

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma Esen SARIGÜLLÜ

**DOĞAL ORTAMLARDAN DENİTRİFİKASYON YETENEĞİ YÜKSEK
BAKTERİ İZOLASYONU VE DENİTRİFİKASYONDA
KULLANILABİLİRLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2007

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL ORTAMLARDAN DENİTRİFİKASYON YETENEĞİ YÜKSEK
BAKTERİ İZOLASYONU VE DENİTRİFİKASYONDA
KULLANILABİLİRLİKLERİNİN
ARAŞTIRMASI**

Fatma Esen SARIGÜLLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez .../.../2007 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir

İmza:.....
Prof. Dr. Ömer ÇOLAK
DANIŞMAN

İmza:.....
Prof. Dr. Haluk SORAN
ÜYE

İmza:.....
Prof. Dr. Sadık DİNÇER
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve mühür

Bu çalışma Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF 2006 YL 40

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DOĞAL ORTAMLARDAN DENİTRİFİKASYON YETENEĞİ YÜKSEK
BAKTERİ İZOLASYONU VE DENİTRİFİKASYONDA
KULLANILABİLİRLİKLERİNİN
ARAŞTIRMASI**

Fatma Esen SARIGÜLLÜ
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Prof.Dr.Ömer ÇOLAK

Yılı: 2007 Sayfa:69

Juri: Prof.Dr.Ömer ÇOLAK

Prof.Dr.Sadık DİNÇER

Prof.Dr.Haluk SORAN

Bu çalışmada alttan havalandırmalı, sabit dolgu yataklı küçük bir arıtma tesisi inşa edilerek dolgu yatağı üzerinde gelişen biyofilmden izole edilen bakterilerin denitrifikasyon yetenekleri araştırılmıştır. Yüksek düzeyde denitrifikasyon yeteneği belirlenen suşların nitrat içerikli atık sudan NO₃-N ve KOI giderim testleri yapılarak denitrifikasyon verimleri belirlenmiştir.

Tesisten izole edilen bakterilerden 19'unun denitrifikasyon yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur. Bu suşların NO₃ içerikli atık sudan ortalama NO₃-N gideriminin %95,7, KOI gideriminin %73, 8 olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu bakteriler sabit yataklı denitrifikasyon prosesinde de denitrifikant floraya NO₃-N giderimine katkı sağladığı bulunmuştur.

Bu denitrifikant suşların VİTEK 2 otomatize sistemiyle *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Comamonas testosteroni*, *Enterobacter cloacae*, *Alcaligenes faecalis*, *Citrobacter freundii* türlerine ait olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Atık su arıtımı, Denitrifikasyon, Nitrat Giderimi

ABSTRACT

MSc THESIS

**ISOLATION OF DENITRIFICANT BACTERIES FROM NATIVE
ENVIRONMENTS AND INVESTIGATION OF USE FOR
DENITRIFICATION**

Fatma Esen SARIGÜLLÜ

**DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA**

Supervisor: Prof.Dr.Ömer ÇOLAK

Year: 2007 Page:69

Jury: Prof.Dr.Ömer ÇOLAK

Prof.Dr.Sadık DİNÇER

Prof.Dr.Haluk SORAN

In this study, denitrification capabilities of bacteria, which were isolated from biofilm grown on the plug material of a small constructed laboratory scales wastewater treatment system having a fixed-bed and bottom aeration, were investigated. Denitrification efficiency of these strains with high denitrification capabilities were identified by using NO₃-N and COD removal analysis from wastewater containing NO₃.

Total 19 of the bacteria isolated from the wastewater treatment system were found to have denitrification capabilities. NO₃-N and KOI removal rate of these bacteria detected as 95,7% and 73,8%, respectively

The isolated denitrificant bacteria were identified as *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Comamonas testosteroni*, *Enterobacter cloacae*, *Alcaligenes faecalis*, *Citrobacter freundii* with VITEK-2 automated system.

Key words: Wastewater treatment, Denitrification, Nitrate removal

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım esnasında bilgi ve deneyimleriyle yol gösterip sabrı ve anlayıőıyla bana örnek olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Ömer ÇOLAK'a teşekkür ederim.

Çalıőmamın deney aşamasında yaptıkları yardımlardan dolayı sayın hocam Prof. Dr. Sadık DİNÇER'e , Prof. Dr. Burhan ARIKAN'a ve Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ' e teşekkür ederim.

Deney aşamasında yardımlarını esirgemeyen Araő. Gör. Gülcihan GÜZELDAĖ , Araő. Gör. Ashabil AYGAN'a, Biyolog H. Aysun MERCİMEK ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölümü Bölüm Başkanlığı'na ve maddi desteklerinden dolayı Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen çok sevgili aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGE DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Atık suların arıtılması.....	2
1.1.1.Mekanik arıtma.....	2
1.1.2. Biyolojik Arıtma.....	4
1.1.2.1.Aerobik Biyolojik Arıtma.....	4
1.1.2.1.(1).Aktif Çamur Sistemi.....	5
1.1.2.1.(2).Biyofilm Sistemler.....	6
1.1.2.2.Anaerobik Biyolojik Arıtma.....	8
1.2.Biyolojik olarak Azot Bileşiklerinin Arıtılması.....	9
1.2.1.Nitrifikasyon.....	9
1.2.1.1.Nitrifikasyona Etki Eden Faktörler.....	10
1.2.1.1.(1).Çözünmüş Oksijen Konsantrasyonu.....	11
1.2.1.1.(2).Sıcaklık Etkisi.....	11
1.2.1.1.(3).Alkalinite ve pH'ın Etkileri.....	11
1.2.2.Denitrifikasyon.....	12
1.2.2.1.Özümsel Nitrat Redüksiyonu.....	14
1.2.2.2.Özümsel Olmayan Nitrat Redüksiyonu.....	15
1.2.2.3.Denitrifikasyona Etki Eden Faktörler.....	16
1.2.2.3.(1).Sıcaklık Etkisi.....	16
1.2.2.3.(2).pH Etkisi.....	17
1.2.2.3.(3).C/N Konsantrasyonunun Etkisi.....	17
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	18
3.MATERYAL VE METOT.....	26

3.1. Materyal.....	26
3.1.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	26
3.1.1.1.Kimyasal Oksijen İhtiyacı Testi (KOI) Sırasında Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	26
3.1.1.2.Biyokimyasal Testlerde Kullanılan Çözeltiler.....	27
3.1.1.2.(1).Kovaks Çözeltisi.....	27
3.1.1.2.(2).Metil Kırmızısı Solüsyonu.....	27
3.1.2.Kullanılan Besiyerleri.....	27
3.1.2.1.Biyokimyasal Testlerde Kullanılan Besiyerleri.....	27
3.1.2.1.(1).Jeloz Besiyeri.....	27
3.1.2.1.(2).N ₁ Besiyeri.....	28
3.1.2.1.(3).İndol Besiyeri.....	28
3.1.2.1.(4).Jelatin Besiyeri.....	28
3.1.2.1.(5).Nişastalı Agar.....	29
3.1.2.1.(6).Üre Agar.....	29
3.1.2.1.(7).Endo_C Besiyeri.....	30
3.1.2.1.(8).SIM Agar.....	30
3.1.2.1.(9).Clark-Lups Besiyeri.....	30
3.1.2.2.Bakterilerin Denitrifikasyon Yeteneğini Belirlemede Kullanılan Besiyerleri.....	31
3.1.2.2.(1).DM Besiyeri.....	31
3.1.2.2.(2).GN Besiyeri.....	31
3.1.2.2.(3).NN Besiyeri.....	32
3.1.3. Kullanılan Yapay Atık Su İçerikleri.....	32
3.1.3.1.Melaslı Atık Su.....	32
3.1.3.2. NO ₃ İçerikli Atık Su.....	32
...3.2.Metot.....	33
3.2.1.Bakteri İzolasyonu.....	34
3.2.2.Atık Sudan İzole Edilen Bakterilerin Denitrifikasyon Yeteneğinin Belirlenmesi.....	34
3.2.3.Denitrifikasyon Yapan Bakterilerin Denitrifikasyon	

Başarılarının Belirlenmesi.....	35
3.2.4.Yapılan testler.....	35
3.2.4.1.KOI (Kimyasal Oksijen İhtiyacı) Testi.....	35
3.2.4.2.Nitrat Testi.....	36
3.2.4.3.Denitrifikasyon Yeteneğini Belirleme Metodu.....	37
3.2.4.4.Biyokimyasal Testler.....	37
3.2.4.4.(1).Katalaz testi.....	37
3.2.4.4.(2).Oksidaz Testi.....	38
3.2.4.4.(3).Jelatin Hidrolizi Testi.....	38
3.2.4.4.(4)Nişasta Hidroliz Testi.....	38
3.2.4.4.(5).İndol Testi.....	39
3.2.4.4.(6).Arjinin Hidroliz Testi.....	39
3.2.4.4.(7).H ₂ S Testi.....	39
3.2.4.4.(8).Metil Kırmızısı Testi	40
3.2.4.4.(9). Hareket testi	40
4.BULGULAR VE TARTIŞMA.....	41
4.1.Bulgular.....	41
4.1.1.Bakterilerin Denitrifikasyon Yeteneğinin Belirlenmesi.....	41
4.1.2.Denitrifikasyon Yapan Bakterilerin Yapay Atık Sudan Nitrat Giderimi Üzerine Etkinliklerine Ait Bulgular.....	44
4.1.3.Denitrifikasyon Yapan Bakterilerin Atıksudan KOI Giderimine Ait Bulgular.....	47
4.1.4.Sabit Yataklı Reaktörde Nitrat Giderimine Ait Bulgular.....	50
4.1.5.Bakteri İdentifikasyonu.....	52
4.2.Tartışma.....	56
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	69

ÇİZELGELER DİZİNİ	SAYFA
Çizelge 4.1. GN besiyerinde renk değişimi gösteren bakteri suşları.....	42
Çizelge 4.2. NN besiyerinde gaz oluşumu gözlenen bakteri suşları.....	43
Çizelge 4.3. NN besiyerindeki denitrifikasyondan sonra kalan nitrat düzeyleri.....	44
Çizelge 4.4. Denitrifikasyon yapan bakterilerin yapay atık sudan NO ₃ -N giderim düzeyleri.....	45
Çizelge 4.5. Test ettiğimiz suşların yapay atık sudaki organik kirliliğin eliminasyonunda sağladıkları arıtma düzeyi.....	48
Çizelge 4.6. Bakteri suşlarının toplam denitrifikasyon etkinliğine yapmış oldukları nitrat giderim katkıları.....	51
Çizelge 4.7. VITEK 2 otomatize sistemiyle tanımlanan suşlar.....	52
Çizelge 4.8. S2,S4,S5,S6,S8,S13,S19,S21,S22 suşlarına ait identifikasyon test sonuçları.....	54
Çizelge 4.9. S24,S25,S26,S28,S31,S33,S35,S39,S44 suşlarına ait identifikasyon test sonuçları.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ	SAYFA
Şekil 4.1. Bakteri suşlarına ait renk değişimleri.....	42
Şekil 4.2 Bakteri suşlarına ait gaz oluşumları.....	43
Şekil 4.3. S2, S4, S5, S6, S8, S13, S19, S21, S22, S24 suşlarının yapay atık sudan NO ₃ -N giderim düzeyleri.....	46
Şekil 4.4. S25, S26, S27, S31, S33, S34, S35, S37, S44 suşlarının yapay atık sudan NO ₃ -N giderim düzeyleri.....	46
Şekil 4.5. S2, S4, S5, S6, S8, S13, S19, S21, S22, S24 suşlarının yapay atık sudan KOI giderim düzeylerini gösteren grafik.....	49
Şekil 4.6. S25, S26, S27, S31, S33, S34, S35, S37, S44 suşlarının yapay atık sudan KOI giderim düzeylerini gösteren grafik.....	49

1.GİRİŞ

Doğada bilinen en iyi çözücü sudur ve su aynı zamanda iyi bir taşıyıcıdır. Doğal halinde pek çok çözülmüş madde, katı parçacık ve canlı organizma içerir. İnsanlar, yaşamsal ve ekonomik gereksinimleri için suyu hidrolojik çevrim denilen bir döngüden alır ve kullandıktan sonra çevrime geri verirler. Bütün metabolik olaylar suda çözülmüş bileşiklerle gerçekleştiğinden susuz hayat olamaz.

Canlılar için büyük öneme sahip olan su herhangi bir şekilde kullanıldıktan sonra ya evsel kökenli yada endüstriyel kuruluşlarından kaynaklanan kirlilikle biyolojik özelliği değişikliğe uğratılır. Bu sular atık su olarak adlandırılır (Remuth, 1954; Deitrich, 1971).

Atık sulardaki bileşik grupları bakımından ortaya çıkan kirlilik çok önemlidir. Hızlı nüfus artışı ve endüstrileşme sonucunda oluşan atık sular doğanın özümleyebileceği miktarı aşmış ve alıcı ortamları kirlenme tehlikesi ile karşı karşıya bırakmıştır. Doğadaki ekolojik dengeyi olumsuz yönde etkileyebilecek ve diğer faydalı kullanımlarını engelleyecek bu durumun önüne geçebilmek için atık suları uzaklaştırmadan önce arıtma zorunluluğu doğmuştur. Atık suların özellikleri kaynaklarına bağlı olarak önemli farklılıklar gösterir ve bu farklılıklara göre arıtma yöntemleri de değişir. Atık suların genellikle %99'undan daha yüksek bir kısmı su ve geri kalan kısmı kirletici maddelerden oluşmaktadır. Bu maddelerin özelliklerine göre uzaklaştırılmaları için kullanılacak arıtma yöntemi de değişir. Atık sulardaki kirletici maddelerden olan organik kirleticilerin uzaklaştırılması için en etkin yöntemin "biyolojik arıtma" olduğu söylenebilir. Biyolojik arıtma atık suyun içinde bulunan askıda veya çözülmüş organik maddelerin bakterilerce parçalanması ve çökebilen biyolojik floklarla sıvının içinde kalan veya gaz olarak atmosfere kaçan sabit inorganik bileşiklere dönüşmesidir. (Metcalf ve Eddy,1991).

Biyolojik arıtma çalışmaları daha çok organik maddelerin giderilmesine yöneliktir. Bu organik madde giderimlerinden en önemlilerinden biri azot bileşiklerinin giderilmesidir. Çünkü bu bileşikler çevrede ötrofikasyon, oksijen tüketimi ve zehirlilik gibi çeşitli çevresel problemlere neden olmaktadır.

Atık sulardaki azot kirleticilerinden en önemlisi nitrat kirliliğidir. Sularda nitratın aşırı miktarda bulunması canlılık faaliyetlerini etkiler. Örneğin, sularda alg

populasyonunda artış gözlenir ve bunun sonucuda sulardaki çözünmüş oksijen oranı düşer (Lloyd ve ark. 1987).

Atık sulardan nitrat, atık sulardaki mikroorganizmalarca azot gazına dönüştürülerek giderimi sağlanır. Bu olay denitrifikasyon olarak adlandırılır. Atık sulardan nitrat giderimi çok önemlidir. Bu yüzden denitrifikasyon gerçekleştiren bu organizmaların tanımlanması ve aktivitelerinin belirlenmesi gerekir (Martin ve ark., 1988).

1.1. Atık Suların Arıtılması

Doğal yapısı değişikliğe uğramış suların tekrar mümkün olduğunca doğal hallerine döndürülmesi için yapılması gereken işlemler vardır. Buna atık suların arıtılması denir.

Yüzey suları organik kirlilik yükleri doğal koşullarda yürütülen doğal arıtma yetenekleriyle elimine edilmediği sürece kirlenme tehlikesiyle karşı karşıya kalmazlar. Ancak günümüzde insan etkisinden ve çevresel zararlı faktörlerden uzak kalmış çok az doğal su ortamı vardır. Similasyonun başlamasıyla birlikte yüzey sularının kirlenmesiyle ilgili tarih başlar.

Endüstriyel atık sular çok farklı tipte olduklarından çok farklı arıtma metotları vardır ancak evsel atık suların arıtılmasıyla ilgili uygulamalar fiziksel ve biyolojik proseslerin rol oynadığı kombinasyonlardır. Arıtma teknolojileriyle uğraşanlar bu kombinasyonu mekanik arıtma(ön arıtma) ,biyolojik arıtma(ana arıtma) ve ileri arıtma(kimyasal arıtma) şeklinde üç gruba ayırırlar. (Metcalf ve Eddy,1991).

1.1.1.Mekanik Arıtma

Ön arıtmada denilen mekanik arıtma aşamasında; atık suda bulunan çözünmemiş her türlü yapının fiziksel davranışlarından yararlanılarak atık sudan uzaklaştırılması amacı gerçekleştirilir. Genellikle yüzebilen ve çökebilen kirlenmelerin bu aşamada arıtıldığı kabul edilir.

Bu aşamada kullanılan ince ve kalın ızgaralar katı haldeki her türlü büyük kitleleri atık sudan uzaklaştırmaya yararlar. Bunların arkasına yerleştirilen kum tutucular ise kum ve cam parçası gibi özgül ağırlığı yüksek, hızla çökebilen yapıların uzaklaştırılmasını sağlarlar. Gerekirse kum tutuculardan sonra yağ ve diğer yüzebilen partikülleri sudan uzaklaştıracak yüzdürme havuzları ve yağ tutucular kullanılır. Mekanik arıtmanın en önemli ve son aşaması ön dinlendirme havuzlarıdır. Bu aşamada 2 saat dinlendirilen atık su çok ince partiküllerden dahi kurtarılır.

Ön dinlendirme havuzlarında çöken kirleticilerin büyük çoğunluğu organik kolloidal partikül şeklinde olduğundan bu havuzların dibinden toplanan kitleye primer çamur adı verilir. Bu yapı biyolojik parçalanılabilirlik açısından çok sorunlu bir organik kitle yapısındadır.

Arıtma tesisine gelinceye kadar suların anoksik koşullara girmemesi için kanalizasyon sisteminde durgun bölgelerin bulunmaması arzu edilir. Atık suya verilen belli bir akış hızı yardımıyla sürekli oksijenlenmesi sağlanmalıdır. Atık su ızgaralardan hızla geçirilmesine rağmen kum tutucularda biraz yavaşlatılır ancak sadece kumların çökmesine olanak verecek, organik partiküllerin çökmesini engelleyecek bir yavaşlama söz konusu olmalıdır. Organik partiküllerin kum tutucularda değil ön dinlendirme havuzlarında çökmesi sağlanmalıdır.

Ön dinlendirme havuzundan çıkan su bundan sonraki arıtma aşaması olan biyolojik arıtma aşamasına gelir. Biyolojik arıtma aşamasında farklı metotlar kullanılmasına rağmen hepsinde ortak olan özellik bu aşamada gerçekleşen biyokimyasal olaylardır. Biyolojik arıtma aşamasında mikroorganizmalar tarafından oluşturulan bir biyokütle vardır. Bu biyokütle atık su içerisindeki organik kirleticilerle temas halindedir ve ortamdaki oksijen düzeyi mümkün olan en optimal düzeyde tutulmaya çalışılır. Biyolojik arıtma teknolojilerinde arıtmaya ulaşmamızı sağlayan uygulamalar iki büyük gruba ayırmak mümkündür. Birincisi serbest yüzen çamur teknolojileridir. Burada aktif çamur adı verilen içerisinde çeşitli mikroorganizma grupları bulunan süngere benzer yapılardır. Bu yapılar gerek havalandırma gerekse karıştırma ile serbest yüzer durumdadır. İkincisi biyofilm teknolojileridir. Burada mikroorganizmalar bir yüzeye tutunarak arıtımı

gerçekleştirirler. Her ikisinde de atık sudaki organik kirleticileri biyokimyasal yolla metabolize eden biyolojik bir kitle bulunmaktadır (Metcalf ve Eddy,1991).

1.1.2.Biyolojik Arıtma

Atık suların özellikleri kaynaklarına bağlı olarak önemli farklılıklar gösterir ve bu farklılıklara göre arıtma yöntemleri de değişir. Atık suların genellikle %99'undan daha yüksek bir kısmı su ve yalnız geri kalan kısmı kirletici maddelerden oluşmaktadır. Kirleticiler suyun içinde çözülmüş halde bulunabilecekleri gibi, katı madde olarak askıda da bulunabilirler. Bu maddelerin özelliklerine göre uzaklaştırılmaları için kullanılacak arıtma yöntemi de değişir. Örnek olarak organik kirleticilerin uzaklaştırılması için en etkin yöntemin “biyolojik arıtma” olduğu söylenebilir. Biyolojik arıtma atık suyun içinde bulunan askıda veya çözülmüş organik maddelerin bakterilerce parçalanması ve çökebilen biyolojik floklarla sıvının içinde kalan veya gaz olarak atmosfere kaçan sabit inorganik bileşiklere dönüşmesidir. Biyolojik arıtmanın esası organik kirleticilerin doğada yok edilmeleri için yer alan biyoflokülasyon ve mineralizasyon proseslerinin kontrolü ile çevrede ve optimum şartlarda tekrarlanmasıdır. Böylece doğadaki reaksiyonların hızlandırılarak daha kısa bir sürede, emniyetli ortamda gerçekleştirilmeleri sağlanmaktadır.

Biyolojik arıtma sistemleri değişik şekillerde sınıflandırılabilirler. Ortamda oksijen varlığına göre havalı (aerobik) ve havasız (anaerobik) olarak sınıflandırılan bu sistemler, kullanılan mikroorganizmaların sistemdeki durumuna göre askıda ve sabit film (biyofilm) prosesleri olarak da sınıflandırılabilirler (Metcalf ve Eddy,1991).

1.1.2.1.Aerobik Biyolojik Arıtma

Aerobik biyolojik arıtım, atık sularda kirlilik etmeni olan çeşitli maddelerin özellikle karbon, azot, ve kükürtlü bileşiklerin mikroorganizmalar tarafından oksijenli ortamda oksitlenmesi ve metabolik faaliyetler için kullanılması esasına

dayanır. Bu proses iki grup altında incelenir. Birincisi, serbest yüzen çamur prosesidir ki bunda aktif çamur adı verilen içerisinde çeşitli bakteriler ile tek hücrelilerden *Siliatlar*, terliksi hayvan, *Vorticella* ve çok hücrelilerden *Rotatorlar*, *Nematotlar* gibi bir çok canlı grubunu içinde barındırabilen sarı esmer yapısı süngere benzeyen yapılardır. Bu yapılar sistemde gerek havalandırma gerekse karıştırma ile yüzer durumdadırlar. İkincisi biyofilm adı verilen ve mikroorganizmaların bir yüzeye yapışarak tutunmaları ve arıtma gerçekleştirmeleri esasına dayanır. En çok kullanılan biyofilm sistemlerinden biri damlatma kuleleridir (Metcaft ve Eddy,1991).

1.1.2.1.(1).Aktif Çamur Sistemi

Aktif çamur içerisinde aerob, fakültatif anaerob bakteriler ile tek hücrelilerden *Siliatlar*, terliksi hayvan, *Vorticella* ve çok hücrelilerden *Rotatorlar*, *Nematotlar* gibi bir çok canlı grubunu içinde barındırabilen sarı ,esmer yapısı süngere benzeyen yapılardır.

Florayı oluşturan çeşitlilik bir yandan atık suyun bileşimine ve mevsim ve havalandırma tipine bağlıdır. Bu çeşitlilik organizmaların atık su içerisinde bulunan karbon, azot ve fosfor bileşiklerini yaşamsal faaliyetleri, üremeleri, enerji ve yapı taşı olarak kullanmalarıyla sağlanır(Anonymous,1983).

Aktif çamur içerisinde ilk üreyen organizmalar bakterilerdir. Bakteriler belirli yoğunluğa geldikten sonra öncelikle *Siliatlar* sonra *Vorticellalar* olmak üzere aktif çamur yumağını oluşturan bütün canlılar yavaş yavaş arıtma sisteminin içinde ortaya çıkmaya başlarlar. *Siliatlar* bakterileri, *Vorticellalar* hem bakterileri hem *Siliatları* ,*Rotatorlar* ve *Nematotlar* ise *Siliatları* besin olarak kullanırlar. Böylece ortamda belirli çamur yoğunluğu sürekli korunmuş olur.

Aktif çamur yumaklarının oluşumu, içinde bulunan mikroorganizmaların birbirine yapışması ve *Zooglea ramigera* bakterisinin ekstra polisakkarit salgılama yeteneğiyle sağlanır. Bu bakterilerin etrafında kalın bir polisakkarit tabakası suda çözünen ağır metal iyonlarını absorbe ederek ortamdaki uzaklaştırır. Ayrıca bu tabaka mukoid özelliğe sahip olduğundan ortamdaki mikroorganizmaların birbirine daha

kolay yapışmalarını ve son dinlendirme aşamasında aktif çamurun daha hızlı çökmesi sağlanmaktadır (Habeck-tropfke,1980;Gruhler,1981;Anonymous,1983).

Aktif çamur sistemi bir havalandırma havuzu ile havuzun çıkışına yerleştirilen bir çökeltme havuzundan oluşur. Havalandırma tankına giren atık su belirli süre havalandırılarak mikroorganizmaların organik maddeleri parçalamak suretiyle floklar oluşması sağlanır ve oluşan aktif çamur çökeltim havuzuna alınır. Havalandırma havuzunda istenen biyokütle konsantrasyonunu elde etmek için çökelen çamurun bir kısmı geri döngüyle havalandırma havuzuna verilir. Fazla çamur ise çamur yatağına veya çamur stabilizasyon prosesine gönderilir. Reaktördeki aerobik ortam difüzörle veya mekanik havalandırıcılarla sağlanır. Bu havalandırıcılar aynı zamanda reaktörde tam bir karışım sağlar. Aktif çamur sistemlerinin saf oksijenli, uzun havalandırmalı, kontakt stabilizasyon, oksidasyon hendekleri gibi çeşitli modifikasyonları bulunmaktadır (Jonstone,1984; Metcalf ve Eddy,1991).

1.1.2.1.(2).Biyofilm Sistemler

Biyofilm sistemler bakterilerin veya biyokütlenin askıdaki sistemlerden farklı olarak herhangi bir yüzey üzerine tutunarak fonksiyonunu gerçekleştirdiği sistemlerdir. Biyofilm tabakası mikroorganizmalar topluluğu ve onları çevreleyen kendileri tarafından salgılanmış jelatimsi yapılar olup bir yüzeye yapışması sonucu oluşurlar.

Atık su arıtma sistemlerinde kullanılan biyofilm sistemlerinden en yaygınları damlatma kuleleri, döner biyodisk reaktörleri, yukarı akışlı filtre ve akışkan yataklı reaktörlerdir. Bu sistemlerde bakterilerin tutunduğu yüzey, sabit yada hareketli olabilir. Bakteri inert materyale tutunarak reaktör içinde olabildiğince uzun kalabilmektedir.

Damlatma kuleleri, geometrik yapı olarak silindirik olan ve içi inert materyal ile doldurulmuş ve üst kısımdan atık su ile beslenen biyolojik atık su arıtma sistemleridir. Alt kısımda yanal açıklıklar bulunmaktadır. Bu açıklıklar hava sıcaklıklarına bağlı olarak aşağıdan yukarıya veya yukarıdan aşağıya doğru tesisin

havalandırılmasını sağlar. Atık suyun homojen olarak dağılabilmesi için dönen dağıtıcı kollar kullanılır.

Yukarıdan aşağıya doğru hareket eden atık su, dolgu materyalinin üzerinde bakteri, mantar, protozon ve diğer organizmalardan meydana gelen jel yapısında, yapışkan olan biyofilm tabakasının oluşumunu sağlar. Biyofilm tabakasının üst kısmında aerobik, orta tabakada fakültatif ve alt tabakada anaerobik mikroorganizmalar gelişir.

Atık su, biyofilm tabakası üzerinden film halinde akarken organik maddeler ve çözülmüş oksijen alınıp karbondioksit gibi metabolizma faaliyeti sonucu oluşan maddeler suya verilir. Damlatma kuleleri organik karbon gideriminin yanı sıra azot gideriminde de oldukça etkilidir.

Atık suyla gelen toksik bileşikler, bakterilerden daha çok, protozonları ve daha yüksek organizmaları etkilediğinden, toksik etki sonucu biyofilm üretimi, tüketimini geçebilir ve tıkanma tehlikesi ortaya çıkar. *Nematotlar* ve böcek larvaları en yaygın damlatma kulesi canlılarıdır. Özellikle böcek larvaları biyolojik film katmanlarında tüneller açtıklarından faydalıdırlar. Böceklerden bu alanlarda en meşhur olanı *Psychoda* cinsidir ve damlatma kulesi sineği olarak da adlandırılır (Anonymous, 1983; Brower ve Barfold, 1977).

Döner disk sistemleri, betonarme veya çelikten yapılmış uzun ve sığ tanklar içerisinde yer alan 2-3 m çapında ve 2-3 cm kalınlığında olan disklerden oluşur. Merkezi bir eksen etrafında horizontal olarak dönen disklerin % 40'ı atık suya batacak şekilde yerleştirilmiştir. Döner diskler bir süre hava bir süre su teması şeklinde alternasyonlu ortamlar yarattıklarından tüm yüzey boyunca bir biyofilm üremesi sağlarlar. Disklerin dönmesi tankın içindeki suya oksijen difüzyonunu kolaylaştırdığından damlatma kulelerine göre daha ileri düzeyde bir arıtma sağlanabilir.

Döner disk sistemlerinin bu şekilde çalışma prensiplerinden faydalanılarak gerek düşük gerekse yüksek organik kirlilik yükleri ile çalışılarak reaktörün performansı değerlendirilecek çalışmalar yapılmışlardır. Benzer şekilde reaktörün disk genişliğinin arıtma başarısı üzerine etkileri de bilim adamlarınca araştırılmıştır (Eckenfelder ve ark., 1980; Fujire ve ark., 1983; Leduc ve ark., 1993).

Akışkan yataklı arıtma sistemleri; Akışkan yataklı biyofilm prosesleri, bakterilerin askıda olan partiküller üzerinde büyüdüğü süspanse sistemler ile biyofilm sistemlerinin bir karışımıdır. Akışkan yatak reaktörlerinde biyokütle bir film halinde taşıyıcının yüzeyinde tutuklanır ve burada büyür. Biyokütle ile kaplı olan taşıyıcı, reaktörün içinde atık su ile akışkanlaştırılır. Tutuklamanın amacı reaktör içinde yüksek biyokütle konsantrasyonları tutarak birim hacimde giderilen KOI miktarını artırmaktır. Biyofilm oluşumu ve aşırı büyüyen biyokütlenin matristen kopması dinamik bir olay olduğundan kontrolü zordur ve bu reaktör içinde farklı yoğunlukta tutuklanmış granüllerin oluşumuna ve yatağın katmanlaşmasına neden olur (Shieh ve Keenan, 1986; Heijnen ve ark., 1989).

Atık sudaki partikül madde, akışkan yatağın hidrodinamiği bozduğu için istenmemektedir. Endüstriyel boyutta 1980'lerde uygulanmaya başlanmıştır. Çeşitli şirketler ABD, Hindistan, Hollanda, Fransa ve Almanya'da akışkan yatak anaerobik arıtma sistemleri kurmuştur (Heijnen ve ark., 1989; Iza, 1991; Schwarz ve ark., 1996). Fransız Degremont firması 1986-1996 arasında 26 adet akışkan yatak tesisi kurmuştur. Organik yükleme hızlarının kararlı operasyon sırasında 60 kg KOI/m³gün'ün üzerine çıktığını iddia etmektedirler (Holst ve ark., 1997). Buna karşın bazı firmalar, daha sonra akışkan yatak reaktörlerini yukarıda sayılan olumsuzluklarını önlemek için EGSB reaktörleri ile değiştirmiştir (Frankin ve ark., 1992; Vesprille ve ark., 1994).

1.1.2.2.Anaerobik Biyolojik Arıtma

Anaerobik biyolojik arıtım özellikle çok yoğun organik kirli atık suların arıtılmasına yönelik olarak uygulanan bir arıtım prosesidir. Anaerobik arıtma, organik maddelerin oksijensiz ortamda karbondioksit, metan ve su gibi son ürünlere dönüştürülmesidir. Anaerobik oksidasyon sırasında çok az miktarda enerji açığa çıktığı için yeni hücre üretimi azdır. Böylece çamur üretimide az olur. Anaerobik biyolojik arıtmada arıtma başarısını desteklemek amacıyla aerob arıtım proseslerinden faydalanılır (Anonymous, 1983; Henze ve ark., 1996).

1.2.Biyolojik Olarak Azot Bileşiklerinin Arıtılması

Atık sulardan azot gideriminde biyolojik süreçler genellikle ekonomik olmaktadır. Yerel bölgelerin çıkış suyu standartlarına bağlı olarak, ya azotun tüm formlarının ya da sadece amonyak azotunun giderimi istenebilir. Her iki durumda da ekonomik olarak, biyolojik arıtma başarılıdır. Azotun atık sulardaki temel formları amonyak-azotu ve organik azottur (Barnard,1973).

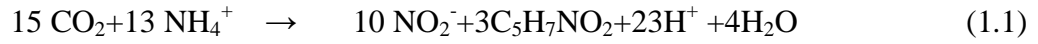
Amonyak-azotunun nitrat-azotuna dönüşümü olan nitrifikasyon, alıcı ortamdaki canlılara amonyak azotuna göre daha toksik olan evredir. Azot dönüşümleri; asimilasyon, mineralizasyon, nitrifikasyon ve denitrifikasyon basamaklarından oluşur (Barnes ve Bliss, 1983; Grady ve Lim, 1980; Horan,1991; Metcalf ve Eddy, 1991; Bitton, 1994). Bu sistemlerden nitrifikasyon-denitrifikasyon, azotun giderimi için iki aşamada gerçekleşir. Birinci aşamada nitrifikasyon; oksijenin varlığında amonyak azotunun nitrat azotuna dönüşümüdür. İkinci aşamada, nitrat azotunun oksijen varlığında denitrifikasyon bakterileriyle azot gazına dönüşümü olan denitrifikasyondur.

1.2.1.Nitrifikasyon

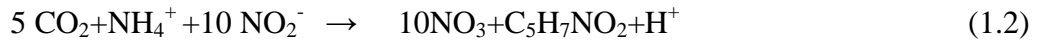
Amonyakın oksijenli ortamda önce nitrite sonrada nitrata okside olması olayına nitrifikasyon denir. Amonyak reaksiyona girmeye yatkın olmadığından güçlü okside edici ajanlara ya da katalizörlere ihtiyaç duyar. Burada katalizör görevini bakteriler üstlenir (Madigan ve ark.,1997). Nitrifikasyon olayı çok az sayıdaki ototrof bakteri tarafından gerçekleştirilir. Amonyakı nitrite ,nitriti nitrata okside ederek büyümeleri için gerekli enerjiyi amonyak ve nitritten üreten bu bakteriler *Nitrosomonas* ve *Nitrobacter* cinsi bakterilerdir. Bu biyolojik proses iki aşamalı bir prosestir. Birinci aşamada amonyum *Nitrosomonas* cinsi bakteriler tarafından nitrite (NO_2) , İkinci aşamada nitrit *Nitrobacter* cinsi bakteriler tarafından nitrata (NO_3) okside edilir (Kuenen ve Robertson 1988). Bu nedenle *Nitrosomonas*'lara amonyum oksitleyiciler, *Nitrobacter*'lere de nitrit oksitleyiciler denir. Nitrifikasyon olayında bu iki bakteri grubunun yanı sıra bazı heteretrof bakteri grubunda etkili olabilir, ancak

şimdiye kadar amonyumdan direkt olarak nitrat oluşturan hiçbir bakteri bilinmemektedir. Nitrat oluşumu daha hızlı bir biyolojik proses olduğundan atık sularda nitrit düzeyi düşüktür.

Amonyumun oksidasyonu aşağıdaki denklemle formüle etmek mümkündür.



Nitritin oksidasyonu ise,



Amonyumun nitrite oksidasyonu birkaç basamakta olurken, nitritin nitrate oksidasyonu tek basamakta olur. Amonyumun hidroksilaminden nitrite dönüştüğü ara bileşik henüz bilinmemektedir (Hooper ve Terry, 1979; Bock ve ark., 1992; Henze ve ark., 1996).

Nitrifikasyon sağlanmış atık sular, biyolojik kullanılabilir karbon bileşikleri yönünden fakirdirler. Bu yüzden dışarıdan karbon kaynağı ilave edilmediği sürece, bütün nitratın azota çevrimi mümkün değildir. Böyle bir durumda metanol bir karbon kaynağı olarak sistemde kullanılabilir (Ericsson ., 1975; Tam ve ark.; 1992).

Nitrifikasyon bakterileri çok spesifik mikroorganizmalardır ve çevre şartlarından kolayca etkilenirler. Bu bakterilerin büyüme hızları dolayısıyla nitrifikasyon hızları pH, sıcaklık ve çözülmüş oksijen konsantrasyonu gibi çevre faktörlerinden etkilenir. Ototrofik olduklarından karbondioksit, karbonatlar ve bikarbonatlar gibi inorganik karbon kaynakları da büyüme hızlarını etkiler. Ayrıca ağır metaller, siyanürler, halojen bileşikler, fenoller gibi bileşikler nitrifikasyon bakterilerine zehir etkisi yapan bileşiklerdir (Hanhan, 1994).

1.2.1.1.Nitrifikasyona Etki Eden Faktörler

Nitrifikasyon sürecine etki eden faktörler;

- Çözülmüş Oksijen Konsantrasyonu
- Sıcaklık
- Alkalinite ve pH

1.2.1.1.(1).Çözünmüş Oksijen Konsantrasyonu

Düşük çözünmüş oksijen konsantrasyonu nitrifikasyon hızını azaltır. Çünkü oksijen, nitrifikasyon yapan organizmalar tarafından oksidasyon reaksiyonunda kullanılır.

Çözünmüş oksijen değeri 2mg/L 'in altına indiğinde nitrifikasyon inhibe olduğu ve 0.5 mg/L lik çözünmüş oksijen değerinde ise nitrifikasyon oluşmadığı bulunmuştur.(Toprak, 1995).

1.2.1.1.(2).Sıcaklık Etkisi

Nitrifikasyon için optimal sıcaklık 30°C dir. Daha düşük sıcaklıklarda nitrifikasyon oranı azalmaktadır.(Viessman ve ark.,1985). Mikroorganizmalar sıcaklıktaki değişmeye reaksiyon hızındaki değişmeyle cevap verir.

1.2.1.1.(3).Alkalinite ve pH'ın Etkileri

Yaşayan tüm organizmalar, büyümek için karbona gerek duyarlar. Heterotrof bakteriler ihtiyaçlarını organik maddelerden temin ederlerken, nitrifikasyon bakterileri ise, atık sulardaki çözünmüş karbohidratlardan ve karbondioksitten sağlarlar.

Nitrifikasyon bakterileri bikarbonat alkalinitesini (HCO_3) tüketirler ve karbonik asit (H_2CO_3) üretirler. Yüzeyde çoğalma sistemlerinde olduğu kadar, askıda gelişme sistemlerinde de nitrate oksitlenen mg $\text{NH}_3\text{-N}$ başına 6-7,4 mg alkalinite gerekli olduğu yapılan çalışmalarda bulunmuştur (Timur, 1985).

Nitrifikasyon için optimal pH=8,0-9,0 arasındadır. Nitrifikasyon yapan bakteriler pH 6 dan küçük ve pH 10 dan büyük olunca etkili değildir. Odegaard'a göre optimum pH =8 civarındadır. En uygun koşullar pH =7,0-8,3 arasındadır (Odegaard,1980).

1.2.2.Denitrifikasyon

Denitrifikasyon, anoksik koşullar altında nitratın(NO_3) nitrite (NO_2), nitritin nitrik okside(NO) ve nitroz okside(N_2O) ve son olarakta azot gazına indirgenmesi olayıdır. Denitrifikasyon bir solunum olayı olduğundan, enerji kaynağı olarak oksitlenebilir bir substrata ya da elektron vericiye ihtiyaç duyar (Tiedje, 1988).

Denitrifikasyon yapan bakteriler çoğunlukla heterotrof olup ,kompleks organik maddeleri oksitlenebilir substrat olarak kullanırlar. Heterotrof organizmalar arasında aşağıdaki cinsler sayılabilir :*Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aprobacterium*, *Alcaligenes* , *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Hypomicrobium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Propionobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Spirillum* ve *Vibrio*. Bu bakterilerin çoğu nitrat gibi oksijeni de kullanabilmekte ve bazılarıda nitrat yada oksijenin olmadığı durumlarda fermentasyon da gerçekleştirebilmektedir. Ancak bazı denitrifikasyon bakterileri ise ototrofturlar ve enerji kaynağı olarak organik karbon yerine karbondioksit yada bikarbonat kullanırlar. Organik karbon kaynağının bulunması durumunda her iki cinste heterotrofik olarak çoğalabilir.

Denitrifikasyonun, prokaryotlara özgü bir özellik olduğu uzun zamandır düşünülmektedir. *Pseudomonas stutzeri* çok sayıda bakteri, anaerobik solunum için temel elektron alıcısı olarak nitrat veya nitriti kullanarak denitrifikasyon yapar. Son zamanlarda, pek çok ipliksi mantar ve mayaların denitrifikasyon aktivitesi gerçekleştirdiği bulunmuştur (Shoun ve Tanimoto, 1991). Ancak mantarları yaptığı denitrifikasyon bakterilerinkinden farklı ve eksiktir. Mantarlar, N_2O redüktaz'ın yokluğundan dolayı, denitrifikasyon ürünü olarak dinitrojen(N_2) yerine nitroz oksid (N_2O) üretirler (Kubota ve ark., 1999).

Denitrifikasyon bakterileri nitratı azot gazına çevirerek büyümeleri için gerekli enerjiyi elde ederler. Ancak hücre sentezi için bir karbon kaynağı gerekir. Heterotrofik denitrifikasyonda karbon kaynağı olarak metanol, etanol, glikoz, asetik asit ve formik asit gibi organik maddeler kullanılmaktadır. Nitrifikasyona uğramış sularda genelde karbon düşük miktarlardadır. Bu yüzden dışarıdan karbon

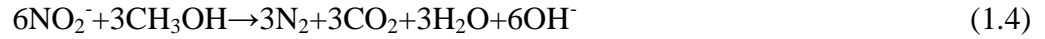
ilave etmek gerekebilir. Karbon kaynağı olarak genellikle metanol ve diğer bazı organik bileşikler kullanılır.

Karbon kaynağı olarak metanolün kullanıldığı ayrı bölmede gerçekleştirilen denitrifikasyon prosesinin sitokiyometrisi aşağıda izah edilmektedir.

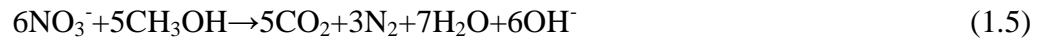
Enerji reaksiyonu birinci aşama;



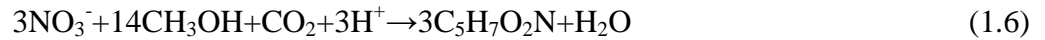
Enerji reaksiyonu ikinci aşama;



Toplam enerji reaksiyonu;

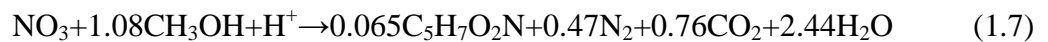


McCarty tarafından verilen tipik reaksiyon;



Uygulamada enerji için gereken metanol miktarının %25 ila %30'u sentez için gereklidir. Mc Carty deneysel laboratuvar çalışmalarını esas alarak toplam nitrat giderim reaksiyonu tanımlamak için aşağıdaki deneysel formülü geliştirmiştir.

Toplam nitrat giderim reaksiyonu;



Şayet tüm azot nitrat formunda ise toplam metanol gereksinimi reaksiyon 1.6 dan hesaplanabilir. Ancak denitrifikasyonun gerçekleşeceği atık su nitrit ve çözülmüş oksijen içerebilir. Nitratın, nitritin ve çözülmüş oksijenin mevcut olduğu yerde, metanol gereksinimi aşağıda deneysel olarak elde edilen formül kullanılmak suretiyle hesaplanabilir. (Metcalf ve Eddy,1991).

$$C_m = 2.47N_o + 1.53N_1 + 0.87D_o$$

C_m = gereken metanol konsantrasyonu, mg/L

N_o =başlangıç nitrat azotu konsantrasyonu, mg/L

N_1 =başlangıç nitrit azotu konsantrasyonu, mg/L

D_o =başlangıç çözülmüş oksijen konsantrasyonu, mg/L

Çoğu araştırmacı belirli bölgedeki azot miktarıyla ilgilenirken, bu değişimi yaratan mekanizmalarla ilgilenmezler. Mikrobiyologlar ise daha çok bu süreçte yer alan mikroorganizmaların bu olayı nasıl gerçekleştirdiğini araştırırlar. Bu nedenle, yanlış anlamaları ortadan kaldırmada ve bu mekanizmayı vurgulamada solunumsal denitrifikasyon terimi kullanılır (Mahne ve Tiedje, 1995).

Nitratı nitrite indirgeyen iki farklı redüksiyon yolu vardır

1-özümsel (asimilatif) nitrat redüksiyonu

2-özümsel olmayan (disimilatif) nitrat redüksiyonu

1.2.2.1.Özümsel Nitrat Redüksiyonu

Azot kaynağı olarak amonyağın, nitrattan daha az olduğu ortamlarda nitratın amonyağa dönüştürülmesi olayıdır. Bu yol prokaryotik canlılarda olduğu gibi ökaryotik organizmalarda da bulunur. Organik azot metabolizmasının başlangıcıdır (Kuenen ve Robertson ,1988).

Fungus olan *Aspergillus nidulans* ve *Neurospora crassa*'da , bakterilerden daha fazla nitrat özümlemesinden sorumlu enzimler elde edilmiştir. Fungal nitrat

özümlemesinin ilk adımı nitratın hücreye alınmasıdır. Nitratın *N. crassa* tarafından alınımı, ortamda nitrat yada nitrit fazla ise artar, pek çok amino asitle ve NH_4^+ iyonu ile baskılanır veya engellenir (Cole, 1988).

Özümsele nitrat redüksiyon sisteminden sorumlu gen grubu *nas* olarak adlandırılır. *Nas* enzim sistemi sitoplazmada yer almasından dolayı nitratın hücre içine taşınmasını gerektirir. Birçok bakterinin *nas* sisteminde nitrat, periplazmik bağlayıcı protein gerektiren ABC-tip taşıyıcı sistemle hücre içine alınır (Moreno-Vivian ve ark., 1999; Steenhout ve ark.,2001).

Özümsele nitrat redüktaz *Alcaligenes eutrophus*'da da bulunmuştur. Bu enzim nitratın bulunduğu amonyaksız ortamlarda sentezlenir. *Alcaligenes eutrophus*' da nitratın özümsemesi ve solunumu iki farklı enzim tarafından katalizlenir. Nitratın özümsemesinden özümsele nitrat redüktaz ve solunumdan da solunumsal nitrat redüktaz enzimi sorumludur. Bu iki enzimin genetik kökeni, hücredeki yeri, biyokimyasal ve düzenleyici özellikleri farklıdır.

1.2.2.2.Özümsele Olmayan Nitrat Redüksiyonu

N_2 oluşumunu sağlayan tam bir denitrifikasyon, nitrat redüksiyonuyla başlar. Denitrifikasyon bakterileri nitratı hücre içine aldığıında, nitrat son elektron alıcısı olarak solunum reaksiyonlarına katılır. Oksijensiz koşullarda meydana gelen bu reaksiyon, membrana bağlı (solunumsal) nitrat redüktaz tarafından katalizlenir. Bu enzimin haricinde periplazmada yer alan diğer enzimde (periplazmik nitrat redüktaz) nitratı nitrite indirgeyebilir (Knowles, 1982; Carter ve ark.,1995; Zumft 1997; Steenhoudt ve ark., 2001).

Özümsele olmayan nitrat redüktaz enzimleri daha çok *Escherichia coli* ve *Paracoccus denitrificans* üzerinde çalışılmıştır (Ballard 1988, Sears ve ark., 1993, Berks ve ark., 1995). Çok sayıda bakteri çözümlerinde özümsele nitrat redüktaz ve iki özümsele olmayan nitrat redüktazlardan (periplazmik ve solunumsal) birini yada daha fazlasını bulundurabilirler.

1.2.2.3.Denitrifikasyona Etki Eden Faktörler

- Karbon/azot konsantrasyonu
- Çözülmüş oksijen konsantrasyonu
- Sıcaklık
- pH.

1.2.2.3.1.Sıcaklık Etkisi

Biyolojik denitrifikasyonda sıcaklık önemli bir parametredir. Denitrifikasyon için sıcaklık sınırlarının 4-60 °C olduğu bulunmuştur. Bu sınırların dışındaki değerlerde denitrifikasyon gerçekleşmediği belirtilmiştir (Hiscock, 1991).

Aslan çalışmasında 20 °C de nitrat giderim oranının çok yüksek olduğu bulunmuştur. 22°C, 27°C ve 37°C 100mg/l nitrat tamamen giderildiği bulunmuştur. 22°C den daha düşük sıcaklıklarda nitrat giderim verimi %100 den %14'e düşmüştür. 5°C sıcaklıkta %1,1 gibi çok düşük nitrat giderim verimi elde edilmiştir.

Volokita ve ark. (1996), çalışmalarında 14 °C'deki nitrat gideriminin 32 °C'deki verime göre 1/3 oranında olduğunu ve nitrat giderme veriminin %99,9' dan %63' e düştüğünü ve yüksek konsantrasyonda nitrit birikimi belirlenmiştir.

1.2.2.3.(2).pH Etkisi

Biyolojik denitrifikasyonda nitratın azot gazına dönüştürülmesi sırasında alkalinite üretilmektedir. pH: 5-9 arasında nitrat giderilmesi sonucu ortam pH'ında artış gözlenirken, optimum pH aralığı dışında mikroorganizma inhibisyonu nedeniyle pH değişimi gözlenmektedir.

Delanghe ve ark. (1994), denitrifikasyon çalışmasında optimum pH 'ı 8 olarak belirlemesine rağmen Hiscock vd. daha düşük pH' larda çalışmışlardır (Delanghe ve ark.,1994). Wattanachira ve Fujita ile Till ve arkadaşları farklı Ph'larda yaptıkları çalışmada pH:6-9 aralığında nitrat gideriminde pH 'ın önemli olmadığını belirtmişlerdir (Wattanachira ve Fujita;1990; Till ve ark.,1998). Vander Hoek ve Klapwizk pH' 9 da nitrat gideriminde inhibisyon etkisi olmadığını belirtmişlerdir (Vander Hoek ve Klapwisk, 1987). pH 4,5 altında mikroorganizma aktivitesi engellenmekte, nitrat giderimi % 10 a düştüğü saptanmıştır.

1.2.2.3.(3).C/N Konsantrasyonunun Etkisi

Biyolojik denitrifikasyon verimini arttırmak için uygun karbon kaybon kaynağı seçimi çok önemlidir (Metaju,1992).

Optimum C/N , maksimum nitrat giderimi minimum kalıntı organik karbon ve nitritin bulunduğu oran olarak belirtilmiştir.

Aslan ve Turkmen (2003), kesikli deney çalışmalarında nitrat konsantasyonu 100mg/L de sabit tutularak C/N oranı 0.3-3 aralığı için çalışılmıştır. Kesikli çalışmada en uygun C/N oranını 1.35 olarak bulmuşlardır. Optimum C/N oranı için ortamda mikrobiyal faaliyet için yeterli karbon kaynağı olmaması sonucu nitrat giderim veriminin % 80 den daha düşük gerçekleşmiştir.

C/N oranı 1 olduğu zaman nitrat giderme verimi % 70 olarak belirlenmiştir.

Dalange (1994), yaptığı çalışmada optimal C/N oranını 1.35 olarak bulmuştur.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Vuoriranta ve ark. (1993), yaptıkları çalışmada pilot ölçekli aktif çamur sisteminin organik madde ve azot giderim verimini araştırmışlardır. En iyi sonuçlar 24 saatlik döngüde ve 6 saatlik anoksik periyotta elde edilmiştir. Nitrifikasyonun 13⁰C de tamamlandığını ve maksimum toplam azot ve BOI₇ gideriminin sırasıyla %80 ve %94 olduğu belirtilmiştir.

Baumann ve ark. (1996), aerobik ve anaerobik durumlar altında *Paracoccus denitrificans* 'ın denitrifikasyon aktivitesi meydana gelecek artışlar ve azalışları yaptıkları bu çalışmada göstermişlerdir. *Paracoccus denitrificans*'ın denitrifikasyon aktiviteleri nitrit, nitrit oksid, nitroz oksid, ve dinitrojen gibi denitrifikasyon ürünlerinin oluşumlarının ölçülmesiyle gösterilmiştir. Nitrat, nitrit, nitroz oksid reduktaz enzim konsantrasyonlarının temel alındığı moleküler düzeyde tespitler yapılmış ve mRNA düzeylerinin bağımsız denitrifikasyon enzimlerinde 45 kat yükseldiği çalışma sonunda tespit edilmiştir.

Rensink ve ark. (1997), çökeltmiş atık suların pilot bir sistemde biyolojik azot giderimini araştırılmışlardır. Bu sistem, sırasıyla anaerobik, aerobik, anoksik ve aerobik olmak üzere dört bölgeden meydana gelmekte ve "Renphosystem" adıyla anılmaktadır. Aerobik bölgede nitrifikasyon, anaerobik bölgede ise denitrifikasyon gerçekleşmektedir. Başlangıç olarak nitrifikasyonun tamamlanması için aktif çamur havuzuna düşük yük verilmiştir. Sistemin sırasıyla anoksik ve aerobik bölgelerinden sonra yüksek nitrat giderimi elde edilmiştir. Bu proseste 4 safhadan geçen atık su çıkışında fosfor(P) ve azot (N) konsantrasyonu sırasıyla 0,4 ve 2 mg/L olarak elde edilmiştir. Çalışmanın sonunda sırasıyla azot(N) ve fosforda(P) %87 ve %98'e varan giderim verileri elde edilmiştir.

Pai ve ark. (1998), Taiwandaki bir pirinç tarlasından izole ettiği 3 denitrifikant bakterinin aerobik ve anaerobik koşullar altında nitratı nitrojen gazına dönüştürme kapasiteleri incelenmiştir. Çalışan bu üç bakteriden ikisi DCB-T23 ve T25 çözünmüş oksijen varlığından etkilenirken diğer suş olan DCB-T6'nın etkilenmediği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışılan bakterilerin denitrifikasyon potansiyeli tamamen havalandırma sağlanan atık su arıtma sistemlerindeki aktif çamura eklenerek ölçülmüştür. T6 suşundan denitrifikasyon başarısında 360 mg N/g düzeyinde ölçülmüştür.

Intrasungka (1999), yüksek tuzluluk içeren deniz ürünleri endüstrisi arıtma tesisinden alınan atık suda, laboratuvar ölçekli ardışık kesikli reaktörler kullanarak nutrient giderimi üzerine çalışmıştır. Tuzluluğun etkisini belirlemek amacıyla sistem başlangıçta düşük tuzlulukta işletilmiş, tuzluluk oranı kademeli olarak artırılmıştır. Araştırma sonucunda tuzluluk oranı düşük durumda (%0,3-%2 NaCl) yüksek verimde nitruent giderimi gözlemlenmiş ancak tuzluluk oranı % 5 NaCl'e yükselince verim belirgin şekilde azalmıştır.

Wang ve Lee (2000), acrylonitrile-butadiene reçineli atık sulardan acrylonitrili substrat gibi kullanan bakteriler izole edildi ve idendifikasyonu yapıldı. Acrylonitrilin farklı konsantrasyonları ele alınarak denitrifikasyon bakterilerinin performansları anoksik durumlar altında araştırıldı. Sonuçlar denitrifikant bakteriler 7 türün acrylonitril ve acrylic asiti bir substrat gibi kullandığı bulundu. Bu türlerden *Acidovorax facilis* B ve *Pseudomonas nautica* denitrifikasyon için 279 mg/L acrylonitril'i bir substrat gibi kullandığı bulunmuştur. Bu türler 1 mg nitrat gideriminde 0,64-0,74 mg acrylonitrile yada 0,87-1 mg acrylic asite ihtiyaçları olduğu bulunmuştur. Çünkü bu türler denitrifikasyon için acrylonitrili bir substrat gibi kullanmaktadır. Ayrıca bu türlerin akışkan yataklı karbon reaktörlerinde acrylonitril kaynaklı suların arıtımında büyük rol oynadığı bulunmuştur.

Cao ve ark. (2001), tarafından yapılan bir çalışmada biyodenitrifikasyona etki eden faktörler olan nitrifikant bakterilerin denitrifikant bakteri oranı, organik karbon kaynağı, pH, sıcaklık, alkalinite ve çözülmüş oksijen miktarı araştırıldı. Deneysel sonuçlar, nitrifikant bakterilerin denitrifikantlara oranı 1,5-1 ve 3,6-1 olduğunda, sıcaklığın 30⁰C, pH'ın 8,2, çözülmüş oksijen miktarının 2-6 mg/L karbon kaynağı olarak metanol kullanıldığında denitrifikasyonun en verimli şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir.

Khan ve Hiraishi (2001) poly 3-hydroxybutyrate(PHB) ve poly 3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV)'nin aerobik ve anaerobik parçalanma kabiliyetine sahip yeni bir denitrifikant kemoorganotrofik bir bakteri aktif çamurdan izole edildi. Bu yeni izolatın 16S lik rRNA sequens dayanan filogenetik analiz sonucunda Proteobacteriaların alt sınıfına ait olduğu saptanmıştır. Karbon kaynağı olarak 3-Hydroxybutyrate, PHB, PHBV' i kullanarak gerçekleştirdiği denitrifikasyonda nitratı hiç nitrit ve nitrozoksid birikimi olmaksızın azot gazına indirgediği bulunmuştur. PHBV 'nin farklı oranlarıyla denitrifikasyonun kinetik analizleri 0.7 gram PHBV'nin 1 gram nitratı indirgediği bulunmuştur. PHBV'nin elektron alıcısı olarak kullanıldığında yüksek oranda denitrifikasyon gerçekleştiği bulunmuştur.

Mekonen ve Kumar (2001), yaptıkları bir çalışmada yüksek miktarda nitrat içeren içme sularının denitrifikasyonu için kullanılan seri reaktörlerin verimini incelediler. Nitrat konsantrasyonunu istenilen değerlere düşürmek için (<10mg/L), COD/N oranı 2 olacak şekilde etanol gerektiğini söyleyen araştırmacılar, reaksiyonun ilk 6 dakikasında başlangıçtaki nitrat konsantrasyonunun artışına paralel olarak nitrit birikiminin de attığını gözlediler. Çalışma sonuçlarına göre birinci saat nitrat uzaklaştırılması %85,7-91,5 yüksek değerler arasındadır. İstenilen nitrit ve nitrat değerlerine ulaşmak için anoksik reaksiyon süresi nitrat konsantrasyonlarının 40, 160 ve 250 mg/L değerlerine göre sırasıyla 3,5 ve 7 saattir. Denitrifike edilmiş su düşürülen her bir mg nitrat başına 3,53 mg CaCO₃ içermektedir ve pH değeri 7,3'ten 8,9'a artmaktadır. Operasyon döngüleri arasında boş geçen zamanların (1-14 saat) denitrifikasyon üzerine bir etkisi bulunmamaktadır. İşlemleri bitmiş sudaki COD konsantrasyonları arasındaki fark 5-15 mg/L ve sülfür konsantrasyonları ise 0,2-0,4 mg/L olarak bulunmuştur. İçme sularında yükseltilmiş COD konsantrasyonlarının genellikle önerilmeyeceği, ayrıca bu yöntemde suda toksik sülfid oluşumunun engellenemeyeceği belirtilerek işlenen suyun daha iyi duruma getirilmesi için ilave çalışmalara ihtiyaç duyulduğu ifade edilmiştir.

Zhou ve ark. (2001), yaptıkları bir çalışmada *Fusarium oxysporium*'un oksijen sağlama ve denitrifikasyon aktiviteleri arasındaki kantitatif benzerli incelenmiştir. Bakteriler tarafından gerçekleştirilen denitrifikasyon O₂ tarafından engellenmesine rağmen, mantarların verimli denitrifikasyonları için minimal miktarda O₂ gerekli olduğu saptanmıştır.

Gomez ve ark. (2002), azot giderici daldırmalı filtre kullanarak yüzey sularından nitrat giderimi üzerine çözünmüş oksijen konsantrasyonunun etkisini araştırdılar. Tek yönlü daldırmalı filtre yöntemi, nitratça kirlenen yüzey sularını biyolojik olarak arıtmak için kullanılmıştır. Prosesteki çözünmüş oksijenin etkisi etanol, metanol ve sükröz gibi karbon kaynakları kullanılarak test edilmiştir. İnorganik azot giderimi, biyofilm büyümesi, biyofilmdeki azot giderici bakteriler ve nitrat indirgeyici bakteriler incelenmiştir. Kullanılan elektron verici tipine göre, oksijen bulunması inorganik azot giderim verimini azaltmış ve arıtılmış sudaki nitrit konsantrasyonunu artırmıştır. Bu olumsuz etkilerin karbon kaynaklarına bağlı olduğu belirtilmiştir. Etanol ve metanol gibi alkollerle biyolojik azot gideriminin çözünmüş oksijenden, sükröze göre daha az etkilendikleri vurgulanmıştır. Bunlar elverişsiz bir inorganik azot giderimine ve arıtılmış suda nitrit bulunmasına ön ayak olmuşlardır. Bu etkilerin sükröz karbon kaynağı olarak kullanıldığında daha belirgin olduğu görülmüştür.

Matsuzaka ve ark. (2002), tarafından yapılan bir çalışmada içerisinde C ve N kaynağı olarak asetamid bulunan zenginleştirilmiş kültürlerden izole edilen heterotrofik nitrifikant bakteriler izole edildi. 21 tür tespit edildi. Basit bir prosedürle bu 21 türün oksijen varlığında denitrifikasyon yapma yeteneği incelendi. Bu nitrifikant bakterilerin birkaçının nitrit yoluyla denitrifikasyon yaptığı bulundu. Nitrifikasyon yapan bu bakterilerin oksijen toleransı gösteren denitrifikasyon sitemlerine sahip oldukları tespit edildi.

Szekeres ve ark. (2002), hidrojen bağımlı bir azot giderim sistemindeki bakteri nüfusu çalışılmıştır. Su, arıtım için biyoreaktöre girmeden önce hidrojen zenginleştirilmiştir. Sistem, içilebilir su arıtımı için tasarlanmış ve elektrokimyasal bir hücreden meydana gelmiştir. Biyoreaktörler (granüle aktif karbon ile doldurulan kolonlar) bir önceki reaktörden ayrılan azot giderici bakteri türleri ile aşılansın, aşılamanın hemen ardından ya da 1 veya 3 ay süreli çalışmadan sonra deneme yapılmıştır. Toplam bakteri sayısı ve farklı her bir bakteri türünün sayıları biyoreaktörün çeşitli safhalarında tayin edilerek çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Kimura ve ark. (2002), yüzey sularından nitrat giderimi için sülfür bazlı azot giderme ve membran ayırmanın birleştirildiği yeni bir metot önermişlerdir. Büyüme

hızları oldukça düşük olan ototrof azot gidericiler membran kullanılarak yüksek konsantrasyonda tutulabilmişlerdir. Önerilen bu yöntemin performansı laboratuarda uzun süreli deneylerle sentetik besleme suyu kullanılarak belirlenmiştir.

Shinoda ve ark. (2003), aerobik ve anaerobik şartlarda Toluen'i bir karbon ve enerji kaynağı olarak kullanan *Thaura* cinsi bakteri izole etmişlerdir. Bu bakteriden izole edilen ve oksijenli solunumda rol oynayan toluen dihidrojenaz enzimi ve anaerobik parçalanmada rol oynayan benzilsüksinat sentaz enziminin Northern Blot analizleri ve PCR analizleri yapılarak toluen parçalanmasındaki etkinlikleri araştırılmıştır.

Çelen ve Kılıç (2003), yaptıkları bir çalışmada tarım toprağından aerobik solunum yapan bakteriler izole ettiler. 60 izolattan 39'unun aerobik koşullarda nitratı nitrite indirgiyebildiği tespit edildi. 39 izolattan beşi aerobik nitrat reduksiyon aktivitesinin belirlenmesi için seçildi. Biyolojik olmayan elektron vericisi MV^+ kullanılarak beş izolattan dördünün periplazmik nitrat reduktaz aktivitesine sahip olduğu bulundu. Bu izolatların farklı azot kaynaklarında, aerobik koşullarda nitrit üretme özellikleri belirlendi. İzolatların nitratlı ortamda, amonyak +nitratlı ortama kıyasla kültürlerde yüksek seviyede nitrit biriktiği, azot kaynağı amonyak olan ortamda ise, izolatların hiçbirinin nitrit biriktirmediği gözlemlendi. Sonuç olarak, aerobik nitrat reduksiyonunda nitratla birlikte amonyakın varlığı yüksek seviyede nitrit birikimine neden olmamaktadır.

Karımıniaae-Hamedani ve ark. (2003), Japonyadaki Ariake denizinden denitrifikasyon yapan ASM 2-3 olarak adlandırılan bir bakteri suşu izole edilmiştir. Bu izolat 225 mg/L nitratı parçalama yeteneğine sahiptir. Biyokimyasal testler ve 16 S lik rRNA sequens analizleri sonucu bakterinin *pseudomonas stutzeri* türüne yakın olduğu belirlenmiştir. İzolatın nitratı parçalama etkisi *pseudomonas stutzeri* NBRC 14165 suşundan daha hızlı olduğu bulunmuştur. ASM 2-3 suşunun %10 NaCl içeren besiyerinde bile yetiştikleri bulunmuştur. Ayrıca bu suşun nitrat ve nitrit reduksiyonundan sorumlu enziminin aktivitesinin kontrol suşlarından daha hızlı olduğu gösterilmiştir.

Lui ve ark. (2005), farklı mineral besiyerlerinde ve sentetik atık suda *Fusarium oxysporium* ve *Pseudomonas stutzeri*' nin saf ve karışık kültürleri tarafından gerçekleştirilen denitrifikasyon incelenmiş ve *F.oxysporium* ve *P.stutzeri*' nin tarafından hızlı bir N₂ gazı oluşumu olduğu gözlemiştir. Karışık kültürlerin denitrifikasyon başarısının saf kültürlerle göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Karışık kültürlerin 6 günlük inkübasyondan sonra ortamdaki nitratı % 87' sini giderdiği bulunmuştur. Daha sonraki denitrifikasyon testlerinde kabuk interaksiyonunun denitrifikasyon üzerine etkisine bakılmış ve bu karışık kültürlerin kabuk bulunan ortamda 36 saatte 1.0 mmol NO₃'dan 442 mikromolar N₂ üretildiği bulunmuştur. Bu sonuçlar, kabuğun denitrifikasyon için uygun bir mikroçevre sağladığını açıkça göstermektedir.

Franco ve ark. (2005), anoksik USB reaktörü uygulamasıyla elde edilecek verimi incelenmişlerdir. 3 tane 0.8 L lik reaktörlerden 2 tanesi darbeli akım şeklinde çalışılmış bunlardan birincisi (P1) çıkışı resikle edilmiş, ikincisinin çıkışı geri döndürülmemiştir(P2). Her üç reaktörde de glikoz ve NaNO₃ karışımıyla beslenmiş olup metanojenik granüller çamurla aşılmıştır. Organik yük ve azot yükü giderek artırılmış ve çalışmanın sonunda ekstrem yüksek düzeylere çıkılmıştır. Darbesiz çalıştırılan reaktörlerde özellikle olgunlaşma devresinde amonyak ve nitrit birikimi denitrifikasyon verimini % 90 azaltacak kadar önemli etki yaparken darbeli çalışan P1 reaktörlerinde son derece düşük nitrit düzeyleri saptanmıştır.P2 reaktörlerinde ise azot giderimi büyük ölçüde olmuştur. Kısacası darbesiz reaktörlerde darbelilere göre daha yüksek oranda denitrifikasyon gözlenmiştir.

Cyplik ve ark. (2006), bu çalışmada halofilik mikroorganizmaların denitrifikasyon yetenekleri araştırılmıştır. Bu halofilik mikroorganizmaların denitrifikasyon yeteneklerini belirlemek için besiyerine potasyum (P), magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca) gibi makro elementler ve bunlara ek olarak demir(Fe), bakır(Cu), molibden(Mo) mikroelementler eklenerek çeşitli besiyeri ortamları hazırlanmıştır. Bu bakterilerin gelişimi için optimal pH, sıcaklık, NaCl konsantrasyonu belirlenmiş ve en iyi gelişme ortamları sağlanmıştır.

Tavares ve ark. (2006), Denitrifikasyon yada disimilatif nitrat redüksiyonu bazı bakteriler tarafından enerji üretimi için kullanılan anaerobik bir prostestir. Çevre problemlerinden biri olan ziraatta suni gübre kullanımındaki artış nitrat birikimine neden olur. Bu çevre problemi sonucu oluşan nitrat birikiminin gideriminde denitrifikasyon önemli rol oynadığı bulmuşlar ve nitratı nitrojen gazına indirgenmesi 4 durumda 4 farklı metalloenzim tarafından gerçekleştirildiği bulundu. Bu enzimler nitratı nitrite sonra nitrik okside ve son olarak da nitrojene indirgediği bulunmuştur.

Vasiliadou ve ark. (2006), tarafından yapılan çalışmada karışık kültürlerle bir grup denemede hidrojenotrofik denitrifikasyon prosesleri incelenmiştir. Çeşitli nitrat konsantrasyonlarında içme sularının hidrojenotrofik denitrifikasyonu için kültürlerin performansı incelenmiştir.

3.MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1.Kimyasal Oksijen İhtiyacı Testi (KOI) Sırasında Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amonyum demir (II) sülfat çözeltisi; $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4).6\text{H}_2\text{O}$; 42 gram amonyum demir (II) sülfat tartılır ve üzerine 20 mL konsantre sülfirik asit konarak saf su ile 1 litreye tamamlanır. Elde edilen çözelti 0.1 N'den biraz daha kuvvetli amonyum demir (II) sülfat çözeltisidir. Çok düşük konsantasyonlardaki KOI değerini daha hassas bulabilmek için, litrede 10 g amonyum demir (II) sülfat bulunan 0,025 N'lik çözelti kullanılmaktadır.

Ferroin indikatörü; 1,735 gram 1-10 phenontralin monohyrate eriyiğine, 0,695 gram $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ilave edilip 25 ml saf suda çözülür ve 100 mL' ye tamamlanır.

Potasyumdikromat çözeltisi ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)(Merck); 12,26 gr potasyumdikromat tartılarak saf su ile 1 litreye tamamlanır. Bu çözelti 0,25 N'dir. 0,05 N çözelti hazırlamak için 2,452 gram potasyumdikromat tartılarak 1 litreye tamamlanır.

Gümüşsülfatlı sülfirik asit çözeltisi; 10 gram gümüş sülfat (Ag_2SO_4)tartılır. 1 litre konsantre sülfirik asit (H_2SO_4) içerisinde çözdürülür.

Civa sülfat (HgSO_4)(Merck)

3.1.1.2.Biyokimyasal Testlerde Kullanılan Çözeltiler

3.1.1.2.1.Kovaks Çözeltisi : İndol testi için kullanılır (Çetin, 1968).

Para-Dimetil Aminobenzaldehit	5g
Amil veya Butil Alkol	75 mL
%37'lik HCL	25 mL

3.1.1.2.2.Metil Kırmızısı Solüsyonu: Metil kırmızısı pH 4,4 de kırmızı, 6.2 de sarıdır. Metil kırmızısı testi için kullanılır (Çetin, 1968).

Metil kırmızısı	0,2 g
Alkol(%95)	50mL
Damıtık su	50mL

3.1.2 Kullanılan Besiyerleri

3.1.2.1 Biyokimyasal Testlerde Kullanılan Besiyerleri

3.1.2.1.(1) Jeloz Besiyeri: Bakterilerin ilk izolasyonlarında ve saf kültür olarak seçilmiş stok kültürlerin hazırlanmasında kullanılmıştır (Çetin, 1968).

Bileşimi	(g\L)
Pepton	10
Et özütü	10
NaCl	5
Agar	1

3.1.2.1.(2).N₁ Besiyeri : Saf kültür olarak seçilmiş bakteri suşlarının çoğalması amacıyla kullanılmıştır (Anonymous,1978).

Bileşimi	(g\L)
Pepton	10
Et özütü	10
Maya özütü	5
Glukoz	1
Agar	15

3.1.2.1.(3).İndol Besiyeri : Ucucu indolün oluşumunu gözlemek amacıyla kullanılmış (MacFaddin, 2000).

Bileşimi	(g\L)
Pepton	20
NaCl	5
Triptofan	10

3.1.2.1.(4).Jelatin Besiyeri: Jelatinin hidrolizini belirlemek amacıyla yapılmıştır (MacFaddin, 2000).

Bileşimi	(g\L)
Pepton	10
Et özütü	10
NaCl	5
Jelatin	120

3.1.2.1.(5).Nişasta Agar : Bu besiyeri organizmanın amilaz enzimine sahip olup olmadığını bulmak için kullanılır (Anonymous,1978).

Bileşimi	(g\L)
Pepton	5
Et özütü	3
NaCl	5
Nişasta	2
Agar	20

3.1.2.1.(6).Üre Agar: Bakterilerin üreyi hidrolize etme yeteneğini belirlemek için kullanılmıştır (MacFaddin, 2000).

Bileşimi	(g\L)
Pepton	1
NaCl	5
Üre	20
KH ₂ PO ₄	0,9
D(+) Glukoz	1
Fenol kırmızısı	0,012
Agar	15

3.1.2.1.(7).Endo_C Agar: Bu besiyeri gram(-) bakteriler için selektif bir besiyeridir (Çetin, 1968).

Bileşimi	(g\L)
Pepton	10
Laktoz	10
Na ₂ SO ₃	2,5
Bazik fuksin	0,04
K ₂ HPO ₄	3,5
Agar	12,5

3.1.2.1.(8).SIM Agar: Bakterilerin hareketliliğini belirlemede ve H₂S oluşumunu belirlemede kullanılan besiyeridir (MacFaddin, 2000).

Bileşimi	(g\L)
Kazein peptonu	20
Et peptonu	6
Amonyum Fe(III) sitrat	0,2
Na-tiyosülfat	0,2
Agar	3

3.1.2.1.(9).Clark-Lups Besiyeri: Bakteri identifikasyonunda metil kırmızı testi için kullanılmıştır (Çetin ,1968).

Bileşimi	(g\L)
Pepton	7
Glukoz	5
K ₂ HPO ₄	5

3.1.2.2.Bakterilerin Denitrifikasyon Yeteneğini Belirlemede Kullanılan Besiyerleri

3.1.2.2.(1).DM Besiyeri: Bu besiyeri denitrifikasyon yapan bakterilerin izolasyonu amacıyla kullanılmıştır. Bu besiyeri saf su ile çözünerek içine iz element solüsyonundan 2 ml ilave edilir. pH 7'ye ayarlanır (Robertson ve Kuenen, 1988). (İz element solüsyonu(mg/L): EDTA, 5; ZnSO₄, 2.2; CaCl₂, 5.5; MnCl₄H₂O, 5.06; FeSO₄.7H₂O, 5; CuSO₄.5H₂O, 1,57)

Bileşimi	(g\L)
Succinate	1
KNO ₃	1
Na ₂ HPO ₄	0,79
NH ₄ Cl	0,15
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3

3.1.2.2.(2).GN Besiyeri: Bu besiyeri bakterilerin denitrifikasyon aktivitesini belirlemek amacıyla kullanılır. Besiyeri saf su içinde çözülerek pH 7' ye ayarlanır (Alexcander, 1965).

Bileşimi	(g\L)
NaNO ₃	0,06
L-asparagine.H ₂ O	1
Na citrate	8,5
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,02
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,05

5 ml Brom Tymol mavisinin % 1'lik alkolik solüsyonun

3.1.2.2.(3).NN Besiyeri: Bu besiyeri bakterilerin gaz oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde kullanılır (Alexander,1965).

Bileşimi	(g\L)
NaNO ₃	0,06
Glukoz	10
Pepton	10
MGSO ₄ .7H ₂ O	0,1
K ₂ HPO ₄	2
Yeast Extract	1

3.1.3. Kullanılan Yapay Atık Su İçerikleri

3.1.3.1.Melashlı Atık Su

Bileşimi	(g\L)
Üre	0,36
KH ₂ PO ₄	0,12
Melas	6

3.1.3.2.NO₃ İçerikli Atık Su

Bileşimi	(g\L)
Succinat	2,5
KNO ₃	3,75
NH ₄ Cl	0,25
Na ₂ HPO ₄	0,028
KH ₂ PO ₄	0,0074
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,025
NaHCO ₃	0,68

3.2. Metot

Bu çalışmada damlatma kulesi şeklinde çalışan yaklaşık 1L hacimli alttan beslemeli bir arıtma tesisi modeli hazırlanmıştır.

Bu tesise verilmek üzere yapay atık su hazırlanmıştır. Atık suda fosfor kaynağı olarak potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), azot kaynağı olarak üre (H_2NCONH_2) ve karbon kaynağı olarak ise melas kullanılmıştır ve tesis yapay atık suyla 2 ay boyunca sürekli beslenmiştir.

Atık suyun tesise verilmesi ayarlanabilir dozaj pompasıyla sağlanmıştır. Pompa tesise, atık suyu 2 saatlik sürede 7,5-8 litre verebilecek debiyle çalışmaktadır. Tesisin alttan havalandırılmasını sağlamak amacıyla akvaryum tipi difüzör kullanılmıştır.

Tesiste oluşan biyomasın tutunması için dolgu materyali kullanılmıştır ve bunun üzerinde gelişen biyofilmin çeşitli katmanlarından homojenizasyon yardımıyla elde edilen flora elemanları arasından rastgele seçilen bakterilerden saf kültür hazırlanmıştır.

Bu bakterilerin içinden denitrifikasyon yeteneği olana bakteriler belirlenmiştir. Biyokimyasal testler ve VİTEK 2 sonuçlarına göre bakterilerin tür seviyesinde idenfikasyonları yapılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında içi 2-3 mm çaplı cam boncuklarla doldurulmuş 500 mL hacimli silindirik bir reaktör hazırlanmıştır. Yan taraftan girilen reaktörün besleme ucu tabana yerleştirilmiş ve nitrat içeren yapay atık su ile 2 günde bir 100 mL verilerek denitrifikant floranın dolgu materyali üzerinde gelişmesi sağlanmıştır. Bu süre sonunda giriş ve çıkış nitrat azotu ölçümlerine başlanmıştır. Saf kültür şeklinde ürettiğimiz bakterilerden 100 mL atık suyla resüspanse edilerek tesise verilmiş ve çıkış suyu nitrat azotu ölçülerek normal denitrifikasyon düzeyine göre sağlanan başarı araştırılmıştır.

3.2.1 Bakteri İzolasyonu

Atık sudan alınan biyofilm örneklerinden nitrifikant ve denitrifikant bakteriler için selektif bir besiyeri olan DM besiyerine ekim yapılarak bakterilerin gelişimi sağlanmıştır. Bunun içinde 50 mL besiyeri bulunan 250 mL lik erlenlere biyofilm örneklerinden özeyle alınarak ekim yapılmıştır. Örnekler 30⁰C de 220 rpm de orbital çarkalıyıcıda bir hafta boyunca inkübe edilmiştir. Bir hafta sonunda besiyerinde bulanıklaşma oldu yani bakteri gelişimi sağlanmıştır. Bu örneklerden seri sulandırma yapılarak 10⁻²,10⁻⁴,10⁻⁶ lık sulandırmalardan içinde N1 besiyeri bulunan petrilere yayma ekim yapılarak bakterilerin tek koloni şeklinde düşmeleri sağlanmıştır Besiyerinde farklı görünen 50 koloni seçilip bunlardan tek tek pasaj yapılmıştır.

3.2.2.Atık Sudan İzole Edilen Bakterilerin Denitrifikasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

Laboratuvar ölçekli atık su arıtma tesisinden izole edilen bakterilerin denitrifikasyon yeteneğinin araştırılması için Giltay and Nitrat (GN) medium besiyeri kullanılmıştır. 5mL GN besiyeri içeren test tüpleri hazırlanmış ve tüplerin içine durham tüpü konmuştur. Arıtma tesisinden izole edilen 50 bakteri süşunun test tüplerine ekimi yapılmış ve örnekler 30⁰C 220 rpm de orbital çalkalayıcı da inkübe edilmiştir. Denitrifikasyon yapan bakteriler bu besiyerinde bulunan nitratı parçaladığında nitrat (NO₃), azot gazına (N₂) dönüştüğü için ortamdan H⁺ uzaklaşır ve pH yükselir. Ortamın pH'ı yükseldiğinde, besiyerinde bulunan brom timol mavisinin yeşilden maviye dönmesi ve durham tüplerinin içinde kabarcık oluşması pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Daha sonra denitrifikasyon yeteneği olduğu düşünülen bu bakterilerin Nitrat Nitruent (NN) besiyerine ekimi yapılmıştır. Bu besiyeri bakterilerin denitrifikasyon sonucu oluşturduğu azot gazını belirlemek için kullanılmıştır. 5 mL NN besiyeri içeren tüpler hazırlanmıştır ve tüpleri içine durham tüpü konmuştur. GN besiyerini maviye dönüştüren bakteri örneklerinden ekim yapılmıştır. Örnekler 30⁰C de 24 saat inkübe edilmiştir İnkübasyon sonucu test tüplerinde gaz oluşturan bakteri örnekleri

pozitif olarak değerlendirilmiştir. NN besiyerindeki nitrat miktarı nitrat testi ile belirlendi. Böylece durham tüplerindeki gazın azot gazı olduğu tespit edilmiştir.

3.2.3.Denitrifikasyon Yapan Bakterilerin Denitrifikasyon Başarılarının Belirlenmesi

1- Nitrat içerikli yapay atık su hazırlanarak 100 mL lik şişelere 50 mL konmuştur. Bu şişelere denitrifikasyon gerçekleştirdiği bulunan bakteri stoklarından ekim yapılmıştır. Örnekler 30⁰C de 220 rpm de orbital çarkalayıcı da 15 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra yapay atık suyun nitrat miktarı ve KOI ölçülerek bakterilerin denitrifikasyon başarıları ölçülmüştür.

2-Yine laboratuvar boyutlarında hazırlanan homojen karışım ve sabit yataklı bir denitrifikasyon kulesi modeli biçiminde kurulan denitrifikasyon prosesinde denitrifikasyon yapan bakterilerin denitrifikasyon verimleri NO₃ giderimi verileri ölçülerek belirlenmiştir.

3.2.4.Yapılan Testler

3.2.4.1.KOI (Kimyasal Oksijen İhtiyacı) Testi

Leithe (1970) metoduna göre yapılmıştır. Laboratuvar da yapay olarak hazırlanmış atık su, kirlilik yüklerindeki değişime bağlı olarak belirli oranlarda sulandırılarak, çıkış suyu ise yarım saat santifüj edildikten sonra sulandırılmadan kullanılmıştır Alınan 20 mililitrelik su örneği 500 milimetrelik rodajlı balona konmuştur.

Kaynamanın daha iyi olması için balon içine kaynama taşı veya iki ucu açık cam parçaları atılmıştır. Örneğin üzerine 0,4 gram HgSO₄ konulmuş ve 0.25 N'lik K₂Cr₂O₇ çözeltilisinden 10 ml ilave edilmiştir.

Karışıma litresinde 10 gram AgSO₄ bulunan H₂SO₄ çözeltilisinden 40 mL yavaş yavaş balona karıştırılarak ilave edilmiştir. Balon mantolu ısıtıcıya yerleştirilerek

geri soğutucu sistem takılmıştır. Örnek kaynamaya başladıktan sonra 10 dakika süreyle kaynatma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bu sürenin sonunda geri soğutucunun ağzından balona 100 mL saf su ilave edilmiştir. Balon geri soğutucudan çıkarılır ve ağzına su kaçırmadan çeşme suyuyla iyice soğutulur. Balon geri soğutucudan çıkartılır ve ağzına su kaçırmadan çeşme suyuyla soğutulur. Balon içine manyetik karıştırıcı balık atılır ve o karışırken kör için ne kadar ferroin indikatörü damlatılmışsa o kadar ferroin indikatörü örnek içine damlatılır. 0.1 N' lik amonyum demir (II)sülfat ile titrasyon işlemine başlanır. Titrasyon sırasında sırası ile sarı, yeşil, yeşil-mavi, cam göbeği mavisi ve kırmızı renk değişimi gözlenmektedir.(Höll, 1979)

KOI Testinin Hesaplanması

$$(A-B)0.1*400*h =mg \text{ KOI/lt}$$

A=Kör için kullanılan amonyum demir (II) sülfat

B= Örnek için kullanılan amonyum demir (II) sülfat

0.1= Amonyum demir (II) sülfatın normalitesi

400= Sabit sayı

h=sulandırma katsayısı

3.2.4.2.Nitrat Testi

10 mL su örneğine 30-50 mg amidosülfonikasit katarak çalkalanır. pH: 2-3 arasında olmalıdır. Daha yüksekse sülfürik asitle pH' ı düşürülür. Çözelti hemen alevde kaynatıp soğumaya bırakılır. İçerisinde 150 mg\L daha yüksek nitrat bulunan örnekleri sulandırılır. Sıvı bulanıksa filtre edilir. Deney şişeleri su örneğiyle birkaç defa durulanır. Şişeler siyah plastik çerçeveye yerleştirilir. Okun gösterdiği tarafa kör konulur. Kör için hazırladığımız şişeye örnekten 5 mL koyulur. Test şişesine de hazırladığımız örnekten 5 mL koyulur. Sonra test şişesine ayıracın kapağına takılı mikro kaşıkla bir silme kaşık ayıraç test şişesine katılır, Şişe kapatılır ve 1dk süreyle çalkalanır, 5 dk dinlendirilir, her iki şişenin kapakları açılır. Kör ve test renk görüntüleri aynı oluncaya kadar ok yönünde tablo üzerinde kaydırma yapılır.

3.2.4.3.Denitrifikasyon Yeteneğini Belirleme Metodu

1. Laboratuvar ölçekli kurulan atık su arıtma tesisinden izole edilen bakteriler denitrifikasyon yapan bakterilerin geliştiği selektif besiyeri olan DM besiyerine ekim yapılmıştır.

2. Bu besiyerinden izole edilen bakterilerin denitrifikasyon yeteneğinin araştırılması için Giltay and nitrat (GN) mediuma ekim yapılmıştır Denitrifikasyon yapan bakteriler bu besiyerinde bulunan nitratı parçaladığında ortamın pH' ı yükseleceğinden besiyerinde bulunan brom timol mavisi yeşilden maviye dönmesi ve durham tüplerinin içinde kabarcık oluşması pozitif olarak değerlendirilmiştir

3. Daha sonra denitrifikasyon yeteneği olduğu düşünülen bu bakteriler Nitrat Nitruent (NN) besiyerine ekim yapılmıştır Bu besiyeri bakterilerin denitrifikasyon sonucu oluşturduğu azot gazını belirlemek için kullanılmıştır. Durham tüpü bulunan tüpler içinde bulunan besiyerine ekilen bu bakterilerden durham tüpünde gaz oluşturanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

4. NN besiyerindeki nitrat miktarı nitrat testi ile belirlenmiştir.

3.2.4.4 Biyokimyasal Testler

3.2.4.4.(1).Katalaz testi

Bu test bazı mikroorganizmalarca sentezlenen katalaz enzimi saptamak amacıyla yapılır. Katalaz enzimi hidrojen peroksid'in (H_2O_2), su (H_2O) ve oksijene (O_2) parçalanmasından sorumlu enzimdir. Test, katı besiyeri ortamında büyütülmüş 24 saatlik kültürlerin üzerine % 3lük hidrojen peroksid damlatılır . kabarcık oluşturan bakteriler pozitif, kabarcık oluşturmayanlar ise negatif olarak değerlendirilir (MacFaddin,2000).

3.2.4.4.(2).Oksidaz Testi

Bu test mikroorganizmalarca sentezlenen oksidaz enzimini saptamak amacıyla kullanılır. Gram(-) aerobik ve fakültatif anarebik bakterilerin ayırt edilmesinde kullanılan önemli bir testir. Test, önce tetrametil diamin dihidroksiklorid çözeltisi 2-3 damla filtre kağıdına emdirilir, katı besiyeri ortamında büyütülmüş 24 saatlik kültürlerden özeyele bir miktar alınıp filtre kağıdı üzerine yayılır. Koyu mor bir renk oluşuyorsa pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Yani organizma bu enzimi üretiyor demektir (MacFaddin,2000).

3.2.4.4.(3).Jelatin Hidrolizi Testi

Bu test mikroorganizmaların, jelatini hidrolize eden jelatinaz enzim sentez yeteneğini ölçmede kullanılır. Test, jelatinli besiyeri yüksek tabakalı jeloz şeklinde tüplere hazırlanır, bakterilerin 24 saatlik kültürlerinden iğne özeyele dik olarak ekim yapılır. Tüpler 37 °C de 15 gün kadar inkübe edilir. Bu süre sonunda kontrollerle birlikte buz dolabına kaldırılır. Jelatinin hidrolize edildiği durumlarda, buzdolabından çıkarılınca, jelatinli ortamın sıvı halinde ve katılaşmadığı görülür. Bu pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Negatif durumlarda tüpteki sıvı jelatinli besi yeri katılaşır (Çetin,1978).

3.2.4.4.(4).Nişasta Hidroliz Testi

Bu test bir polisakkarit olan nişastanın bazı mikroorganizmalarca sentezlenen estrasellüler enzim olan amilaz enzimi tarafından hidrolizasyonunu ortaya koymak amacıyla yapılır. Test, nişastalı agar üzerine çizgi şeklinde ekim yapılır. 30°C de 24 saat üretilen bakteri kültürlerinden çizgi ekim yapılır. 30°C de 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonrası agarların üzeri lugol solusyonuyla kaplanır. 5 dakika sonra sonuçlar değerlendirilir Kolonilerin etrafında berrak veya renksiz bir bölge meydana gelmesi pozitif sonuç olarak, koloniler etrafında mavi bölge ise negatif olarak değerlendirilir (MacFaddin,2000).

3.2.4.4.(5).İndol Testi

Bu test mikroorganizmaların bir amino asit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirme yeteneğini belirlemek amacıyla yapılır. İçinde triptofan bulunan sıvı besiyeri 5 mL şeklinde tüplere hazırlanır. 30⁰C de 48 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonrası tüplerin üzerine kovaks ayracından 0,5 mL ilave edilip iyice karıştırılır. Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif olarak değerlendirilir. (MacFaddin,2000).

3.2.4.4.(6).Arjinin Hidroliz Testi

Bu test mikroorganizmaların arjinaz enzimiyle temel amino asitlerden arjinini hidrolize ederek amonyak oluşturmasını belirlemek amacıyla yapılır. Arjinin besiyeri 5 mL şeklinde tüplere hazırlanır. Bakterilerin 24 saatlik kültürlerinden batırma ekim yapıldı. 30 °C 4 gün inkübe edilir. İnkübasyon sonucu besiyerindeki fenol kırmızısı indikatörü kırmızıya dönmüşse sonuç pozitif olarak değerlendirilir. (MacFaddin,2000).

3.2.4.4.(7).H₂S Testi

Bu test mikroorganizmaların kükürt (sülfür) bulunan organik maddeleri parçalayarak veya bazı inorganik maddeleri (sülfatlar) redükte ederek hidrojen sülfid oluştururlar. Hidrojen sülfid oluşumunu gözlemek amacıyla SIM besiyerine bakterilerin 24 saatlik kültürlerinden batırma ekim şeklinde ekim yapılır. SIM besiyerinde ekim hattı boyunca siyah çizginin meydana gelmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilir (MacFaddin,2000).

3.2.4.4.(8). Metil Kırmızısı Testi

Bu test, bakterilerin glikozu fermente ederek organik asit oluşturma yeteneğini saptamak amacıyla kullanılmıştır. Tüpte hazırlanmış Clark-Lups besiyerine bakterilerin saf kültürlerinden alınan örnek özeyle ekilir ve beş gün boyunca 30 °C de 5 gün boyunca inkübe edilir. 5 gün sonra örneklerin üzerine metil kırmızısı soluyonundan 4-5 damla damlatılır. Metil kırmızısı solüsyonu damlatıldıktan sonra üste kırmızı halka meydana gelmesi pozitif, sarı halka meydana getirilmesi negatif olarak değerlendirilir (MacFaddin,2000).

3.2.4.4.(9).Hareket testi

Bu test bakterilerin besiyerindeki hareketliliklerini saptamak amacıyla, yumuşak tabakalı jeloz (%0.5 agar ihtiva eden) kullanılmıştır. Bakterilerin saf kültürlerinden alınan örnek, iğne özeyle batırma kültür şeklinde ekilmiş, 24 saat inkübe edilir Ekim çizgisi boyunca üremenin görülmesi hareketsizliği, ekim çizgisinden besiyerinin içine doğru yayılan üreme davranışı, bakterinin hareketli olduğunun kanıtıdır (Çetin, 1978).

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1.Bulgular

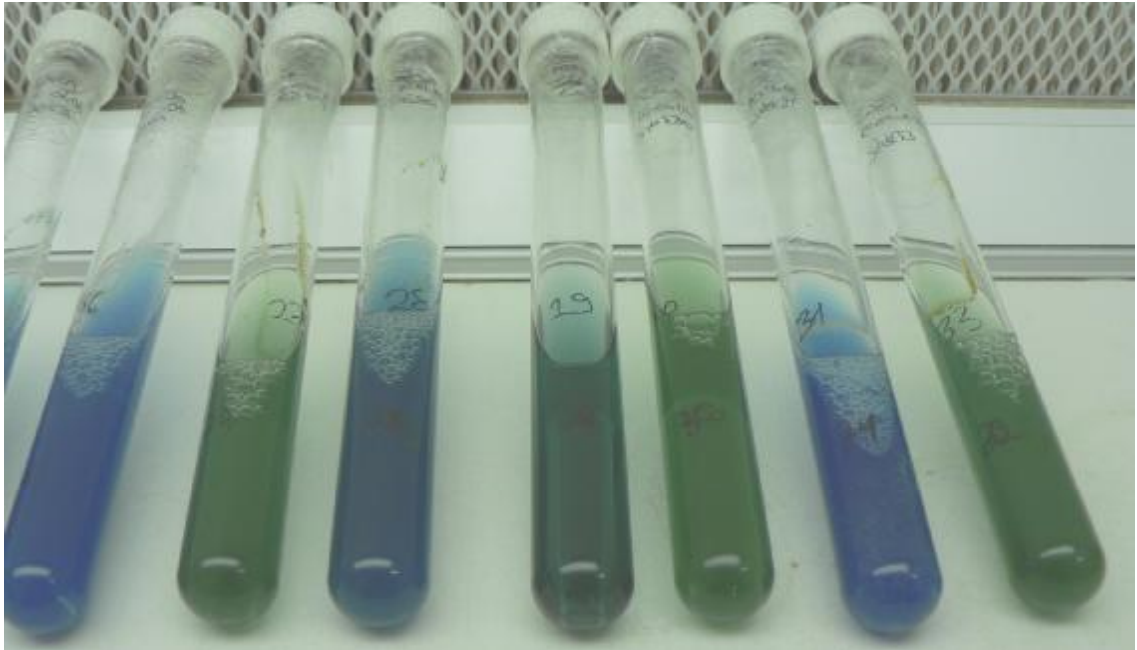
Bu çalışmada denitrifikasyon yapan bakterileri izole etmek için laboratuvar ölçekli atık su arıtma tesisi kurulmuş, belirli kirlilik yükü içeren yapay atık su verilerek biyofilm oluşumu sağlanmıştır. Bu biyofilm örneklerinden izole edilen bakterilerden denitrifikasyon yeteneğine sahip olanların belirlenmesi için denitrifikasyon testi sonuçları değerlendirilmiştir ve denitrifikasyon yeteneğine sahip olan bu bakterilerin denitrifikasyon başarıları değerlendirilmek için, nitrat giderimi ve KOI değerleri göz önüne alınmıştır.

4.1.1.Bakterilerin Denitrifikasyon Yeteneğinin Belirlenmesi

Laboratuvar ölçekli atık su arıtma tesisinden izole edilen bakterilerin denitrifikasyon yeteneğinin araştırılmasında GN “Giltay and Nitrat medium” besiyeri kullanılmıştır. Denitrifikasyon yapan bakteriler bu besiyerinde bulunan nitratı parçaladığında NO_3 , N_2 gazına dönüştüğü için ortamdan H^+ uzaklaşır ve pH yükselir. Ortamın pH' ı yükseldiğinden besiyerinde bulunan bromtimol mavisi yeşilden maviye döner. GN besiyerinde inkübasyonu takiben gözlenen renk değişimlerine ait bakteri suşları Çizelge 4.1 de ve aynı stoklarda meydana gelen renk değişimlerine ait görüntü şekil 4.1 de belirtilmiştir. GN besiyerini yeşilden maviye dönüştüren suşlar gaz oluşumunun gözlenmesi için NN “Nitrat Nutrient Medium” besiyerine ekildi. Çizelge 4.2 de ve aynı suşlarda meydana gelen gaz oluşumlarına ait görüntü şekil 4.2 de belirtilmiştir. Daha sonra gaz oluşan tüplerdeki besiyerinde kalan nitrat miktarının ölçüm sonuçları ise çizelge 4.3 de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. GN besiyerinde renk değişimi gösteren bakteri suşları.

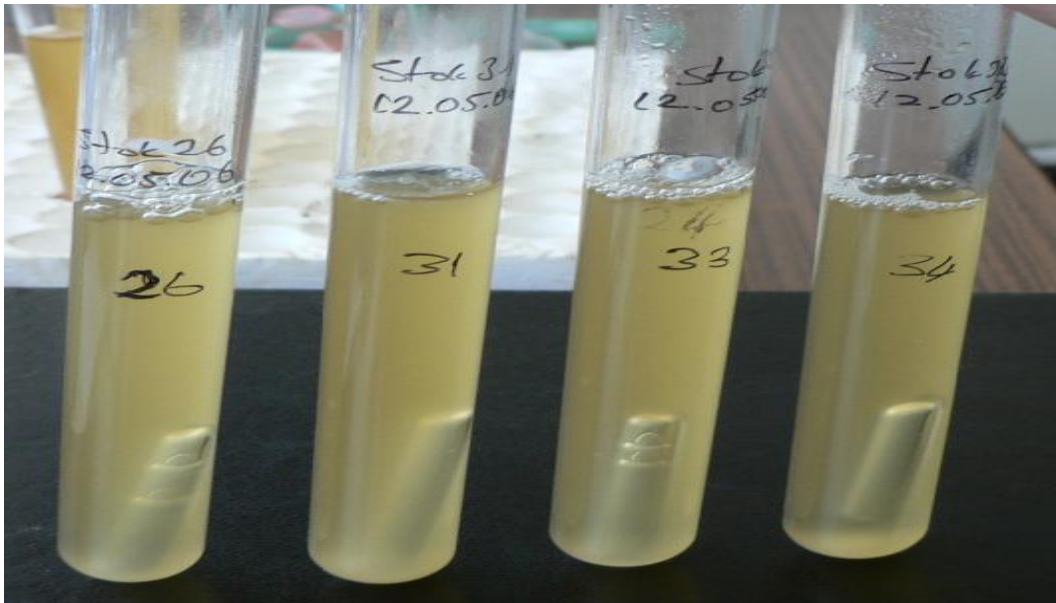
Tarih	GN Besiyerine Ekilen Suşlar	İnkübasyon Süresi	Tüplerde Renk Değişimi Gözlenen Suşlar
03.04.06	Suş 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13	3 Gün	Suş 2,4,5,6,8,13
10.04.06	Suş 14,15,16,17,18,18,20,21,22 23,24,25,26,28,30,31,32	3gün	Suş 19,20,21,22,24,25,26,27,31
16.04.06	Suş 33,34,35,36,37,38,39,40 41,42,43,44,45	3gün	Suş 33,34,35,37,39,41,43,44
24.04.06	Suş 46,47,48,49,50	3gün	Suş 46,47,48,49



Şekil 4.1.Bakteri suşlarına ait renk değişimleri

Çizelge 4.2. NN besiyerinde gaz oluşumu gözlenen bakteri suşları.

Tarih	NN Besiyerine Ekilen Suşlar	İnkübasyon Süresi	Tüplerde Gaz Oluşturan Suşlar
04.05.06	Suş 2,4,5,6,8,13,17	3 Gün	Suş 2,4,5,6,8,13
14.05.06	Suş 19,20,21,22,24,25,26,27,31	3gün	Suş 19,20,21,22,24,25,26,27,31
20.05.06	Suş 33,34,35,37,39,41,43,44 50,51,54,55	3gün	Suş 33,34,35,37,44'te
25.05.06	Suş 50,51,54,55	3gün	-



Şekil 4.2 Bakteri suşlarına ait gaz oluşumları

Çizelge 4.3. NN besiyerindeki denitrifikasyondan sonra kalan nitrat düzeyleri

Suşlar	NN Besiyerindeki NO ₃ Miktarı(mg/L)	Besiyerinde Kalan NO ₃ Miktarı(mg/L)	NO ₃ Giderimi (mg/L)
S2	60	25	45
S4	60	10	50
S5	60	25	45
S6	60	25	45
S8	60	10	50
S13	60	10	50
S19	60	10	50
S21	60	25	45
S22	60	25	45
S24	60	25	45
S25	60	25	45
S26	60	25	45
S27	60	25	45
S31	60	10	50
S33	60	25	45
S34	60	25	45
S35	60	25	45
S37	60	25	45
S44	60	25	45

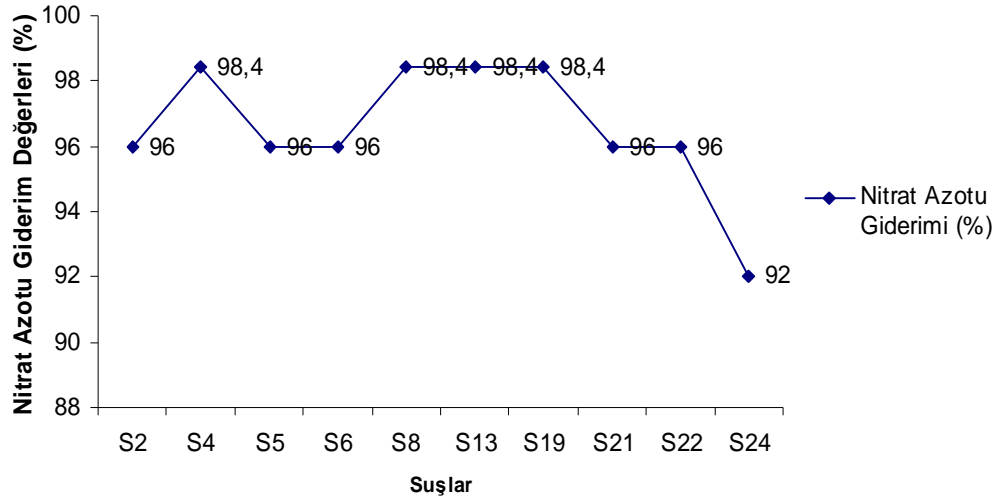
4.1.2.Denitrifikasyon Yapan Bakterilerin Yapay Atık Sudan Nitrat Giderimi Üzerine Etkinliklerine Ait Bulgular

Denitrifikasyon yeteneği tespit edilen bakteri suşlarının şişelerde hazırlanan nitrat içerikli atık suya ekimi yapılmıştır.15 günlük inkübasyon sonucu NO₃-N giderimine ait bulgular çizelge 4.4, şekil 4.1 ve şekil 4.2 de gösterilmiştir.

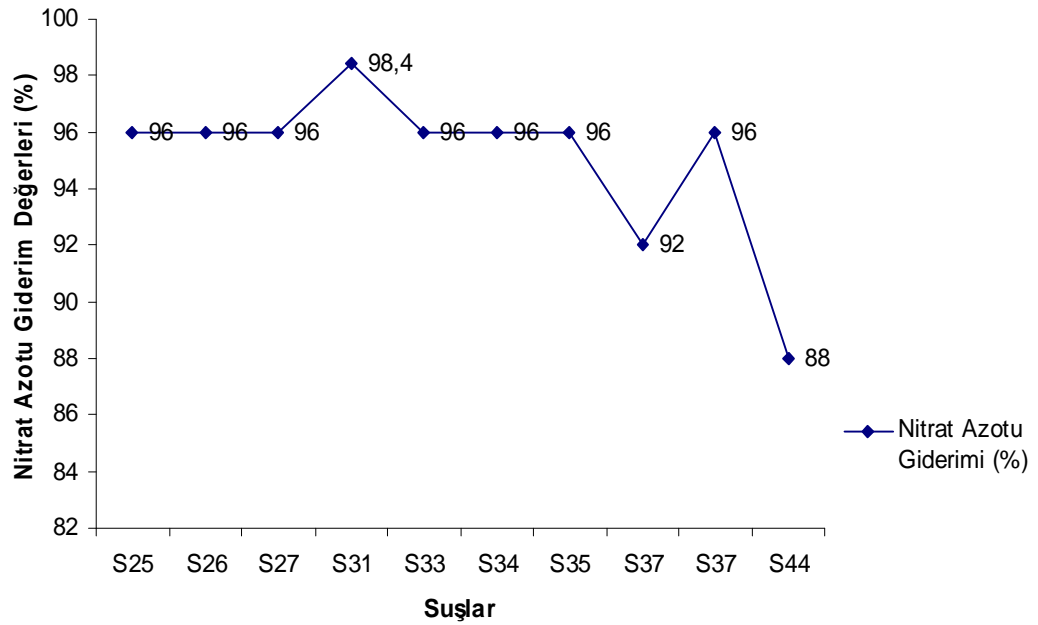
Başlangıçta atık suyun nitrat içeriği 625 mg iken, saf bakteri kültürleriyle 15 günlük inkübasyon sonucunda $\text{NO}_3\text{-N}$ gideriminin ortalama 26.3 mg, yani % $\text{NO}_3\text{-N}$ giderim düzeyinin %95.7 olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.4. Denitrifikasyon yapan bakterilerin yapay atık sudan $\text{NO}_3\text{-N}$ giderim düzeyleri

Suşlar	Yapay Atık Sudaki NO_3 Miktarı(mg/L)	$\text{NO}_3\text{-N}$ Giderimi(mg/L)	$\text{NO}_3\text{-N}$ % Giderimi
S2	625	25	96
S4	625	10	98,4
S5	625	25	96
S6	625	25	96
S8	625	10	98,4
S13	625	10	98,4
S19	625	10	98,4
S21	625	25	96
S22	625	25	96
S24	625	50	92
S25	625	25	96
S26	625	25	96
S27	625	25	96
S31	625	10	98,4
S33	625	25	96
S34	625	25	96
S35	625	50	92
S37	625	25	96
S44	625	75	88



Şekil 4.3. S2, S4, S5, S6, S8, S13, S19, S21, S22, S24 suşlarının yapay atık sudan NO₃-N giderim düzeyleri



Şekil 4.4. S25, S26, S27, S31, S33, S34, S35, S37, S44 suşlarının yapay atık sudan NO₃-N giderim düzeyleri

4.1.3.Denitrifikasyon Yapan Bakterilerin Atık Sudan KOI Giderimine Ait Bulgular

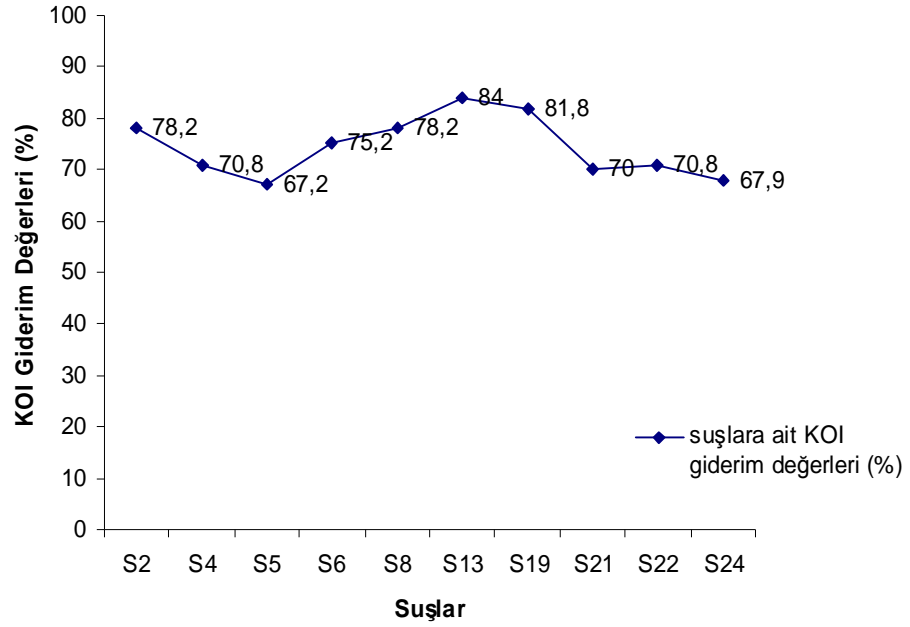
Denitrifikasyon yeteneği belirlenen bakterilerin şişelerde hazırlanan nitrat içerikli yapay atık suyunun giriş ve çıkış sularından elde edilen KOI değerleri ve kirliliğin yüzde olarak giderim düzeyini ait veriler çizelge 4.5 de sayısal olarak gösterilmiştir.

Ham atık suyun KOI değeri 548 mg O₂/L iken, saf bakteri kültürleriyle 15 günlük inkübasyon sonucunda ortalama KOI değerinin 144,8 mg O₂/L' ye düştüğü ve ortalama kirlilik eliminasyonun %73,8 düzeyine ulaştığı görülmüştür.

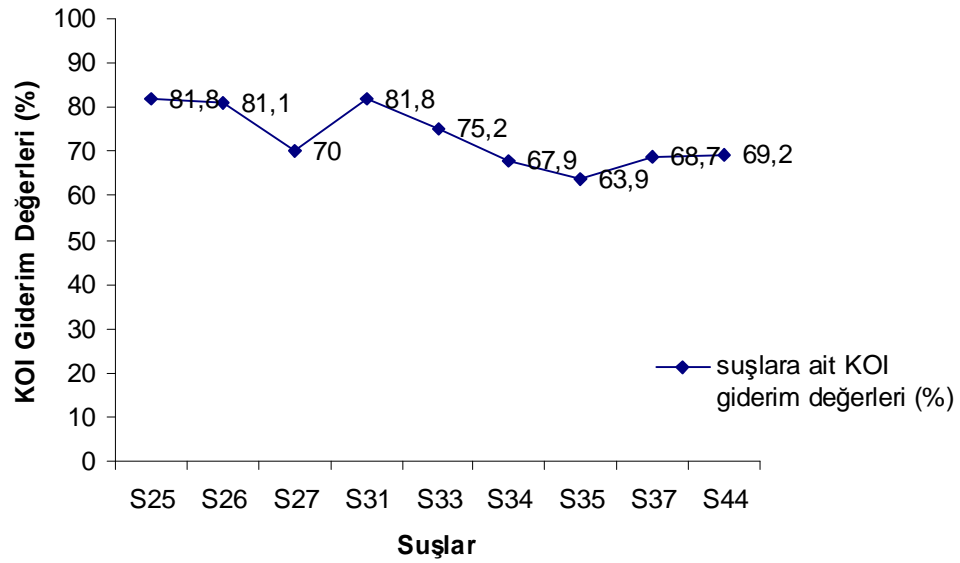
13, 19, 25, 26, 31 suşlarla ulaşılan ortalama kirlilik eliminasyon düzeyi %82,1 olup, bu bakterilerin metabolik aktivitelerinin atık sudaki organik bileşiklerin yok edilmesinde çok başarılı olduğu görülmüştür.

Çizelge4.5 Test ettiğimiz suşların yapay atık sudaki organik kirliliğin eliminasyonunda sağladıkları arıtma düzeyi.

Suşlar	Giriş KOI(mg O ₂ /L)	Çıkış KOI(mg O ₂ /L)	Kirlilik Eliminasyonu %
S2	548	120	78,2
S4	548	160	70,8
S5	548	180	67,2
S6	548	136	75,2
S8	548	120	78,2
S13	548	88	84
S19	548	100	81,8
S21	548	164	70
S22	548	160	70,8
S24	548	176	67,9
S25	548	100	81,8
S26	548	104	81,1
S27	548	164	70
S31	548	100	81,8
S33	548	136	75,2
S34	548	176	67,9
S35	548	200	63,9
S37	548	172	68,7
S44	548	196	69,2



Şekil 4.5. S2, S4, S5, S6, S8, S13, S19, S21, S22, S24 suşlarının yapay atık sudan KOI giderim düzeyleri



Şekil 4.6. S25, S26, S27, S31, S33, S34, S35, S37, S44 suşlarının yapay atık sudan KOI giderim düzeyleri

4.1.4.Sabit Yataklı Reaktörde Nitrat Giderimine Ait Bulgular

Çalışmamızın ikinci aşamasında hazırlanan yaklaşık 500 mL hacimli sabit yataklı reaktörümüzde önce hiçbir aşılama yapmaksızın, 2 günde bir 100 mL yapay atık su beslemesi yapılmış ve 2 hafta sonunda, besleme suyumuzun içindeki doğal floranın dolgu materyalinin üzerine yerleşmesi sağlanmış ve bunların sağladığı temel denitrifikasyon etkinliğinin düzeyi saptanmıştır. Daha sonra elimizdeki saf bakteri kültürleri ile dolgu materyalinin üzerindeki standart floraya ek olarak yapılan aşılamaların toplam denitrifikasyon düzeyi üzerine etkisi ayrı ayrı her bir suş için test edilmiştir. Bu testlere ait bulgular çizelge 4.6 da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Bakteri suşlarının toplam denitrifikasyon etkinliğine yapmış oldukları nitrat giderim katkıları.

	Giriş NO ₃ -N Miktarı	Çıkış NO ₃ -N Miktarı	Çıkış Suyu NO ₃ -N Düzeyinde Azalma (%) Olarak
Flora	3750	150	–
Flora+S2	3750	75	50
Flora+S4	3750	75	50
Flora+S5	3750	50	66
Flora+S6	3750	75	50
Flora+S8	3750	75	50
Flora+S13	3750	50	66
Flora+S19	3750	75	50
Flora+S21	3750	50	66
Flora+S22	3750	75	50
Flora+S24	3750	75	50
Flora+S25	3750	50	66
Flora+S26	3750	50	66
Flora+S27	3750	50	66
Flora+S31	3750	50	66
Flora+S33	3750	75	50
Flora+S34	3750	75	50
Flora+S35	3750	75	50
Flora+S37	3750	75	50
Flora+S44	3750	100	33

4.1.5.Bakteri İdentifikasyonu

Denitrifikasyon yeteneği tespit edilen suşların idendifikasyonu Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarında VITEK 2(biomeriux, Fransa) otomatize sistemi ile yapılmıştır. Sonuçlar çizelge 4.7 de belirtilmiştir.

Çizelge 4.7. VITEK 2 otomatize sistemiyle tanımlanan suşlar.

SUŞLAR	TÜR ADI
S2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
S4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
S5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
S6	<i>Klebsiella oxytoca</i>
S8	<i>Enterobacter cloacae</i>
S13	<i>Enterobacter cloacae</i>
S19	<i>Klebsiella oxytoca</i>
S21	<i>Comamonas testosteroni</i>
S22	<i>Klebsiella oxytoca</i>
S24	<i>Klebsiella oxytoca</i>
S25	<i>Enterobacter cloacae</i>
S26	<i>Enterobacter cloacae</i>
S27	<i>Enterobacter cloacae</i>
S31	<i>Enterobacter cloacae</i>
S33	<i>Enterobacter cloacae</i>
S34	<i>Klebsiella oxytoca</i>
S35	<i>Citrobacter freundii</i>
S37	<i>Enterobacter cloacae</i>
S44	<i>Alcaligenes faecalis</i>

Laboratuvarımızda yaptığımız çalışmalarla da nitratı azot gazına indirgediği tespit edilen 19 suşun gram boyama sonucu gram(-) oldukları tespit edildikten sonra, suşun Endo-C besiyerinde gram özellikleri tekrar onaylandı ve hepsinin Endo-C besiyerinde ürediği gözlemlendi. Işık mikroskopunda izolatlardan S6, S19, S21 nin uzun çomaklar, diğerlerinin (S4, S5, S8, S13, S22, S24, S25, S26, S28, S31, S33, S34, S35, S37, S44) ise kısa çomak şeklinde olduğu (cocobasil) gözlemlenmiştir. Ayrıca hareket testleri sonucunda S2, S4, S5, S6, S22,S24, S34 dışındaki diğer suşların hareketli olduğu gözlemlenmiştir.

Bakterilerinin identifikasyonu için ayrıca çeşitli biyokimyasal testler yapılmıştır Bunlar oksidaz, katalaz, hidrojen sülfür (H₂S) oluşumu, jelatinin hidrolizi, metil kırmızısı, arjinin hidrolizi, indol oluşturma, nişasta hidrolizi ve ürenin hidroliz testleridir. Test edilen 19 izolatın tümünün katalaz pozitif olduğu saptanmıştır. Oksidaz testlerinde ise sadece stok 21 'in pozitif olduğu gözlemlenmiştir. Bu testlerin sonuçları çizelge 4.8 ve çizelge 4.9 da gösterilmiştir Bu testlerin sonuçları Bergey's Manual of Determinative kitabına göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar VİTEK 2 otomatize sistemiyle bulunan sonuçları desteklemektedir.

Çizelge 4.8. S2,S4,S5,S6,S8,S13,S19,S21,S22 suşlarına ait identifikasyon test sonuçları

Bakteri identifikasyon testleri	S2	S4	S5	S6	S8	S13	S19	S21	S22
Gram boyama	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endo-C üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hareket testi	-	-	-	-	+	+	-	+	-
H ₂ S Testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil Kırmızısı	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatin Hidrolizi Testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arjinin Hidroliz Testi	-	-	-	-	+	+	-	-	-
İndol Testi	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Nişasta Hidroliz Testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Üre testi	+	+	+	+	-	-	+	-	+

Çizelge 4.9. S24,S25,S26,S27,S31,S33,S35,S37,S44 suşlarına ait identifikasyon test sonuçları

Bakteri identifikasyon testleri	S24	S25	S26	S27	S31	S33	S34	S35	S37	S44
Gram boyama	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Endo-C üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hareket testi	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
H ₂ S Testi	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Metil Kırmızısı	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Jelatin Hidrolizi Testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arjinin Hidroliz Testi	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
İndol Testi	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Nişasta Hidroliz Testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Üre testi	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-

4.2.Tartışma

Çalışmamızda kullandığımız arıtma tesisleri her ne kadar laboratuvar ölçekli olsalar da, gerek kullandığımız yapay atık suyun bileşimi ve gerekse modern tesislerin işletim şekillerinin teknik uygulamalarda kullanılan büyük boyutlu biyolojik arıtma tesislerine benzer şekilde hazırlanmış olması evsel atık suyla beslenen büyük ölçekli arıtma tesislerinde gelişen denitrifikant floranın oldukça benzeri biçimde gelişmesi düşünülerek başlatılan çalışmamızda gerçektende gram (-) ağırlıklı etkin bir bakteri florasının kalıcı olarak geliştiği açıkça görülmektedir.

Arıtma teknolojilerinde, atık sulardan azot eliminasyonunun zorunlu bir hedef haline getirilmesi 1990 yılından itibaren uygulamaya konmuş yönetmenliklerle düzenlenmiştir. Gelişmiş ülkelerde azot eliminasyonunun yanı sıra arıtma tesisindeki biyokütlenin biyolojik ve fizikokimyasal sağlığının ve düzeninin korunmasında olanak sağlayan ileri biyoteknolojik uygulamalar günlük rutin teknolojik uygulamalar haline geldiği halde, ülkemizde hangi düzeyde olursa olsun biyolojik atık su arıtımı denildiğinde sadece karbon giderimi ile sınırlı bir biyoteknolojik uygulamanın anlaşılır olmasından kaygı duymaktayız.

Yaptığımız çalışmada Avrupa iklim koşullarından daha uygun iklim koşullarına sahip olan birçok bölgemizde, kolayca ulaşılabilen nitrifikasyon düzeyinin hemen ardından denitrifikasyon sağlanmasının çok ucuza ulaşılabilecek biyoteknolojik bir hedef olduğunu göstermiş bulunmaktayız. Buna ek olarak basit mikrobiyolojik testlerle izole edilerek identifiye edilebilecek denitrifikant bakteri gruplarının, tesis dışında saf kültür halinde üretildikten sonra zaman zaman arıtma tesisinin denitrifikasyon ünitelerine verilmesi ile denitrifikasyon başarısının önemli düzeyde artırılacağı ortaya çıkartılmıştır.

Pai ve ark., (1998) da pirinç tarlasından izole ettikleri ve DCB-T6 ve DCB-T23 ve DCB-T25 olarak isimlendirdiği suşları kesikli reaktör şeklinde kurulan atık su arıtma tesisine tek tek vererek bunların aerobik ve anaerobik koşullar altında denitrifikasyon yapma yeteneklerini belirlemiştir. Bu bakterilerin denitrifikasyon yetenekleri KOI, NO₃-N VE NO₂-N, toplam Kjeldahl azot testleri yapılarak belirlenmiştir. T6 suşu tesise verildikten sonra nitrat azotu miktarında 7.5 mg azalma,

T23 verildikten sonra nitrat azotu miktarında 62.5 mg azalma, T25 verildiğinde ise 22.5 mg azalma gözlenmiştir. Bu çalışmayla da denitrifikasyon yapan bakterilerin arıtma tesislerine verilmesiyle arıtma başarısının yükseltilebileceği gösterilmiştir.

Yaptığımız çalışmada da denitrifikasyon yeteneğini saptadığımız bakteriler; sabit yataklı reaktörde belirli denitrifikant floranın gelişimi sağlandıktan sonra saf bakteri kültürleri tek tek tesise verilmiştir. S2,S4,S6,S19,S22,S24,233,S34,S35,S37 suşları yapay atık sudan 75 mg/L NO₃-N giderdiği S5,S13,S21,S25,S26,S27,S31 suşlarının ise 100mg/L atık sudaki nitrat azotu giderdiği bulundu. Bu sonuçların da gösterdiği gibi denitrifikant bakterilerin denitrifikasyon ünitelerine verilmesi denitrifikasyon başarısını arttırmaktadır.

Laboratuvarımız olanaklarının sınırlı olmasına rağmen model arıtma tesisi florasından izole ettiğimiz ve ilk teşhisini laboratuvarımızda yaptığımız bakterilerin, en son literatür bilgileri hariç denitrifikasyon yeteneklerinin bulunduğu dair pek veri bulunmayan gruplara ait olduğu görülmektedir. Enterobacteriaceae ağırlıklı floraya ait oldukları açıkça belli olan izolatlarımızın, normal evsel atık su arıtma uygulamaları yapılan biyolojik arıtma tesislerinde de yaygın şekilde bulunacakları şüphesizdir.

İzole ettiğimiz ve denitrifikasyon başarılarını saptadığımız bakterilerin denitrifikasyon yetenekleri ile ilgili destekleyici bulgular Hoseborg adlı bir araştırmacı tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada atık su tesisine gelen biyolojik arıtılmış suda bulunan denitrifikasyon etkinliğine sahip bakterilerin karşılıklı yüzey sularında meydana getirebilecekleri etki araştırıldığı çalışmada 1999-2001 yılları içinde arıtılmış sularla yüzey sularında ve Lahn nehrinin sedimentlerinde bakteri taraması yapılmıştır. Bu suların elektrik iletkenliği 45 cm derinliğe kadar aynı davranışı gösterdiğinden incelen bölgeye yer altı suyu karışımı olmadığı düşünülmektedir. Araştırmanın yapıldığı ve örneklerin alındığı bölgede kültürü yapılabilir ve denitrifikasyon yapan bakteriler elde edilmiştir. Gece gündüz oksijen konsantrasyonu farklarından ve nehrin belirli bölgelerinde anoksik bölgelerin ortaya çıkmasından dolayı denitrifikasyonun teşvik edildiği bulunmuştur. İzole edilen denitrifikant bakterilerin ARDRA-Metoduyla filogenetik gruplara ayrılmıştır. Bu analiz sonucunda *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Shewanella*,

Stenotrophomonas ve *Klebsiella* cinslerine girdikleri tespit edilmiştir (Hoseborg,2005).

Bu çalışmayla, ülkemizde atık su arıtma biyoteknolojileri ile uğraşan kişilere, biyolojik olayların daha iyi kullanılabilir olduğunu ve pratik bir katkı sağlamanın yanısıra bu alanda saf kültür desteği şeklindeki uygulamaların da yapılabilirliğini gösterilmiş bulunmaktayız.

5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Şişelerde hazırlanan NO₃-N içerikli ve her bir suşun denitrifikasyon yeteneği ayrı ayrı test edildiği araştırma bölümünde ortalama NO₃-N eliminasyonu düzeyinin %95.7 olduğu gözlenmiştir. Sentetik atık suyun KOI değeri 548 mg O₂/L iken 15 günlük saf bakteri kültürleriyle yapılan inkübasyon sonucunda KOI değerinin 144.8 mg O₂/L' ye düştüğü ve ortalama kirlilik eliminasyonunun %73.8 olduğu görülmüştür. Bu sonuçlardan da anlaşıldığı gibi bakterilerimiz yüksek denitrifikasyon yeteneğine sahiptir.

Sabit yataklı reaktörde gelişen denitrifikant floranın tek başına sağladığı nitrat azotu giderimi 3600 mg/L iken denitrifikasyon yeteneği onaylanmış bakterilerimizin tesise verilmesiyle NO₃-N eliminasyon düzeyinin 3682 mg/L'ye ulaştığı gözlenmiştir. Kantitatif düzeyde karşılaştığımızda izole ettiğimiz ve denitrifikasyon etkinliklerinin bulunduğunu saptadığımız bakterilerin tesisin nitrat eliminasyonuna başarısına sadece 82 mg/L lik bir katkı sağladığı şeklinde bir görüntü ortaya çıkmaktadır. Ancak bu çalışmanın asıl amacını oluşturan ve çevre kirliliğinin önlenmesi yönünde faydalı katkılar sağlayacak olan isolatların tesisin çıkış suyu nitrat suyu düzeyi üzerine yaptıkları etkinin incelenmesi gerekir.

Sabit yataklı reaktörün doğal florası, tesisin çıkış suyunda 150 mg/L düzeyinde nitrat azotu bulunurken isolatların tesise katılmasından sonraki çıkış suyunda nitrat azotu düzeyi 50 mg/ L ye kadar düşmüştür. Bu demektir ki doğal floranın başardığı çıkış suyu nitrat düzeyi ile karşılaştırıldığında isolatların katkısıyla elde edilen çıkış suyu nitrat düzeyi arasındaki farkın %132 'ye varan bir başarı artışı şeklinde karşımıza çıktığı söylenebilir.

Tesisin çıkış suyu NO₃-N eliminasyonu artıran bu suşların *Alcaligenes faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Comamonas testosteroni*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* türlerine ait olduğu VİTEK 2 otomatize sistemiyle gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bu türlerin denitrifikasyon yetenekleri oldukça yüksek olduğu söylenebilir.

Denitrifikasyon etkinlikleri tespit edilen bu suşlardan *Klebsiella pneumoniae* haricinde insan sağlığı için tehdit oluşturmayan Enterobacteriaceae grubu bu türler

denitrifikasyon yapması istenilen biyolojik arıtma tesisinde doğal olarak gelişmiş floraya tek başlarına olduğu kadar birlikte de aşılabilirler ve belki biyolojik çeşitliliğin daima pozitif katkıda bulunduğu noktasından hareket ederek daha başarılı denitrifikasyon sonuçları alınabilecektir.

KAYNAKLAR

- ALEXANDER, 1965. Denitrifying bacteria, In Black, C.A., Methods of Soil Analysis, American Society of Agronomy, Wisconsin, 1485-1486
- ANONYMOUS, 1978. Münchener Beiträge zur Abwasser-Fischerei und Flubioogie Band 29, Moderne Abwasser-reinigungs verfahren, Auflage München, Wien-Oldenbourg
- ANONYMOUS, 1975. Deutsche Einheitsverfahren Zurwasser-, Abwasser- und Schlamm-Untersuchung, Verlag Chemie- Weinheim
- ANONYMOUS, 1983. Lehr- und Handbuch der Abwassertechnik Dritte. Überarbeitete Auflage Band **III**: Grundlagen für Planung und Bau von Abwasserkläranlagen und Mechanische Klärverfahren Verlag Von Wilhelm Ernest & Sohn Berlin- München.
- ASLAN, 2002. Combined Biological Removal Of Pesticides and Nitrate in Drinking Water, Doktora Tezi, DEU Çevre Mühendisliği Bölümü, İzmir
- BALLARD, A. L. and FERGUSON, S. 1988. Respiratory nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans*, Eur. J. Biochem, 174:207-212
- BARNARD, J.L (1973) Biological Denitrification, Journ. Wat. Pol. Con. Fed., 72, 705-709.
- BARNES, D., and BLISS, P.J (1983) Biological Control of Nitrogen in Wastewater Treatment, 1 st edition, London.
- BAUMANN, B., SNOZZI, M., ZEHNDER, A.J.B, ROELOF, J., 1996. Dynamics of Denitrification Activity of *Paracoccus denitrificans* in Continuous during Aerobic- Anaerobic Change , Journal of bacteriology, 4367-4374
- BERKS, B. C, PAGE, D. M., RICHARDSON, D. J., REILLY, A., OUTEN, F. and FERGUSON S. J. 1995. Sequence Analysis of Subunits of The Membrane Bound Nitrate Reductase from A Denitrifying Bacterium: The Integral Membrane Subunit Provides A Prototype for The Dihaem Electron-Carrying Arm of A Redox Loop, Mol. Microbiol., 15(2): 319-331.
- BİTTON, G., 1994. Wastewater Microbiology, JohnWiley And Sons, USA.

- BOCK, E., KOOPS, H.-P., AHLERS, B. and HARMS, H. (1992). Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds as Energy Source.: In. A. BALOWS. H.G. TRUPER. M. DWORKIN
- BROWER, B., and BARFORD, C. C., 1997 Biological Fixed Film Systems Water Environ. Res., Volume 69 , No 4, 487-500
- CABELLO, P., MARTINEZ-LUQUE, M., BLASCO, R. and CASTILLO, F., 1999. Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction Among Bacterial Nitrate Reductases, J. Bact., 181(21): 6573-6584.
- CAO, G., ZHAO, Q., SUN, X., ZHANG, T., 2001. Characterization of Nitrifying and Denitrifying Bacteria Coimmobilized in PVA and Kinetics Model of Biological Nitrogen Removal by Coimmobilized Cells, Enzyme and Microbial Technology, 49-55
- COLE, J. A. , 1998. Assimilatory and Dissimilatory Reduction of Nitrate to Ammonia, In : J. A. Cole and S. J. Ferguson (Editors), The Nitrogen and Sulphur Cyclus, Cambridge University Press, 281-327
- CYPLIK, P., GRAJEK, W., MARECİK, R., KROLICZAK, P., 2006. Effect of Macro/Micro Nutrient and Carbon Source over The Denitrification Rate of *Haloferax denitrificans* Archaeon
- ÇELEN, E., KILIÇ, A., 2003. Isolation and Characterization of Aerobik Denitrifiers from Agricultural Soil, Turk J Biol, 9-14
- ÇETİN, E.T.,1968.Pratik mikrobiyoloji. İstanbul Üniversitesi, 2. Baskı, Menteş Matb.,İstanbul, 508,552,556,645
- DEITRICH, K.R., 1971. Abwasserreinigung. Alfred Hüthing Verlag. Gmbruma
- DELANGE, B., NAKARUMA, F., MYOGA, H., MAGARAT, Y., GUİBAL, E., 1994. Drinking Water Denitrification in A Membrane Bioreaktor, Water Science and Techology, 30:157-160
- ECKENFELDER Jr, W. W. and VANDEVENNE, L., 1980. A Design Approach for Rotating Biological Contactors Treating Industrial Wastewaters. in Proceedings: First National Symposium/Workshop on Rotating Biological Contactor Technology, ed. E. D. Smith and Y. C. Wu, Vol. II pp. 1065-1075.

- ERICSSON, B., (1975). Nitrogen Removals in a Pilot Plant. J. WPCF 47 727- 74
- FRANCO, A., ROCA, E., LEMA, J. M., 2005. Granulation in High-load Denitrifying Upflow Sludge Bed (USB) Pulsed Reactors, *Water Research*, 871-880
- FRANKIN, R.J., KOEVOETS, WAA., VAN GILS, WMA., VAN DER PAS, A., 1992., Application of The Biobed Upflow Fluidized Bed Process For Anaerobic Waste Water Treatment, *Water Science Technology*, 25, 7, 373-382.
- FUJIE, K., BRA VO, H. E. and KUBOT, A H. (1983). Operation Design and . Power Economy of Rotating Biological Contactor, *Water Res.* 17, 1153-1162
- GRADY, C.P.L. and LIM, H.C., 1980. *Biological Wastewater Treatment: Theory and Applications*, Marcel Dekker, Newyork
- GRUHLER, J., 1981. *Kleine Kläranlagen*, VEB Verlag Für Bauwesen, Ost., Berlin
- GOMEZ, M. A., HONTORÍA, E. ve GONZALEZ-LOPEZ, 2002. Effect of Dissolved Oxygen Concentration on Nitrate Removal from Groundwater Using a Denitrifying Submerged Filter, *Journal of Hazardous Materials*, 90(3), 267-278,
- HABECK-TROPHKE, H. H., 1980. *Abwasserbiologie*, Werner Ingenieur Texte 60 Werner, Verlag Düsseldorf
- HANHAN, O., 1994. *Aktif Çamur Sistemlerinde Biyolojik Azot Giderimi ve Tasarım Seçenekleri*, İTÜ Fen Bilimleri Ens. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- HARDER, W. and SCHLEIFER, K.H. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, i vjjation, Identification, Applications*, eds pp. 414-430. Springer New York.
- HASEBORG, E., 2005. *Verbreitung und Diversität Denitrifizierender Bakterien im Oderflächenwasser und hyporheischen Interstitial der Lahn unter dem Einfluß von Kläranlagenabwässern*, Fachbereich Biologie, Universität Marburg.
- HEIJNEN, J.J., MULDER, A., WELTEVREDE, R., HOLS, J., VAN LEEUWEN, 1991. Large Scale Anaerobic Aerobic Treatment of Complex Industrial Wastewaters Using Biofilm Reactors, *Water Science. Technology*, 23, 1427-1436.
- HENZE, M., HARREMOES, P., JANSEN, J.C., and ARVIN, E., 1996. *Wastewater Treatment Biological and Chemical Processes*, 285

- HISCOCK, K.M., LLOYD, J.W., LERNER, D.N., 1991. Review of Natural and Artificial Denitrification of Groundwater, *Water Research*, 25, 1099-1111
- HOLST, T.C., TRUC, A., PUJOL, R., 1997. Anaerobic Fluidized Beds: Ten Years of Industrial Experience, *Water Science Technology*, 36, 6-7, 415-422.
- HOLT, J., KRİEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T. and WILLIAMS, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams & Wilkins, USA, 138-166.
- HOOPER, A. B. and TERRY, K. R. (1998). Hydroxylamine Oxidoreductase of *Nitrosomonas*. Production of Nitric oxide from Hydroxylamine. *Biochim. Biophys. Acta* 512. 12-20
- HORAN, N.J., 1991. *Biological Wastewater Treatment Systems, Theory and Operation*, John Wiley and Sons, England
- HÖLL, K., 1979. *Wasser de Gruyter-Verlag*, Berlin, Newyork
- INTRASUNGKHA, N., KELLER, J., BLACKALL, L., 1999. Biological Nutrient Removal Efficiency in Treatment of Saline Wastewater, *Water Science Technology*, 39, 6, 183-190.
- IZA, J., 1991., *Fluidized Bed Reactors for Anaerobic Waste Water Treatment*, *Water Science Technology*, 24, 8, 109-132.
- JONSTONE, O.W.M., 1984. Oxygen Requirements Energy Consumption and Sludge Production in Extended-Aeration Plants, *Wat. Poll. Control*. 83(1):100-115
- KHAN, C.T., HIRAIŞHI, A., 2001. Isolation and Characterization of A New Poly(3-Hydroxybutyrate)- Degrading, Denitrifying Bacterium From Activated Sludge, *EMS Microbiology Letters* , 253-257
- KILIÇ, M. A., 1995. *Physiological and Biochemical Studies of The Periplasmic Nitrate Reductase from A Pseudomonas Species*, Master Thesis, University of East Englia, 75 ss. England.
- KİMURA, K., MASAHIKO, N., VE YOSHIMASA, W., "Nitrate Removal by a Combination of Elemental Sulfur-Based Denitrification and Membrane Filtration", *Water Research*, 36(7), 1758-1766, 2002.

- KNOWLES, R., 1982. Denitrification, *Microbiological Research*, 46: 43-70.
- KUBOTA, Y., TAKAYA, N., SHOUN, H., 1999. Membrane Associated, Dissimilatory Nitrite Reductase of The Denitrifying fungus *Cylindrocarpon tonkinense*,, 171,210-213
- KUENEN, J. G. and ROBERTSON, L. A., 1998. Ecology of Nitrification and Denirfication .In: J. A. Cole and S. J. Ferguson (Editors), *The Nitrojen and sulphur cyclus*,Cambridge University Press, 161-217.
- LEDUC, R. and BUCHANAN, I., 1993. Minimization of Multistage RBC active Disc Area. 1. *Environ.Eng. Div. Am. Soc. Civ. Eog.* 119,271-286.
- LĪU, D., ZHANG, S., ZHENG, Y., SHOUN, H., 2005. Denitrification by The Mix-culturing of Fungi and Bacteria with Shell, *Microbiyological Research*, 132-137
- MACFADDĪN, J.F., 2000. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*,Third Edition, USA, 506-509
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M. and PARKER, J., 1997. *Biology of microorganisms.* 986 ss., Printed in the United States of America
- MAHNE, I. and TIEDJE, J.M. 1995. Criteria and Methodology for Identifying Respiratory Denitrifiers, *Applied and Environmental Mikrobiology* 54(11): 2711-2716
- MATSUZAKA, E., NOMURA, N., NAKAJIMA-KAMBE, T., OKADA, N. and NAKAHARA T. 2002. A Simple Screening Procedure for Heterotrophic Nitrifying Bacteria with Oxygen –Tolerant Denitrification Activity, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol 95,No. 4, 409-411
- MEKONEN, A.and KUMAR, P., 2001. A Use of Sequencing Batch Reactor for Biological Denitrification of High Nitrate-Containing Water'', *Journal of Environmental Engineering*, 127(3), 273-278
- METCALF and EDDY (1991) *Wastewater Engineering:Treatment, Disposal and Reuse*, Third edition, McGraw-Hill, Newyork.
- MORENO-VIVIAN, C., MORENO-VIVIAN, C., CABELLO P., MARTINEZ-LUQUE M., BLASCO R. and CASTILLO F. 1999. Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J Bact.*, 181(21): 6573-6584

- ODEGAARD, H., RUSTEN, B., 1980. Nitrojen Removal in Rotating Biological Contactors without the use of External Carbon Source, First National Symposium, Workshop on Technology Champion, Pennsylvania.
- ÖKMEN, G., ALGUR, Ö., 1999. Farklı Karbon Kaynaklarından ve C/N Oranlarının Mikrobiyal Denitrifikasyon Üzerine Etkileri, Turk J. Biol, 533-542.
- PAI, S., CHONG, N., CHEN, C., 1998. Potential application of aerobic denitrifying bacteria as bioagents in wastewater treatment, Bioresource Technology, 179-185
- RANDALL, C.W., BARNARD, J. L., STENSEL, H. D., 1992. Design and Retrofit of Wastewater Treatment Plants for Biological Nutrient Removal. Technomic Publishing Company, Inc.
- RENSINK, J.H., VANDER VAN, J., VAN PAMELEN, G., FEDDER, F., MAJLOOR, E., 1997. The Modified Reprosystem : A High Biological Nutrient Removal System. Water Science Technology., 137- 146
- REUMUTH, H., 1954. Mikroskopische Beiträge zur Gebrauchs und Abwasser Frage für die Textilindustrie und das Wäschereigewerbe. Zeitschrift für Gesamte Textilindustrie Jahrgang 15-25.
- ROBERTSON, L.A., KUENEN, J.G., 1988. Heterotrophic Nitrification in *Thiosphaera pantotropha*: Oxygen Uptake and Enzyme Studies, J. Gen. Microbiol., 134, 857-863.
- SCHWARZ, A., YAHYAVI, B., MÖSCHE, M., BURKHARDT, C., JÖRDENING, HJ., BUCHHOLZ, K., REUSS, M., 1996., Mathematical Modelling for supporting scale up of an anaerobic wastewater treatment in a fluidized bed reactors, Water Science Technology, 35, 5-6.
- SEARS, H. J., SAWERS, G., BERKS, B. C., FERGUSON, S. J. and SPIRO, S., 1993. The Identification of A Periplasmic Nitrate Reductase in *Paracoccus denitrificans*, FEMS Mikrobiol Lett, 107-112
- SHIEH, W.K., KEENAN, J.D., 1986. Fluidized Bed Biofilm Reactors for Waste Water Treatment, Adv. Biochem. Eng., 33, 132-169.

- SHINODA, Y., SAKAI, Y., UENISHI, Y., UCHIHASHI, Y., HIRAIISHI, A., YUKAWA, H., YURIMOTO, H. and KATO, N., 2003. Aerobik and Anaerobik Toluene Degradation by A Newly Isolated Denitrifying Bacterium, *Thaure* sp. DNT-1, Applied and Environmental Microbiology, 1385-1392
- SHOUN, K., TANIMOTO, T., 1991. Denitrifikation by The Fungus *Fusarium oxysporum* and Involvement of Cytochrome P450 In The Respiratory Nitrite Reduction, J. Biol. Chem. 266, 11078-11082
- STEENHOUDT, O., KEIJERS, V., OKON, Y. and VANDERLEYDEN, J. 2001. Identification and Caharactenzation of A Periplasmic Nitrate Reductase in *Azospirillum brasilence* Sp245. Arch. Microbiol., 175: 344-352
- SZEKERES, S., KISS, I., KALMAN, M., INES, M ve SOARES, M., 2002. Microbial Population in a Hydrogen-Dependent Denitrification Reactor , Water Research, Baskıda.
- TAM, N. F. Y; WONG, Y S.; LEUNG, G., 1992 . Effect of Exogeneous Carbon Sources on Removal of Inorganic Nutrient by the Nitrification-Denitrification Process. Water Research. 26, 1229-1236
- TAVARES, P., PEREIRA, A.S., MOURA, J.J.G., MOURA, I., 2006. Metaloenzymes of the Denitrification Patway, Journal of Inorganic Biochemistry, 2087-2100
- TEIDGE, J.M., 1988. Ecology of Denitrification and Disimilatory Nitrate Reduktion to Ammonium Biology of Anaerobik Mikroorganism. John Willey & Sons, New York, 179-244
- TILL, A.B., WEATHERS, L.J., ALVAREZ, P.J. 1998. Fe Supported Autotrophic Denitrification , Environmental Science Technology, 32,634-639
- VAN DER HOEK, J.P., KLAPWIJK, A.,1987. Nitrate Removal from Groundwater, Water Research ,21,989-997
- VASILIADOU, I. A., PAVLOU, S., VAYENAS, D.V., 2006. A Kinetik Study of Hydrogenotrophic Denitrifcation, Process Biochemistry, 1401-1408
- VESPRILLE, AI., FRANKIN, RJ., ZOUTBERG, GR., 1994., Biobed, A Successful Cross Breed Between UASB And Fluidized Bed, 7th Int. Symp. On Anaerobic Digestion, RSA, 587-590.

- VÍSSMAN, W., 1985. Water Supply and Pollution Control, University of Florida, 692-709
- VOLOKÍTA, M., BELKIN, S., ABELÍOVÍCH, A. and SOARES, M. I. M., (1996). Biological Denitrification of Drinking Water Using Newspaper, Water Research, 965-971
- VUORIRANTA, P., HAILE MARIAM, D., KAUTIA, E., 1993. Organic Carbon and Nitrogen Removal from Wastewaters of Single Houses and Small Separate Establishments using A Simple Sequencing Batch Reaktör. Water Science Technology, 243-249
- WANG, C.C., LEE, C.M., 2000. Denitrification with Acrylonitrile as A Substrate Using Pure Bacteria Cultures Isolated from Acrylonitrile-Butadiene-Styrene Wastewater, Environment International, 237-241
- WATTANACHĪRA, S., FUJĪTA, K., 1990. The Effects of Filtrate Rate, Temperature, pH, Alcalinity on Biyolojical denitrification in garnular filters
- ZHOU, Z., TAKAYA, N., SAKAĪRĪ, M.A., SHOUN, H., 2001. Oxygen Requiriment for Denitrification by the Fungus *Fusarium oxysporium*, Arch. Microbiol. 175,19-25.
- ZUMFT, W.G., VIEBROCK, A. and KÖRNER, H. 1988. Biochemical and Physiological Aspects of Denitrification. In: J. A. Cole and S. J. Ferguson (Editors), The Nitrogen and Sulfur Cyclus, Cambridge University Press, 245-279

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana'da doğdum. İlk ve orta öğrenimini Adana'da tamamladım. 2000 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne kaydoldum. 2004 yılında mezun oldum. 2005 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalında yüksek öğrenimime başladım halen devam etmekteyim.