.4. Katı alıkonma süresinin çıkış suyu amonyak konsantrasyonu ve nitrifikasyon verimi üzerindeki etkisi (Toprak, 1999).

Nitrifikasyon istenen durumlarda, arıtma tesisindeki katı alıkonma süresi veya ortalama hücre alıkonma süresi yeterli derecede yüksek olmalıdır. Bir reaktörde hücre alıkonma süresi, bölünme süresinden daha büyük değilse, hücreler daha çoğalmadan sistemi terk edebilirler. Yani düşük katı alıkonma süresi, biyolojik sistemde, özellikle sıcaklık ve oksijen konsantrasyonu düşükse, düşük büyüme oranlarının sonucu olarak nitrifikasyon bakterilerinin sistemden yıkanmasına sebebiyet verir (Wiesmann, 1994). Bu yüzden Şekil 2.5'de de görüldüğü gibi 10° C' de katı alıkonma süresi en az 9,5 gün, 20°C' de ise en az 3 gün olmalıdır. Uzun havalandırmalı tesisler genellikle 10 günden daha büyük katı alıkonma süreleri için projelendirilir (Arceivala,2002).



Şekil 2.5. Sıcaklıkla nitrifikasyon için çamur yasının ve *Nitrosomonas* için gelisme hızının değişimi (Arceivala, 2002).

Wuhrmann (1968) ve Schroeder (1985)' in, yaptıkları çalışma, nitrifikasyonun, katı alıkonma süresinin 4 ve 7 günden daha fazla olduğu kentsel atıksu arıtımı yapan aktif çamur ünitelerinde, başarıyla gerçekleştiğini ortaya koymuştur.

Nitrifikasyon bakterilerinin bulunduğu sistemlerde hemen her zaman heterotrof bakterilerin de bulunacağı gerçeği nitrifikasyon bakterileri için oksijen ve yer kısıtlamasını da beraberinde getirecektir. Bu iki dezavantaj nitrifikasyon bakterileri için yüksek bir katı alıkonma süresi sağlanarak giderilebilir. Bu değer kimi araştırmacılara göre 15 günden büyük olmalıdır.

Hatta düşük oksijen konsantrasyonlarında, toksik maddelerin varlığında veya düşük sıcaklıklarda daha da yüksek katı alıkonma sürelerine ihtiyaç duyulabilir. Katı alıkonma süresi 15 gün veya üzerinde olan aktif çamur sistemleri yükleme türü olarak uzun havalandırmalı sistemler olarak sınıflandırılırlar. Yani uzun havalandırmalı bir sistem aynı zamanda nitrifikasyonun gerçekleştiği bir sistemdir (Arceivala, 2002).

2.5.7. Biyolojik Oksijen İhtiyacı / Toplam Kjeldahl Azotu Oranı (BOİ/TKN)

Nitrifikasyon sistemleri atıksuyun BOİ/TKN oranından üç şekilde etkilenebilirler. Bunlardan birincisi bu oranın çok yüksek olması durumunda hetetrofik biyomas sentezinin tüm azotu tüketmesi ve dolayısıyla azotun amonyumdan nitrite ve daha sonra nitrata dönüşümünü engellemesidir. Bu oranın örneğin 25 g BOİ/gTKN olması durumunda nitrifikasyon için çok az veya hiç indirgenmiş azot kalmayacaktır.

İkincisi, BOİ/TKN oranı aktif çamurun yüzde kaçının nitrifikasyon bakterilerinden oluştuğunu belirler. Nitrifikasyon bakterilerinde hücre sentezinde kullanılan substrat miktarı az olduğundan (büyük çoğunluğu enerji üretiminde kullanıldığından) sistemde bulunma yüzdeleri de normal şartlarda düşüktür. Evsel nitelikli atıksulardaki normal BOİ/TKN oranlarında (5-10 gBOİ/gN), nitrifikasyon bakterileri aktif biyomasın genellikle yaklaşık olarak %20'den azını oluştururlar.

Üçüncü olarak da BOİ/TKN oranı, nitrifikasyon bakterileri ve heteretrof bakteriler arasında oksijen veya biyofilm içindeki büyüme yüzeyi gibi ortak bazı kaynaklar için nasıl bir yapışma olacağını belirler. Uzun vadede, rölatif olarak daha yüksek BOİ/TKN oranları, nitrifikasyon bakterilerini flok veya biyofilm içerisinde daha derinlere doğru yerleşmeye zorlar. Bu da, özellikle NH_4^+ ve O_2 gibi besin maddelerinin nitrifikasyon bakterilerine ulaşmasında daha büyük kütle transfer dirençlerinin oluşmasına neden olur (Ritmann ve McCarty, 2003). Kısa vadede ise, heterotrof bakterilerin yüksek büyüme hızları, oksijeni tüketimi, azotun asimilasyonu veya nitrifikasyon bakterilerini fiziksel olarak flok veya biyofilm içinden dışarıya atmaları gibi olumsuz etkiler yaratabilir.

Organik bileşiklerin çoğu nitrifikasyon bakterilerine inhibitör olmalarına rağmen, organik madde nitrifikasyonu doğrudan inhibe etmez. Aktif çamur sistemlerinde organik madde ile görülen inhibisyonun, genellikle hetetrofik organizma faaliyetleri ile çözünmüş oksijen konsantrasyonunda azalmaya bağımlı olduğu düşünülür. Nitrifikasyon üzerindeki bu inhibisyon etkisi, organik madde varlığında, yüksek dönüşüm hızlarına ve büyüme oranlarına sahip hetetrofik mikroorganizmaların, nitrifikasyon bakterileri üzerinde hızla baskın hale gelmeleri seklinde açıklanabilir (Wiesmann, 1994). Aslında baskın olan hetetroflarla nitrifikasyon yapan bakteriler arasında, sistemde, oksijen kullanımından doğan rekabet sonucu, inhibisyon etkisi ortaya çıkmış olur (Hanaki ve diğ., 1990).

Yapışık büyüme sistemlerinde ise yapışma sadece oksijen açısından değil aynı zamanda mikroorganizmaların tutunacağı yer açısından da mevcuttur.

2.5.8. Diğer etkiler

Partikül yüzeylerinin durumu, türbülansın varlığı ve ışık geçirgenliğinin çeşitli ortamlarda nitrifikasyon üzerine etkili olduğu bazı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Painter, 1970).

Nitrifikasyon bakterilerinin büyüme hızlarını, iz elementlerin varlığı da etkiler. Kalsiyum, bakır, demir, magnezyum, mangan, fosfor, sodyum ve çinko gibi elementler büyüme için gereklidir. Bakır, amonyağın nitrit yükseltgenmesi kademesinde enzimleri aktive eden bir 'kofaktör'dür. Molibden *Nitrobacter*lerin büyümesini hızlandırır (Toprak,1999).

2.6. Biyofilm Prosesi

Biyofilm tabakası "canlı veya cansız bir yüzeye yapışık olarak kendi ürettikleri polimerik matriks içinde yaşayan bakteri hücrelerinin oluşturduğu topluluk", "yoğun bir ekzopolimer matriks içinde, mikroorganizmalar tarafından organize olmuş fonksiyonel ortaklık" ya da "bir yüzeye tutunmuş, organik polimer matrikse gömülü mikrobiyal birlik" olarak değişik tarzlarda tanımlanmıştır. Tanımlardan anlaşıldığı üzere biyofilm tabakası mikroorganizma, yüzey ve matriks olarak üç temel bileşenden oluşmaktadır. Eğer bu temel bileşenlerden biri olmazsa biyofilm tabakasından söz edilemez. Elbette bu yapı çok basite indirgenmiştir ve çevresel faktörleri içine almamaktadır. Sözü edilen matriks, yani EPS, terminolojide "hücre dışı polimerik maddeler", "ekzopolisakkaritler" ya da "ekzopolimerler" terimlerinin karşılığı olarak kullanılmaktadır. EPS, biyofilm tabakasında bakterilerin hücre dışına saldıkları maddelerdir ve bakterileri bir arada tutan çimento gibi düşünülmektedir. Aynı zamanda biyofilm tabakasının bütünlüğünü ve mimari yapısını da korumaktadır. Biyofilm tabakasının morfolojisi ise büyük bir oranda çevre şartları tarafından belirlenmektedir. EPS'nin üstünlüğü, aracısız olarak tüm katı yüzeylere tutunmayı sağlamasıdır. Kirpik ya da pilus ise daha çok canlı doku yüzeylerine özgün birleşme için gerekli hücre zarı yapılarıdır.

Bakteriler, suda serbest yüzmek yerine bir yüzeye tutunmayı tercih eder. Bunun sebebi, tutunduğu yüzeyin besin kaynağı olması, suyun akışıyla tutunduğu yere besin maddesi taşınması ya da su akışı sayesinde bol oksijen bulunması olabilir. Çünkü mikroorganizmalar ekolojik stratejilerinde en çok besin maddesi bulunan ortamı seçmektedir. Biyofilm tabakasının oluşumunda yüzeye ilk tutunan ve çoğalan bakterinin türü de önemlidir. Yerleşik bir biyofilm tabakasının varlığı yeni bakteri türlerinin girişini engellemektedir. Çünkü yerleşik mikroorganizmalar elektrik yükü farklılığı, besin rekabeti ya da saldığı kimyasal maddeler ile diğer mikroorganizmaları uzaklaştırabilir. Mikroorganizmaların bazıları yüzeylere tutunurken, bazıları da su içinde serbest halde

dağılmış olarak bulunurlar. Planktonik bakterilerin akuatik bir ekosistemde total bakterilerin % 0.1'ini temsil ettiği düşünülmektedir. Serbest formdaki mikroorganizmalar hareketlerini yavaşlatarak yüzeye yaklaşırlar, yüzeyle veya yüzeye daha önceden tutunmuş olan organik maddelerle ya da diğer mikroorganizmalarla geçici bir ilişki kurarlar. Bu geçici ilişki, bakterilere yüzeyde kendilerine uygun bir yer bulma olanağı sağlar. Yüzeye tutunan bakteriler, hücre dışına saldığı polimerlerle diğer mikroorganizmaların da o bölgeye yapışmasını sağlayarak biyofilm tabakasını oluşturmaya başlar. EPS matriks, moleküler bir filtre olarak davranıp bakterileri bir örtü gibi sarar. Onları antimikrobiyal ajanlardan, besinsizlikten, geçici kuraklıktan, pH dalgalanmalarından, oksijen radikallerinden, toksinlerden, bakteriyofajlardan ve avcı protozoonlardan korur, hücreleri bir arada tutar, iz miktardaki organik molekülleri, iyonları ve besin maddelerini biriktirir. Ayrıca tabaka, zengin gen havuzu sayesinde kolay gen transferi, mekanik destek sağlama, kanallar yardımıyla hızlı madde transferi, hücre dışı enzimlerin alıkonması gibi avantajlar sağlar. Bu jelsi tabaka (ekzopolisakkaritler) negatif yüklüdür ve bir iyon değişim reçinesi gibi davranarak büyük miktarlarda besin moleküllerini kendilerine bağlar. Aşırı besinsizlik durumunda, bakterilerin kendilerinin ya da diğer türlerin ürettiği EPS tabakasını yıkarak beslenme amacıyla tükettikleri de bilinmektedir. EPS tamamen geçirimsiz bir tabaka değildir, ancak kimyasal ajanların difüzyonunu yavaşlatır ve konsantrasyonlarını düşürür.

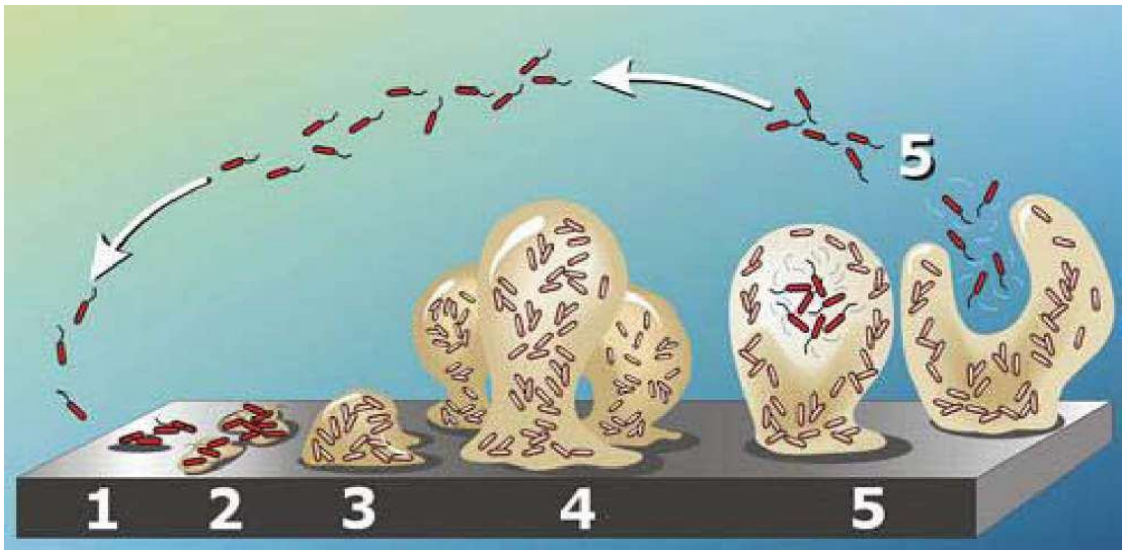
EPS birikmesi, su ile temasta bulunan yüzeylerde kirliliğin en önemli basamağıdır. Olgun biyofilm tabakasında mikrobiyal çoğalma hiçbir zaman durmaz. Özellikle suyun akış gücü ile kopan hücre ya da hücre kümelerinin yeri hemen doldurulur. Tek bir hücre kopabildiği gibi 500 pm çapında bir hücre kümesi de yüzeyden ayrılabilmektedir. Biyofilmden kopma süreci, enfeksiyonların yayılması ve su sistemlerinin uzak uçlarının kontaminasyonunda klinik ve halk sağlığı açısından önem taşımaktadır. Hücrelerin tabakadan tek tek kopması "erozyon", kütleler halinde kopması ise "dökülme" olarak adlandırılır. Erozyon ya da dökülme suyun akış hızıyla doğrudan ilişkilidir. Biyofilmden ayrılma çoğunlukla erozyon ile gerçekleşirken, dökülmede gözlenen hücre sayısının türe bağlı olarak 10 ila 300 hücre arasında değiştiği bildirilmiştir (Satoh ve ark. 2004).

Özellikle besinin bol bulunduğu (ötrofik) sularda biyofilm tabakası çok hızlı gelişirken, düşük düzeyde besin bulunan (oligotrofik) sularda bu süreç yavaştır, çünkü düşük düzeyde besin maddesinin bulunduğu ortamda bakteri üremekten çok hücre canlılığının devamı için mücadele eder. Bu strateji, bakteri için önemli bir hayatta kalma

çabasıdır. Yetersiz besin ve enerji nedeniyle bakterilerin üremesi uzun bir süre engellenebilir. Oligotrofik ortamda bakterilerin açlık stresine karşı farklı bir fenotipe büründüğü, küçülerek yuvarlak bir şekil aldığı ve besin miktarı arttığında tekrar eski şekline döndüğü bildirilmiştir. Dezenfeksiyon gibi stres faktörlerinin biyofilm oluşumunu teşvik ettiği, laboratuar ortamında pasajları yapılan suşların yapışma yeteneklerinin ve saldıkları EPS miktarlarının zamanla azaldığı bildirilmiştir. Biyofilm tabakası, su sistemlerine uygulanan dezenfeksiyon etkinliğini azaltmaktadır. Sisteme katılan dezenfektanların etkinliği biyofilm tabakasının kalınlığına bağlı olarak derinlere girdikçe azalmakta, biyofilmin içinde veya su fazında bulunan organik moleküllere bağlanmasıyla sudaki etkin konsantrasyonu düşmektedir. Özellikle serbest klorun çok hızlı bir şekilde EPS ile reaksiyona girerek sudaki etkinliğinin azaldığı belirtilmektedir. Besin ya da oksijen gibi yaşamsal moleküller için var olan rekabet, biyofilmin içinde farklı ekolojik katmanların oluşmasına yol açar. Hibiya ve diğ., (2004) yaptıkları çalışmada biyofilm tabakasında derine indikçe çözünmüş oksijen miktarının hızla azaldığını göstermişlerdir. Bu koşullar anaerop bakteriler için biyofilm tabakasının derinlerinde bir yaşam alanı oluşturmaktadır. Yapılmış olan bir araştırmada, besin açısından fakir ortamlarda yaşayan bakterilerin, antimikrobiyal ajanlara agar plağında üreyenlerden daha dirençli oldukları gösterilmiştir. Stepanovic ve diğ. tarafından yapılan bir çalışmada, seyreltilmiş besin maddesi içeren ortamda (1/20 Tripton soya broth) *Salmonella sp*., *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* bakterilerinin normal oranda hazırlanmış besiyerine (Tripton soya broth) göre daha hızlı biyofilm oluşturdukları gözlenmiştir. Prokaryotlar değişik ortam şartlarına genetik düzenleme ile çok kolay uyum sağlarlar ve yüzeye yaklaşırken düzenleyici genlerin çalışmasıyla dakikalar içinde sessil yaşam fenotipine dönerler. Bu adaptasyon sonucunda planktonik ve sessil hücrelerin birbirinden farklı protein sentezlediklerini ortaya koyan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Değişim esnasında bazı genlerin anlatımı teşvik edilirken bazıları da baskılanır. Biyofilm tabakası oluşturmak üzere anlatım yapmaya başlayan genler, polisakkarit, peptidoglikan, hücre içi adezin, otolizin, haberleşme sinyalleri, yüzey ve kontrol proteinleri gibi maddelerin sentezini başlatır. Planktonik faza göre önemli farkların olması, "biyofilm yaşam modu" tanımını kuvvetle desteklemektedir. Bu esnek ve hızlı değişimleri çok hücreli ökaryotların yapması imkansızdır.

Biyofilm tabakası ısı değiştiricilerde, su ve yakıt ileten borularda, gemi karinalarında, diş ünitelerinde, bina duvarlarında, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde biyofauling olarak da adlandırılan istenmeyen tortu ve tabakalaşmalara yol açarak önemli derecede ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Biyofilm tabakası katı-sıvı, gaz-katı, gaz-sıvı, sıvı-sıvı, katı-katı gibi farklı ara yüzlerde oluşabilir. Yapılan çalışmalara dayanarak, yüzeylerde biyofilm tabakasının oluşumunun engellenmesinin neredeyse imkansız olduğu söylenebilir. Ancak doğru malzeme seçimi, düzenli temizlik ve dezenfeksiyon ile biyofilm oluşumu azaltılabilir. Yüksek biyofauling potansiyeline sahip endüstriyel sistemlerde ek olarak sürfaktan madde kullanımı ile yüzeye tutunmuş bakterilerin sökülmesi kolaylaşır. Özellikle iyonik olmayan yapıdaki sürfaktanların biyofilm tabakasını anlamlı düzeyde depolimerize ettiği bildirilmiştir (Satoh ve ark. 2004).

Yüzeye tutunan bakteri çoğalarak önce mikrokolonileri, bunlar da büyüyüp yatay planda genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturmaktadır (Şekil 2.6). Tutunma gerçekleşince bakteri bir takım adaptasyon evreleri geçirir. Bunlar içinde EPS üretimi ve antimikrobiyal ajanlara direnç gelişimi en önemli olanlarıdır. Biyofilm ile ilgili yapılmış çalışmalarda en iyi incelenmiş tür olan *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri, hücre-hücre haberleşmesiyle (quorum-sensing) üremelerini durdurma özelliğine sahiptir. Hücre dışına saldıkları sinyal moleküller yardımıyla hücreler popülasyon yoğunluğunu algılayabilmektedir. Ancak her türün kendine özgü sinyal molekülleri olduğu için farklı türlerin bulunduğu heterojen biyofilm tabakalarında farklı haberleşmeler gerçekleşmektedir. Bakteriler hücre-hücre haberleşmesiyle çevre şartlarına göre davranışlarını düzenler. Ayrıca, besin varlığı, diğer mikroorganizmalara karşı savunma, toksik maddelere direnç gibi değişkenlere cevap vererek canlılıklarını sürdürür. Biyofilm tabakasının en küçük birimleri mikrokolonilerdir. Mikrokoloni içinde bulunan bakteriler Brown Hareketi yeteneğini kaybetmişlerdir. Mikrokoloniler çoğunlukla şapkalı mantar görünümündedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Yüzeylerde biyofilm oluşumunu gösteren şematik diyagram (Peg Dirckx'm yazılı izniyle kullanılmıştır - Center for Biofilm Engineering, Bozeman USA)

Bakterilerin büyük çoğunluğu bu yapının şapka kısmında, çok azı ise sap kısmında yer alır. Mikrokoloninin ince yapısında çok fazla miktarda su kanalları olduğu ve bu geçirgen kanallar yardımıyla oksijen, besin ve artık maddelerin taşındığı belirtilmiştir. Bu kanallarının birbiriyle birleşen yapısı, ökaryotik hücrelerdeki endoplazmik retikuluma benzetilebilir. Bu şekliyle olgun bir mikrokoloni olarak kabul edilen yapının oluşumu 10 günde tamamlanabilmektedir. Mikrokoloniler ince biyofilm tabakalarında yatay, kalın biyofilm tabakalarında ise dikey planda düzenlenir. Bu düzenlenmede en önemli etkenler su akış hızı ve yüzey gibi çevre koşullarıdır. Suyun akış hızının artması EPS üretimi ile mikroorganizma sayısını artırmakta ve daha ince biyofilm tabakası oluşmasına yol açmaktadır.

Bazı mikroorganizmalar yüzey üzerinde hareketlidir ve 10 Hz'den büyük titreşimler yaparak ya da göç ederek (~1 μm/saat) yer değiştirirler. Hareket, bakterinin hücre dışı yapılarıyla olabileceği gibi su akışı tarafından da teşvik edilebilir. *P. aeruginosa* ve *E. coli* bakterileri sahip oldukları kirpik ile yüzeye yaklaşıp tutunarak mikrokoloni oluşturur. Bu bakterilerin kirpik taşımayan mutantlarının sadece tek sıralı biyofilm tabakası oluşturdukları ve bu süreci daha uzun zamanda tamamladıkları tespit edilmiştir. *Vibrio cholerae* bakterisi flagella hareketiyle yüzeyde hızla yayılırken, kirpiksiz mutantlar aynı yüzeyde birbirinden çok uzak, adacıklar halinde gelişen zayıf mikrokoloniler

oluşturmaktadır. Biyofilm tabakasının dinamiğine etki eden bazı biyotik ve abiyotik faktörler Şekil 2.7'de genel olarak gösterilmiştir.

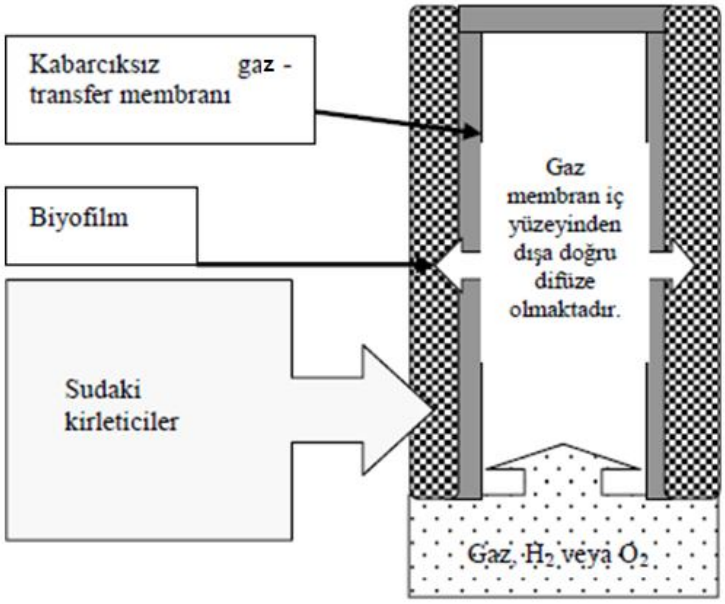
Şekil 2.7. Biyofilm tabakasının gelişimi ve biyolojisine etki eden bazı faktörler(Satoh ve ark. 2004)

Biyofilmin üst tabakalarındaki hücreler besin maddeleri ve oksijene daha kolay ulaşırken, metabolik atıkların deşarjı da kolay olur. Besin ve oksijenin daha zor girdiği derin kısımlardaki bakteriler bu sıkıntı nedeniyle metabolik olarak daha az aktiftir ya da uyku fazındadır. Çoğunlukla bakterilerin baskın olduğu biyofilm tabakalarında protozoon ve mantara da rastlanır. Protozoonlar genellikle beslenme amacıyla EPS matriksin içine girerler.

2.6.1. Membran Biyofilm Reaktörleri

Membran Biyofilm Reaktörleri (MBfR), membran ve biyofilm kombinasyonundan oluşan doğal mekanizmalı bir sistemdir (Şekil 2.8). Bu sistemde kullanılan membranlar gaz transfer eden membranlar olup gaz substratı membranın dış yüzeyinde tutunmuş halde bulunan biyofilme doğru difüze edilirler. Genellikle iki tip membran biyofilm reaktörleri bulunmaktadır: oksijene dayalı MBfR (gaz substrat elektron alıcı) ve hidrojene dayalı

MBfR (gaz substrat elektron verici). MBfR kavramı aslında 1960'lı yıllara dayanmaktadır. Schaffer ve diğ. (1963) geçirgen plastik film kullanarak oksijen transferini sağlamışlar ve dış yüzeyde biyofilm oluşturmuşlardır. 1970 ve 1990 yılları arasında membran materyallerinin artışıyla organik BOİ oksidasyonu, nitrifikasyon ve nitrifikasyon/denitrifikasyon için O_2-MBfR sistemleri geliştirilmiştir. Biyofilme direk substratı ileten bu aerobik sistemler membran havalandırmalı biyofilm reaktörler (MABRs) olarak adlandırılmıştır. Maalesef su ve atıksu arıtımında bugüne kadar çok etkili bir uygulamasına rastlanmamıştır. Muhtemelen bunun nedeni mikroorganizma için oksijen transferini sağlayan çok çeşitli yöntemlerin mevcut olmasıdır.



Şekil 2.8. MBfR'ın çalışma mekanizması

2.6.2. Litaratür Özeti

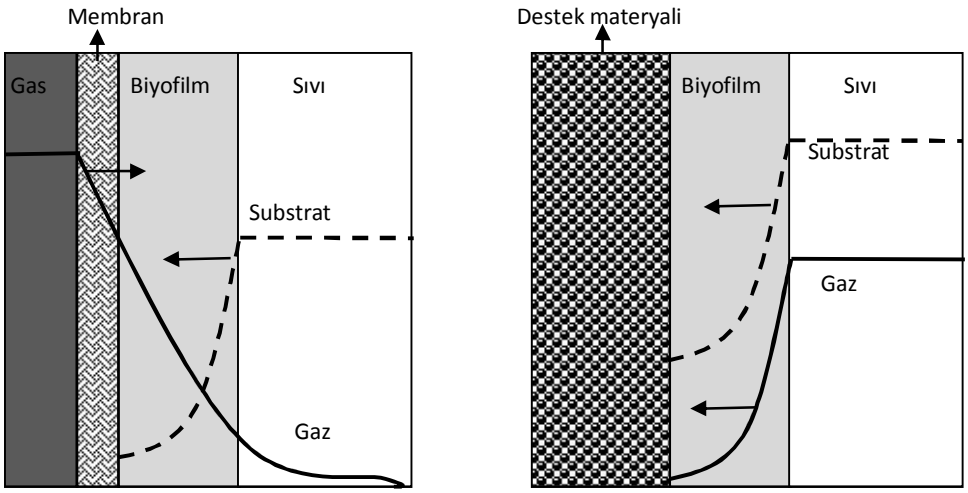
Atıksudan nütrient giderimi sucul ortamlardaki yaşam için oldukça önemli can alıcı bir konudur. Nehirlere veya göllere yüksek azot deşarjı aşırı alg büyümesine yol açarak ötrofikasyonu tetikleyeceğinden su kalitesinde bozunmalara yol açmakta ve halk sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (Vasiliadou ve diğ., 2006). Azot giderimi için fiziksel, kimyasal ve biyolojik proseslerin kombinasyonu olan çok sayıda yeni arıtma teknikleri bilinmektedir. Fizikokimyasal prosesler ile kıyaslandığında daha düşük arıtma maliyetinden dolayı biyolojik azot giderim prosesleri ön plana çıkmaktadır (Kapoor ve

Viraraghavan,1997). Özellikle, mikrobiyal populasyonların daha iyi anlaşılmasını sağlayan moleküler biyolojideki gelişmeler nedeniyle biyolojik hibrit prosesler üzerinde yapılan çalışmalarda büyük artış gözükmektedir. Biyolojik azot giderimi temel olarak iki aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşama, amonyumun nitrat ve nitrite oksidasyonunu kapsayan nitrifikasyon prosesidir. İkinci aşama ise nitrat ve nitrit bileşiklerinin azot gazına indirgenmesini kapsayan denitrifikasyon prosesidir (Metcalf&Eddy, 2003).

Heterotrofik denitrifikasyon özellikle atıksu arıtımında nitrat giderimi için kullanılan en yaygın prosestir. En yaygın bilinen heterotrof denitrifikasyon bakterileri *Achromobacter, Acinetobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Bacillus* ve *Chromobacterium*'dur. Bu bakteriler nitrit ve nitratı elektron alıcı olarak kullanarak organik maddeyi biyolojik olarak parçalamaktadırlar. Organik maddenin düşük olduğu durumlarda heterotrofik denitrifikasyon yetersiz kaldığından dolayı azot giderimi istenen düzeyde gerçekleşmemektedir. Bu nedenle, üçüncül arıtım durumlarında genellikle metanol, etanol ve asetat gibi organik maddeler ilave edilmektedir. İkincil çıkış sularında nitrat konsantrasyonundaki değişimlerden dolayı, üçüncül arıtım çıkışında organik madde kalıntısı kaldığından arıtılmış su kalitesi açısından sistem performansı olumsuz etkilenmektedir. Heterotrofik denitrifikasyonda karşılaşılan dezavantajlardan dolayı, bazı araştırmacılar ötötrofik denitrifikasyon üzerinde yoğunlaşmaya başlamışlardır (Lee and Rittmann 2002; Lee and Rittmann 2003; Cowmann ve diğ., 2005; Terada ve diğ., 2006; Rittmann, 2006; Hasar ve diğ., 2008). Ototrofik denitrifikasyon prosesinde, elektron alıcı nitrat ve nitrit, elektron verici hidrojen ve karbon kaynağı ise CO_2, HCO_3^- gibi inert karbon kullanıldığından çıkış sularında organik madde kalıntısı ve yüksek çamur oluşumu gibi dezavantajlar söz konusu değildir. Ötötrofik denitrifikasyon prosesinde ise *Ochrobactrum anthropi, Pseudomonas strutzeri, Paracoccus denitrificans* ve *Paracoccus panthotrophus* türleri tanımlanmıştır (Smith ve diğ., 2005). Ötötrofik prosesin diğer bir avantajı da düşük biyokütle oluşumudur (Rittmann, 2006). Heterotrofik denitrifikasyon prosesinde metanol kullanıldığında biyokütle oluşum hızı 1.05 g VSS/g NO_3^--N (Folgar ve Briski, 2003) iken ötorotrofik denitrifikasyonda biyokütle üretim hızı 0.24-0.31 g VSS/g NO_3^- - N'dır (Nerenberg ve diğ., 2002).

Çeşitli polimerik materyallerden üretilen yeni membranlar biyolojik proseslerde sadece katı/sıvı ayrımında değil aynı zamanda gaz substrat transferinde ve biyofilm destek

malzemesi olarak da kullanılmaya başlanmıştır. Gaz geçirgen membranlar üzerinde biyofilm oluşturmak klasik biyofilm sistemlerine nazaran daha avantajlı gözükmektedir. Membran biyofilm reaktörleri (MBfR), substrat gaz transferini sağlayan hidrofobik membranlardan teşkil edilmektedir. Elektron alıcı veya elektron verici bir gaz atıksudan giderilmek istenen kirletici çeşidine göre değişkenlik gösterebilir. Örneğin nitrat, klorlu solventler, perklorat gibi okside olmuş kirleticiler su ortamından giderilmek istendiğinde elektron verici olarak H_2 gazı kullanılırken biyooksidasyon için elektron alıcı olarak O_2 kullanılmaktadır (Hasar ve diğ., 2008). Her bir membran fiberine verilen gazın kabarcık oluşturmaksızın iş taraftan dış tarafa doğru difüzyon ile transferi, membran biyofilm reaktörlerinin en önemli avantajlarından biridir. Böylece membran yüzeyi üzerinde oluşan biyofilm, ilgili gaz substratını %100'e yakın ölçüde kullanacağından hem daha ekonomik hem de daha hızlı biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi söz konusudur.



1. MBfR 2. Klasik biyofilm sistemi

Şekil 2.9. Membran ve Klasik Biyofilm Sistemlerinin Çalışma Prensibi (Hasar ve ark. 2008)

Şekil 2.9, hem klasik hem de membran biyofilm reaktörlerindeki çalışma mekanizmasını göstermektedir. Klasik biyofilm reaktöründe, hem gaz hem de substrat aynı tarafta olduğundan biyofilmin derin kısımlarında anoksik veya anaerobik şartlar oluşmaya başlar. Ayrıca, damlatmalı filtreler, döner biyolojik kondaktörler, biyolojik filtreler gibi klasik biyofilm sistemlerinde reaktör hacminin %50-60'ı destek malzemesiyle

doldurulmaktadır. Diğer taraftan, MBfR'da ise gaz konsantrasyonu membran yüzeyinde maksimum değerde iken substrat konsantrasyonu ise minimum değerdedir. Ayrıca, klasik sistemlerdekine eşit substrat yüklerini arıtan MBfR'da biyofilmin tutuklu olduğu destek materyali reaktörün sadece %1-2'i kadardır (Brindle ve diğ., 1998).

Literatürde, membran biyofilm reaktörünün özellikle nitrifikasyon amaçlı üçüncül arıtım aşamasında kullanıldığı bazı çalışmalar (Brindle ve diğ., 1998; Shin ve diğ., 2005; Cowman ve diğ., 2005; Hasar ve diğ., 2008) olduğu gibi, toplam azot giderimini hedefleyen çeşitli çalışmalara da rastlanmaktadır. Toplam azot giderimi üzerine yoğunlaşan çalışmalar incelendiğinde; özellikle denitrifikasyon amacıyla hem heterotrof mikroorganizmalar (Satoh ve diğ., 2004; Jacome ve diğ., 2006; LaPara ve diğ., 2006) hem de ötorotrof mikroorganizmaların kullanıldığı görülmektedir (Cowman et al, 2005; Hasar ve diğ., 2008; Hasar, 2009).

Membran biyofilm reaktörlerinde heterotrof denitrifikasyon için, elektron verici olarak besleme suyu içerisinde mevcut olan organik madde kullanılmış ve tek reaktör içerisinde membran yüzeyinde hem denitrifikasyon bakterilerinin hem de nitrifikasyon bakterilerinin birlikte büyümesi planlanmıştır. Nitrifikasyon bakterilerinin daha yavaş büyümeleri denitrifikasyon hızını etkilemiş, nitrifikasyon bakterileri tarafından üretilen NO_3^- and NO_2^- sınırlamasından dolayı denitrifikasyon bakterileri yeterli elektron verici bulamadıkları zaman sistem performansı yeterli düzeyde olmamıştır. Diğer taraftan, Cowman ve diğ. (2005) ardışık nitrifikasyon ve denitrifikasyon reaktörlerinde, denitrifikasyon için elektron verici olarak organik madde yerine H_2 gazı kullanmışlar ve ötotrofik denitrifikasyon ile toplam azot giderimine ulaşmışlardır. Yapılan bu çalışmada, nitrifikasyon reaktörü ve denitrifikasyon reaktöründe sürekli bir sirkülasyon sağlanarak elektron alıcı ve vericiler arasında bir denge sağlanmaya çalışılmıştır. Fakat nitrifikasyon reaktöründen denitrifikasyon reaktörüne geçen çözünmüş oksijen denitrifikasyon reaktöründe inhibisyona neden olduğundan toplam azot verimi olumsuz etkilenmiştir. Hasar ve diğ., (2008) iki ardışık membran biyofilm reaktörü ile BOİ oksidasyonu, nitrifikasyon ve denitrifikasyon proseslerini gerçekleştirmişlerdir. İlk reaktörde elektron alıcı olarak membran fiberleri içerisine verilen oksijen gazı ile hem heterotrof hem de ötotrotrof biyofilm oluşturulmaya çalışılmıştır. BOİ oksidasyonunu sağlayan heterotroflar ile nitrifikasyonu sağlayan ötotroflar arasındaki rekabet nedeniyle nitrifikasyon prosesi 120.

günden sonra oluşmaya başlamıştır. Diğer taraftan BOI oksidasyonunu sağlayan biyofilmde gerçekleşen kopmalar ve çözünmüş mikrobiyal ürünler nedeniyle birinci reaktörle direk bağlantılı olan hidrojene dayalı denitrifikasyon reaktöründe çeşitli işletim problemleriyle karşılaşılmıştır. Ototrofik denitrifikasyon prosesi birçok araştırmacı tarafından çalışılmış ve sistem optimizasyonu netlik kazanmıştır (Lee and Rittmann 2002; Lee and Rittmann 2003; Terada, 2006; Hasar ve İpek; 2010). Lee ve Rittmann (2002) ile Terada ve diğ., (2006) çalışma sonuçları kıyaslandığında 20 kPa H_2 basıncı altında farklı nitrat akıları tespit edilmiştir. Lee ve Rittmann (2002), 0.5-1.6 g N/m^2.gün aralığında nitrat akısına ulaşmışken Terada ve diğ., (2006) 3.5 g N/m^2.gün değerinde nitrat akısını rapor etmişlerdir. Her iki araştırmacı grubu tarafından belirlenen denitrifikasyon kapasitelerindeki önemli farklılık sistem kararlılığı bakımından bir şüphe uyandırmıştır. Bu nedenle, Lee ve Rittmann (2002) çalışmasındaki aynı membran ve şartları temsilen Hasar ve İpek (2010) detaylı bir çalışma yürütmüşlerdir. Yapılan çalışma neticesinde, nitrat yüklemesine bağlı olarak denitrifikasyon kapasitesinin değiştiğini tespit etmişlerdir. Nitrat yükü 0.26-3.61 g N/m^2.gün aralığında değiştirildiğinde nitrat akısının da 0.26-3.44 g N/m^2.gün aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar hidrojene dayalı MBfR'deki ötotrofik denitrifikasyon kapasitesi üzerinde nitrat yüklemesinin azot giderim seviyesini etkileyeceğini kanıtlamıştır. Ayrıca, elde edilen sonuçlar başarılı nitrifikasyon prosesi sonrasında kurulan ötotrofik denitrifikasyon reaktörü ile % 100'e yakın azot gideriminin vukuu bulacağını göstermektedir.

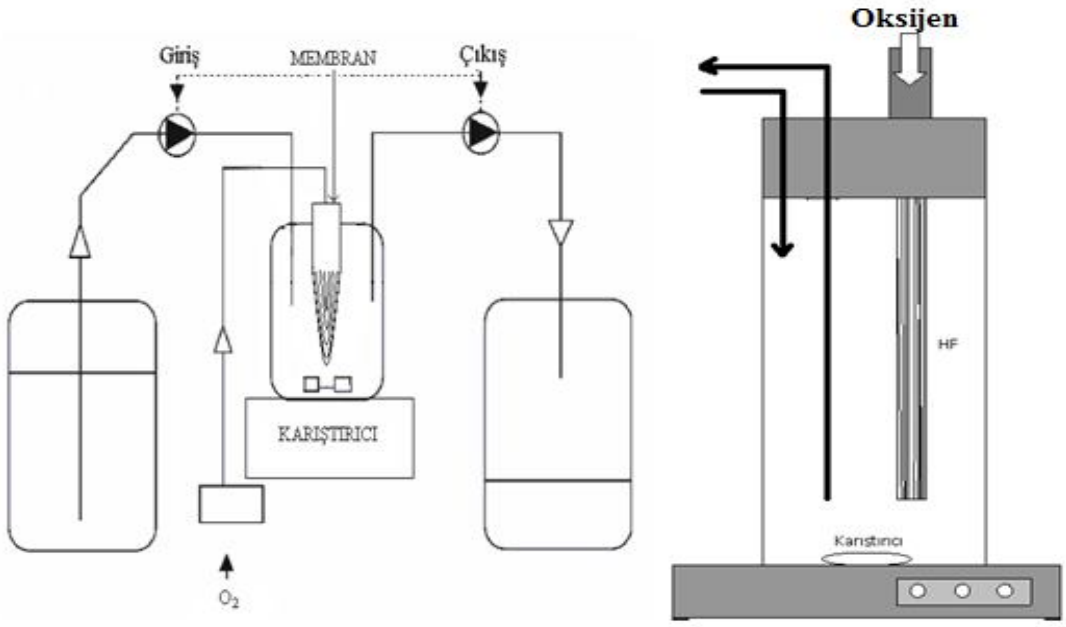
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Membran Biyofilm Reaktörü

Reaktörün aşılanması için Malatya Atıksu Arıtma Tesisi Havalandırma Havuzu'ndan alınan ve aerobik mikroorganizmalarca zengin amonyum oksitleyici bakterilerden oluşan çamur kullanılmıştır. Deney 250 ml'lik tam karışımlı oksijene dayalı membran biyoreaktör içerisinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Reaktörlerde kullanılan membranların (Model MHF 200 TL, Mitsubishi Rayon) fiziksel özellikleri Tablo 3.1'de sunulmuştur.

Tablo 3.1. MBfR sisteminde kullanılan membranların fiziksel özellikleri

Özellik	**Birim**	
Etkili Fiber Uzunluğu	cm	11
Fiber dış çapı	μm	310
Toplam Fiber yüzey alanı	cm^2	107
Toplam Fiber sayısı	-	32



Şekil 3.1. Deney düzeneği ve şematik gösterimi

3.2. İşletim Süreci

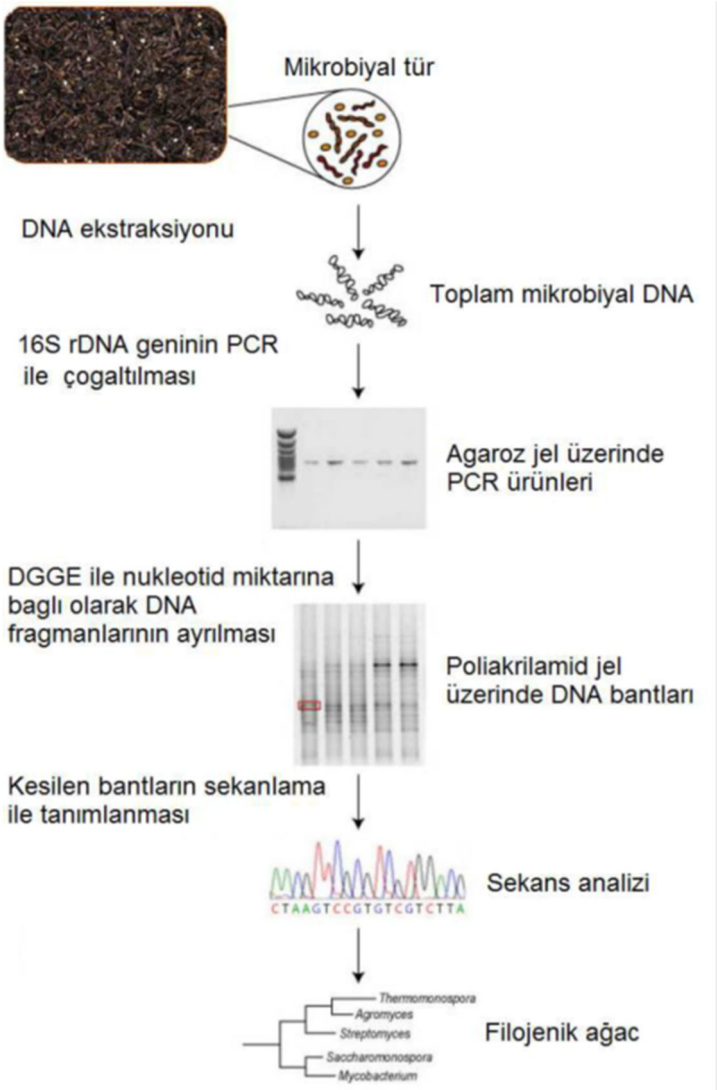
Reaktöre O_2 gazı sürekli olarak verilmek suretiyle reaktör içerisinde aerobik koşulların sürekliliği sağlanmıştır. Reaktör ilk olarak, hidrolik bekletme süresi 10 gün olacak şekilde çalıştırılmış, tam karışım 250±10 rpm (devir/dk.) hızında çalışan otomatik karıştırıcı ile sağlanmıştır. Reaktör, klima sayesinde oda sıcaklığında 25±1 °C olacak şekilde sabit tutulmuştur. Reaktöre, artan konsantrasyonlarda amonyum içeren sentetik atıksu beslenmiştir. Sentetik atıksu, NH_4Cl formunda amonyum ve mineraller ile oluşturulmuştur (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Sentetik atıksu için kullanılan mineral ortamın bileşimi

Bileşen	**Konsantrasyon(g/l)**
NH_4Cl	0,15
$NaHCO_3$	0,6
Na_2CO_3	0,1
$CaCl_2.2H_2O$	0,004
$MgSO_4.7H_2O$	0,0125
$ZnSO_4.7H_2O$	0,00125
$MnSO_4.H_2O$	0,005
$CoCl_2.6H_2O$	0,0003
$FeSO_4.7H_2O$	0,002
$CuSO_4$	0,0001
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,00035
KCl	0,007
K_2HPO_4	0,0074

3.3. Moleküler Tanımlama

Reaktör işletimi sırasında biyofilm numuneleri alınarak moleküler teknikler kullanılmış ve okisjene dayalı MBfR'da mikrobiyal türler tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, alınan numunelerde bakteri DNA'sı ekstrakte edilmiş, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile 16S rRNA genleri çoğaltılmış ve DGGE tekniği kullanılarak popülasyon dinamiği incelenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Mikroorganizmaların belirlenmesi amacıyla yürütülen moleküler analiz yöntem basamakları

3.3.1. DNA Ekstraksiyonu

Numunelerden DNA ekstraksiyonu için UltraClean Soil DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi üretici firma tarafından verilen protokole göre yapılmıştır. Hücre materyalinde bulunan DNA haricindeki safsızlıkları gidermek maksadıyla DNA ekstraksiyonu, PCR reaksiyonuna başlamadan önce gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, uygulanan protokol aşağıda verilmiştir.

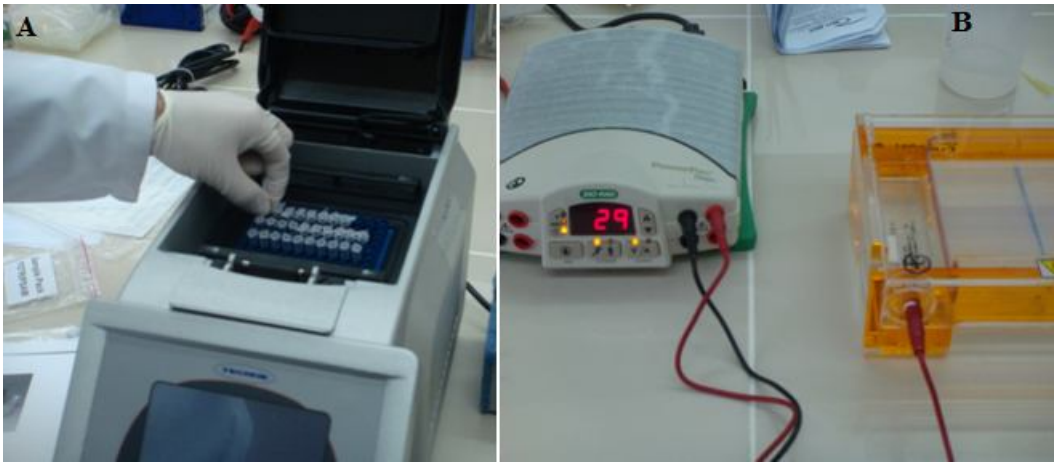
1. Tüpte 2 ml çözelti bulunmak şartıyla, 1 cm uzunluğunda kesilen biyofilm içerikli membran fiberi DNA ekstraksiyon kitine ilave edilmiştir.
2. Vortekste yavaşça karıştırılmıştır.
3. S1 çözeltisinin çökelek içerip içermediği kontrol edilmiş, eğer S1 çözeltisi çökelek içermiş ise kullanmadan önce çözelti çözünene kadar 60 ºC'de ısıtılmıştır.
4. 60 µl S1 çözeltisinden DNA ekstraksiyon kitine ilave edilmiş ve bir kaç kez ters düz edilmiştir veya vortekste yavaşça karıştırılmıştır.
5. 200 µl IRS çözeltisinden ilave edilmiştir
6. Vorteks için kullanılan Mo Bio vorteks adaptör tüp tutucusu yatay olarak kullanılmış tüp kapaklarının kapalı olduğundan emin olunduktan sonra 10dk maksimum hızda karıştırılmıştır.
7. 2 ml'lik tüplerin santrifüjde sürtünmeden döndüğünden emin olunduktan sonra tüpler 10000 rpm de 30 saniye santrifüj edilmiştir (Şekil 3.3 A). 10.000 rpm'in aşılmadığından veya tüplerin kırılmamış olduğundan emin olunmuştur.
8. Üst sıvı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu aşamada, kalıntı tipine bağlı olarak, 400 ile 450 µl üst sıvı olması beklenmektedir. Alınan üst sıvının hala bazı katı partikülleri içerebildiği bilinmelidir.
9. 250 µl S2 çözeltisi üst sıvının alındığı tüpe ilave edilmiş ve 5 sn vortekste karıştırılmıştır. Daha sonra, 4 ºC'de 5 dakika inkübe edilmiştir.
10. Tüpler 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
11. Santrifüjden sonra küçük parçacıklar almamaya çalışılmış ve 450 µl üst sıvı temiz mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
12. 900 µl S3 çözeltisi üst sıvıya ilave edilmiş ve 5 sn vortekste karıştırılmıştır.
13. Ortalama 700 µl'si spin filtereye boşaltılmış ve 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir ve filtrelenen kısım uzaklaştırılmıştır. Tekrar 700 µl üst sıvı spin filtreye ilave edilmiş ve aynı koşullar altında santrifüjlenmiştir. Kalan diğer üst sıvı da spin filtreye ilave edilerek aynı işlemler yapılmıştır (Her numune için üç defa üst sıvı spin filtreye alınmış, santrifüjlenmiş ve uzaklaştırılmıştır)
14. 300 µl S4 çözeltisi spin fitlere ilave edilmiş, daha sonra 30 sn 10 000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
15. Filtrelenen kısmı uzaklaştırılmıştır.
16. 1 dakika tekrar santrifüj edilmiştir.

17. Spin filtre dikkatli bir şekilde yeni ve temiz bir tüpe yerleştirilmiştir. Spin filtre üzerine herhangi bir S4 çözeltisinin sıçramamasına dikkat edilmiştir.
18. 50 µl S5 çözeltrisi beyaz membran filtrenin merkezine ilave edilmiştir.
19. 30 sn. santrifüj edilmiştir.
20. Spin filtre çıkarılmıştır. Artık, tüpün içerisindeki DNA uygulamaya hazır haldedir. Başka bir işleme gerek yoktur. Ekstraksiyonu yapılan DNA numuneleri -20^{o}C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.3 B).

Şekil 3.3. A) Soğutmalı Mikrosantrifüj B) Numune Saklama Bölmesi (-20^{o}C)

3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR işleminde tür tanımlamasında kullanılacak hedef genin (16SrDNA) çoğaltılması için TECHNE /TC-512 cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.4 A).



Şekil 3.4. A) DNA çoğaltma işlemi için kullanılan TECHNE /TC-512, B) agaroz jel elektroforezi

16S rRNA geninin mutasyona daha az uğraması ve dirençli bir gen olması bakımından tür tanımlamalarında tercih edilmektedir. PCR işlemi hedef genin çoğaltılmasında birkaç adımdan oluşan hücre dışı DNA replikasyonu olarak da tabir edilebilir. PCR reaksiyonunda ilk aşamada çift sarmal halde bulunan DNA molekülünde birbirine hidrojen bağlarıyla bağlı olan baz çiftleri yüksek sıcaklıkta ayrılarak tek zincir haline dönüşmektedir. İkinci aşamada ileri ve geri primerler 16SrRNA genine bağlanmakta ve uygun sıcaklıkta polimeraz enziminin de yardımıyla ortamdaki bazlar uygun yerlere bağlanarak uzama işlemi gerçekleşmektedir. TECHNE (TC-512) marka PCR cihazı hücre dışı DNA replikasyonuyla hedef genin çoğaltılması işlemi için programlanmıştır. Kullanılan program aşağıdaki şekildedir.

1. 95^{o}C'de 5 dakika ilk ayrılma (denaturasyon) ard arda toplam 30 döngü olacak şekilde;
2. 94^{o}C'de 30 saniye (denatürasyon),
3. 50^{o}C'de 1 dakika primer bağlanması (ileri geri primer),
4. 72^{o}C'de 2 dakika boyunca primere yeni nükleotitlerin bağlanması (primerlerin uzaması)

30 döngünün tamamlanmasını takiben son olarak

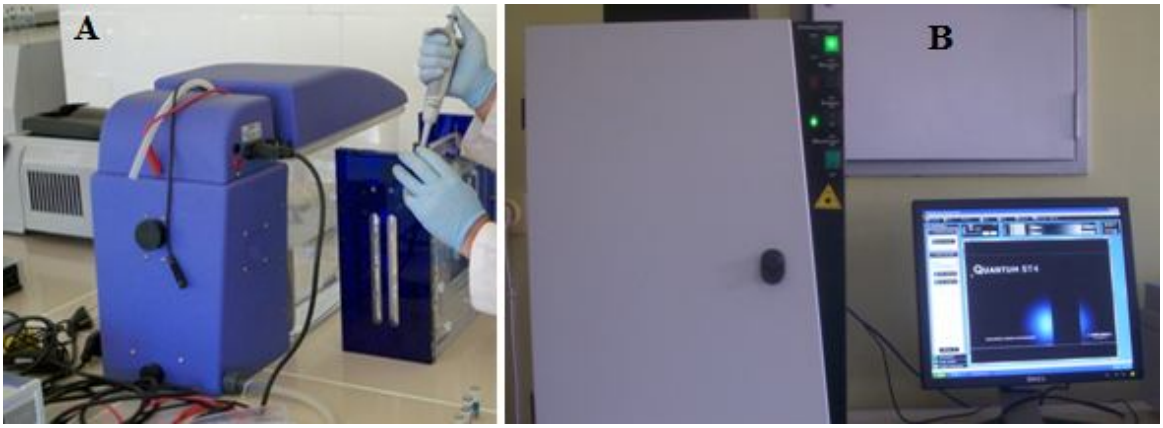
1. 72^{o}C de 10 dakika boyunca son nükleotit eklenmesi (final extension)

PCR ürünlerinin mevcudiyeti etidium bromür veya Syber Gold ile boyanan %1 ağırlık / hacim (w/v)'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir (Şekil 3.4 B).

3.3.3. Denatüre Gradyan Jel Elektroforezi (DGGE)

Agaroz jel elektroforezinde PCR işleminin başarılı olup olmadığı test edildikten sonra, PCR işleminde çoğaltılan hedef gen denatüre gradyan jel elektroforez (DGGE) işlemine tabi tutulmuştur. DGGE işlemiyle bir önceki aşamada elde edilen PCR ürünlerindeki türlerin birbirinden ayrılması sağlanmıştır. INGENY phor L-2 cihazı kullanılarak gerçekleştirilen işlemde mikrobiyal türler içerdikleri G ve C içeriğine farklı noktalarda konumlanmış ve ayrılan bantlar kesilerek dizi analizi işlemine tabi tutulmuştur (Şekil 3.5 A). DGGE için hazırlanan jel, %35-60 arasında değişen bir gradyanta (%100 lük

denatürant, 7 M üre, %40 Akrilamid bis (v/v) ve formamit) sahip olup, 1XTAE tampon çözeltisi içinde % 8 poliakrilamid jel içermektedir. DGGE işlemi 60^{o}C ve 100 V da 16-22 saat sürdürülmüştür. Elektroforezden sonra, jel SYBR Gold çözeltisinde (100µL/L TAE tampon çözeltisi) 35 dakika boyanmış ve jel görüntüleme cihazı ile fotoğrafı çekilmiştir (Şekil 3.5 B).



Şekil 3.5. A) DGGE için kullanılan INGENY phor L-2, B) Jel Görüntüleme Cihazı

DGGE analizinde elde edilen bantlar steril bir bistürü ile karanlık odada kesilmiş ve içinde 20 µL DNA içermeyen su bulunan 1 mL'lik tüplere konmuştur. Daha sonra tüpler -20^{o}C ayarlı buzdolabında saklanmıştır. Bu numuneler PCR analizinde kullanılmış ve yukarıda bahsedilen PCR programı kullanılarak DNA parçaları çoğaltılmıştır. Çalışmada DGGE tekniği için PCR yürütüldüğünde kullanılan ileri yönlü (forward) primer dizilimi GC klampli (GC-BacV3f) 5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-'3 ve ters yönlü (reverse) primer ise 5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG-'3 şeklindedir. DGGE bantları kesildikten sonra ileri yönlü (BacV3f) 5'- CCT ACG GGA GGC AGC AG-'3 ve aynı ters yönlü primer ile PCR'da çoğaltılıp DNA sekans analizi için gönderilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Membran Biyofilm Reaktöründe Oksijen Difüzyon katsayısı (ODH)

Membran biyofillm reaktörleri kurulduktan sonra, saf su kullanılarak membran fiber yüzeyleri temiz iken farklı O_2 basınçlarında oksijen difüzyon hızı (ODH) belirlenmiştir. Saf su ile doldurulan MBfR reaktöründe çözünmüş oksijen konsantrasyonunun sıfırlanması için sülfit ve kobalt ilave edilmiş ve çözünmüş oksijen metre ile reaktörde oksijen olmadığı kontrol edilmiştir. Daha sonra oksijen tüpü açılarak basınç regülatörü ile 2-10 psi (0,136-0,68 atm) oksijen basınçları altında MBfR reaktöründeki çözünmüş oksijen konsantrasyon değeri 6 mg/l oluncaya kadar zamana karşılık kaydedilmiştir. Elde edilen verilere dayalı olarak oksijen transfer katsayıları belirlenmiştir (Şekil 4.1). Oksijen gazı membrandan difüzyon mekanizması ile su ortamına geçtiğinden ve membranlarda kabarcık oluşmadığından dolayı oksijenin tamamen suda çözündüğü kabul edilmiş ve atmosfere kaçan miktar ihmal edilmiştir.

Şekil 4.1'de görüldüğü gibi, 10 psi (0,68 atm) basınç altında biyokütle içermeyen reaktör içeriğindeki çözünmüş oksijen konsantrasyonu 6 dakika içerisinde yaklaşık 6 mg/l'ye ulaşırken uygulanan basınç düşerken 6 mg/l'e ulaşma süresi uzamıştır. 8 psi(0,544 atm) basınç altında 7 dakikada, 6 psi(0,408 atm) basınç altında 9 dakikada, 4 psi(0,272 atm) basınç altında 12 dakikadave 2 psi(0,136 atm) basınç altında oksijen transfer katsayısı 22 dakikada 6 mg/l seviyesine ulaşmıştır.

Oksijen Transfer Katsayısı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$Kla = -\frac{1}{t} \times ln\frac{Cs-Ce}{Cs-Co} \quad (4.1)$$

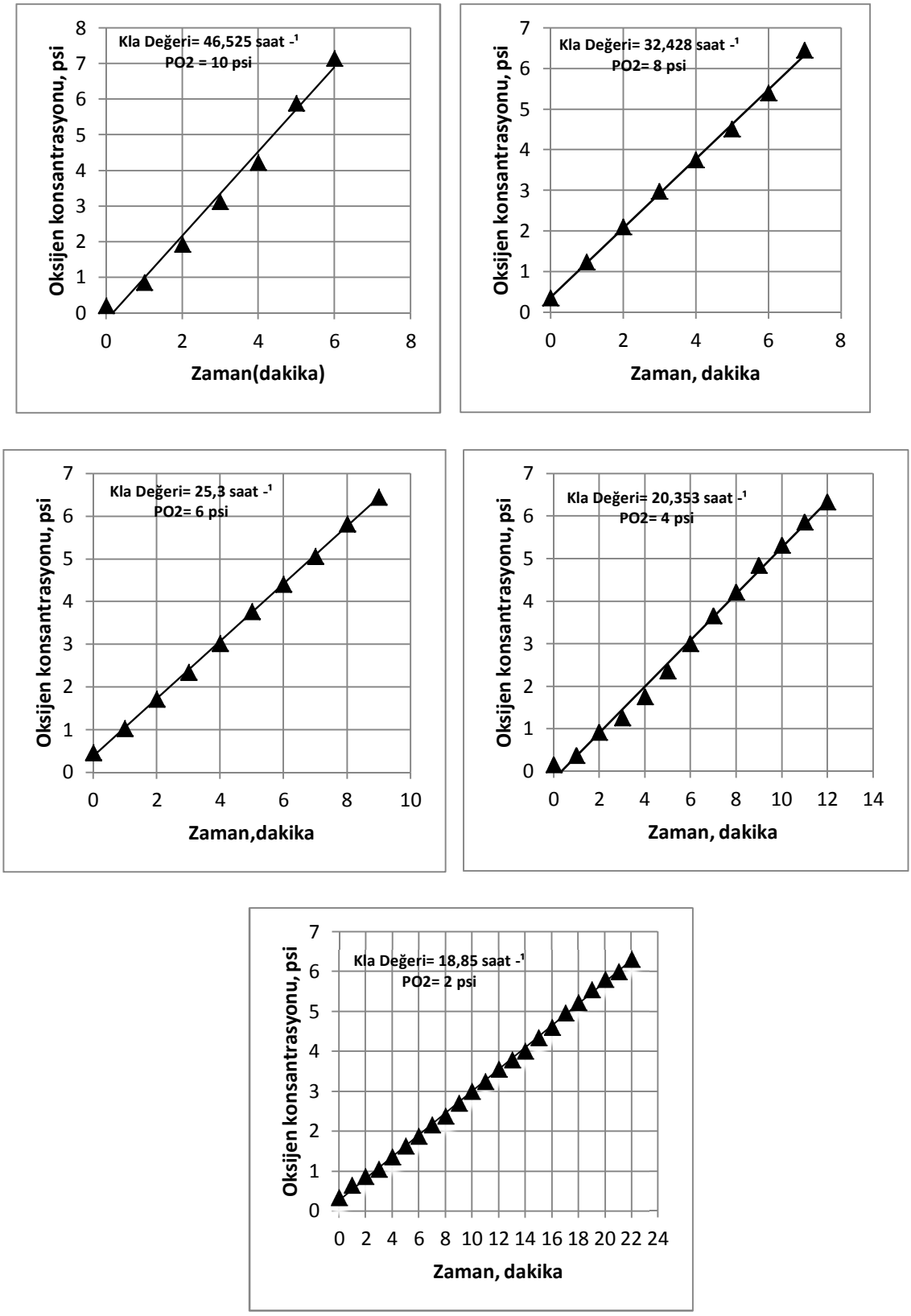
Kla: Oksijen Transfer Katsayısı (saat $^{-1}$)

t: zaman (saat)

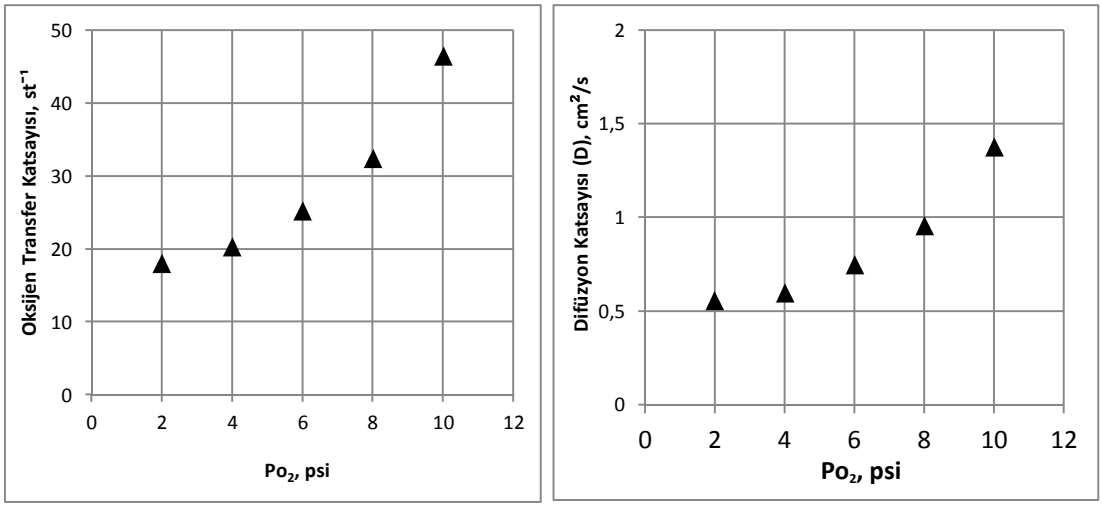
Cs: Doygunluk anındaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu (mg/l)

Ce: Herhangi zamandaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu (mg/l)

Co: 0 anındaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu (mg/l)



Şekil 4.1. Membran Biyofilm Reaktöründe Farklı Basınçlar Altında Oksijen Transfer Katsayıları



Şekil 4.2. Membran Biyofilm Reaktöründe Uygulanan Oksijen Basınçlarına göre A) Oksijen Transfer Katsayısı ve B) Difüzyon Katsayısının Davranışı

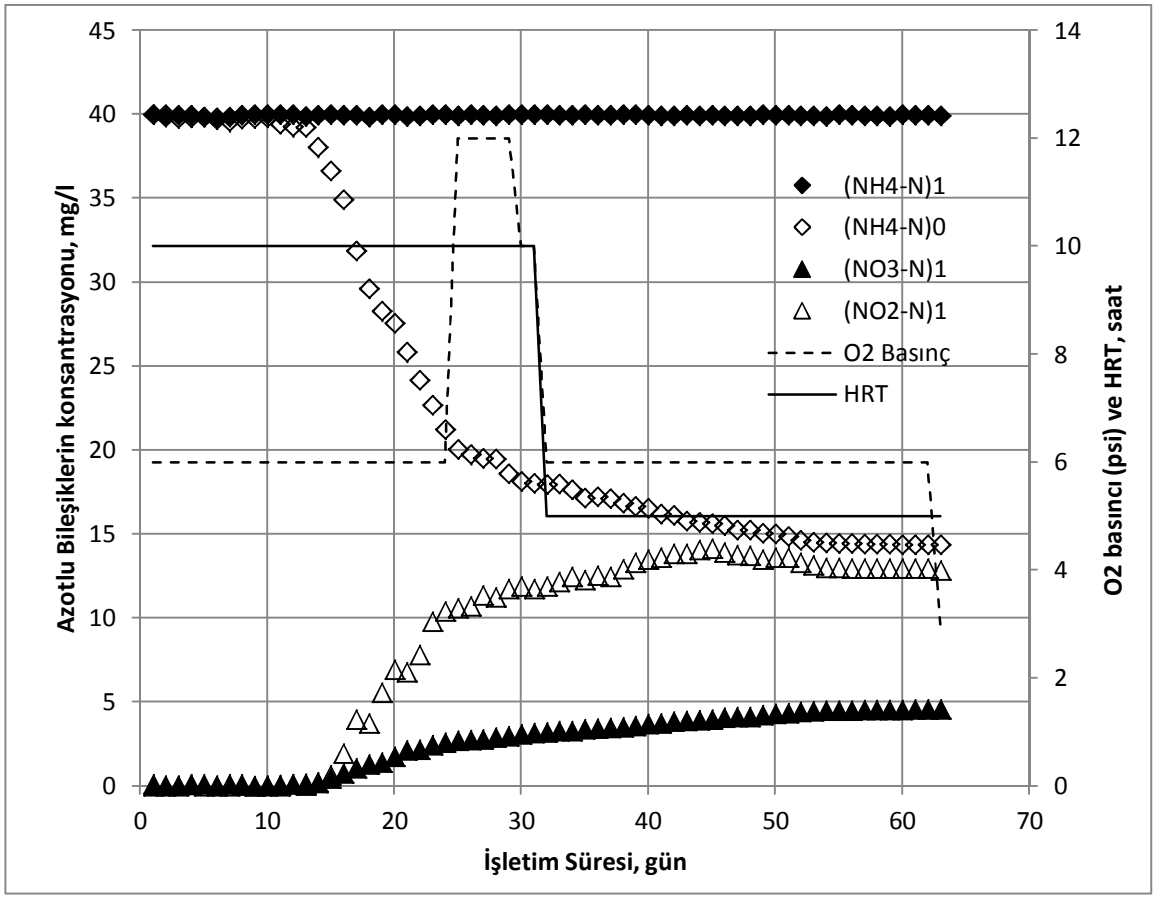
Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere kurulan membran biyofilm reaktörünün oksijen transfer katsayısı ve difüzyon katsayısının uygulanan gaz basınçları altında nasıl davrandığı Şekil 4.2'de görülmektedir. Oksijen transfer katsayısı ve difüzyon katsayısı, oksijen gaz basıncı 2 ve 4 mg/l aralığında yavaş hızla artarken, uygulanan 6-10 psi oksijen basınçlarında her iki katsayının hızlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.

Oksijen basıncı 2 psi (0,136 atm)'de sabit tutulduğunda oksijen transfer katsayısı 18,05 st^{-1} ve difüzyon katsayısı 0,56 cm^2/s iken, oksijen basıncı 4 psi (0,272 atm)'e yükseltildiğinde bu değerlerin sırasıyla 20,35 st^{-1} ve 0,60 cm^2/s'e yükseldiği tespit edilmiştir. Oksijen transfer katsayısı 6 psi (0,408 atm) oksijen basıncında 25,30 st^{-1}, 8 psi (0,544 atm)'de 32,43 st^{-1}ve 10 psi (0,68 atm)'de 46,53 st^{-1} olarak hesaplanmıştır. Diğer taraftan, Difüzyon katsayısı ise 6 psi (0,408 atm)'de 0,75 cm^2/s; 8 psi (0,544 atm)'de 0,96 cm^2/s ve 10 psi (0,68 atm)'de 1,38 cm^2/s olarak hesaplanmıştır.

4.2.Membran Biyofilm Reaktöründe Biyofilm Oluşması

1 adet MBfR reaktörü 10 psi O_2 basıncı altında 4 saatlik bekletme süresinde ve 100 rpm (devir/dk.) oranındaki sirkülasyon hızında amonyum içerikli sentetik besleme suyu ile işletime alınmıştır. MBfR, bölüm laboratuarında işletilen ve nitrifikasyonun vukuu bulduğu ardışık kesikli biyoreaktör çıkışından alınan sıvı ve Malatya İli Atıksu Arıtma Tesisi çıkışından alınan çıkış suyu karışımları ile aşılanmıştır. Aşılanan membran biyofilm

reaktörü 3 psi saf oksijen basıncı altında 48 saat döngülü olarak işletilmiştir. Daha sonra reaktörün 1/3'ü boşaltılmış ve 100 mg/L konsantrasyonuna sahip amonyum içerikli besleme suyu ile tamamlanmıştır. Bir hafta boyunca, sürekli aynı şekilde günlük beslemeler yapılmış ve nitrifikasyon gözlenmeye başlandığında oksijen basıncı 10 psi'ye arttırılarak reaktör sürekli işletime alınmıştır.



Şekil 4.3. Nitrifikasyon Kararlı Hale Gelinceye Kadar Basınç ve Oksijene Bağlı Amonyum, Nitrit ve Nitrat Miktarı

Reaktör sürekli beslemeye alındıktan sonra, giriş amonyum konsantrasyonu 40 mg/l olarak sabit tutulmuştur. İlk 25 gün oksijen basıncı 6 psi (0,408 atm) ve hidrolik bekletme süresi 10 saat olacak şekilde reaktör işletilmiştir. Şekil 4.3'de görüldüğü gibi bu süreçte amonyum giderim yaklaşık %50 olarak gözlenmiştir. Bu işletim sürecinde, reaktör çıkışında amonyum konsantrasyonu 20 mg/l'e düşerken nitrit konsantrasyonu yaklaşık olarak 11 mg/l ve nitrat miktarı da 2,5 mg/l'e kadar artmıştır.

25. günden sonra reaktörde, oksijen basıncı 12 psi (0,816 atm) olacak şekilde ayarlanmıştır. Reaktör bu şekilde 5 gün işletilmişve amonyum giderimi yaklaşık % 55 olmuştur. Çıkış suyundaki nitrat konsantrasyonu 3,5 mg/l ve nitrit konsantrasyonu da 12 mg/l'e artmıştır. Daha sonra reaktörde oluşan yüksek basınç nedeniyle oksijen basıncı tekrar 10 psi (0,68 atm)'edüşürülmüş ve 2 gün boyunca bu şekilde işletilmiştir.

32. günden itibaren reaktör işletim şartları oksijen basıncı 6 psi (0,408 atm), bekleme süresi 5 saat olacak şekilde değiştirilmiştir. 45. güne kadar amonyum miktarı sürekli olarak azalmış, nitrit ve nitrat miktarı ise artmıştır. Bu süreçte, çıkış suyu amonyum konsantrasyonu 16 mg/l'e düşmüş, nitrat konsantrasyonu 4 mg/l ve nitrit konsantrasyonu 14 mg/l'e yükselmiştir.

45. günden sonra nitrit miktarında da azalma başlamıştır. Nitrat miktarında ise yavaş bir şekilde artış gözlenmiştir. 63 gün boyunca reaktör amonyum miktarı 40 mg/l olacak şekilde çalıştırılmıştır. Bu süreçte, amonyum giderimi yaklaşık olarak % 64'e ulaşmıştır. Nitrit miktarı 12,5 mg/l'e düşerken nitrat miktarı ise 4,5 mg/l'e yükselmiştir.

Reaktör çıkışında yapılan analizler sonucu amonyum, nitrit ve nitrat miktarları giriş amonyum miktarı ile eşdeğer olmadığı gözlenmiştir. Bunun sebebi membran yüzeyinde bulunan biyofilm üzerindeki mikroorganizmaların amonyumun belirli kısmını kendi bünyelerinde tutmaları ile açıklanabilir.

Reaktör işletimi bu süreçte nitrifikasyon prosesinin için gerekli olan biyofilm oluşumu için işletilmiştir. Amonyum konsantrasyonundaki azalma, nitrat konsantrasyonunda sürekli artma ve nitrit konsantrasyonunda ise öncelikle artan akabinde azalan bir eğilim oluşması nitrifikasyon biyofilminin oluştuğunu gösterdiğinden projenin ana amacı olan iş paketlerine geçilmiştir.

4.2.1. Membran Biyofilm Reaktöründe Amonyum, Nitrit ve Nitrat Analizleri

4.2.1.1. Amonyum Analizi

Membran biyofilm reaktör çıkışından alınan 50 ml numuneye 1 ml Nessler Reaktifi ile 1-2 damla Rochelle çözeltisi eklendi. Standart amonyum çözeltisinden seyreltme ile 1, 2,5, 5, 7,5, 10 ppm'lik 50 ml'lik çözeltiler hazırlanarak 50 ml'lik ayrı ayrı balon jojelere alındıktan sonra her birinin üzerine 1 ml Nessler Reaktifi ile 1-2 damla Rochelle çözeltisi eklendi.

50 ml'lik balon jojeye 50 ml saf su ve üzerine 1 ml Nessler Reaktifi ile 1-2 damla Rochelle çözeltisi eklenen şahit çözelti hazırlandı. Hazırlanan bütün çözeltiler 10 dakika bekletildikten sonra spektrofotometre kullanılarak 410 nm'de şahit ile spektrofotometrenin absorbans değeri sıfırlanarak kalibre edildi. Ayarlanan spektrofotometrede numune ve standart çözeltilerin absorbans değerleri okundu. Grafiği çizilen absorbans değerlerinde numunenin kaç mg/l olduğu hesaplandı.

4.2.1.2. Nitrit Analizi

Renk gelistirici ayraç: 800 ml distile su içerisine 100 ml % 85'lik fosforik asit ve 10 g sülfanilamid eklendi. Sülfanilamid tamamıyla çözüldükten sonra 1 g N-(1 naphthyl)-etilendiamin dihidroklorid eklendi. Çözülünceye kadar karıstırdı ve 1 litreye tamamlandı.
Stok nitrit çözeltisi: 1.232 g $NaNO_2$ distile suda çözüldü ve 1000 mL'ye tamamlandı.
Ara stok nitrit çözeltisi: Stok nitrit çözeltisinden 50 ml alarak distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.
Standart nitrit çözeltisi: Orta nitrit çözeltisinden 10 ml alınarak 1000 ml'ye tamamlandı.

50 ml ya da 50 ml'ye seyreltilmiş numuneye 2 ml renk geliştirici ayraç ilave edildi ve karıştırıldı. Renk geliştirici ayraç eklendikten 10 dk. bekleme süresinden sonra 543 nm dalga boyundaki absorbansı ölçüldü. Standart nitrit çözeltisinden 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 ml alındı ve 50 ml'ye tamamlandı. Numuneye uygulanacak olan işlemler aynı şekilde standartlara da uygulanarak kalibrasyon eğrisi olusturuldu. Numunenin konsantrasyonu eğriden direkt olarak hesaplandı.

4.2.1.3. Nitrat Analizi

Stok nitrat çözeltisi: KNO_3 105 °C'de etüvde 24 saat kurutuldu. 0,7218 g susuz potasyum nitrat distile suda çözüldü ve 1000 ml'ye tamamlandı.
Orta nitrat çözeltisi: 100 ml stok nitrat çözeltisi distile su ile 1000 ml'ye seyreltildi.
Hidroklorik asit çözeltisi: HCl, 1N.

50 ml numuneye 1 ml HCl çözeltisi eklendi ve iyice karıştırıldı. Orta nitrat çözeltisinden 0-7 mg NO_3-N içeren kalibrasyon standartları hazırlandı. Orta nitrat çözeltisinden 0; 1.0 ; 2.0; 4.0; 7.0 ;.... 35.0 ml hacimlerinde alınıp 50 ml'ye seyreltilerek kalibrasyon için standartlar hazırlandı. Numuneye uygulanan işlemlerin aynısı standartlara

da uygulandı. 220 nm dalga boyunda nitrat standartları okundu, kalibrasyon eğrisi hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi yardımı ile numunenin nitrat konsantrasyonu bulundu.

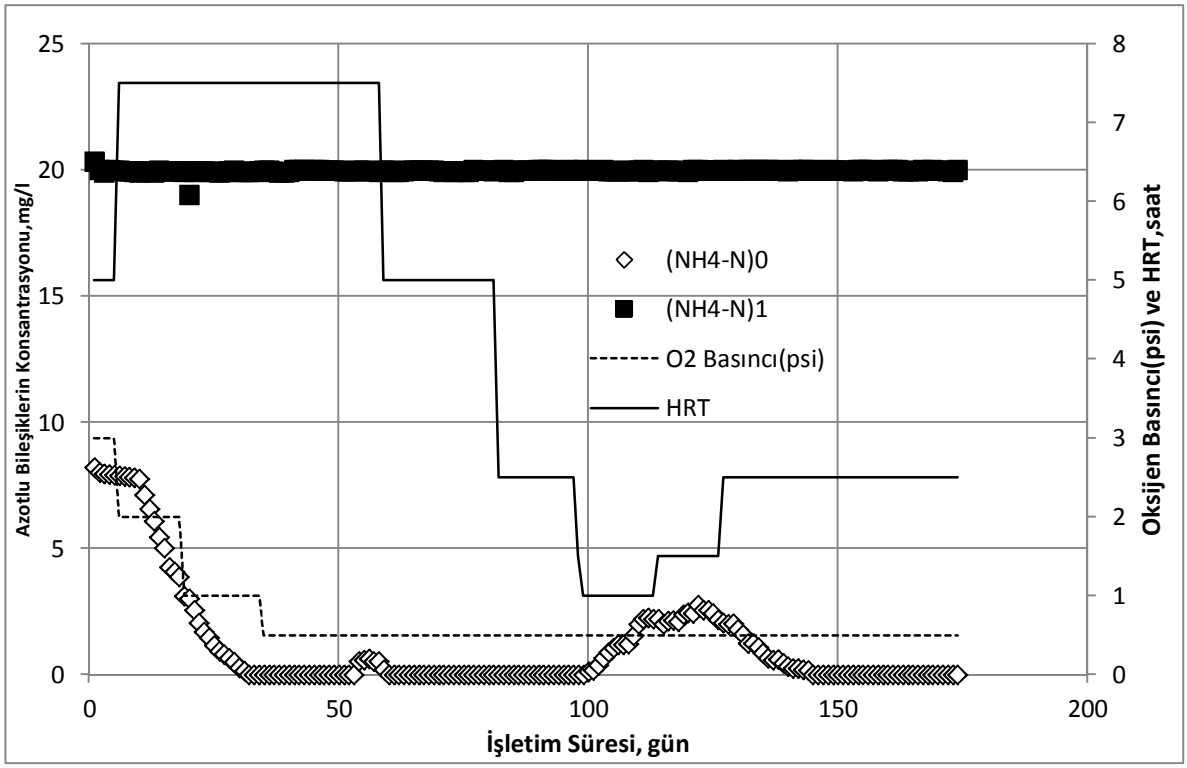
4.3.Membran Biyofilm Reaktöründe Nitrifikasyon Süreci

MBfR reaktöründe nitrifikasyon süreci için biyofilm oluşumu için yürütülen çalışma tamamlandıktan sonra, amonyum konsantrasyonu 20 mg/l seviyesine düşürülmüştür. Bu süreçte nitrifikasyon bakterileri ile aşılanan ve biyofilm içeren 1 (bir) adet rektör 175 gün işletilmiştir. Reaktör kararlı hale gelinceye kadar çözünmüş oksijen seviyesi 3 mg/l'den kademeli olarak 0,5 mg/l'e kadar düşürülmüştür. Reaktörde hidrolik bekletme süresi 7,5 saat'e yükseltildiğinde oksijen basıncı 2 psi değerine düşürülmüştür. Bu şartlarda işletilen reaktörde kısa bir süre sonunda (5 gün) çıkış suyundaki amonyum ve nitrit konsantrasyonu önceki işletim günlerine göre düşmeye ve nitrat konsantrasyonu da yükselmeye başlamıştır. Reaktördeki oksijen basıncı da kademeli olarak düşürülmüş ve sistem performansında herhangi bir bozulma gözlenmemiş, aksine nitrifikasyon performansı düzelmeye başlamıştır.

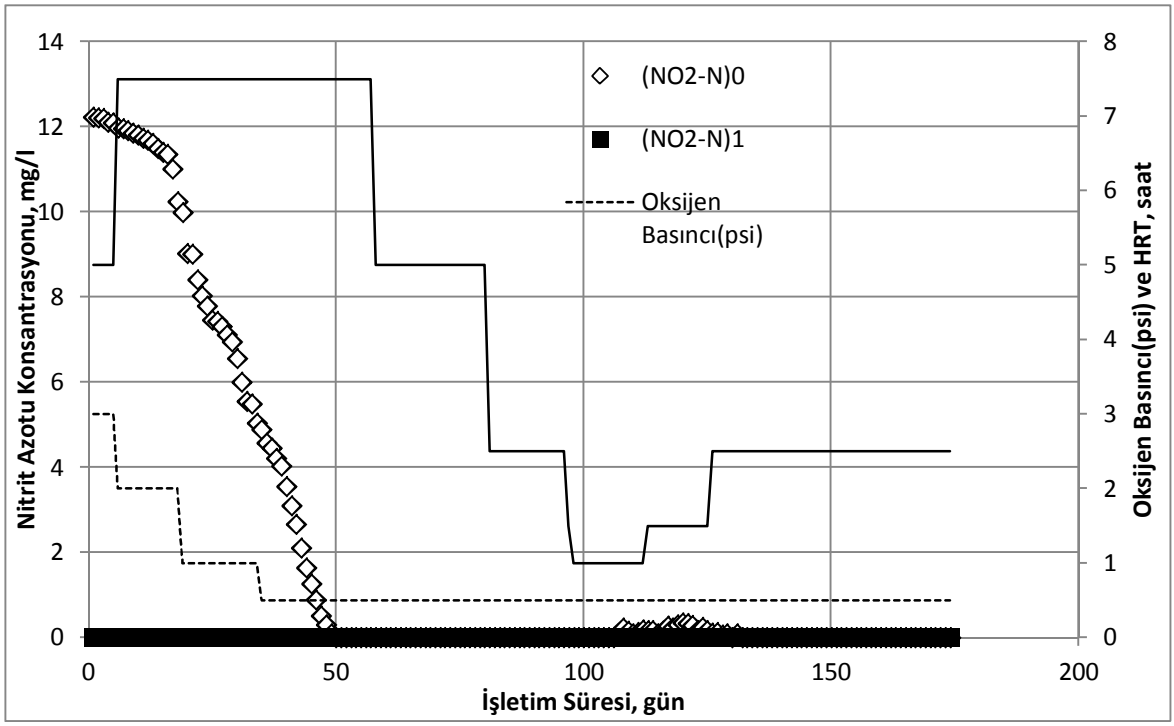
Optimum O_2 gaz basıncı 0,5 psi olarak belirlenmiştir. Bu basınçta hidrolik bekletme süresi 1-7,5 saat aralığında değiştirilerek hem optimum hidrolik bekletme süresi hem de reaktörün farklı yüklerdeki nitrifikasyon hızları, amonyum akısı, oksijen akısı belirlenmiştir. Bu bölümde, işletim süreci boyunca amonyum, nitrat, nitrit parametrelerinin değişimi, nitrifikasyon hızı, amonyum yükü, oksijen akısı ve KOİ 20 mg/l ve 50 mg/l'de MBfR performansı detaylıca sunulmuştur (Şekil 4.4-4.10).

Şekil 4.4'de görüldüğü gibi, reaktör, amonyum azotu miktarı 20 mg N/l, oksijen basıncı 3 psi (0,204 atm), bekleme süresi 5 saat olacak şekilde işletilirken çıkış suyundaki amonyum azotu konsantrasyonu ortalama olarak 8 mg N/l olarak gözlenmiştir. 5 gün sonunda amonyum giderim miktarı yaklaşık % 61'olmuştur.

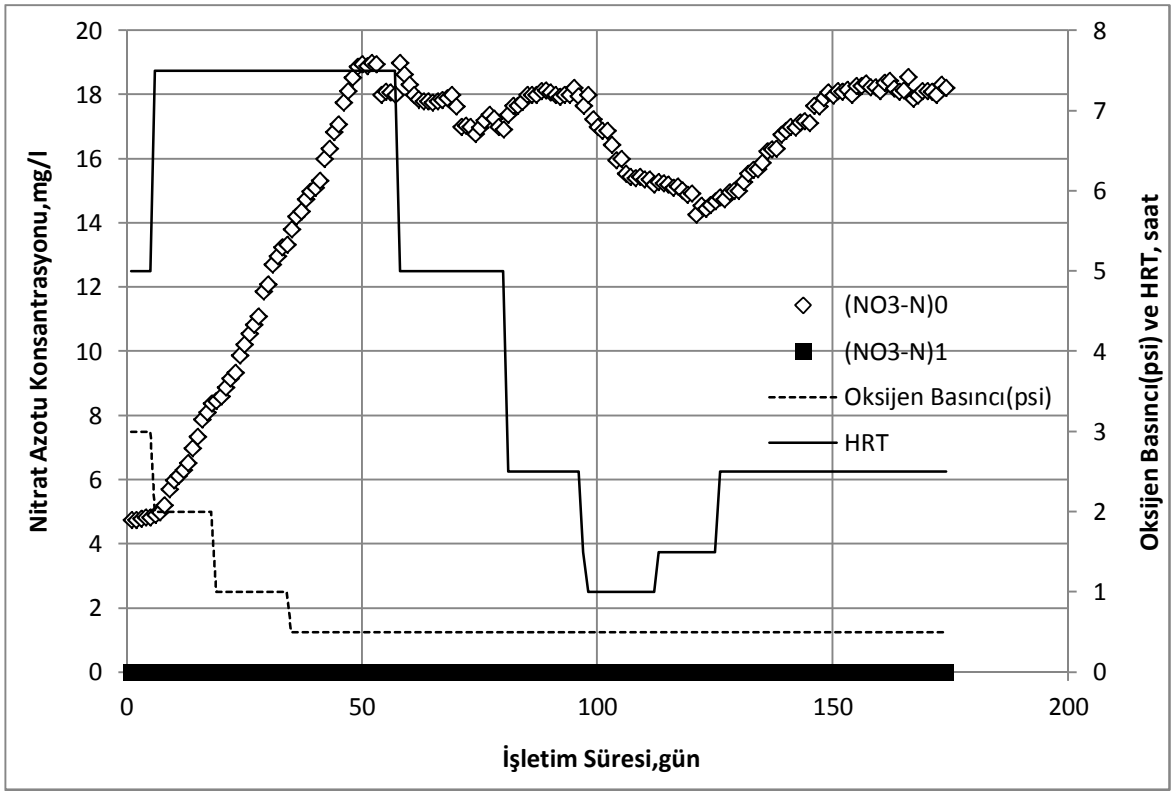
Reaktörde hidrolik bekletme süresi 7,5 saat'e yükseltilip oksijen basıncı 2 psi değerine düşürüldüğünde, çıkış suyundaki amonyum konsantrasyonu 4 mg N/l'e kadar düşmüştür. Diğer taraftan, nitrit miktarı da azalmaya başlamış ve 11 mg N/l'e kadar düşmüş, nitrat ise 8 mg N/l'e kadar yükselmiştir.



Şekil 4.4. Oksijen Basıncı ve Hidrolik Bekletme Süresine Bağlı Amonyum Değişimi



Şekil 4.5. Oksijen Basıncı ve Hidrolik Bekletme Süresine Bağlı Nitrit Değişimi



Şekil 4.6. Oksijen Basıncı ve Hidrolik Bekletme Süresine Bağlı Nitrat Değişimi

Hidrolik bekletme süresi sabit tutulup fiberler arasındaki oksijen basıncı 1 psi'e düşürüldüğünde, çıkış suyundaki amonyum konsantrasyonu lineer bir şekilde azalmışve 0,1 mg N/l'nin altına düşmüştür. Benzer şekilde, nitrit konsantrasyonu da önceki periyotlara göre lineer bir şekilde düşmüş ve periyot sonunda 5 mg/l'e düşmüştür. Nitrat konsantrasyonu ise 13 mg N/l'e kadar yükselmiştir.

Hidrolik bekletme süresi sabit tutulup (7,5 saat) oksijen seviyesi 0,5 psi'e düşürüldüğünde, çıkış suyundaki amonyum konsantrasyonu azalma eğilimine devam etmiş ve 0,05 mg N/l altına düşmüştür. Bu süreçte çıkış suyundaki nitrit miktarı da sıfırlanmış ve nitrat konsantrasyonu 19 mg N/l seviyesine kadar yükselmiştir. Bu süreçte, nitrifikasyon verimi % 100 seviyelerinde gözlenmiştir. 50.güne geldiğimizde nitrit tamamen tükenirken, amonyum giderim miktarı da %100'e yakın gerçekleşmiştir.

Farklı amonyum yüklerinde nitrifikasyon verimini incelemek için oksijen basıncı 0,5 psi ve giriş amonyum azotu konsantrasyonu da 20 mg/l'de sabit tutularak hidrolik bekletme süresi kademeli olarak düşürülmüştür. 58.günden sonra, hidrolik bekletme süresi

5 saat'e düşürülmüş ve bu durum 23 gün sürmüştür. Bu aşamada, çıkış suyundaki amonyum ve nitrit azotu konsantrasyonu tayin edilemeyecek kadar düşük olarak elde edilmiştir. Nitrat azotu ise 17-18 mg N/l değerlerinde belirlenmiştir.

81.günden sonra hidrolik bekletme süresi 2.5 saat olacak şekilde değiştirilmiştir Bu süreçte, reaktörün amonyum giderim miktarı %100 ve sistem içinde nitrit tamamen nitrata yükseltgenmiştir. Çıkış suyundaki nitrat azotu konsantrasyonu ortalama olarak 18 mg/l ölçülmüştür.

İşletim sürecinin 96'ıncı günü hidrolik bekletme süresi 1 saat'e kadar düşürüldüğünde, çıkış suyundaki amonyum konsantrasyonu hemen artmış ve nitrat konsantrasyonu da düşmüştür. Bu şartlarda, çıkış suyunda amonyum konsantrasyonu 3 mg/l'e yükselmiş ve nitrat konsantrasyonu da 15,5 mg/l'e kadar düşmüştür. Sistem performansındaki bozulma nedeniyle optimizasyon amacıyla hidrolik bekletme süresi kademeli olarak tekrar yükseltilmiştir. Bu amaçla, 115'inci gün hidrolik bekletme süresi 1,5 saat'e yükseltilmiştir. Sistem performansında kayda değer bir düzelme gözükmediğinden işletimin 130'uncu günü hidrolik bekletme süresi 2,5 gün'e tekrar yükseltilmiştir. HRT'nin 2.5 gün'e yükseltilmesiyle sistem performansı düzelmeye başlamıştır. Bu süreçte işletimin 140'ıncı gününden sonra amonyum konsantrasyonu 0,05 mg/l'nin altına düşmüş ve zamanla sıfırlanmıştır. Nitrat azotu konsantrasyonu da tekrar 18 mg/l'nin üstüne çıkmıştır.

4.4. Amonyum Yükü ve Nitrifikasyon Hız Değişimi

Amonyum yükü hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$NH_4\ Yük\ddot{u} = \frac{(NH_4-N)0\ x\ Q}{A} \tag{4.2}$$

NH_4 Yükü : Amonyum yükü (g/m^2-gün)

(NH_4-N)0 : Amonyum Giriş (mg/l)

Q : Debi (l/gün)

A : Alan (m^2)

Örneğin; amonyum giriş miktarı 19,958 mg/l iken,

$$Q = \frac{V}{HRT} \tag{4.3}$$

V: Hacim (l)

HRT: Bekleme süresi (gün)

V= 250 ml x 1 l / 1000 ml = 0,25 l

HRT = 7,5 saat x (1 gün / 24 saat) = 0,3125 gün

$$Q = \frac{0{,}25\ l}{0{,}3125\ g\ddot{u}n} = 0{,}8\ l/g\ddot{u}n$$

Alan = 107 cm^2 = 0,0107 m^2

Amonyum Giriş = 19,958 mg / l x 1 g /1000 ml = 0,019958 g / l

Gerekli düzenlemeler yapılıp denklemde yerine yazılırsa;

$$NH_4\ Y\ddot{u}k\ddot{u} = \frac{0{,}019958\ x\ 0{,}8}{0{,}0107} = 1{,}49\frac{g}{m^2\ x\ g\ddot{u}n}$$

olur.

Nitrifikasyon hız değişiminde ise aşağıdaki formül kullanılmıştır;

$$Nitrifikasyon\ Hızı = \frac{(NO_3-N)1\ x\ Q}{A} \quad (4.4)$$

$(NO_3 – N)1$: Nitrat çıkış miktarı(mg/l)

Örneğin;

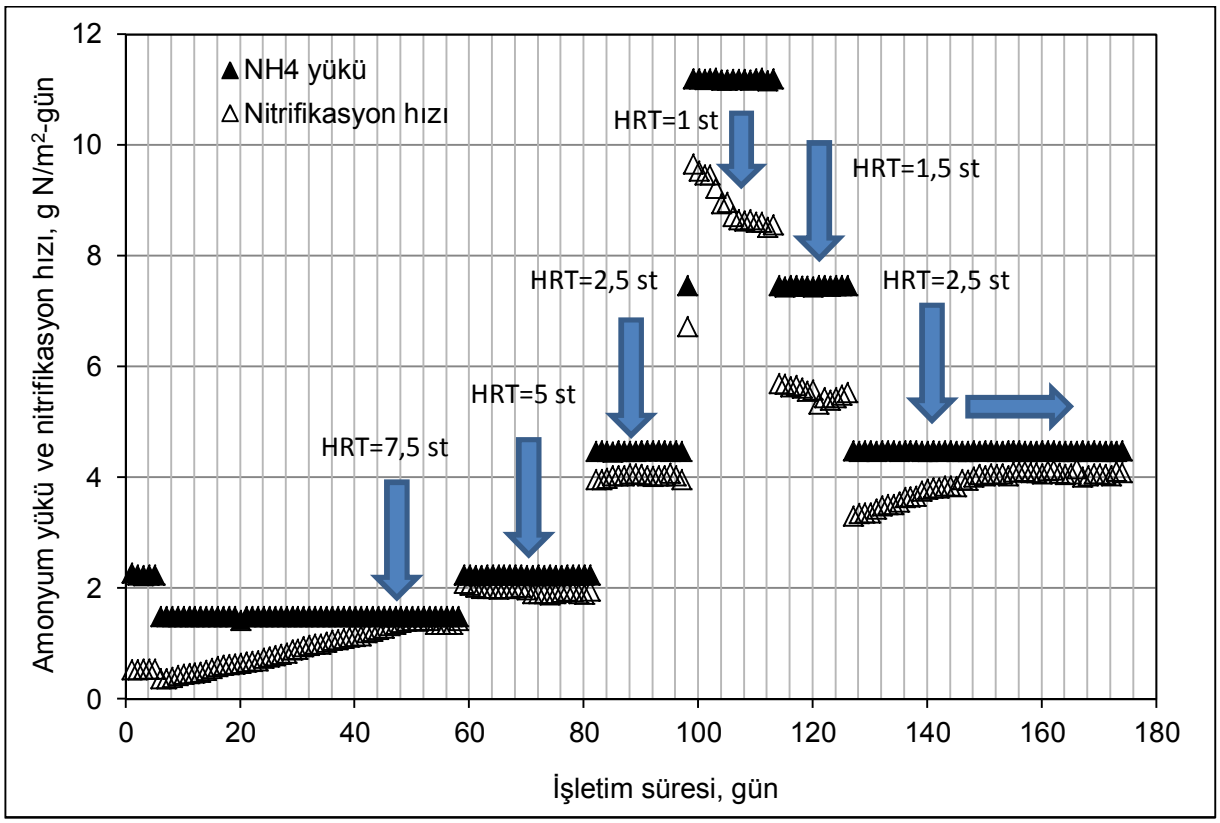
$(NO_3 – N)1$ = 18,96 mg/l x 1 g / 1000 mg = 0,01896 g / l olan MBfR'ın Nitrifikasyon hızı;

$$Nitrifikasyon\ Hızı = \frac{0{,}01896\ x\ 0{,}8}{0{,}0107} = 1.41\frac{g}{m^2\ x\ g\ddot{u}n}$$

olur.

Şekil 4.7'de işletim boyunca sistemdeki amonyum yükü ve nitrifikasyon hızının değişimi verilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmasında 0,5 psi oksijen basıncın tam nitrifikasyona ulaşmak için yeterli gözükmektedir. Sistem kararlı hale geldikten sonra, farklı amonyum yüklerinde sistem performansını izlemek için 0,5 psi oksijen basıncı altında hidrolik bekletme süreleri kademeli olarak değiştirilmiştir. Amonyum yükünün

ortalama 1,5 g N/m^2-gün olduğu durumlarda nitrifikasyonun tamamen gerçekleştiği ve nitrifikasyon hızının ortalama 1,42 g N/m^2-gün olduğu tespit edilmiştir. Amonyum yükü ortalama 2,2 g N/m^2-gün seviyesine çıkarıldığında nitrifikasyon tamamen gerçekleşmiş ve nitrifikasyon hızı ortalama 2,0 g N/m^2-gün'e ulaşmıştır. Amonyum yükü ortalama 4,4 g N/m^2-gün seviyesine çıkarıldığında nitrifikasyon tamamen gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu süreçte, nitrifikasyon hızı ortalama 3,98 g N/m^2-gün'e ulaşmıştır. Amonyum yükü ortalama 11,15 g N/m^2-gün seviyesine çıkarıldığında nitrifikasyon hızı ortalama 8,6 g N/m^2-gün'e ulaşsa da nitrifikasyon prosesi tam gerçekleşmemiş ve sistemde performans bozulması görülmüştür. Bu nedenle, amonyum yükü kademeli olarak, tekrar 4,4 g N/m^2-gün'e kadar düşürülerek sistemin performansı tekrar eski haline getirilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda ortalama 4.5 g N/m^2-gün amonyum yükü ve 0,5 psi saf oksijen basıncında MBfR reaktöründe nitrifikasyonun tam gerçekleştiği kanıtlanmıştır.



Şekil 4.7. Amonyum yükü ve nitrifikasyon hız değişimi

4.5. Oksijen Akı Değişimi

Akı, birim zamanda membranın birim alanından geçen akım miktarıdır. Akı, m3/m2.sn veya lt/m2.gün gibi birimlerle ifade edilmektedir. Oksijen akı değişimini hesaplamak için gerekli oksijen miktarının bulunması gerekir. Bunun için öncelikle amonyumun nitirite ve nitritin nitrata dönüştüğü reaksiyonlardan yola çıkarsak;

$$NH_4^+ + \frac{3}{2}O_2 \rightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O \quad (1)$$

$$NO_2^- + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow NO_3^- \quad (2)$$

Sonuç olarak amonyumun nitrata dönüştüğü ve nitrifikasyon olayının gerçekleştiği;

$$NH_4^+ + 2\,O_2 \rightarrow NO_3^- + 2\,H^+ + H_2O \quad (3)$$

reaksiyonundan 1 mol NH_4 için 2 mol O_2 gerekli olduğu görülür. Yani 14 gram NH4-N için gerekli oksijen miktarı 32 gramdır. Böylece oksijen akısı;

$$J_o = \frac{Nitrifikasyon\ Hızı\ x\ 32}{14} \quad (4.5)$$

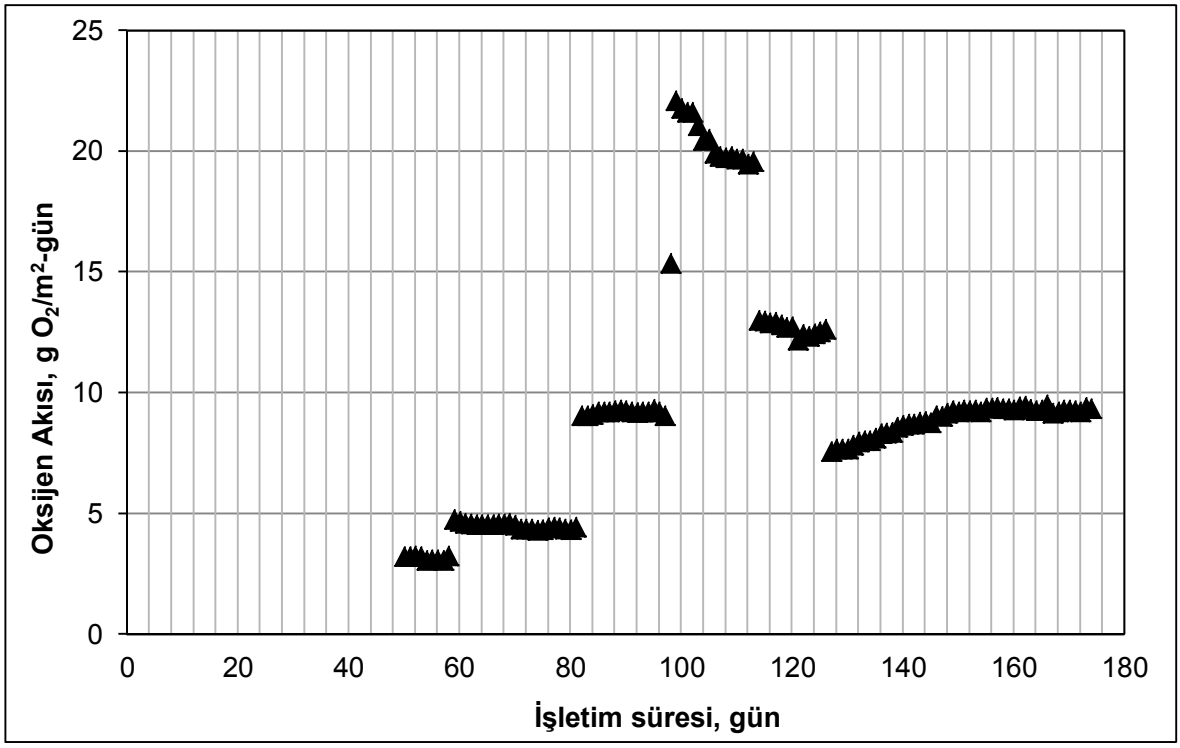
formülü ile hesaplanır.

Örneğin; Nitrifikasyon hızının 1,41 g / m^2-gün olduğu oksijen akısı ;

$$J_o = \frac{1{,}41\ x\ 32}{14} = 3{,}1\ \frac{g}{m^2\ x\ g\ddot{u}n}$$

olur.

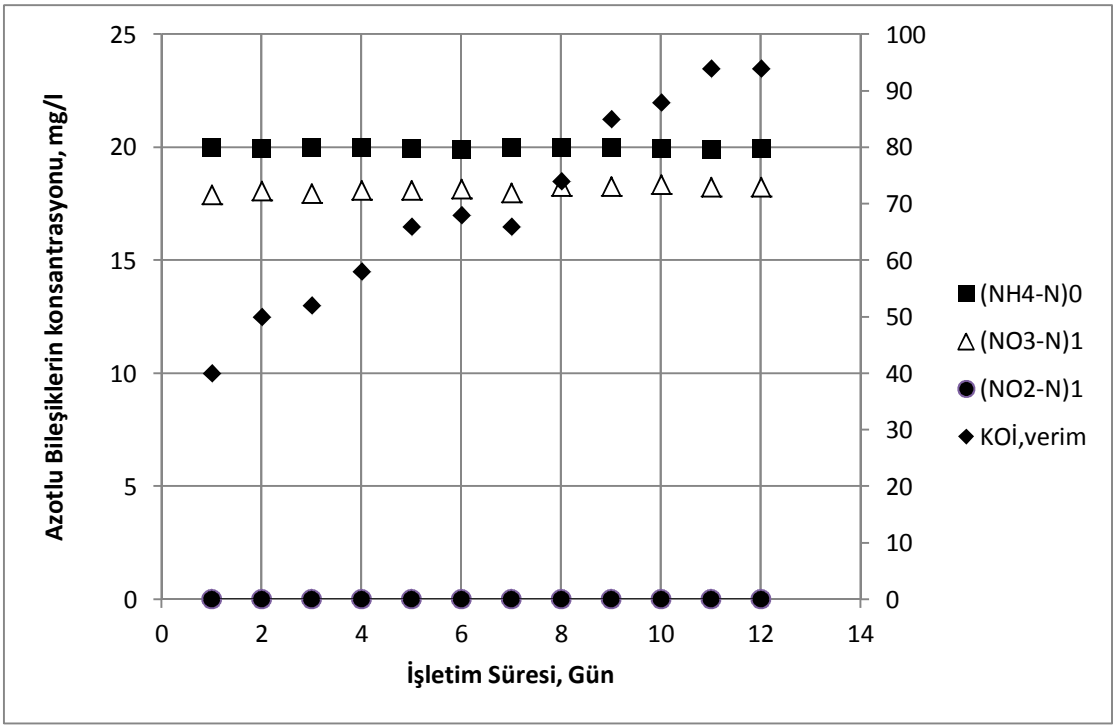
Şekil 4.8'de MBfR reaktöründe biyofilmin nitrifikasyon için kullanmış olduğu oksijen akı değişimi görülmektedir. Amonyum yükünün ortalama 1,5 g N/m^2-gün olduğu durumlarda oksijen akısı ortalama 3,1 g O_2/m^2-gün olduğu tespit edilmiştir. Amonyum yükü ortalama 2,2 g N/m^2-gün seviyesine çıkarıldığında oksijen akısı 4,5 g O_2/m^2-gün'e ulaşmıştır. Amonyum yükü ortalama 4,4 g N/m^2-gün seviyesine çıkarıldığında ise oksijen akısı 9,2 g O_2/m^2-gün olarak belirlenmiştir. Amonyum yükü ortalama 11,15 g N/m^2-gün seviyesine çıkarıldığında oksijen akısı 19,7 g O_2/m^2-gün seviyesine ulaşmıştır. Amonyum yükünün ortalama 7,4 g N/m^2-gün olduğu durumlarda oksijen akısının ortalama 12,5 g O_2/m^2-gün olduğu tespit edilmiştir.



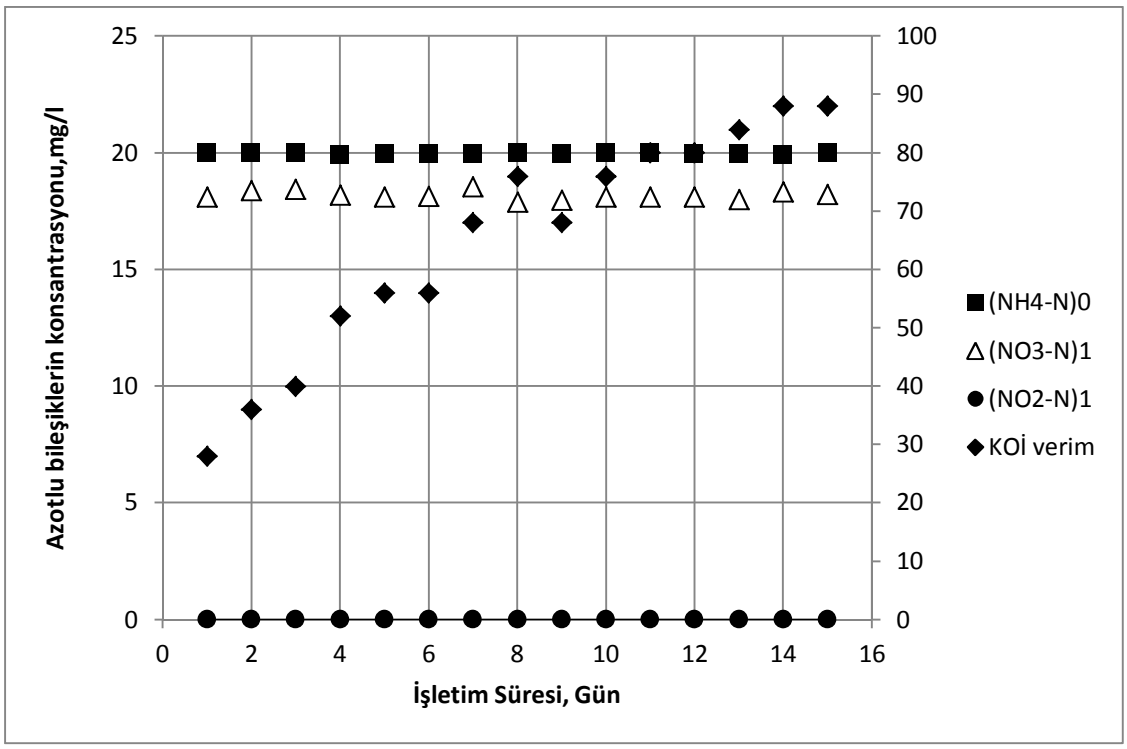
Şekil 4.8. Oksijen akısının değişimi

4.6. Organik Maddenin Etkisi

MBfR reaktörünün organik madde olmaksızın işletildiği süreç sonunda besleme suyuna giriş KOİ'si 20 mg/l olacak şekilde glikoz ilavesi yapılmıştır. Bu süreçte, giriş amonyum konsantrasyonu 20 mg/l, oksijen basıncı 0,5 psi ve HRT 2,5 gün olarak muhafaza edilmiştir. Çıkış suyunda yapılan amonyum ve nitrit tayin limitlerinin altında belirlenirken, nitrat konsantrasyonu kararlı bir şekilde 18 mg/l'nin üzerinde belirlenmiştir. Bu işletim periyodunda KOİ giderim verimi, 12 gün içerisinde Şekil 4.9'da görüldüğü gibi % 94 olmuştur. Daha sonra aynı işletim şartları altında giriş KOİ'si 50 mg/l olacak şekilde besleme yapılmıştır. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi, bu işletim şartlarında KOİ giderimi % 30'a kadar düşmüş fakat zamanla reaktördeki KOİ giderim verimi % 88'e ulaşmıştır.



Şekil 4.9.KOİ 20 mg/l'de MBfR Performansı



Şekil 4.10. KOİ 50 mg/l'deMBfR Performansı

4.6.1. Membran Biyofilm Reaktöründe Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Analizi

Sülfürik asit (H_2SO_4): 220 ml sülfürik asit 500 ml distile suya eklendi ve soğuduktan sonra 1 litreye tamamlandı.

Gümüş sülfat- sülfürik asit: 10 g gümüş sülfat (Ag_2SO_4) 35 ml distile suya eklendi ve üzerine 965 ml sülfürik asit ilave edilerek gümüş sülfatın çözünmesi için 1-2 gün beklendi.

Demir(II) amonyum sülfat, standart hacimli çözelti ($(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$): 98 g $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$ suda çözüldü ve üzerine 20 ml sülfürik asit ilave edildi. Soğuduktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Civa tuzu içeren standart potasyum dikromat çözeltisi ($K_2Cr_2O_7$): 0,4 g civa sülfat ($HgSO_4$) 20 ml distile suda çözülerek üzerine 30 ml sülfürik asit ilave edildi. Soğuduktan sonra, önceden 2 saat süreyle 105^oC'de kurutulmuş olan 10 ml 0,0417 M potasyum dikromat bu çözeltiye eklendi ve 120 ml distile su eklendi.

Ferroin inikatör çözeltisi: 1,485 g 1,10-Fenantrolin ve 695 mg $FeSO_4$ x $7H_2O$ suda çözerek hacim 100 ml' ye tamamlandı.

Geri soğutuculu bir balon jojeye 0,4 gr $HgSO_4$ konuldu 20 ml lik su numunesi ile 10 ml 0,0417 M K_2 Cr_2 O_7 çözeltisi balon jojeye transfer edilerek karıştırıldı. Sonra çok yavaş ve çalkalayarak 30 ml H_2SO_4 reaktifi ilave edildi. Homojen bir çözelti elde edilinceye kadar karıştırıldı. Balon jojeye geri soğutucu takılarak geri soğutucuda su sirkülasyonu temin edildi. 2 saatlik bir ısıtmadan sonra bek kapatıldı. Oda sıcaklığına kadar soğutulmuş karışıma hacminin 2 katı kadar destile edilmiş su ilave edildi. Aynı deney reaktör çıkışından alınan su numunesi yerine şahit çözeltisi kullanılarak tekrarlandı.

Gerek numune ve gerekse şahit çozeltisi kullanılarak yukarıda açıklandığı gibi işlem görmüş karışımlara ayrı ayrı 2-3 damla ferroin indikatör çözeltisi ilave edilerek 0,25 M $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \times 6H_2O$ çözeltisi ile renk mavi – yeşilden kırmızı- kahverengine dönünceye kadar titre edildi ve sarfiyatlar kaydedilip aşağıdaki formülden hesaplandı:

$$KO\dot{I}(O_2 mg/l) = \frac{(A-B)\times M\times 8000}{Numune\ Hacmi(ml)} \quad (4.6)$$

A:Şahit çözeltisi için sarfedilen $Fe(NH_4)_2\ (SO_4)_2\times 6\ H_2O$(ml)

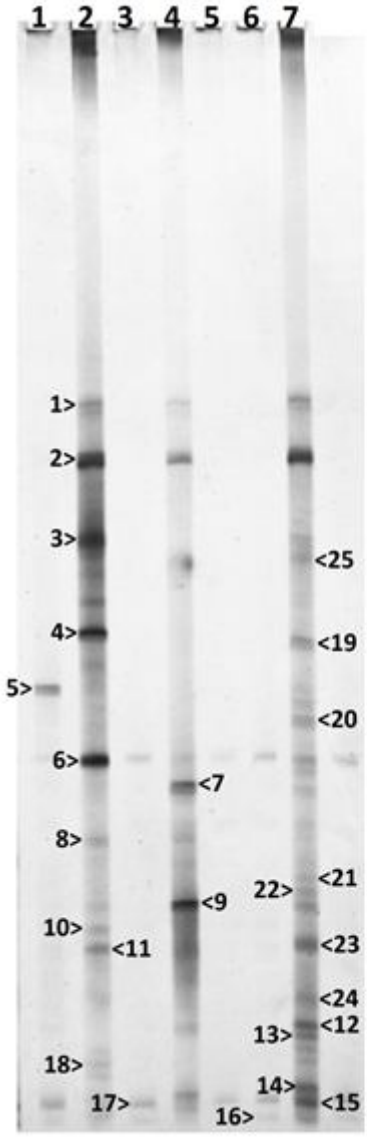
B:Numune çözeltisi için sarfedilen $Fe(NH_4)_2\ (SO_4)2\times 6\ H_2O$(ml)

M: $Fe(NH_4)_2(SO_4)2\times 6\ H_2O$ (ml) Çözeltisinin molaritesi

4.7. Membran Biyofilm Reaktöründe Mikrobiyal Popülasyon

Nitrifikasyon kararlı hale geldikten sonra alınan eş zamanlı biyofilm numunelerinin DGGE tekniği poliakrilamid jel üzerindeki DNA bantları Şekil 4.11'de gösterildiği gibidir. DGGE analizinde 25 bant kesilmiş ve sekans analizleri yapılmıştır. Sekans analiz sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir. Sekans analiz sonuçlarına göre mikroorganizmalara ait filogenetik ağaç Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

Nitrifikasyon kararlı hale geldikten sonra alınan biyofilm örneklerinde reaktör işletim şartları, bekleme süresi 5 saat, oksijen basıncının 0,5 psi (0,034 atm) olduğu zamanda çıkan sonuç *Pseudomonas sp.* bakterisinin etkili olduğunu göstermiştir. Şartların her değişiminde alınan biyofilm numunelerinde; reaktördeki şartlar bekleme süresi 5 saat ve oksijen basıncı 1 psi (0,068 atm) olduğu zamanda *Uncultured bacterium gene, Pseudomonas sp., Uncultured Pseudoxanthomonas sp., Bacillus cereus, Uncultured bacterium clone* ve *Acinetobacter* bakterileri baskın olmuştur. Bekleme süresinin değişmediği yani 5 saat olduğu ancak oksijen basıncının 6 psi (0,408 atm) olduğu zamanda etkili olan mikroorganizma türü *Uncultured bacterium clone*'dur. Bekleme süresinin 7,5 saat oksijen basıncınında 2 psi (0,136 atm) olduğu reaktör şartlarında biyofilm üzerinde etkili olan mikroorganizmalar *Pseudomonas sp. ve Pseudomonas putida*'dır. Bekleme süresi yine 7,5 saat yalnız oksijen basıncının 6 psi(0,408 atm) olduğu zamanda alınan biyofilm numunesinden çıkan sonuç *acinotobacter sp.*'dir. En son kuyu ise KOİ şartlarının değiştiği zamanda alınan ve bekleme süresinin 2,5 saat, oksijen basıncın 0,5 psi(0,034 atm) olduğu biyofilm numunesinde etkili olan mikroorganizmalar; *Uncultured Nitrospira sp., Uncultured bacterium clone, Uncultured arthrobacter sp., Pseudomonas stutzeri, Uncultured bacterium gene, Bacillus flexus, Uncultured pseudoxanthomonas'*tır.



KUYU	NUMUNE
1	HRT 5, psi 0,5
2	HRT 5, psi 1
3	HRT 5, psi 6
4	HRT 7,5, psi 2
5	HRT 7,5, psi 3
6	HRT 7,5, psi 6
7	HRT 2,5, psi 0,5

Şekil 4.11.DGGE ile Yürütülen Poliakrilamid Jel Üzerindeki DNA Bantları

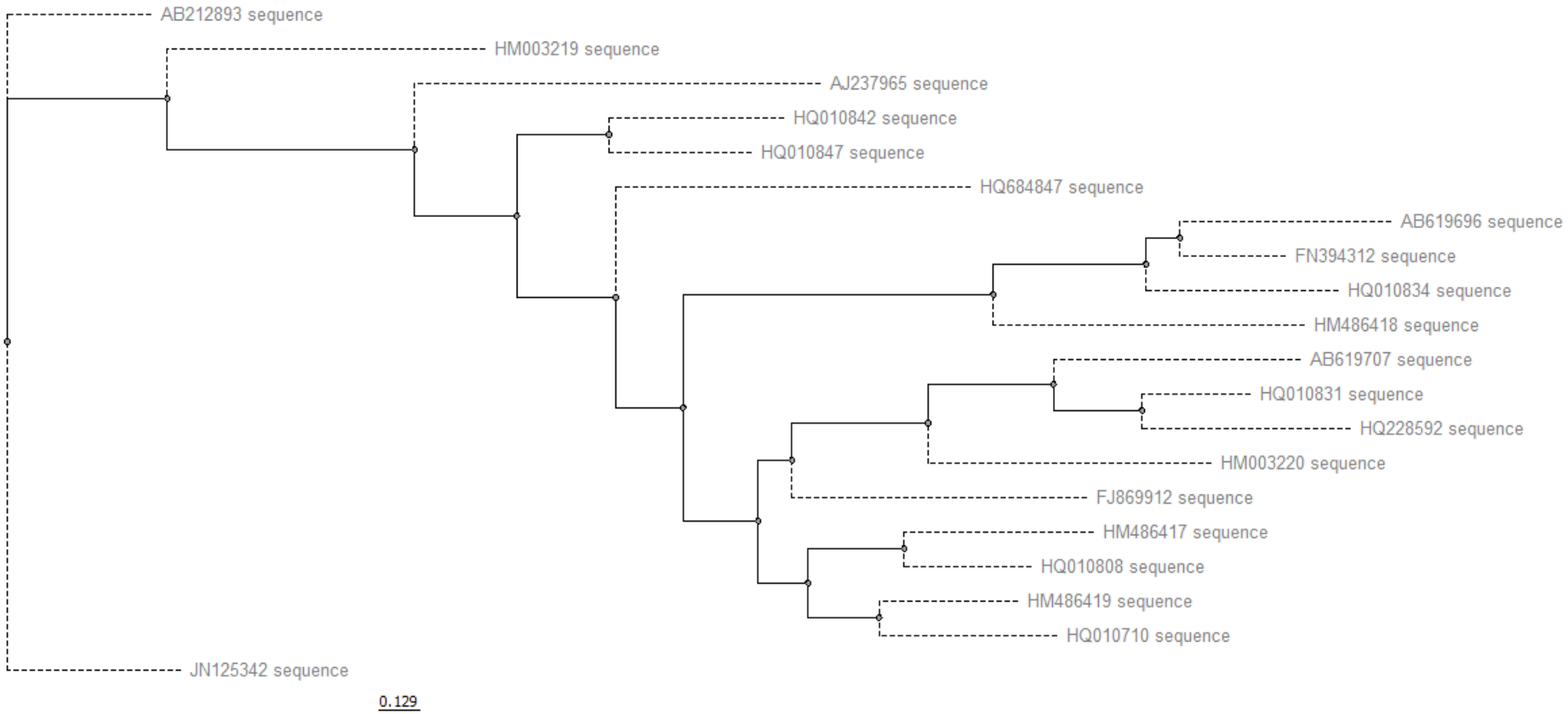
Tablo 4.1. Sekans Analiz Sonuçları

Bant No	Ref Numarası	Tür	Benzerlik	Organizma	Daha Önce Belirlendiği Kaynak
1	AB619696	*Uncultured bacterium gene*	99	Bacteria; environmental samples.	Chuang,H., Wu,J., Yamaguchi,T., Abe,K., Hatamoto,M. and Ohashi,A. Nitrous Oxide Driven Nitrification and Denitrification in Aerobic Biological Systems Unpublished
2	HM486419	*Pseudomonas sp.*	98	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Rhodocyclales; Rhodocyclaceae; Denitratisoma; environmental samples.	Zhang,D.Y., Li,W.G. and Liu,M. Isolation of heterotrophic nitrification bacteria, Unpublished
3	JN125342	*Uncultured Pseudoxanthomonas sp*	95	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Rhodocyclales; Rhodocyclaceae; Denitratisoma; environmental samples.	Xia,S., Li,H., Yang,X., Xu,X., Liang,J., Jia,R. and Xie,K., Microbial biofilm-community structure dynamics during bioreduction of nitrate, sulfate and para-chloronitrobenzene in a hydrogen-based membrane biofilm reactor, Unpublished
4	JN125342	*Uncultured Pseudoxanthomonas sp*	96	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Rhodocyclales; Rhodocyclaceae; Denitratisoma; environmental samples.	Xia,S., Li,H., Yang,X., Xu,X., Liang,J., Jia,R. and Xie,K., Microbial biofilm-community structure dynamics during bioreduction of nitrate, sulfate and para-chloronitrobenzene in a hydrogen-based membrane biofilm reactor, Unpublished
5	AJ237965	*Pseudomonas sp.*	99	Bacteria; Proteobacteria.	Katsivela,E., Bonse,D., Kruger,A., Strompl,C., Livingston,A. and Wittich,R.M. An extractive membrane biofilm reactor for degradation of 1,3-dichloropropene in industrial waste water, Appl. Microbiol. Biotechnol. 52 (6), 853-862 (1999)

6	HM003220	*Bacillus cereus*	99	Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus cereus group.	Liu,J. Isolation and Identification of a Heterotrophic Nitrification Aerobic Denitrifier with High Efficiency in the Removal of N from Wastewater Denitrification System, Unpublished
7	HM486419	*Pseudomonas sp.*	98	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.	Zhang,D.Y., Li,W.G. and Liu,M. Isolation of heterotrophic nitrification bacteria Unpublished
8	AB619707	*Uncultured bacterium gene*	95	Bacteria; environmental samples.	Chuang,H., Wu,J., Yamaguchi,T., Abe,K., Hatamoto,M. and Ohashi,A. Nitrous Oxide Driven Nitrification and Denitrification in Aerobic Biological Systems Unpublished
9	HM486417	*Pseudomonas putida*	100	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.	Zhang,D.Y., Li,W.G. and Liu,M. Isolation of heterotrophic nitrification bacteria, Unpublished
10	HQ010831	*Uncultured bacterium clone*	98	Bacteria; environmental samples.	Ji,Z. and Chen,Y. Using sludge fermentation liquid to improve wastewater short-cut nitrification-denitrification and denitrifying phosphorus removal via nitrite, Environ. Sci. Technol. 44 (23), 8957-8963 (2010)
11	HQ010710	*Uncultured bacterium clone*	99	Bacteria; environmental samples	Ji,Z. and Chen,Y. Using sludge fermentation liquid to improve wastewater short-cut nitrification-denitrification and denitrifying phosphorus removal via nitrite, Environ. Sci. Technol. 44 (23), 8957-8963 (2010)
12	HQ010808	*Uncultured bacterium clone*	100	Bacteria; environmental samples	Ji,Z. and Chen,Y. Using sludge fermentation liquid to improve wastewater short-cut nitrification-denitrification and denitrifying phosphorus removal via nitrite, Environ. Sci. Technol. 44 (23), 8957-8963 (2010)

13	FN394312	*Uncultured Nitrospira sp*	100	Bacteria; Nitrospirae; Nitrospirales; Nitrospiraceae; Nitrospira; environmental samples.	Sudarno,U., Bathe,S., Winter,J. and Gallert,C. Nitrification in fixed-bed reactors treating saline wastewater, Appl. Microbiol. Biotechnol. 85 (6), 2301-2304 (2010)
14	HQ010847	*Uncultured bacterium clone*	98	Bacteria; environmental samples	Ji,Z. and Chen,Y. Using sludge fermentation liquid to improve wastewater short-cut nitrification-denitrification and denitrifying phosphorus removal via nitrite, Environ. Sci. Technol. 44 (23), 8957-8963 (2010)
15	HQ132347	*Uncultured Arthrobacter sp.*	100	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Micrococcaceae; Arthrobacter; environmental samples.	Verma,V., Khardenavis,A., Kapley,A. and Purohit,H.J., Effect of nitrogen source on change in bacterial diversity in soil microcosm with respect to nitrification and denitrification: ammonium chloride as nitrogen source, Unpublished
16	HM486418	*Acinetobacter sp.*	100	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae; Acinetobacter.	Zhang,D.Y., Li,W.G. and Liu,M., Isolation of heterotrophic nitrification bacteria, Unpublished
17	HQ010842	*Uncultured bacterium clone*	98	Bacteria; environmental samples	Ji,Z. and Chen,Y. Using sludge fermentation liquid to improve wastewater short-cut nitrification-denitrification and denitrifying phosphorus removal via nitrite, Environ. Sci. Technol. 44 (23), 8957-8963 (2010)
18	HQ684847	*Acinetobacter sp.*	100	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae; Acinetobacter.	Xin,Y.F. and Yuan,M.D., Isolation, identification and nitrification conditions of a high-efficient heterotrophic nitrifier, Unpublished

19	FJ869912	*Pseudomonas stutzeri*	96	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.	Zhang,J., Wu,P., Hao,B. and Yu,Z. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium Pseudomonas stutzeri YZN-001, Bioresour. Technol. 102 (21), 9866-9869 (2011)
20	AB212893	*Uncultured bacterium gene*	100		Gurung,B., Onuki,M., Satoh,H., Mino,T., Ito,K. and Miki,O. Bacterial community in nitrification and denitrification process for Coke Oven wastewater treatment by 16S rDNA Unpublished
21	*No significant similarity found*				
22	HQ010834	*Uncultured bacterium clone*	99	Bacteria; environmental samples	Ji,Z. and Chen,Y. Using sludge fermentation liquid to improve wastewater short-cut nitrification-denitrification and denitrifying phosphorus removal via nitrite, Environ. Sci. Technol. 44 (23), 8957-8963 (2010)
23	HQ228592	*Uncultured bacterium clone*	99	Bacteria; environmental samples.	Ahn,J.H., Kwan,T. and Chandran,K. Comparison of partial and full nitrification processes applied for treating high-strength nitrogen wastewaters: microbial ecology through nitrous oxide production, Environ. Sci. Technol. 45 (7), 2734-2740 (2011)
24	HM003219	*Bacillus flexus*	100	Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.	Liu,J. Isolation and Identification of a Heterotrophic Nitrification Aerobic Denitrifier with High Efficiency in the Removal of N from Wastewater Denitrification System, Unpublished
25	JN125342	*Uncultured Pseudoxanthomonas sp*	95	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Rhodocyclales; Rhodocyclaceae; Denitratisoma; environmental samples.	Xia,S., Li,H., Yang,X., Xu,X., Liang,J., Jia,R. and Xie,K., Microbial biofilm-community structure dynamics during bioreduction of nitrate, sulfate and para-chloronitrobenzene in a hydrogen-based membrane biofilm reactor, Unpublished



Şekil 4.12. Mikroorganizmaların Filogenetik Ağaçtaki Yeri

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Son zamanlarda pek çok ülkede atıksu deşarj standartlarına getirilen değişiklikler ve sıkı denetimler sebebiyle mevcut arıtma sistemleri bazı durumlarda bu standartları karşılamakta yetersiz kalmakta ve yeniden düzenlenmeleri gerekmektedir. Alıcı ortam üzerindeki zararlı etkilerinden dolayı amonyum azotu söz konusu önemli kirletici parametrelerden biri olup, özellikle yüksek amonyum içeriğine sahip atıksular göz önüne alındığında deşarj standartlarının sağlanmasında güçlük çekilen parametrelerden biridir. Amonyum azotunun gideriminde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Yöntem seçimi için yapılan çalışmalarda özellikle maliyetinin düşük olması açısından biyolojik arıtmanın tercih edilen proseslerden biri olduğu bilinmektedir.

Bu çalışma kapsamında, 40 mg/l ve 20 mg/l amonyum azotu konsantrasyonuna sahip sentetik atıksuyun sürekli beslemeli işletilen membran biyofilm sisteminde arıtımı için bazı işletme parametrelerinin maksimum arıtma verimi sağlayacak şekilde optimizasyonu ve bu işletme parametrelerinin nitrifikasyon üzerindeki etkisi ile mikroorganizma türünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Etkisi incelenen parametreler bekletme süresi, oksijen basıncı, düşük KOİ ve başlangıç amonyum azotu konsantrasyonudur. Bu çalışmada varılan sonuçlar kısaca şu şekilde özetlenebilir;

1. Nitrifikasyon bakterilerinin membran yüzeyinde çoğalan biyofilme 2 aylık sürede uyum sağladığı belirlenmiştir. Yüksek oksijen basınçları altında MBfR sisteminin adaptasyonunun uygun olduğu gözlenmiştir.

2. MBfR sistemi işletime alındığında nitrit birikimi gözlenmiş olmasına rağmen zamanla nitrit sistemde sıfırlanmış ve tam nitrifikasyon gerçekleşmiştir.

3. Nitrifikasyon kültürü ve proses performansı bakımından MBfR sistemi değerlendirildiğinde, 0,5 psi oksijen basıncının yeterli olduğu belirlenmiştir.

4. O_2 basıncı 0,5 psi'de 2,5 saat'lik HRT'nin altında MBfR sisteminin çalıştırılmaması gerektiği belirlenmiştir.

5. Mikrobiyal türün tespiti, DGGE analizi ve sekans analizleri ile belirlenmiş ve nitrifikasyon prosesinde aktif olan biyofilm kültürünün değişken olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular ışığında, araştırması yapılan membran biyofilm reaktörde gaz basıncı ve

amonyum yükünün nitrifikasyon üzerinde etkisi, fiziksel ve kimyasal parametreler göz önüne alınarak, mikroorganizma türünün işletim şartlarının değişimine uygun olarak çeşitlilik gösterdiği saptanmıştır.

6. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar sürekli beslemeli oksijene dayalı membran biyofilm reaktörün amonyum azotu içeren atıksuların nitrifikasyonunda başarıyla kullanılabileceğini göstermiştir. Bu konuda gerçek atıksuların kullanılıp daha detaylı araştırmaların yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

7. Membran biyofilm reaktörlerinin özellikle enerji avantajlarından dolayı yakın gelecekte üçüncül arıtma olarak kullanılması kaçınılmazdır.

KAYNAKLAR

Ahn, J.H., Kwan, T. and Chandran, K. 2011. Comparison of partial and full nitrification processes applied for treating high-strength nitrogen wastewaters: microbial ecology through nitrous oxide production, *Environ. Sci. Technol.* 45, 2734-2740

Barnes, D. ve Bliss, P.J., 1983. Schooll of Civil Engineering the University of New South Wales, Australia, 126.

Bernet, N., Dangcong, P., Delgene`s, J-P., and Moletta, R., 2001. Nitrification at low oxygen concentration in biofilm Recator, *Journal of Environmental Engineering*, March, 266-271

Bernet, N., Habouzit, F., and Moletta, R. 1996. Use of wine distillery effluent as a carbon source for denitrification of a high-strength wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **46**, 92–97.

Brindle, T. Stephenson, and M.J. Semmens 1998. Nitrification and oxygen utilization in a membrane aeration bioreactor, *J. Membr. Sci*. **144,** 197-209.

Chuang, H., Wu, J., Yamaguchi, T., Abe, K., Hatamoto, M. and Ohashi, A. NitrousOxide Driven Nitrification and Denitrification in Aerobic Biological Systems *Unpublished*

Ciudad G, Rubilar O, Munoz P, Ruiz G, Chamy R, Vergara C, Jeison D. 2005. Partial nitrification of high ammonia concentration wastewater as a part of a shortcut biological nitrogen removal process. *Process Biochem*, **40,** 1715–171.

Coskuner,G., 2004, Yerinde Floresanlı Hibridizasyon Yöntemi ile Aktif ÇamurSistemlerinde Amonyak Oksitleyen Bakterilerin Sayımı, *1.Ulusal Çevre Kongresi*, Sivas, 295-300.

Cowman, J., C.I. Torres, and B.E. Rittmann 2005, Total nitrogen removal in an aerobic\anoxic membrane biofilm reactor system, *Water Sci. Tech.* **52,** 115-120.

Eckenfelder, W.W., 1989, Industrial Water Pollution Control, Second Edition, *McGrawHill Book Company*, Civil Engineering Series, 173-176.

Filibeli, A., 1988, Nitrifikasyon _slemini _nhibe Eden Faktörler, *Çevre 88, Bilimsel ve Teknik Çevre Kongresi*, s.48-56.

Folgar L. and F. Briski 2003, Watewater denitrification process: The influnce of methanol and kinetic analysis*, Process-Biochemistry*, **39,** 95-103.

Gurung, B., Onuki, M., Satoh, H., Mino, T., Ito, K. and Miki, O. Bacterial community in nitrification and denitrification process for Coke Oven wastewater treatment by 16S rDNA Unpublished

Hanhan, O., 1999. Aktif Çamur Sistemlerinde Biyolojik Azot Giderimi ve Tasarım Seçenekleri, *İTÜ Fen Bilimleri Ens.Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul.

Hasar, H ve İpek U. 2010. Gas permeable-membrane for Hydrogenotrophic denitrification. *Clean*, **38**, 23-26.

Hasar, H. 2009, Simultaneous Removal of Organic Matter and Nitrogen Compounds by Combining a membrane Bioreactor and a Membrane Biofilm Reactor, *Bioresour. Technol.* 2009, 100, 2699-2705.

Hasar, H., Xia, S., C. H. Ahn, B.E. Rittmann 2008. Total Nitrogen Removal of Organic Matter and Nitrogen Compounds by an Aerobic\Anoxic Membrane Biofilm Reactor, *Water Res*. **42,** 409-411.

Hibiya, K., Nagai, j., Tsuneda, S., Hırata, A., 2004. Simple Prediction of oxygen penetration depth in biofilms for wastewater treatment, *Biochem Eng*. J, 19, 61-68.

J.H. Shin, B.I. Sang, Y.C. Chung, and Y.K. Choung 2005, The removal of nitrogen using an hybrid hollow fiber membrane biofilm reactor, *Desalination,* 132, 447-454.

Jacome, A., Molina, J., Suárez, J, and Tejero, I. 2006, "Simultaneous removal of organic matter and nitrogen compounds in autoaerated biofilms, " *J. Environ. Engr*. **132**, 1255-1263.

Jenicek, P. Svehla, P., Zabranska, J., and Dohanyos, M. 2004. Factors affecting nitrogen removal by nitritation/denitritation *Wat. Sci. & Tech*, **49,** 5–6, 73–79.

Ji, Z. and Chen, Y. 2010 Using sludge fermentation liquid to improve wastewater short-cut nitrification-denitrification and denitrifying phosphorus removal via nitrite, *Environ. Sci. Technol*. 44 (23), 8957-8963.

Kapoor A. and T. Viraraghavan, 1997. Nitrate removal from drinking water-review, *J. Environ. Engin.* 123, 371-380.

Katsivela, E., Bonse, D., Kruger, A., Strompl, C., Livingston, A. and Wittich, R.M. 1999 An extractive membrane biofilm reactor for degradation of 1, 3-dichloropropene in industrial waste water, *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **52**, 853-862.

LaPara, T. M., Cole, A. C., Shanahan, J. W., and Semmens, M. J. 2006, "The effects of organic carbon, ammonical-nitrogen, and oxygen partial pressure of the stratification of membrane-aerated biofilms, " *J. Indust. Microb. Biotech.* **33**, 315~323.

Lee K.C. and B.E. Rittmann 2002. Applying a novel autohydrogenotrophic hollow-fiber membrane biofilm reactor for denitrification of drinking water; *Water Res*. **36**, 2040-2052.

Lee K.C. and B.E. Rittmann 2003. Effects of pH and precipitation on autohyrogenotrophic denitrification using the hollow fiber membrane-biofilm reactor; *Water Res.* **37,** 1551-1556.

Liu, J. Isolation and Identification of a Heterotrophic Nitrification Aerobic Denitrifier with High Efficiency in the Removal of N from Wastewater Denitrification System, *Unpublished.*

Metcalf&Eddy 2003, Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse, McGraw-Hill, 4th ed.,*Maidenhead*,

Nerenberg, R., Rittmann, B.E., and I. Najm 2002, Perchlorate reduction in a hydrogen-based membrane reactor; *K. AWWA*, **94,** 103-114.

Rittmann B.E., 2006. The membrane biofilm reactors: the natural partnership of membranes and biofilm, *Water Sci. Tech.* **53,** 219-225.

Ruiz, G., Jeison, D. and Chamy, R. 2003. Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Wat Res*. 37, 1371–1377.

Satoh, H. Ono, B. Rulin, J. Kamo, S. Okabe, and K.I. Fukushi 2004. Macroscale and microscale analyses of nitrification and denitrification in biofilms attached on membrane aerated biofilm reactors, *Water Res*. **36,** 1633-1641.

Satoh, H., Ono, H., Rulin, B, Kamo, J., Okabe, S., and Fukushi, K.-I. 2004. "Macroscale and microscale analyses of nitrification and denitrification in biofilms attached on membrane aerated biofilm reactors," *Water Res.* **38**, 1633~1641.

Smith, R.L., Buckwalter, S.P. 2005, D.A. Repert, and D.N. Miller, Small-scale, hydrogen-axidizing –denitrifying bioreactor for treatment of nitrate-contaminated drinking water: *Water Res*. **38.** 2014-2023.

Sudarno, U., Bathe, S., Winter, J. and Gallert, C. 2010. Nitrification in fixed-bed reactors treating saline wastewater, Appl. Microbiol. Biotechnol. **85**, 2301-2304.

Terada, A., Kaku, S., Matsumoto, S. and Tsenuda, S., 2006. Rapid autohyrogenotrophic denitrification by memrane biofilm reactor equipped with a fibrous support around a gas-permeable membrane, *Biochem. Engin*. J. **31**, 84-91.

Vasiliadou, I.A., S. Siozios, I.T. Papadas, K. Bourtzis, S. Pavlou, and D.V.Vayenas, 2006. Kinetics of pure cultures of hydrogen oxidizing denitrifying bacteria and modelling the interactions among them in mixed cultures, *Biotechnol. Bioeng*. **95,** 513-524.

Verma, V., Khardenavis, A., Kapley, A. and Purohit, H.J., Effect of nitrogen source on change in bacterial diversity in soil microcosm with respect to nitrification and denitrification: ammonium chloride as nitrogen source, *Unpublished*

Water Pollution Control Federation, 1983, Nutrient Control Manuel of Practice FD-7, Facilities Design.

Xia, S., Li, H., Yang, X., Xu, X., Liang, J., Jia, R. and Xie, K., Microbial biofilm-community structure dynamics during bioreduction of nitrate, sulfate and para-chloronitrobenzene in a hydrogen-based membrane biofilm reactor, *Unpublished*

Xin, Y.F. and Yuan, M.D., 2000. Isolation, identification and nitrification conditions of a high-efficient heterotrophic nitrifier, *Unpublished,*

Zhang, D.Y., Li, W.G. and Liu, Isolation of heterotrophic nitrification bacteria, *Unpublished*

Zhang, J., Wu, P., Hao, B. and Yu, Z. 2011. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium Pseudomonas stutzeri YZN-001, *Bioresour. Technol.* **102**, 9866-9869.

ÖZGEÇMİŞ

Ben 21 Şubat 1987 yılında Hatay'ın İskenderun ilçesinde doğdum. İlkokul'u 5'e kadar Şükrü Kanatlı İlkokulu'nda okudum. Daha sonra babamın işi dolayısıyla Suudi Arabistan'ın başkenti Riyad'a taşındık ve bundan sonra ki liseye kadar olan eğitim hayatımı Riyad Uluslararası Türk Okulu'unda devam ettim. Lise eğitimimi Şemsettin Mursaloğlu Lisesi'nde aldım. 2006 yılında Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği bölümünü kazandım. 2010 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği bölümünde yüksek lisansa başladım. Şuan Elazığ Alacakaya Mermer ve Maden İşl.Tic. A.Ş.'nde ihracat departmanında ve aynı şirketin Çevre Mühendisi ünvanı ile çalışmaktayım.