

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**ANAMMOX BAKTERİLERİNİN AKLİMASYONU İÇİN UYGUN AŞI
ÇAMURUNUN BELİRLENMESİ**

Selin ÇOBANSOY

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HAZİRAN 2018

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**ANAMMOX BAKTERİLERİNİN AKLİMASYONU İÇİN UYGUN AŞI
ÇAMURUNUN BELİRLENMESİ**

Selin ÇOBANSOY

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HAZİRAN 2018

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANAMMOX BAKTERİLERİNİN AKLİMASYONU İÇİN UYGUN AŞI
ÇAMURUNUN BELİRLENMESİ**

**Selin ÇOBANSOY
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**(Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından FYL-
20172816 nolu proje ile desteklenmiştir.)**

HAZİRAN 2018

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANAMMOX BAKTERİLERİNİN AKLİMASYONU İÇİN UYGUN AŞI
ÇAMURUNUN BELİRLENMESİ

Selin ÇOBANSOY
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 21/06/2018 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Aslı Seyhan ÇIĞGIN (Danışman)
Prof. Dr. Hasan MERDUN
Prof. Dr. Gökhan CİVELEKOĞLU

ÖZET

ANAMMOX BAKTERİLERİNİN AKLİMASYONU İÇİN UYGUN AŞI ÇAMURUNUN BELİRLENMESİ

Selin ÇOBANSOY

Yüksek Lisans Tezi, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Aslı Seyhan ÇİĞGIN

Haziran 2018; 60 Sayfa

Azotun çevresel etkilerini azaltmak amacıyla sıkı atıksu deşarj standartları uygulanmaktadır. Geleneksel nitrifikasyon-denitrifikasyon proses yol izinin kısaltılmasıyla uygulanan yeni teknolojilerin keşfedilmesiyle azotun biyolojik dönüşümü daha ekonomik ve verimli hale gelmiştir. Anammox (anaerobik amonyum oksidasyonu) prosesi, havalandırma ve karbon kaynağı maliyetlerinde azalma açısından sağladığı faydalarından dolayı en çok tercih edilen azot giderim prosesidir. Prosesin pratik uygulama için temel dezavantajı Anammox bakterilerinin düşük çoğalma hızı nedeniyle uzun bir işletmeye alma dönemi gerektirmesidir. Bu nedenle, en uygun aşı çamurunun seçimi işletmeye alma sürecinde son derece önemlidir.

Bu kapsamda, bu çalışmanın amacı anammox bakterilerinin aklımasyonu için uygun aşı çamurunun ve uygun besleme süresinin belirlenmesidir. Bu amaçla, aerobik ve anaerobik çamur karışımı ile oluşturulan aşı çamuru ve katı atık düzenli depolama sahasından temin edilen aşı çamuru olmak üzere iki farklı aşı çamuru kullanılmıştır. Bu iki aşı çamuruna farklı besleme koşulları uygulanarak anammox bakterilerinin aklımasyonu için en uygun aşı çamuru araştırılmıştır. Oldukça yavaş çoğalma hızlarına sahip oldukları için anammox bakterilerinin aklımasyonu için çok uzun süreçler gerekmektedir. Aklımasyon çalışmaları sırasında uzun aklımasyon süreleri uygulamak yerine anammox bakterilerine özgü hidrazin sentaz enzimine ait genin toplam bakteri miktarına nispi miktarı belirlenerek, kısa sürede kullanılan aşı çamuru ve uygulanan besleme koşulların anammox bakterilerinin aklımasyonu için uygun olup olmadığı araştırılmıştır. Yürütülen deneysel çalışmalar sonucunda, anammox bakterilerinin aklime edilebilmesi için aerobik ve anaerobik çamur karışımının aşı çamuru olarak kullanılması ve beslemenin en az 2 saat süreyle uygulanması gerektiği belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Anammox, Biyolojik Azot Giderimi, Denitrifikasyon, Nitrifikasyon, Mikrobiyal Ekoloji.

JÜRİ: Doç. Dr. Aslı Seyhan ÇİĞGIN

Prof. Dr. Hasan MERDUN

Prof. Dr. Gökhan CİVELEKOĞLU

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE SUITABLE INOCULUM FOR THE ACCLIMATION OF ANAMMOX BACTERIA

Selin ÇOBANSOY

MSc. Thesis in Environmental Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aslı Seyhan ÇIĞGIN

Haziran 2018, 60 pages

Strict wastewater discharge standards are applied in order to reduce the environmental effects of the nitrogen. The biotransformation of the nitrogen has become more economical and efficient with the discovery of new technologies applied by shortening the conventional nitrification-denitrification process pathway. The Anammox (anaerobic ammonium oxidation) process is most preferred nitrogen removal process because of its benefits in terms of reduction in aeration and carbon source costs. The main disadvantage of the process for practical application is the requirement of long acclimation periods due to the low growth rate of Anammox bacteria. For this reason, the selection of the most suitable inoculum is crucial in the startup of the process.

In this context, the aim of this study is to determine the appropriate inoculum and the feeding time for the acclimation of the anammox bacteria. For this purpose, two types of inoculum were used, namely inoculum formed by aerobic and anaerobic sludge mixture and inoculum obtained from the solid waste landfill site. The most suitable inoculum was investigated for the acclimatization of anammox bacteria by applying different feeding conditions to these two inoculum. Because very slow growth rates of anammox bacteria, very long processes are required for the acclimation period. Therefore, instead of applying the long acclimation periods during acclimation studies, the suitability of the inoculum and feeding conditions for acclimation of anammox bacteria were determined in a short time by analyzing the relative amount of hydrazine synthase gene, which is specific to anammox bacteria. The results of experimental studies were revealed that anammox bacteria can be acclimated by applying at least 2 hours of feeding period when aerobic and anaerobic sludges are used as inoculum.

KEYWORDS: Anammox, Biological nitrogen removal, denitrification, nitrification, Microbial ecology.

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Aslı Seyhan ÇIĞGIN

Prof. Dr. Hasan MERDUN

Prof. Dr. Gökhan CİVELEKOĞLU

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın danışmanım Doç. Dr. Aslı Seyhan ÇIĞGIN’a teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Deneyisel çalışmalarım için laboratuvarlarında bulunan cihazları kullanmama izin veren Sn. Dr. Öğr. Üyesi Ayça ERDEM ve Sn. Prof. Dr. Ayşe MUHAMMETOĞLU’na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen beni bu günlere getiren sevgili aile bireylerim annem Birsen ÇOBANSOY, babam Abdullah ÇOBANSOY, kardeşim Kaan ÇOBANSOY, anneannem Zehra BİLGİN, teyzem Nursen ŞENGÜL ve kuzenim Dilara Nur ŞENGÜL’e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans hayatım süresince yanımda olan, yardımına koşan ve zor dönemlerimde beni motive eden Kubilay ÇİFTÇİ’ye çok teşekkür ederim.

Örnek temin etme konusunda yardımlarını esirgemeyen Antalya Hurma Atıksu Arıtma Tesisi ve Manavgat Katı Atık Ayrıştırma ve Düzenli Depolama Tesisi personellerine teşekkür ederim.

Bu araştırmayı FYL-2017-2816 numaralı proje ile destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Doğada Azot Çevrimi.....	3
2.2. Mikrobiyal Azot Çevrimi	4
2.3. Azot Gideriminin Önemi	5
2.4. Azot Giderim Yöntemleri.....	6
2.4.1. Fizikokimyasal azot giderim yöntemleri	6
2.4.2. Geleneksel biyolojik azot giderimi	7
2.4.3. Azot gideriminde yenilikçi prosesler	9
2.5. Anammox Prosesi.....	11
2.5.1. Anammox prosesi çalışma prensibi	12
2.5.2. Anammox bakterileri	12
2.5.3. Anammox prosesi ara ürünleri ve enzimleri.....	13
2.5.4. Anammox prosesinin avantaj ve dezavantajları	14
2.6. Anammox Proses Verimini Etkileyen Parametreler	16
2.6.1. Amonyum ve nitrit konsantrasyonu.....	16
2.6.2. Çözünmüş oksijen.....	17
2.6.3. Bikarbonat konsantrasyonu.....	17
2.6.4. Organik madde.....	17
2.7. Anammox Bakterilerinin Aklimasyonuna Yönelik Çalışmalar	18
2.8. Anammox Bakterilerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Yöntemler	21
2.9. Tezin Motivasyonu	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1. Aşı Çamurlarının Temini ve Özellikleri.....	26
3.2. Anammox Reaktörlerinin Kurulması ve İşletilmesi.....	27
3.3. Analitik Yöntemler	30
3.3.1. Amonyum azotu analizleri.....	30
3.3.2. Nitrit analizleri.....	31

3.3.3. Nitrat analizleri	32
3.3.4. Askıda katı madde ve uçucu askıda katı madde analizleri	32
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizleri	32
3.4.1. DNA izolasyonu	32
3.4.2. Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qPCR).....	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	35
4.1. Aşı Çamuru ve Besleme Koşullarının Azot Giderim Verimine Etkisi (Set 1).....	35
4.1.1. Aerobik ve anaerobik aşı çamuruna kısa süreli besleme uygulanmasının azot giderimine etkisi (R1).....	36
4.1.2. Aerobik ve anaerobik aşı çamuruna 2 saat süreli besleme uygulanmasının azot giderimine etkisi (R2).....	39
4.1.3. Katı atık aşı çamuruna 2 saat süreli besleme uygulanmasının azot giderimine etkisi (R3)	41
4.2. Besleme Koşullarının Azot Giderim Verimine Etkisi (Set 2).....	43
4.2.1. Karışık aşı çamuruna 2 saat süreli besleme uygulanmasının azot giderimine etkisi (R4)	43
4.2.2. Karışık aşı çamuruna 12 saat süreli besleme uygulanmasının azot giderimine etkisi (R5)	45
5. SONUÇLAR	48
6. KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Anammox Bakterilerinin Aklımasyonu için Uygun Aşı Çamurunun Belirlenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak bulunduğunu belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

21/06/2018

Selin ÇOBANSOY

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Ar	: Argon
C	: Karbon
dk	: Dakika
g	: Gram
kg	: Kilogram
Kj	: Kilojoule
L	: Litre
m ³	: metreküp
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
N	: Azot
nm	: Nanometre
O ₂	: Oksijen
P	: Fosfor

Kısaltmalar

(NH ₄) ₂ SO ₄	: Amonyum Sülfat
AAT	: Atıksu Arıtma Tesisi
AGH	: Azot Giderim Hızı
AGV	: Azot Giderim Verimi
AKM	: Askıda Katı Madde
AKR	: Ardışık Kesikli Reaktör
AMO	: Amonyak Monooksijenaz
amoA ve amoB	: Amonyak Monooksijenaz Alt birimleri
Anammox	: Anaerobik Amonyum Oksidasyonu

AOA	: Amonyak Oksitleyen Arke
AOB	: Amonyum Oksitleyici Bakteriler
ATP	: Adenozin trifosfat
AYH	: Azot Yükleme Hızı
BOİ ₅	: Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı
CaCl ₂ .2H ₂ O	: Kalsiyum Klorit Dihidrat
CANON	: Nitrit Üzerinden Tamamen Ototrofik Proses
CHCl ₃	: Kloroform
CO ₂	: Karbondioksit
CoCl ₂ . 6H ₂ O	: Kobalt Klorit Hekzahidrat
CuSO ₄ . 5H ₂ O	: Bakır Sülfat Pentahidrat
çKOİ	: Çözünmüş Organik Madde
ÇO	: Çözünmüş Oksijen
DAMO	: Denitrifikasyona Dayalı Anaerobik Metan Oksidasyonu
DMP	: 2,6-di-metilfenol
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNRA	: Nitratın Amonyuma Katabolik İndirgenmesi
FeSO ₄ . 7H ₂ O	: Demir Sülfat Heptahidrat
FISH	: Floresanlı Yerde Hibritleşme
H ₂ SO ₄	: Sülfirik Asit
H ₃ BO ₄	: Borik Asit
HAO	: Hidroksilamin Oksidoredüktaz
HBS	: Hidrolik Bekletme Süresi
HDH	: Hidrazin Dehidrojenaz
HZO	: Hidrazin Oksidoredüktaz
HZS	: Hidrazin Sentaz

KH_2PO_4	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
KHCO_3	: Potasyum Hidrojen Karbonat
KOI	: Kimyasal Oksijen İhtiyacı
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	: Magnezyum Sülfat Heptahidrat
mmol	: Minimol
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	: Mangan Klorit Tetrahidrat
N_2	: Azot Gazı
N_2H_4	: Hidrazin
N_2O	: Nitröz Oksit
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	: EDTA Disodyum Dihidrat
Na_2SeO_3	: Sodyum Selenit
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	: Sodyum Molibdat Dihidrat
NaNO_2	: Sodyum Nitrit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NapAB	: Nitrat Redüktaz Kompleksi
NAR	: Nitrat Redüktaz
NarGH	: Nitrat/Nitrit Oksidoredüktaz
NH_2OH	: Hidroksilamin
NH_3	: Amonyak
NH_4	: Amonyum
NH_4Cl	: Amonyum Klorür
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	: Nikel Klorür
NIR	: Nitrit Redüktaz
nirK	: bakır içeren Nitrit redüktaz
nirS	: sitokrom cd1 içeren Nitrit redüktaz
NO	: Nitrik Oksit

NO ₂	: Nitrit
NO ₃	: Nitrat
NOB	: Nitrit Oksitleyici Bakteriler
NOR	: Nitrit Oksit Redüktaz
NOS	: Nitroz Oksit Redüktaz
NrfA	: Nitrit Redüktaz Enzimini Kodlayan Gen
NXR	: Nitrit Oksidoredüktaz
OLAND	: Oksijen Sınırlı Ototrofik Denitrifikasyon
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyon
qPCR	: gerçek zamanlı nicel Polimeraz Zincir Reaksiyon
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
SHARON	: Nitrit üzerinden yüksek amonyum giderimi için basit reaksiyon sistemi
TKN	: Toplam Kjeldahl Azotu
UAKM	: Uçucu Askıda Katı Madde
UASB	: Yukarı Akışlı Anaerobik Çamur Yataklı Reaktör
UKM	: Uçucu Katı Madde
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	: Çinko Sülfat Heptahidrat

Bu tezde ondalık ayırıcı olarak virgül kullanılmıştır.

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Doğada azot çevrimi	3
Şekil 2.2. Mikrobiyal azot çevrimi	4
Şekil 2.3. Anammox prosesi	12
Şekil 2.4. Plantomiset şubesinin filogenetik ağacı.....	13
Şekil 2.5. (a) Geleneksel nitrifikasyon/denitrifikasyon prosesleri ile azot giderimi, (b) Anammox prosesi üzerinden azot giderimi	15
Şekil 2.6. Mikrobiyal azot çevriminde fonksiyonel genlerin rolü	23
Şekil 3.1. Hurma Atıksu Arıtma Tesisi (a) aktif çamur geri devir hattı ve (b) anaerobik çamur geri devir hattı.....	26
Şekil 3.2. (a) Manavgat Katı Atık Ayrıştırma ve Düzenli Depolama Tesisi depolama alanı ve (b) aşı çamurunun temin edildiği bölge	26
Şekil 3.3. (a) Aklımasyon çalışmalarında kullanılan aşı çamurları, (b) aklımasyon reaktörleri	27
Şekil 3.4. (a) Makro kjeldahl düzeneği, (b) distilatın toplanması.....	30
Şekil 3.5. Fenat metodu amonyum azotu standart çözeltileri	31
Şekil 3.6. Kolorimetrik yöntem nitrit azotu standart çözeltileri	31
Şekil 4.1. Aşı çamurlarında bulunan genlerin toplam bakteri miktarına nispi miktarları	36
Şekil 4.2. R1 reaktöründe aklımasyon sürecinde çıkış azot konsantrasyonları	37
Şekil 4.3. R1 reaktöründe aklımasyon sürecinde azot giderim verimleri	38
Şekil 4.4. R1 - azot gideriminden sorumlu genlerin nispi mikarındaki değişim	39
Şekil 4.5. R2 reaktöründe aklımasyon sürecinde çıkış azot konsantrasyonları	40
Şekil 4.6. R2 reaktöründe aklımasyon sürecinde azot giderim verimleri	40
Şekil 4.7. R2 - azot gideriminden sorumlu genlerin nispi mikarındaki değişim	41
Şekil 4.8. R3 reaktöründe aklımasyon sürecinde çıkış azot konsantrasyonları	42
Şekil 4.9. R3 reaktöründe aklımasyon sürecinde azot giderim verimleri	42
Şekil 4.10. R3 - azot gideriminden sorumlu genlerin nispi mikarındaki değişim	43

Şekil 4.11. R4 reaktöründe aklımasyon sürecinde çıkış azot konsantrasyonları	44
Şekil 4.12. R4 reaktöründe aklımasyon sürecinde azot giderim verimleri	44
Şekil 4.13. R4 - azot gideriminden sorumlu genlerin nispi mikarındaki değişim	45
Şekil 4.14. R5 reaktöründe aklımasyon sürecinde çıkış azot konsantrasyonları	46
Şekil 4.15. R5 reaktöründe aklımasyon sürecinde azot giderim verimleri	46
Şekil 4.16. R5 - azot gideriminden sorumlu genlerin nispi mikarındaki değişim	47



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı aşı çamurları ve aklımasyon stratejileri ile elde edilen işletmeye alma süreleri	22
Çizelge 3.1. Aklımasyon çalışmalarında kullanılan aşı çamurları ve besleme koşulları...	28
Çizelge 3.2. Sentetik besleme çözeltisi kompozisyonu	28
Çizelge 3.3. İz element 1 ve İz element 2 çözeltilerinin kompozisyonu	29
Çizelge 3.4. Azot giderim proseslerinin araştırılması amacıyla kullanılan primerler.....	33
Çizelge 4.1. Set 1 aklımasyon çalışmalarında reaktörlere beslenen azot konsantrasyonları.....	35

1. GİRİŞ

Aşırı azot konsantrasyonu (özellikle amonyum formunda) sucul sistemlerin işlevselliğini bozmakta ve halk sağlığı riski oluşturmaktadır. Azotun olumsuz etkilerini önlemek veya azaltmak amacıyla, sıkı atıksu deşarj standartları uygulanmakta ve azot deşarjının kontrolü için etkili giderim teknolojilerinin uygulanması talep edilmektedir. Yüksek azot konsantrasyonu içeren atıksulardan azotun yaygın olarak uygulanmakta olan klasik nitrifikasyon-denitrifikasyon prosesleri ile tamamen giderilmesi için büyük miktarda karbon kaynağı gerekmektedir. Fakat sızıntı suyu, biyolojik stabilizasyon çıkış suları ve çeşitli endüstriyel faaliyetler sonucu açığa çıkan atıksularda bulunan organik karbon miktarı denitrifikasyonun gerçekleşmesi için ihtiyaç duyulan organik madde miktarını karşılayacak düzeyde değildir (Tchobanoglous 2003).

Karbon eklenmesi artı maliyet anlamına geldiği için son yıllarda yüksek amonyum azotu içeren atıksularda azot giderimi için yeni prosesler geliştirilmiştir. Klasik azot giderimi proseslerine alternatif bir biyolojik strateji olarak amonyumun nitrite oksitlenmesine dayalı olan nitrit rotası ile kısayol azot çevrimini içeren teknolojilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Nitrit üzerinden nitrifikasyon ya da kısmi nitrifikasyon olarak tanımlanan proste geleneksel nitrifikasyon adımıyla gerçekleşen amonyağın nitrite ve ardından nitrata dönüşümünden farklı olarak amonyum sadece nitrite oksitlenmektedir. Kısmi nitrifikasyon uygulanmasıyla havalandırmada %25 tasarruf elde edilebilmektedir. Kısmi nitrifikasyonun ardından Anammox prosesinin uygulanması ise atıksuyun organik karbon kaynağı ilavesi gereksiz artırımını sağlamaktadır.

Anaerobik amonyum oksidasyonu (anammox), anaerobik koşullar altında elektron alıcısı olarak nitritin varlığında amonyumun oksitlenerek azot gazının üretildiği proste (Strous vd. 1998). Oksijen ve harici karbon gerektirmeyen düşük maliyetli anammox prosesinin en büyük sorunu anammox bakterilerinin oldukça düşük çoğalma hızına sahip olmasıdır. Düşük biyokütle spesifik çoğalma hızı proses dizaynı sırasında göz önüne alınması gereken önemli bir parametredir ve çok büyük reaktör hacmi ile yüksek biyokütle alıkonma süresi sağlanmasını gerektirir (Lotti vd. 2015). Ayrıca, anammox biyokütlesinin karakterindeki herhangi bir değişim veya işletme parametrelerinin değişmesi sonucu diğer mikrobiyal türlerin aşırı çoğalması, anammox bakterilerinin azalmasına ve bunun sonucunda da sistemin kararlı halinin bozulmasına sebep olabilmektedir. Bu nedenle, en uygun aşı çamurunun seçimi veya reaktörde anammox bakterileri birikimini elde etmek için en verimli reaktör sisteminin seçimi işletmeye alma sürecinde son derece önemlidir. Anammox bakterilerinin düşük çoğalma hızı nedeniyle, proses anammox kültürü ile işletmeye başlatılamadığı durumlarda, prosesi işletmeye alma süreci çok uzun olmaktadır. Anammox prosesinin işletmeye alma süresini kısaltmak için uygun koşulları belirlemek amacıyla farklı reaktör konfigürasyonlarında aktif çamur, nitrifikasyon bakterisi ve anaerobik çamur gibi farklı başlangıç aşı çamurları ile araştırmalar yürütülmüştür.

Bu doğrultuda, tez kapsamında, aynı aşı çamuruna farklı besleme koşullarının uygulanması ve farklı aşı çamurlarına aynı besleme koşullarının uygulanması ile anammox prosesinin işletmeye alınması için uygun aşı çamurunun ve besleme koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, aktif çamur ile nitrifikasyon bakterisinden oluşan çamur ile anaerobik çamur karıştırılarak oluşturulan aşı çamuru ile

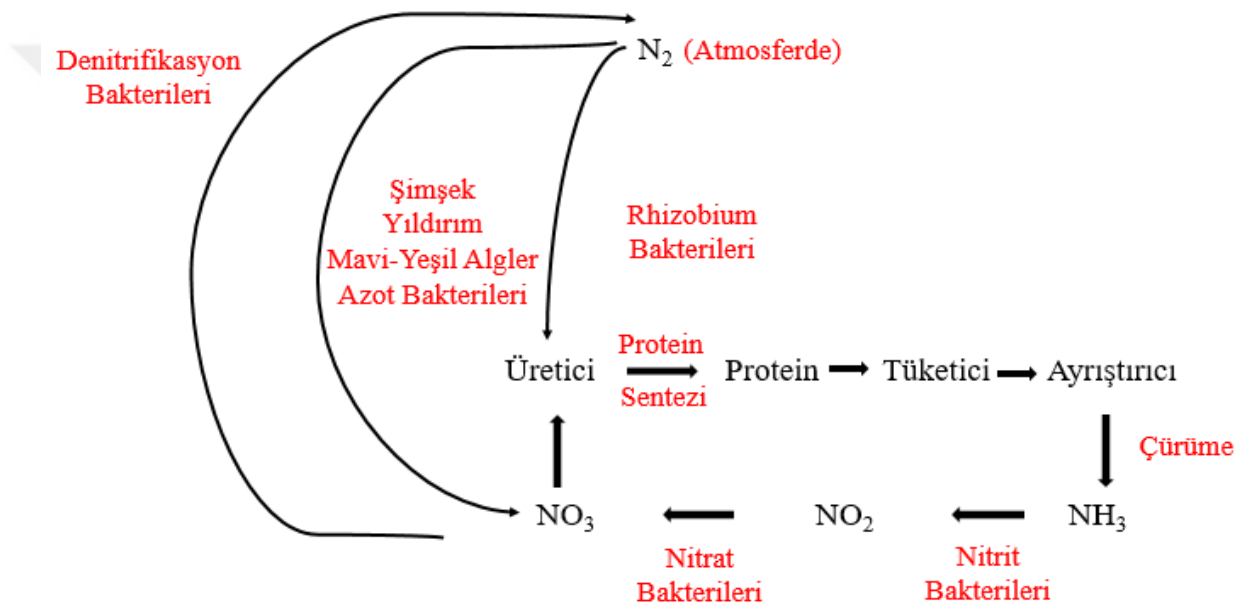
düzenli depolama sahasından temin edilen aşı çamuru olmak üzere 2 farklı aşı çamuru ile anammox bakterilerinin zenginleştirilmesi için çalışmalar yürütülmüştür. Ayrıca, anammox bakterilerinin aklımasyonu amacıyla yaygın olarak kullanılan aktif çamur ile anaerobik çamurun karışımı ile oluşturulan aşı çamuruna farklı besleme koşulları uygulanarak besleme koşullarının azot giderimindeki rolü araştırılmıştır. Çalışmanın son aşamasında, aerobik aktif çamur, anaerobik çamur ve düzenli depolama sahasından temin edilen çamur karıştırılarak oluşturulan aşı çamuru paralel işletilen iki reaktöre eklenerek farklı besleme koşullarının azot giderimini ne şekilde etkileyeceği araştırılmıştır.

Çalışmalar kapsamında aklımasyon (bakterilerin koşullara alıştırılması) süreçlerinin incelenmesi amacıyla, azot gideriminin gerçekleştiği proseslerden sorumlu enzimlere özgü genlerin farklı koşullardaki bakterilere nispi miktarları polimeraz zincir reaksiyon (PCR) ile belirlenmiştir. Böylece, farklı aşı çamurları ve farklı besleme koşullarında işletilen reaktörlerde, anammox bakterilerinin aklımasyonu için uygun aşı çamuru ve besleme koşulları uzun aklımasyon süreleri uygulanmadan, bakterilerin proseslerden sorumlu enzimleri üretme potansiyeli belirlenerek kısa sürede değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Doğada Azot Çevrimi

Azot birçok biyojeokimyasal proseste rol oynayan önemli elementlerden biridir. Azot yaşam için önemli olan nükleik asitler, karbonhidratlar, aminoasitler gibi birçok maddenin önemli yapı taşlarındandır. Azot çevrimi inorganik ve organik azot formlarının birbirine dönüşümünü içerir (Spieck ve Bock 2005). Azot formları doğal olarak karasal, sucul ve atmosferik ekosistemlerde çeşitli biyolojik ve kimyasal prosesler ile gerçekleşen azot fiksasyonu, mineralizasyon, nitrifikasyon ve denitrifikasyon süreçlerini içeren bir döngü halindedir. Azot çevriminde jeosfer, atmosfer ve biyosferde farklı formlarda bulunan azotun hareketi düzenlenir. Canlı bünyesinde, besin maddelerinde ve ölü organizmalarda bulunan azot, doğada azot çevrimi içinde bir döngü halindedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Doğada azot çevrimi

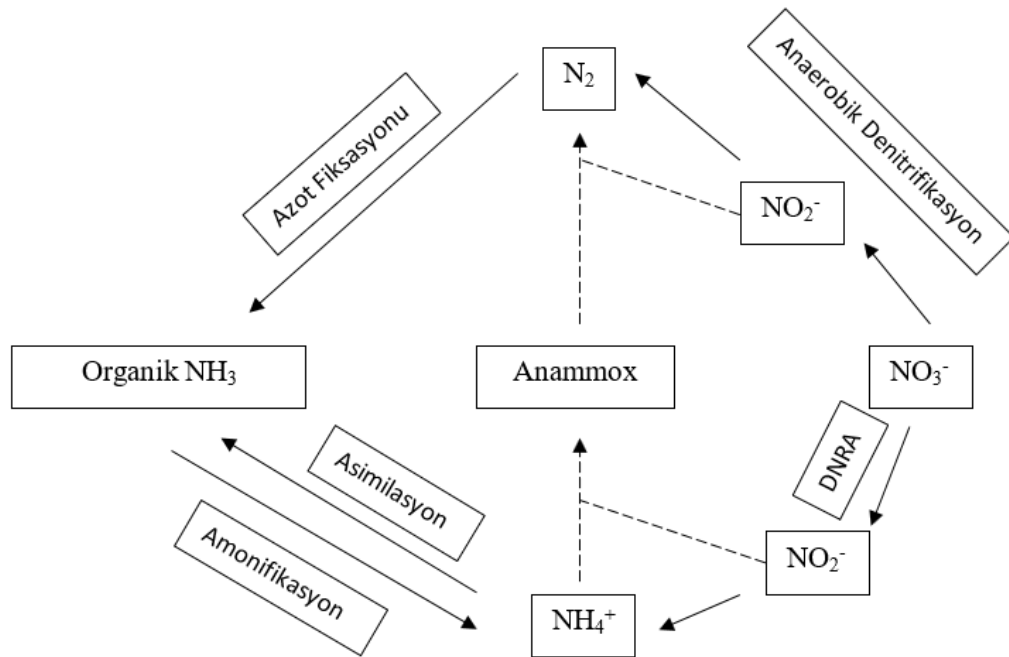
Şekil 2.1’de görüldüğü üzere; azot, atmosferde azot gazı (N_2) şeklinde bulunur. Toprakta ise amonyak (NH_3), nitrat (NO_3) ve nitrit (NO_2) şeklinde bulunur. Atmosferdeki azot gazının bir kısmı, şimşek ve yıldırım sonucunda açığa çıkan enerjinin etkisi ile oksijen gazı ile tepkimeye girerek nitrat ve nitrit şeklinde yeryüzüne düşer. Azot gazının bir kısmı da azot fiksasyonu olarak tanımlanan proseste azot bağlayıcı bakteriler tarafından bağlanır ve toprağa verilir. Aynı zamanda, *Rhizobium* bakterileri atmosfer azotunu bağlar ve bitkiye verir. Mineralizasyon olarak tanımlanan proseste ise, üretici canlılar topraktaki nitratı ve *Rhizobium* bakterileri tarafından bağlanan azotu kullanarak protein, DNA (Deoksiribonükleik Asit), RNA (Ribonükleik Asit) ve ATP (Adenozin Trifosfat) sentezi gerçekleştirir. Üretici canlıların besin zincirine katılması sonucunda, azot bir canlıdan diğer bir canlıya aktarılır. Ölen canlıların ayırıştırıcılar tarafından parçalanması sonucunda, amonyak açığa çıkar. Açığa çıkan amonyak, topraktaki nitrit bakterileri tarafından kullanılarak nitrite ve ardından nitrat bakterileri tarafından kullanılarak nitrata dönüştürülür. Nitrit ve nitrat bakterilerinin gerçekleştirdikleri bu

dönüşüm olayına nitrifikasyon denir. Topraktaki nitratin bir kısmı, tekrar üreticiler tarafından alınır. Nitratin geri kalan kısmı ise denitrifikasyon bakterileri tarafından parçalanır ve atmosfere azot gazı şeklinde bırakılır. Böylece azot döngüsü tamamlanır.

2.2. Mikrobiyal Azot Çevrimi

Azot dönüşümünde görev yapan yeni mikroorganizmaların keşfi ve bu mikroorganizmaların gerçekleştirdiği prosesler hakkında araştırmalar yapılması sonucunda mikrobiyal azot çevrimi basit bir çevrimden çok daha kompleks bir çevrime dönüşmüştür. Yaklaşık 20 yıl öncesine kadar, nitrifikasyon bakterileri ve denitrifikasyon bakterileri mikrobiyal azot çevrimindeki iki önemli biyokimyasal prosesi gerçekleştiren başlıca mikroorganizma grupları olarak düşünülürdü (Strous ve Jetten 2004). Yeni keşiflerin ardından anaerobik amonyum oksitleyen bakteriler ve amonyak oksitleyen arkelerin (AOA) doğal ekosistemlerde amonyumu oksitleme kapasitesi doğrulanmış ve azot çevriminde azot akışının büyük bir kısmının daha önce kabul edilen aksine Anammox ve AOA'lar tarafından gerçekleştirildiği belirlenmiştir (Strous vd. 1999; Köenneke vd. 2005).

Yeni mikroorganizmaların keşfi ile geleneksel azot çevriminde gerçekleşen azot fiksasyonu, mineralizasyon (amonyifikasyon), nitrifikasyon ve denitrifikasyon proseslerine ek olarak, nitratin amonyuma katabolik indirgenmesi (DNRA) ve anammox proseslerinin azot çevriminde rol oynadığının belirlenmesiyle azot çevriminin Şekil 2.2'de görüldüğü gibi gerçekleştiği belirlenmiştir.



Şekil 2.2. Mikrobiyal azot çevrimi

Oksijenin yokluğunda termodinamik olarak en çok tercih edilen elektron alıcısı nitrattır. Yeni keşifler ışığında, nitratin geleneksel denitrifikasyon prosesine ek olarak

DNRA prosesinde de kullanıldığı belirlenmiştir. DNRA prosesinin ilk adımında nitrat nitrite indirgenmekte ve ardından nitritin amonyuma indirgenmesi gerçekleşmektedir. King ve Newdwell (1985) tarafından DNRA'nın organik elektron verici konsantrasyonunun fazla ve nitrat konsantrasyonunun az olduğu ortamlarda gerçekleşebileceği belirlenmiştir. DNRA veya denitrifikasyon proseslerinden hangisinin baskın proses olacağı mevcut elektron verici ve elektron alıcı arasındaki orana bağlıdır (Smith ve Zimmerman 1981; Tiedje vd. 1982).

Azot çevriminin son prosesinde amonyumun anaerobik oksidasyonu sonucunda azot gazı üretilmektedir (van de Graaf vd. 1995; Jetten vd. 2001; Dalsgaard vd. 2003; Kuypers vd. 2003). 1977 yılında Broda tarafından yapılan termodinamik hesaplamalara göre doğada azotun dönüşümü için önemli iki tür bakteri olduğu önerilmiştir (Broda 1977). Yaklaşık 20 yıl sonra 1990'larda denitrifikasyon gerçekleştirilen bir reaktörden önemli miktarda amonyumun yok olduğu gözlenmiştir (Mulder vd. 1995). Bu reaktörün biyokütlesi aşı olarak kullanılarak kültür zenginleştirme çalışmaları başlamıştır. Başlangıçta amonyumun anaerobik gideriminin nitrata dayalı olduğu düşünülmüştür. Ancak prostele elektron verici olarak bulunan nitratın nitrite indirgenmesi ve nitritin amonyum oksidasyonunda elektron verici olarak görev aldığı belirlenmiştir (Mulder vd. 1995). Çalışmaların sonucunda Anammox bakterilerin eşit mol oranında amonyum ve nitrit sağlandığında azot gazı oluşturduğu belirlenmiştir (van de Graaf vd. 1996). Anammox deniz ekosisteminde azot gazı üretimine önemli katkı sağlamaktadır (Dalsgaard vd. 2003, 2005; Francis vd. 2007). Doğal sulak alanlarda Anammox ile yapılan çalışmalar azot gazı üretiminde Anammox'un küçük bir rol oynadığını gösterirken atıksu arıtımı için inşa edilen yapay sulak alanlarda inorganik azotun giderimine katkı sağladığı belirtilmiştir (Matheson vd. 2003; Meyer vd. 2005; Paredes vd. 2007). Anammox bakterileri birçok oksijen limitli ortamda belirlenmiş ve azot çevriminde önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır.

2.3. Azot Gideriminin Önemi

Başlıca besi maddeleri (nütrientler) olan azot (N) ve fosfor (P) organizmaların yaşayıp gelişmeleri için oldukça gereklidir. Ancak, besi maddesi miktarlarının güvenli seviyeyi aşması ötrofikasyona neden olmaktadır. Özellikle tabakalaşmış göllerde başlıca besi maddeleri olan azot ve fosforun konsantrasyonunun artması ile ayrıştırıcıların oksijen ihtiyacı artar ve bunun sonucunda gölün oksijen potansiyeli aşılır. Oksijen potansiyelinin aşılması aerobik ayrıştırıcıların ölümüne ve anaerobik formlar ile yer değiştirmelerine neden olur. Sonuç olarak, azot ve fosfor kaynaklarının sürekli göle girişi ile bütün göl anaerobik olur, çoğu balık ölür ve su yüzeyinde alg miktarı artar. Göl yüzeyinde oluşan yeşil ince alg kütlesi "alg patlaması" olarak adlandırılır. Zamanla göl ölü ve çürümüş organik madde ile dolarak bataklık haline dönüşür. Bu süreç ötrofikasyon olarak adlandırılmaktadır (Vesilind vd. 2014).

Azotun esas kaynakları evsel ve endüstriyel atıksulardır. Birçok ulusal ve uluslararası yönetmelik ile azot deşarj limitleri belirlenmiştir. Ancak, karışık çamur çürütücünden çıkan çamurlar yaklaşık 1000 mg/L $\text{NH}_4\text{-N}$ (amonyum azotu) içerebilmektedir (Wiesmann 1994). Bazı çalışmalar çöp sahası sızıntı sularının 1400 ve 2800 mg/L arasında değişen amonyum konsantrasyonlarına sahip olduğunu göstermiştir (Liang ve Liu 2008; Cema vd. 2009). Bu sebeple atıksu arıtma tesislerinde deşarjdan önce azotun sınır değerlere getirilmesi gerekmektedir.

2.4. Azot Giderim Yöntemleri

Azotun doğal ortamlarda yarattığı problemler nedeniyle giderimine yönelik birçok yöntem geliştirilmiştir. Her bir yöntemin farklı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Azot giderim yöntemleri, fizikokimyasal azot giderim yöntemleri, geleneksel biyolojik azot giderim yöntemleri ve yenilikçi biyolojik azot giderim yöntemleri olmak üzere üçe ayrılabilir.

2.4.1. Fizikokimyasal azot giderim yöntemleri

Azotun fizikokimyasal giderimi amacıyla uygulanan başlıca yöntemler; amonyak sıyırma, kırılma noktası klorlaması, iyon değişimi ve strüvit çöktürmesidir. Amonyak sıyırma, alkali koşullar altında amonyağın sudan gaz formunda ayrıldığı prostestir. Hava ve buhar baloncuk olarak kullanılabilir. Hava baloncuk halindeyken elde edilen amonyak içeren hava daha konsantre ve temizlenmiş halde daha sonra toprak iyileştirici olarak kullanılabilen amonyum sülfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ veya amonyum klorür (NH_4Cl) çözeltisi oluşturmak üzere asit ile yıkanır (Zhao vd. 2015). Amonyak buharla sıyırılması için, buharın sürekli sirküle edilmesi sonunda daha ileri kullanıma hazır amonyak çözeltisi elde edilmektedir (Zeng vd. 2006). İşlem düşük maliyetlidir ve basit işletme avantajlarına sahiptir. Ancak düşük sıcaklıkta, düşük verimlilik ve hassasiyet gibi dezavantajları vardır (Capodaglio vd. 2015).

Kırılma noktası klorlaması prosesinde, klor amonyum aracılığıyla azot gazına oksitlenir. Klor amonyak içeren çözeltiye minimum artık kloru ulaşıncaya dek eklenmektedir. Proses esnasında amonyum ve diğer oksitlenebilir kirleticiler giderilmektedir (Jeong vd. 2014). Prosesin en büyük avantajları düşük yatırım maliyeti, yüksek verimlilik ve amonyağın reaktif olmayan azot gazı içine oksidasyonudur. Dezavantajları ise; tamamlanmamış oksidasyonla rahatsız edici kötü koku veren kloroaminlerin üretimi ve ortamda organik madde bulunması durumunda azotun tehlikeli kloroform (CHCl_3) formuna dönüşebilmesidir. Ayrıca yüksek klor ihtiyacı çevreyi ve güvenliği etkilemektedir (Capodaglio vd. 2015).

İyon değişimi prosesinde klinoptilolit amonyuma bağlı kalsiyum, magnezyum ve sodyum için seçici olmasıyla amonyum giderimi gerçekleştirilebilmektedir. Pratikte iyon değiştirme kolonu boyunca elenen atıksudaki klinoptilolit, maksimum kapasitede zeolit doyana dek amonyum klinoptilolit tarafından absorbe edilir. Kostik sıvı ya da tuzlu su ile geri yıkama yapılarak kolonda rejenerasyon elde edilebileceği bildirilmiştir (Almutairi ve Weatherley 2015). İyon değiştirme prosesinin başlıca avantajları yüksek verimlilik ve proses kararlılığıdır. Dezavantajları ise; yüksek yatırım ve işletme maliyeti, kompleks proses kontrolü ve ilave rejenerasyon ihtiyaçlarıdır (Capodaglio vd. 2015).

Strüvit çöktürmesi, atıksudan eş zamanlı amonyum ve fosfat giderimini sağlayan bir prostestir. Proses sırasında harici magnezyum kaynağı ilavesiyle atıksu tipine bağlı olarak 8,5-10 arasında pH değerlerinin uygulanması ile strüvit kristalleri oluşturulmakta ve böylece atıksudan azot giderimi sağlanmaktadır. Prosesin en büyük avantajı oluşan strüvit kristallerinin gübre olarak kullanılabilmesidir. Proseste eş zamanlı amonyum ve fosfat giderimi olmasına rağmen yüksek maliyet ve karmaşık işletme koşulları yaygın olarak uygulanmasını engellemiştir (Capodaglio vd. 2015).

Kırılma noktası klorlaması dışındaki fizikokimyasal azot giderim prosesleri aslında kararlı formda atıksu içindeki azotu geri kazanmaktadır. Artan gübre fiyatları da azotun geri kazanımı cazip yapmaktadır. Ancak proses işletme maliyetleri açısından değerlendirildiğinde biyolojik azot giderimi prosesleri evsel ve endüstriyel atıksuların arıtımı için ana akım prosesleri olarak tercih edilmektedir.

2.4.2. Geleneksel biyolojik azot giderimi

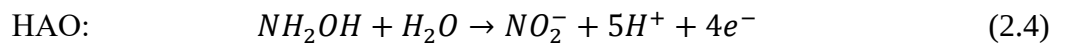
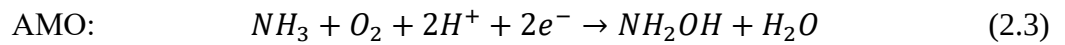
Nitrifikasyon ve denitrifikasyon ile azot giderimi enerji ihtiyacı olan ve büyük hacimler gerektiren bir prosestir ve birbirini takip eden iki ayrı süreçten oluşmaktadır. Atıksulardan azot gideriminde kullanılan biyolojik prosesler nitrifikasyon ve denitrifikasyondur.

2.4.2.1. Nitrifikasyon

Nitrifikasyon amonyum oksitleyici bakteriler (AOB) ve nitrit oksitleyici bakteriler (NOB) olarak isimlendirilen iki nitrifikasyon bakterisi grubu tarafından gerçekleştirilir. Her iki bakteri grubu da elektron alıcısı olarak oksijeni, elektron vericisi olarak amonyum veya nitriti ve karbon kaynağı olarak karbondioksiti (CO₂) kullanan kemolitotrof mikroorganizmalardır (Tchobanoglous vd. 2013). Nitrifikasyon sürecinde amonyak AOB'lar tarafından nitrite (Eşitlik 2.1) ve ardından nitrit NOB'lar tarafından nitrata (Eşitlik 2.2) oksitlenir.



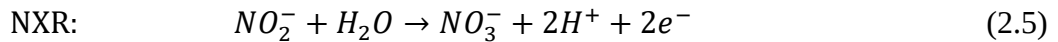
Aerobik AOB'ların başlıcaları *Nitrosomonadaceae* familyasından *Nitrosomonas*, *Nitrospira* (Head vd. 1993; Purkhold vd. 2000) ve *Nitrosococcus* (Ward ve O'Mullan 2002) olarak tespit edilmiştir. İndirgenmiş azotun AOB'lar tarafından dönüşümü amonyağın hidroksilamin (NH₂OH) oksidasyonu ile başlar. Bu reaksiyon amonyak monooksijenaz (AMO) enzimi tarafından katalizlenir (Eşitlik 2.3). Ardından hidroksilamin, hidroksilamin oksidoredüktaz (HAO) enzimi aracılığı ile nitrite dönüştürülür (Kowalchuk ve Stephen 2001) (Eşitlik 2.4).



AMO'nun anaerobik AOB'ların metabolizmasındaki anahtar enzim olduğu düşünülür. AMO enzimi farklı yapılara sahip AmoA, AmoB ve AmoC alt gruplarından oluşur (Jetten vd. 1997). Bu üç gen arasında AMO'nun alfa alt grubu olan amoA aerobik AOB bakterilerinin çeşitliliğine yönelik çalışmalarda moleküler izleyici olarak kullanılmaktadır (Bothe vd. 2000, Kowalchuk ve Stephen 2001). AmoA geni AOB çeşitliliği biyoizleyicisi olarak kullanılmasının yanı sıra toprak, içme suyu ve atıksu habitatlarında AOB'ların varlığını tespit etmek için kullanılmaktadır (Watson 1971; Watson ve Mandel 1971; Winogradsky 1982; Watson vd. 1986; Wayne vd. 1987).

Nitritin nitrata oksidasyonu olan nitritasyon ise NOB'lar tarafından gerçekleştirilir. *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* ve *Nitrospira* olmak üzere dört

farklı NOB grubu tanımlanmıştır (Koops vd. 2001). İlk keşfedilen olduğu ve saf kültürünün elde edilmesi kolay olduğu için nitrite yönelik çalışmalar çoğunlukla *Nitrobacter* ile gerçekleştirilmiştir (Henze vd. 1997). 1986 yılında *Nitrospira*'nın ilk kültürünün tanımlanmasının ardından (Watson vd. 1986; Ehrich vd. 1995) *Nitrospira*'nın aktif çamur sisteminde de önemli bir oksitleyici olduğu belirlenmiştir (Juretschko vd. 1998; Daims vd. 2001). Atıksu arıtma tesislerinin yanı sıra *Nitrospira* türünün üyelerinin birçok doğal ve mühendislik ekosistemlerinde en dominant nitrit oksitleyici olduğu belirlenmiştir (Hovanec vd. 1998; Daims vd. 2001; Lebedeva vd. 2005). NOB'lar tarafından nitrit oksidasyonu nitrit oksidoredüktaz (NXR) enzimi tarafından katalizlenir. Bu reaksiyon sırasında nitrit nitrata oksitlenirken sudan 2 elektron açığa çıkar (Sundermeyer ve Bock 1981). (Eşitlik 2.5).



Nitrifikasyon kinetiği pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen konsantrasyonu gibi faktörlerden etkilenir. Amonyum oksitleyici bakterilerin aktivitesi için optimum sıcaklık 35-45°C ve nitrit oksitleyici bakterilerinin aktivitesi için optimum sıcaklık 35-42°C olarak önerilmektedir (EPA, 1993). Nitrifikasyon hızı, pH nötr aralık altına düştüğünde önemli oranda düşebilir ve nitrifikasyon hızının kararlılığı için pH 6,5-8,0 arasında korunmalıdır. Oksijen konsantrasyonunun 1 mg/L'den daha az olması nitrifikasyon bakterilerini inhibe ettiği için oksijen konsantrasyonu 1 mg/L'nin altına düşmemelidir (Tchobanoglous vd. 2013). Nitrifikasyon prosesi, önemli miktarda alkalinite tüketir ve bu nedenle nitrifikasyonun gerçekleşmesinde suyun asitleşmesi bir göstergesi olarak kullanılabilir. Nitrifikasyon normalde aktif çamur sistemlerinde heterotrofik bakteriler tarafından organik karbon oksidasyonu ile birleştirilir (Tchobanoglous vd. 2013).

Nitrifikasyon sistemleri karbon (C) ve azot giderimi aynı tank içerisinde gerçekleştiriliyorsa “birleşik” veya “tek kademeli” olarak adlandırılır. Eğer karbon ve azot giderimi ayrı tanklarda gerçekleştiriliyorsa “ayrık kademeli” veya “iki kademeli” sistem olarak isimlendirilir. Aktif çamur sistemlerinde nitrifikasyonun gerçekleşebilmesi Biyokimyasal oksijen ihtiyacının toplam kjeldahl azotuna oranı (BOI₅/TKN) ile ilişkilidir. Pek çok klasik aktif çamur sisteminde BOI₅/TKN oranı 5'den büyük olduğu zaman nitrifikasyon tek kademeli sistemde gerçekleştirilir. Bu oranın 1 ile 5 arasında olması durumunda ise ayrık sistem uygulanması gerekir. Her ne kadar azot giderimi karbon giderimi ile birlikte (tek kademeli) gerçekleştirilebilse de nitrifikasyonun ayrı tankta (iki kademeli) gerçekleştirilmesi yüksek proses kontrolüne olanak sağlar. İki kademeli sistemde her bir havalandırma tankı bağımsız işletilebilir ve nitrifikasyon bakterileri için toksik olan birçok atık karbon gideriminin gerçekleştirildiği ilk tankta giderilebilir veya azaltılabilir. Genel olarak ayrık sistemlerde nitrifikasyon tankına (ya da ikinci havalandırma tankına) giriş kimyasal oksijen ihtiyacının (KOİ) 40-50 mg/L olması sağlanır (Tchobanoglous 2003). İlk kademede teşkil edilen yüksek hızlı aktif çamur sürecinde karbonlu madde giderimi gerçekleştirilir. İkinci kademede ise nitrifikasyon gerçekleştirilir. Her kademe ayrı bir çökeltme havuzuna ve geri devire sahiptir. Bununla birlikte, uzun havalandırma aktif çamur sürecinde karbon ve azot giderimi aynı havuzda gerçekleşir. Nitrifikasyon için tesiste kullanılacak sistem tasarımı, giderilmesi gereken sezonluk veya yıllık amonyak miktarı, sıcaklık, amonyum iyonun istenen çıkış konsantrasyonu, diğer çıkış su kalitesi gereksinimleri ve maliyet başta olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır (Tchobanoglous vd. 2003). Nitrifikasyon birleşik aktif çamur

sisteminde gerçekleşiyorsa sistemin kararlılığı için aşağıdaki işletme koşulları sağlanmalıdır (Tchobanoglous vd. 2003):

- Nitrifikasyon için ilave oksijen sağlanmalıdır.
- Uzun çamur yaşı seçilmelidir. Nitrifikasyon bakterileri ototrofik bakteriler olup, heterotrofik bakterilerden daha yavaş büyüme hızına sahiptirler. Bu nedenle bu bakterilerin etkin olabilmesi için daha uzun çamur yaşı sağlanmalıdır.
- Mikrobiyolojik dönüşüm nedeniyle ortamın pH'ı düştüğünde kireç veya soda ilavesiyle pH ayarlaması yapılmalıdır.

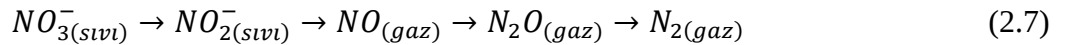
2.4.2.2. Denitrifikasyon

Nitrifikasyon işleminde azot sadece form değiştirerek, nitrata dönüşür ve toplam azot giderimi ancak denitrifikasyon yolu ile gerçekleştirilebilir. Bu nedenle, azotun tamamen giderimi için nitrifikasyondan sonra denitrifikasyon basamağı zorunludur (Tchobanoglous vd. 2003).

Denitrifikasyon, oksijensiz ortamda fakültatif anoksik bakteriler (denitrifikasyon bakterileri) tarafından çözünmüş organik maddenin (çKOİ) giderimi için nitrat veya nitritin elektron alıcısı olarak kullanılması ile gerçekleşir. Eğer endüstriyel atık deşarjı söz konusu değil ise, aktif çamur sistemine nitrat ya da nitrit girişi olmaz. Denitrifikasyonun gerçekleşebilmesi için aktif çamur sisteminde nitrifikasyon ile nitrat veya nitrit üretilmesi gerekir. Denitrifikasyonda nitrat iyonları anoksik koşullarda azot gazına dönüştürülerek atmosfere salınır (Eşitlik 2.6).



Denitrifikasyon nitratin nitrite indirgenmesiyle başlar ardından nitrit, nitrik oksite (NO) ardından nitroz oksite (N_2O) indirgenir, son olarak da azot gazı oluşur. Her bir ara ürün oksijen konsantrasyonu ve elektron verici bulunması gibi faktörlere bağlı olarak son ürün olabilir (Betlach ve Tiedje 1981; Hernandez ve Rowe 1987; Härtig vd. 1999) (Eşitlik 2.7).



Denitrifikasyon prosesi dört farklı azot redüktaz enzimi tarafından katalizlenir. Nitrat redüktaz (NAR) enzimi nitratin nitrite indirgenmesini, nitrit redüktaz enzimleri (nirK ve nirS) tarafından nitritin nitrik oksite indirgenmesini, nitrik oksit redüktaz (NOR) enzimi nitrik oksitin nitroz oksite indirgenmesini ve son olarak nitroz oksit redüktaz (NOS) enzimi nitroz oksitten azot gazı oluşumunu sağlar (Zumft 1997).

2.4.3. Azot gideriminde yenilikçi prosesler

Yüksek azot konsantrasyonu içeren atıksulardan azotun tamamen giderilmesi için büyük miktarda karbon kaynağı gerekmektedir. Fakat atıksuda bulunan organik karbon miktarı ihtiyacı karşılayacak düzeyde değildir (Tchobanoglous vd. 2003). Karbon eklenmesi artı maliyet anlamına geldiği için son yıllarda yüksek amonyum azotu içeren

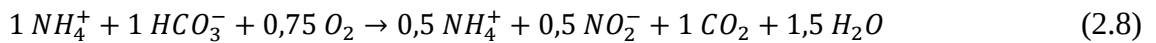
atıksularda azot giderimi için yeni prosesler geliştirilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda amonyum azotu ve düşük konsantrasyonlarda organik madde içeren atıksuların arıtımında konvansiyonel prosesler yerine alternatif kısmi nitrifikasyon-denitrifikasyon sistemleri yenilikçi teknolojiler olarak uygulanmaya başlanmıştır (Güven vd. 2010). Bu prosesler SHARON (Nitrit üzerinden yüksek amonyum giderimi için basit reaksiyon sistemi), ANAMMOX ve DAMO (denitrifikasyona dayalı anaerobik metan oksidasyonu) prosesleridir.

2.4.3.1. Kısayol nitrifikasyon-denitrifikasyon (Sharon Prosesi)

Konvansiyonel nitrifikasyon-denitrifikasyon prosesinde önce amonyumun (NH_4) nitrite ve ardından nitritin nitrate oksitlenmesiyle nitrifikasyon prosesi gerçekleşir. Takip eden denitrifikasyon prosesinde ise nitrat tekrar nitrite ve nitritte azot gazına indirgenir. Bu proses adımlarına göre azot gideriminin nitrat üretimi olmaksızın nitrit üzerinden gerçekleştirilmesi mümkündür. Bu yaklaşıma göre, kısayol nitrifikasyon-denitrifikasyon prosesinde nitrat üretimini durdurmak için nitrit oksitleyici bakterilerin aktivitesinin durdurulması hedeflenmiştir (Hellings vd. 1998). Proses, yüksek sıcaklıklarda ($30-35^\circ C$) nitrit oksitleyici bakterilerin amonyak oksitleyici bakterilerden daha yavaş büyümesi prensibine dayanmaktadır (Hellings vd. 1998). Nitrit oksitleyici bakteriler nitriti nitrate oksitleyemediği için denitrifikasyon nitrit üzerinden gerçekleşmektedir. Bu proses düşük C/N oranlı atıksularda %25 daha az havalandırma, %40 daha az biyobozunur KOİ tüketimi ve %40 daha az çamur üretimi ile uygun maliyetli arıtım sağlamaktadır.

2.4.3.2. Kısmi nitrifikasyon-anammox prosesi

Anammox prosesi nitriti elektron alıcısı olarak kullanarak amonyum azotunu azot gazına dönüştüren bir grup *Planctomycete* bakteri tarafından gerçekleştirilen bir prosestir (van Dongen vd. 2001). Gerçek atıksularda amonyum ve nitrit aynı oranda bulunmadığı için Anammox prosesinin gerçekleşmesi ve Anammox bakterilerinin azotu giderebilmesi ortamda yeterli amonyum-nitrit karışımının bulunmasına bağlıdır. Bu amaçla, prosesin birinci adımı olarak atıksuda bulunan amonyağın yarısının nitrite oksitlenmesi için kısmi nitrifikasyon prosesleri uygulanmaktadır. Kısmi nitrifikasyonun toplam reaksiyonu aşağıdaki gibi ifade edilmektedir (Eşitlik 2.8):



Kısmi nitrifikasyonun ardından Anammox prosesinin uygulanması ise atıksuyun organik karbon kaynağı ilavesi gerekmeksizin arıtımını sağlar. Bu alternatif ile havalandırma giderlerinden %40, karbon kaynağı giderlerinden ise %100 tasarruf etmek mümkündür (Van Loosdrecht ve Jetten 1998).

Kısmi nitrifikasyon-Anammox prosesi, kısmi nitrifikasyonun gerçekleştirildiği tam karışımli reaktör ve onu izleyen Anammox çevriminin olduğu diğer reaktörü içeren iki aşamalı sistemde gerçekleştirilebilir. Ayrıca, kısmi nitrifikasyon ve Anammox'un eş zamanlı meydana geldiği tek aşamalı sistemler olan nitrit üzerinden tamamen ototrofik (CANON) prosesi ve oksijen sınırlı ototrofik denitrifikasyon (OLAND) prosesi geliştirilmiştir. Bu proseslerde kısıtlı oksijen şartları altında tek bir reaktör içinde iki sıralı reaksiyon gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonları nitrifikasyon bakterileri ve anammox bakterileri iş birliği içinde gerçekleştirmektedir. Aynı reaktör içinde oksijen kontrolü uygulanan CANON ve OLAND gibi konfigürasyonlarda iki proses birlikte

gerçekleştirilse de tek reaktörlü sistemler yüksek amonyum konsantrasyonuna sahip atıksulardan yeterli azot giderim verimi sağlayamamaktadır. Ancak, kısmi nitrifikasyon-Anammox prosesinin farklı tanklarda ardışık uygulanması her bir adımın bağımsız kontrolü ile esneklik ve kararlılık sunmaktadır (Van Hulle vd. 2010).

2.4.3.3. DNRA

DNRA, nitrat amonifikasyonu veya ototrofik denitrifikasyon olarak bilinmektedir. DNRA'nın azot çevriminde nitrat giderimi açısından denitrifikasyon kadar önemli olduğu belirlenmiştir (Tiedje 1988). Denitrifikasyon sırasında nitrat azot gazına indirgenirken DNRA prosesinde nitrat amonyuma dönüşmektedir. DNRA mekanizmasının ilk adımı nitrat redüktaz kompleksi (NapAB) tarafından katalizlenen nitratın nitrite indirgenmesidir. Ardından nitrit redüktaz enzimini kodlayan gen (NrfA) tarafından nitrit amonyuma indirgenmektedir (Kraft vd. 2011). DNRA prosesinin fakültatif anaerobik bakteriler, zorunlu anaerobik bakteriler ve bazı aerobik bakteriler tarafından gerçekleştirilebildiği belirlenmiştir (Tiedje 1988; Cole 1996).

2.4.3.4. Damo prosesi

DAMO prosesinin keşfinin karbon ve azot döngüleri arasında önemli bir bağ oluşturduğu düşünülmektedir (Raghoebarsing vd. 2006; Hu vd. 2014). Metan oksidasyonundan elde edilen elektronları nitratın nitrite indirgenmesinde kullanılabilen damo arkeleri (Haroon vd. 2013) ve metan oksidasyonundan açığa çıkan elektronları kullanarak nitritten azot gazı dönüşümü sağlayan damo bakterileri tespit edilmiştir (Ettwig vd. 2010). Yeni ve ilginin giderek arttığı damo prosesleri mikrobiyal topluluğun karakterizasyonuna (Raghoebarsing vd. 2006; Ettwig vd. 2009; Haroon vd. 2013), özel mikroorganizmaların zenginleştirilmesine (Ettwig vd. 2009; Hu vd. 2009; Kampman vd. 2012) ve uygulamanın potansiyel genişletmelerine (Luesken vd. 2011; Shi vd.2013; Cai vd. 2015; Xie vd.2017) odaklıdır. Ayrıca, Damo mikroorganizmalarının Anammox bakterileri ile bir arada var olma yetenekleri kanıtlanmıştır (Shi vd.2013; Ding vd. 2014; Xie vd.2017). Damo bakterilerinin azot giderimini metan kullanarak yerinde gerçekleştirmesi, Anammox prosesinin zayıf yönlerinin üstesinden gelmede potansiyel alternatifler sunmaktadır. Ancak, deneysel çalışmaların sınırlı olması ve belirsizlikleri Damo mikroorganizmalarının fizyoloji ve kinetikleri hakkında daha ileri uygulamaların yapılmasına engel olmaktadır (Kampman vd. 2012).

2.5. Anammox Prosesi

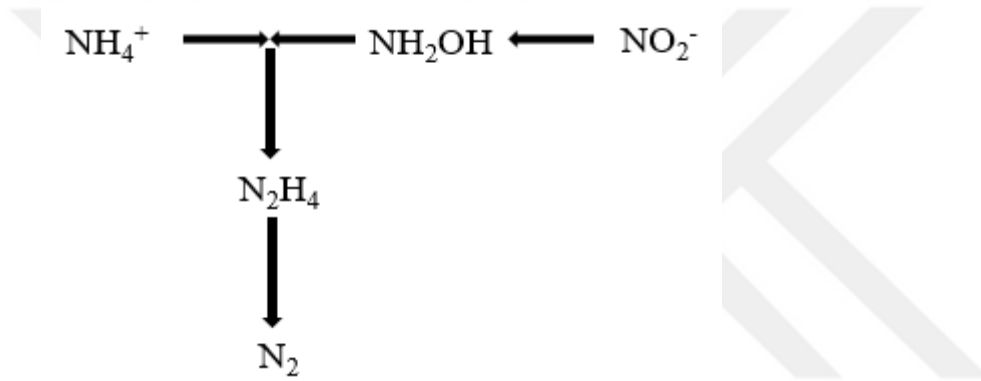
Proses ismini Anaerobic Ammonium Oxidation'ın (Anaerobik Amonyum Oksidasyonu'nun) ilk harflerinden almaktadır. Anammox prosesinin varlığı fizikçi Broda tarafından önerilmiştir (Broda 1977). Anammox prosesinin keşfedilmesine kadar amonyumun kimyasal olarak inert olduğu ve bu yüzden amonyumun anaerobik oksidasyonunun mümkün olmadığı kabul edilirdi (Kuenen 2008). 1990'ların başında amonyumun anaerobik oksidasyonuna ait ilk doğrudan delil Hollanda Delft'deki bir atıksu arıtma tesisinden gelmiştir (Van de Graaf vd. 1995). Burada ANAMMOX prosesi anaerobik çürütme çıkış suyunu arıtmak amacıyla denitrifikasyon uygulanan bir reaktörde keşfedilmiştir (Mulder vd. 1995). Mulder vd. (1995) tarafından yürütülen çalışmada anoksik şartlarda, nitrat tüketimi ve azot gazı üretimi sürekli yükselirken yüksek miktarda amonyumun yok olduğu gözlenmiştir. Daha sonra nitrit azotunun

varlığında anoksik şartlarda amonyak oksitleyiciler tarafından amonyanın oksitlenebildiği belirtilmiş ve proses için elektron alıcı olarak nitritin tercih edildiği gözlemlenmiştir.

Uzun süren çalışmalar sonunda laboratuvar ölçekli anaerobik amonyum oksidasyonu yapan bakterilerin (anammox bakterilerinin) varlığı ispatlanmıştır. Birkaç yıl sonra da doğal çevrede anaerobik amonyum oksidasyonu ile ilgili ilk bulgular yayınlanmıştır. Böylece “doğanın kayıp litotroflarının” bulunduğu bildirilmiştir. “ANAMMOX” kelimesi hem prosesi hem de bunu gerçekleştiren mikroorganizmaları tanımlamaktadır (Van Hulle vd. 2010).

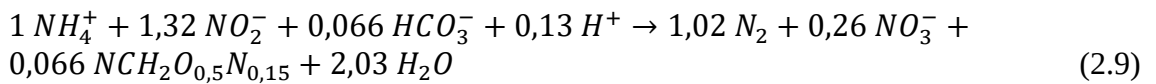
2.5.1. Anammox prosesi çalışma prensibi

Anammox anaerobik koşullar altında elektron alıcısı olarak nitritin varlığında amonyumun oksitlenerek azot gazının üretildiği prostestir (Strous vd. 1998) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Anammox prosesi

Anammox reaksiyonuna göre, teorik olarak, Anammox prosesinin gerçekleşmesi için nitrit ve amonyum arasındaki en uygun mol oranı 1:1,32’dir (Eşitlik 2.9).

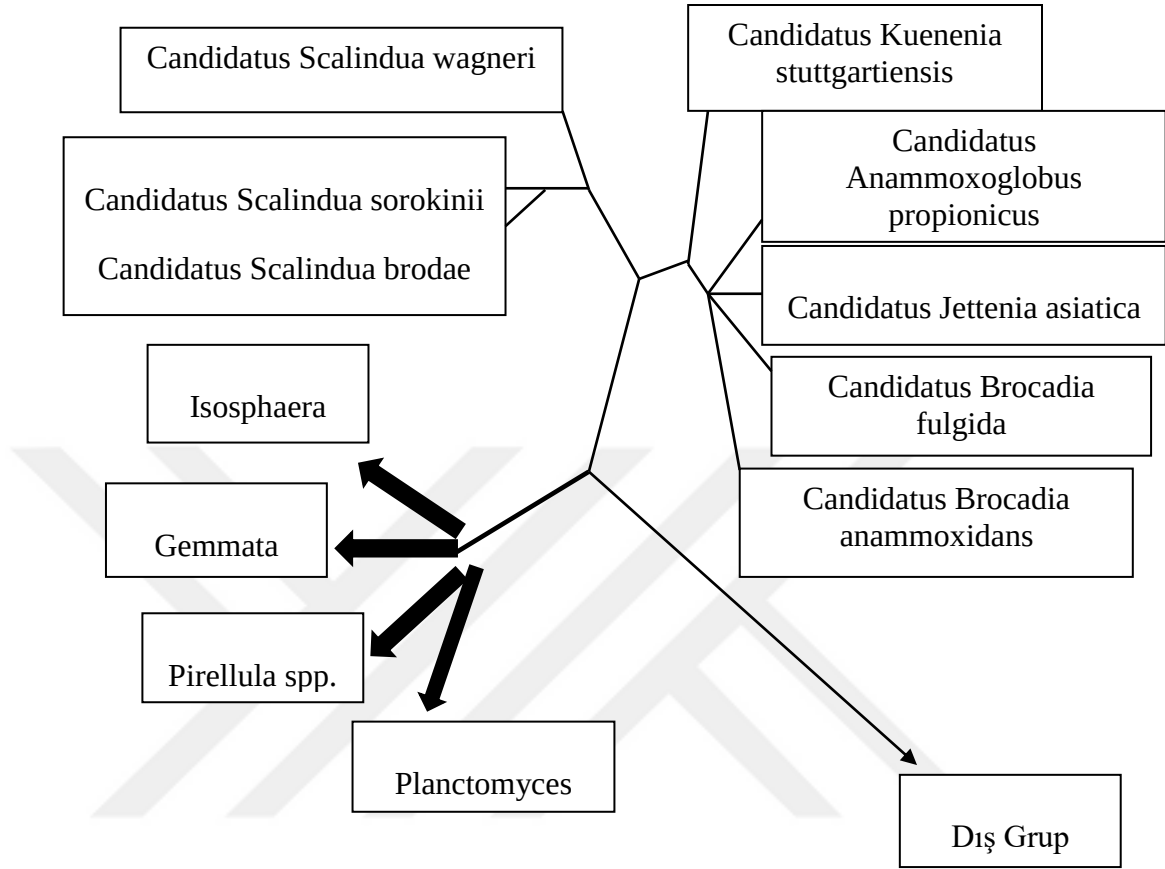


Anammox prosesinde azotun %90’ı azot gazına dönüşürken yaklaşık %10’u nitrata dönüşür. Eşitlik 2.9’da görüldüğü üzere bikarbonat karbon kaynağıdır. Buna göre Anammox bakterileri inorganik karbon olan bikarbonatı kullanan kemoototrof bakterilerdir (Kartal vd. 2012).

2.5.2. Anammox bakterileri

Anammox mikroorganizmaları nitrit ve amonyumu birleştiren başlıca protein olan hidrazin oksiredüktazı içeren ve anammoksozom olarak adlandırılan özgün prokaryotik organel sahiptir (Jetten vd. 2005b). Bu özgün organel merdiven tipi ladderan lipidler ile çevrelenmiştir ve hücrenin ortasında yer almaktadır (Jetten vd. 2005b). Anammox hücresi genellikle kokoid şeklindedir (Nozhevnikova vd. 2012). Anammox prosesini gerçekleştiren bakteriler ilk olarak Planktomiset şubesinden Planktomiset benzeri bakteri olarak belirlenmiştir (Jetten vd. 2003). Şekil 2.4’de görüldüğü üzere, günümüzde

Anammox bakterilerinin Planktomiset (Planctomycetes) şubesinde farklı dallarda bulunan beş farklı aileden olduğu bilinmektedir (Date vd. 2009).



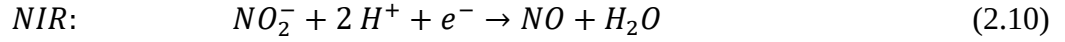
Şekil 2.4. Planktomiset şubesinin filogenetik ağacı (Kuenen 2008).

16S rRNA analizlerine göre Anammox bakterileri *B. anammoxidans* (Strous vd. 1999) ve *B. Fulgida*'yı (Kartal vd. 2008) içeren *Brocadia* cinsi, *K. stuttgartiensis* (Schmid vd. 2000) içeren *Kuenenia* cinsi, *S. wagneri*, *S. brodae* ve *S. sorokinii* (Kuypers vd. 2003, Schmid vd. 2003), *Jettenia* (Quan vd. 2008) ve *Anammoxoglobus* içeren *Anammoxoglobus propionicus* (Kartal vd. 2007) cinsi olmak üzere beş cins içerisinde yer almaktadır. Henüz hiçbir bakteri saf kültürde zenginleştirilemediği için hepsi Candidatus olarak tanımlanmaktadır (Li ve Gu 2011). Anammox bakterilerinin atıksu arıtımında kullanımında en çok tespit edilen Anammox cinsleri *Brocadia* ve *Kuenenia*'dır (Lotti vd. 2012).

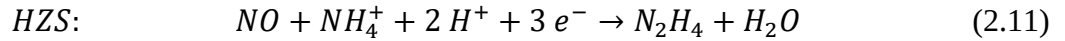
2.5.3. Anammox prosesi ara ürünleri ve enzimleri

Anammox bakterileri ara ürün olarak NO ve hidrazini (N_2H_4) içeren karmaşık bir reaksiyon mekanizması kullanırlar. Bu reaksiyon mekanizması hidrazin sentaz (HZS), hidrazin dehidrojenaz (HDH), nitrit redüktaz (NIR) ve NAR olmak üzere dört ana enzimi içerir (Kartal vd. 2011).

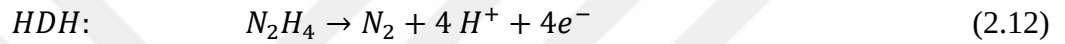
Strous vd. (2006) tarafından nirS ve hidroksilamin/hidrazin oksidoredüktaz (hao/hzo) (Hooper vd. 1997) genlerin incelenmesi ile anammox metabolik süreçleri hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Anammox reaksiyonu için belirlenen metabolik mekanizmaya göre, proses nitritin nirS ile NO⁻ya indirgenmesi ile başlar (Eşitlik 2.10).



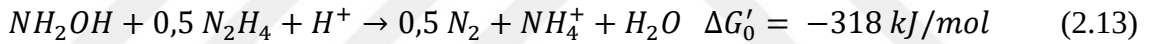
NO ve NH₄ hidrazin sentaz enzimi tarafından enerji açısından zengin bir ara ürün olan N₂H₄'e dönüştürülür (Kartal vd. 2010) (Eşitlik 2.11).



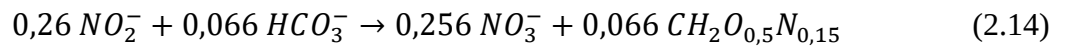
Son aşamada HDH enzimi tarafından azot gazının N-N bağı oluşturulur (Eşitlik 2.12). Hidrazin sentaz enziminin N-N bağı oluşturabilen iki enzimden biri olduğu düşünülmektedir (Kartal vd. 2012).



Hidrazin en güçlü indirgeyicilerden biridir ve sadece insanlar ile anammox bakterileri tarafından sentezlenebilir (van de Graaf vd. 1997). Son yıllarda hidrazin sentaz anammox bakterilerinin belirlenmesi amacıyla biyolojik indikatör olarak sıkça kullanılmaktadır. Hidroksilamin hidrazinin oksidasyonu sırasında elektron alıcı olarak görev alabilir (van der Star vd. 2008) (Eşitlik 2.13).

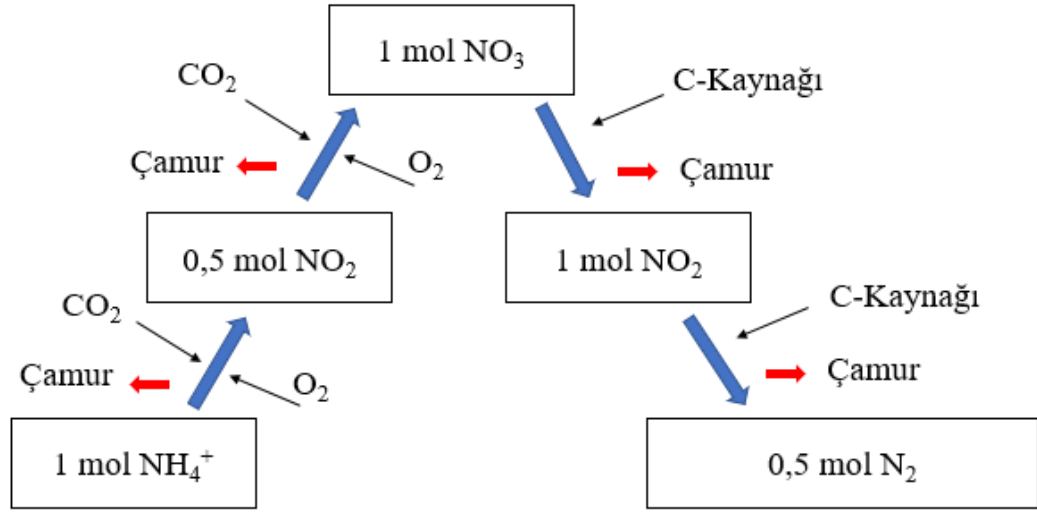


Ayrıca, anammox metabolizması sırasında nitrat/nitrit oksidoredüktaz (NarGH) enzimi nitritin bir kısmını nitrata oksitleyerek bikarbonat fiksasyonu için elektron üretir (Strous vd. 2006) (Eşitlik 2.14).

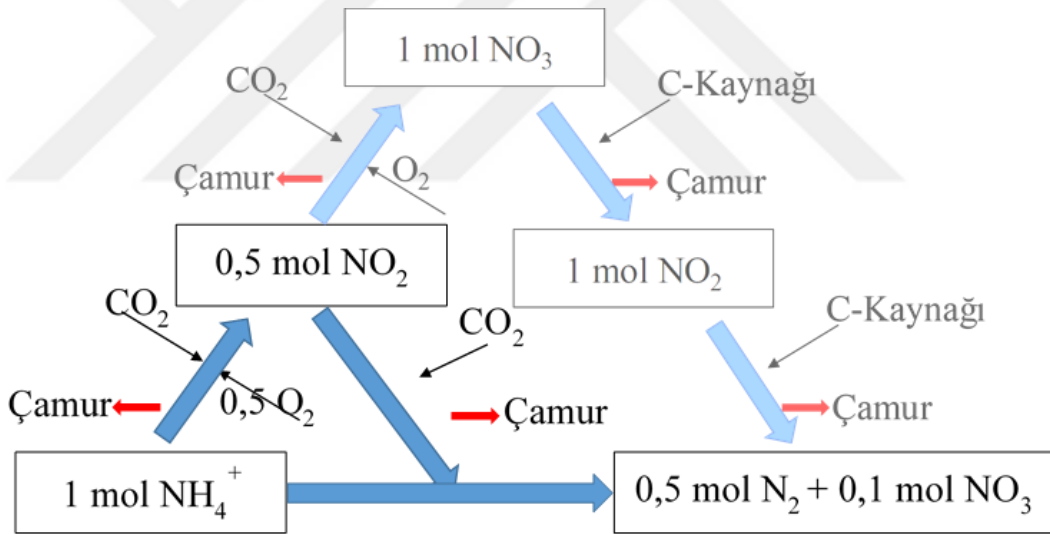


2.5.4. Anammox prosesinin avantaj ve dezavantajları

Geleneksel nitrifikasyon-denitrifikasyon prosesi ile karşılaştırıldığında anammox üzerinden gerçekleştirilen proseslerde, kısmi nitrifikasyon (nitritasyon) sırasında amonyumun yarısı sadece nitrite kadar oksitlenmektedir (Şekil 2.5). Ardından Anammox bakterileri tarafından anaerobik koşullarda kalan amonyumun tüketimi için üretilen nitrit elektron alıcısı olarak kullanılmakta ve böylece ortamdaki tüm azot, azot gazına indirgenmektedir. Aerobik koşullarda gerçekleşen nitritin nitrata dönüşümü prosesi gerçekleşmediği için daha az oksijen ve dolayısıyla daha az enerji harcanmaktadır. Ayrıca, NOB'ların çoğalması da söz konusu olmadığından çamur üretimi azalmaktadır.



(a)



(b)

Şekil 2.5. (a) Geleneksel nitrifikasyon/denitrifikasyon prosesleri ile azot giderimi, (b) Anammox prosesi üzerinden azot giderimi

Bu doğrultuda, anammox prosesi, klasik nitrifikasyon-denitrifikasyon proseslerine kıyasla; harici karbon ilavesi gerektirmemesi, daha düşük çamur üretimi, daha yüksek azot giderim hızı, daha az alan gereksinimi, düşük enerji tüketimi ve düşük işletme maliyeti açılarından daha avantajlıdır.

Anammox prosenin dezavantajları ise teknolojik kısıtlar ve proses açısından kısıtlar olarak ikiye ayrılabilir. Teknolojik açıdan kısıtlar; geleneksel nitrifikasyon-denitrifikasyon sistemleri ile karşılaştırıldığında inşaat maliyetinin yüksek olması,

kalifiye eleman ve bakım gereksinimidir. Proses açısından kısıtlar ise anammox bakterilerinin düşük çoğalma hızına sahip olması ve bu bakterilerin çevre koşullarına karşı hassas olmaları ile ilgilidir. Anammox bakterilerinin ikilenme süresinin 7-11 gün olduğu belirlenmiştir (Strous vd. 1999b; Jetten vd. 2001). Uzun ikilenme süresinin anammox bakterilerinin, doğal habitatlarında bulunan amonyum ve nitrit konsantrasyonları nedeniyle, metabolik aktivitelerini yavaşlatmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Ward vd. 2011). Anammox bakterilerinin yavaş çoğalma hızına sahip olması prosesin gerçek ölçekli uygulamalarında uzun işletmeye alma sürelerine gerek duyulmasına sebep olur (Dapena-Mora vd. 2004).

2.6. Anammox Proses Verimini Etkileyen Parametreler

Gerçek bir atıksuyun arıtıldığı Anammox prosesinde gözlenen azot giderim performansı farklılıkları birden çok parametrenin birlikte etkisinden kaynaklanmaktadır. Sistemin aşırı yüklenmesi veya işletme parametrelerindeki büyük farklılık maksimum spesifik anammox aktivitesini geri dönüşsüz şekilde etkileyebilir. Anammox aktivitesinin azalması sonucu azot giderim veriminde de azalma gözleniyor ise sistemde azot (substrat) birikmesi gerçekleşir. Substrat birikmesi olduğunda substrat inhibisyonu gerçekleşebilir ve bunun sonucunda Anammox istikrarı bozulabilir. Ayrıca, Anammox biyokütlesinin karakterindeki herhangi bir değişim veya işletme parametrelerinin değişmesi sonucu yan popülasyonların aşırı çoğalması Anammox bakterilerinin azalmasına ve bunun sonucunda da sistemin kararlı halinin bozulmasına sebep olabilir. Bu nedenle, verimi etkileyen parametreler aynı zamanda inhibisyona neden olan parametreler olarak da değerlendirilmekte olup, başlıca parametreler, amonyum ve nitrit konsantrasyonu, bikarbonat konsantrasyonu, çözünmüş oksijen konsantrasyonu, organik madde varlığı, pH ve sıcaklıktır.

2.6.1. Amonyum ve nitrit konsantrasyonu

Anammox prosesinin verimi amonyum, nitrit ve bikarbonat konsantrasyonlarının artırılması ile artmaktadır. Ancak, diğer proseslerde olduğu gibi aşırı substrat yüklemesi ciddi inhibisyona neden olabilir (Jin vd. 2012). Nitrit, anammox işleminin kararlılığındaki en kritik faktördür (Lotti vd. 2012).

Strous vd. (1999) tarafından 100 mg/L üzerindeki nitrit konsantrasyonlarında Wett (2007) tarafından ise 5 mg/L altındaki konsantrasyonlarda; Anammox prosesinin ciddi şekilde inhibe olduğu bildirilmiştir. Kimura vd. (2011) ise 400 mg/L'den daha düşük nitrit konsantrasyonlarında Anammox aktivitesinde herhangi bir düşüş gözlenmediğini, nitrit konsantrasyonu 750 mg/L olduğunda ise aktivitenin %10 düştüğünü rapor etmiştir. Dapena-Mora vd. (2007) ve Lotti vd. (2012) ise nitritin %50 inhibisyona (IC₅₀) yol açtığı konsantrasyonun 350-400 mg/L olduğunu belirlemiştir. Bir diğer çalışmada giriş 280 mg/L nitrit konsantrasyonunun Anammox prosesi için bir alarm değeri olduğu düşünülmektedir (Jin vd. 2012). Nitrit inhibisyonuna ilişkin bu sonuçlar farklı işletme koşulları ve prosesi gerçekleştiren biyokütleyi oluşturan mikrobiyal topluluğun yapısından kaynaklanmaktadır (He vd. 2015).

2.6.2. Çözünmüş oksijen

Anammox bakterileri anaerobiktir ve çözünmüş oksijen ile inhibe olmaktadır (Strous vd. 1997; van Dongen vd. 2001). Anammox bakterileri aktivitesinin çözünmüş oksijen (ÇO) konsantrasyonu 2 mM (0,064 mg O₂/L) üzerine çıktığında tersinir bir şekilde inhibe olduğu (Jetten vd. 1997b) ve ÇO konsantrasyonunun 72 mM (2,3 mg O₂/L) üzerine çıkmasının proses için toksik olduğu belirlenmiştir (Ward vd. 2011). Lotti vd. (2012b) çalışmalarında oksijenin geri dönüşsüz olarak Anammox prosesine uzun ve kısa etkililerinin olduğunu rapor etmişlerdir.

2.6.3. Bikarbonat konsantrasyonu

Anammox bakterileri kemoototrofik bakteriler olduklarından çoğalmak ve aktivitelerini devam ettirmek için karbon kaynağı olarak inorganik karbona ihtiyaç duyarlar. Anammox reaksiyonundan görüldüğü üzere, 1 mol amonyanın oksitlenmesi için 0,066 mol inorganik karbon (bikarbonat) gerekmektedir. Uygun miktarda bikarbonat eklenmesi Anammox aktivitesini arttırabilmektedir. Giriş bikarbonat ve azot oranı 10'dan yüksek olduğunda proste inhibisyona sebep olmaktadır (Liao vd. 2008). Liao vd. (2008) bikarbonat konsantrasyonunun 196,7 mg/L'den 295 mg/L'ye arttırılması sonucunda Anammox aktivitesinin arttığını, bikarbonat konsantrasyonu 393,4 mg/L'ye ulaştığında ise inhibisyon gerçekleştiğini bildirmiştir. Kimura vd. (2011) bikarbonatın amonyum konsantrasyonuna oranının 0,1'den yüksek, ideal olarak 0,2 olması gerektiğini belirlemiştir. Jin vd. (2014) tarafından ise bikarbonatın toplam azota en uygun oranının 0,24 olduğu kabul edilmiştir. Yang vd. (2010) Anammox prosesi ile verimli azot giderimi için uygun bikarbonat dozunun 150 mg/L olması gerektiğini önermiştir. Araştırmacılar tarafından farklı bikarbonat konsantrasyonları önerilmiş olmakla birlikte, ortak nokta Anammox prosesinden yüksek performans elde etmek için yeterli miktarda bikarbonat eklenmesi gerektiğidir. Ancak, maliyet göz önüne alındığında, fazla miktarda bikarbonat eklenmesi ekonomik değildir.

2.6.4. Organik madde

Sızıntı suyu ve hayvan atıklarının parçalanmasından elde edilen azotça zengin atıksular biyolojik olarak parçalanabilir ve ısıya dirençli organik madde içermektedirler. Yüksek konsantrasyonda biyolojik olarak parçalanabilir organik karbon atıksuyun giriş akımında anammox bakterilerini inhibe edebilmektedir. Biyolojik olarak parçalanabilir organik karbon anammox bakterileri ve hetetrofik denitrifikasyon bakterileri arasında nitrit için rekabete neden olabilmektedir. Yüksek biyolojik olarak parçalanabilir organik madde konsantrasyonu altında hetetrofik bakteri anammox bakterilerini eleyebilir ve anammox bakterilerinin azot giderim kapasitesini azaltabilir. Kartal vd. (2007b) "*Candidatus Anammoxoglobus propionicus*" un amonyum, nitrit ve nitrat varlığında propiyonatin oksidasyonu için diğer anammox bakterileri ve heterotrofik denitrifikasyon bakterileri ile kıyaslandığında karbondioksiti karbon kaynağı olarak kullanan tek tür olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, Kartal vd. (2008), asetat varlığında anammox bakterilerinin yüksek yoğunlukta zenginleşebileceğini göstermiş, "*Candidatus Brocadia fulgida*"nın format, propiyonat, monometilamin ve dimetilamin gibi organik bileşikler oksitleyebildiğini belirtmişlerdir (Kartal vd. 2008).

2.6.5. Sıcaklık ve pH

pH Anammox prosesinin işletilmesinde önemli bir kontrol parametresi olduğu için, pH'ın arıtma performansına etkisi hakkında birçok çalışma yürütülmüştür. Anammox reaktöründe, yüksek azot yükleme hızı ve azot giderim hızı elde edildiğinde çıkış akımının pH'ı önemli oranda artmaktadır (Szatkowska vd. 2007; Liu vd. 2008; Tang vd. 2009). Anammox bakterileri amonyağı oksitlemek için elektron alıcısı olarak nitriti kullanırken hidrojen iyonlarını (H^+) tüketirler. Bu asidite tüketimi pH artışı ile sonuçlanır ve bu durum Anammox prosesinde pH değişkenliği gözlenmesinin başlıca sebebidir. Çıkış akımında pH artışı gözlenmesinin bir diğer sebebi düşük giriş alkalinitesidir. Girişte alkalinitenin düşük olması düşük tampon kapasitesine ve karbondioksitin sıvı fazdan gaz faza geçmesine sebep olur. Bunun sonucunda da çıkış pH'ı artar. Anammox bakterileri için pH aralığının 6,6-8,3 ve en uygun pH'ın 7,5-8,0 olduğu bildirilmiştir (Strous vd. 1999; Egli vd. 2001). Daha yüksek pH değerlerinde Anammox bakterilerinin metabolik aktivitesinin yavaşladığı belirlenmiştir (Strous vd. 1999; Tang vd. 2009).

Yüksek azot giderim verimi elde etmek için yürütülen çalışmalarda Anammox sistemleri 30-40°C'de işletilme eğilimindedir. Bunun nedeni Anammox bakterilerinin fizyolojisine göre maksimum aktivitenin 37°C'de elde edilmesi ve 45°C'den yüksek sıcaklıklarda biyokütlede parçalanma olduğu için aktivite kaybı gerçekleşmesidir (Strous vd. 1999; Toh vd. 2002).

2.7. Anammox Bakterilerinin Aklımasyonuna Yönelik Çalışmalar

Prosesinin pratik uygulama için temel dezavantajlarından biri Anammox bakterilerinin düşük spesifik çoğalma hızı (0,065 L/gün) nedeniyle uzun bir işletmeye alma dönemi gerektirmesidir (Strous vd. 1998). Düşük biyokütle spesifik çoğalma hızı proses dizaynı sırasında göz önüne alınması gereken önemli bir parametredir ve çok büyük reaktör hacmi ile yüksek biyokütle alıkonması verimi sağlanmasını gerektirir (Lotti vd. 2015). Bu nedenle, en uygun aşı çamurunun seçimi veya reaktörde Anammox bakterileri birikimini elde etmek için en verimli reaktör sisteminin seçimi işletmeye alma sürecinde son derece önemlidir. Anammox bakterilerinin çoğaltılması için akışkan yataklı reaktör (Mulder vd. 1995), membran biyoreaktör (Van der Star vd. 2008), yukarı akışlı çamur yataklı reaktör (Schmidt vd. 2004) ve ardışık kesikli reaktör (Strous vd. 1998) gibi reaktör sistemleri kullanılmış olup, çeşitli reaksiyon konfigürasyonları arasında ardışık kesikli reaktör etkin biyokütle tutulması ve güvenilir işletme koşulları sağladığından Anammox bakterilerinin çoğalması için en uygun reaktör olduğu kabul edilmektedir (Strous vd. 1998; He vd. 2015). Ardışık kesikli reaktörde, özellikle substrat limitli koşullarda biyokütle ve substratın homojen bir şekilde dağılımı sağlanabilmektedir (Strous vd. 1998).

Anammox prosesi aklımasyonu genellikle sıcaklığın 30-37°C'de tutulabilmesi için su banyosuna bağlı bir su ceketli ile 2 ila 15 litrelik bir ardışık kesikli reaktörde gerçekleştirilmektedir. Reaktör 80±10 rpm (dakikadaki devir sayısı) ile karıştırılmaktadır. Anoksik koşullar, reaktöre argon (Ar)/CO₂ (%95/5) gaz karışımı verilmesi ile korunmaktadır. Gaz içinde bulunan CO₂ miktarı reaktör pH'ını 7-8 arasında tutmak için yeterli olmaktadır. Taze anoksik mineral madde ardışık kesikli reaktöre beslenmekte ve ardından reaksiyon süresi boyunca karıştırma uygulanmaktadır. Reaksiyon süresinden sonra karıştırıcı durdurulmakta ve çamurun çökmesi için 15-20 dakika (dk)

beklenilmektedir. Toplam çevrimin kalan 10-15 dakikasinda, reaktör hacminin yaklaşık yarısı bir atıksu pompası ile uzaklaştırılmaktadır. Ardışık kesikli reaktör için uygun başlangıç maddesi, uzun bir çamur yaşı olan arıtma tesisindeki aktif çamurdur (van Dongen vd. 2001; Pynaert vd. 2003; Dapena vd. 2004). Reaktörlerde başlangıç amonyum ve nitrit konsantrasyonlarının 5mM olması ve nitrit tamamen harcandığı sürece amonyum ve nitrit konsantrasyonlarının 30 mM'e kadar kademeli olarak artırılması önerilmektedir. Azot yüklemesi için en yüksek miktar yaklaşık 9 kg N/m³.gün olarak önerilmiştir (Sliemers vd. 2003). 10 mM veya daha fazla nitrit konsantrasyonlarının uzun süre uygulanması biyokütlenin inhibisyonuna ve aklımasyonun başarısız olmasına neden olmaktadır (Strous vd. 1999).

Anammox bakterilerinin düşük çoğalma hızı nedeniyle, yürütülecek çalışma anammox kültürü ile işletmeye başlatılamadığı durumlarda, prosesi işletmeye alma süreçleri çok uzun olmaktadır. Anammox prosesinin işletmeye alma süresini kısaltmak için uygun koşulları belirlemek amacıyla farklı reaktör konfigürasyonlarında aktif çamur, nitrifikasyon bakterisi ile bunların karışımı ve anaerobik çamur gibi farklı başlangıç aşısı çamurları ile araştırmalar yürütülmüştür.

Babaei vd. (2013) tarafından yürütülen çalışmada yukarı akışlı anaerobik çamur yatağı (UASB) reaktöründen temin edilen 12,3 g UAKM/L konsantrasyonuna sahip granül çamur aşısı çamuru olarak kullanılmıştır. 35±1°C'de sentetik atıksu ile sürekli beslenen anammox reaktöründe başlangıçta 24 saat olarak uygulanan hidrolik bekletme süresi kademeli olarak 8 saate düşürülmüştür. Bu sırada giriş amonyum ve nitrit azotu konsantrasyonları kademeli olarak sırasıyla 60 mg N/L'den 700 mg N/L'ye ve 80 mg N/L'den 920 mg N/L'ye artırılmıştır. Anammox prosesinin performansı farklı azot yükleme hızları ve farklı hidrolik bekletme sürelerinde değerlendirilmiştir. Anammox çamur kültürü anaerobik reaktörden alınan aşısı çamurunun kademeli olarak beslenmesiyle KOİ/N oranının azaltılması ile hazırlanmıştır. Bu aklımasyon süreci 120 gün sürmüştür. Aklımasyon sürecinin ardından hidrolik bekletme süresinin kademeli olarak düşürülmesi ve azot yükleme hızının kademeli olarak artırılmasıyla anammox performansı için en uygun azot yükleme hızı araştırılmıştır. Bu süreçte amonyum giderim verimi %11-75, nitrit giderim verimi ise %85-91 olarak belirlenmiştir. Ancak kademeli olarak giriş azot konsantrasyonunun artırılması sonucu 5 gr N/L.gün azot yükleme hızında amonyum ve nitrit giderim verimleri aniden düşmüştür.

Demir partiküllerinde bulunan elektronların anammox bakteri metabolizmasını etkilediği belirlenmiştir (Van Niftrik vd. 2008). Ayrıca demir elektrot reaksiyonlarının anammox bakterilerinin çoğalması için uygun ortam oluşturduğu bildirilmiştir (Zhang vd. 2012). Bu doğrultuda Bi vd. (2014) tarafından yürütülen çalışmada demir oksit ilavesinin anammox prosesinin işletmeye alma sürecine etkisi incelenmiştir. Anaerobik aşısı çamuru ile 0,5 litre hacimli 3 adet yukarı akışlı kolon reaktörü sentetik atıksu ile beslenmiş ve reaktörlere 0,03 mmol (minimol), 0,06 mmol, 0,09 mmol demir oksit eklenmiştir. Gözlenen azot giderim verimlerine göre anammox prosesi işletmeye alma sürecinin 3 faza ayrıldığı bildirilmiştir. Bu süreçte; 1. faz olarak tanımlanan hücre parçalanma fazında çıkış amonyum konsantrasyonu giriş amonyum konsantrasyonundan yüksek olmakta, 2. faz olan lag fazında çıkış amonyum konsantrasyonu giriş amonyum konsantrasyonu civarında sabitlenmektedir. Aktivite artış fazı olarak tanımlanan 3.fazda ise çıkış amonyum konsantrasyonu ve nitrit konsantrasyonu hızla azalmaktadır.

Hücre parçalanma fazı reaktörlerde sırasıyla 39, 31 ve 26 gün sürmüştür. Lag fazının başladığı amonyum ve nitritin eş zamanlı giderilmesi ile belirlenmiştir. Lag faz 1. reaktörde yaklaşık olarak 53. gün, 2. reaktörde 44. gün, 3. reaktörde 34. gün sona ermiş ve anammox aktivitesi artmaya başlamıştır. Anammox aktivitesinin hızla arttığı aktivite artış fazının sona erdiğine ve anammox prosesinin işletmeye alma sürecinin tamamlandığına, nitrit tüketiminin amonyum tüketimine oranının stokiometrik orana yakın hesaplandığı zaman baz alınarak karar verilmiştir. Buna göre R1 reaktöründe 70 günde, R2 reaktöründe 59 günde ve R3 reaktöründe 50 günde aklımasyon süreci tamamlanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre 0,09 minimol demir oksit ilavesi ile anammox aklımasyon süreci 70 günden 50 güne indirilebilmektedir.

Ren vd. (2015) tarafından yürütülen çalışmada anammox prosesi aklımasyon sürecini kısaltmak amacıyla sıfır değerlikli demir kullanılmıştır. Sıfır değerlikli demir indirgeyici olarak kalıntı oksijeni kullandığı ve böylelikle zorunlu anaerobik bakteriler için uygun anaerobik ortamı sağladığından tercih edilmiştir. Anammox prosesinin aklımasyonu için paralel işletilen üç anaerobik yukarı akışlı çamur yataklı reaktöre anaerobik aşı çamuru eklenmiştir. R0 olarak tanımlanan reaktöre demir ilavesi yapılmamış, R1 reaktörüne mikro sıfır değerlikli demir ve R2 reaktörüne nano sıfır değerlikli demir ilave edilmiştir. Sentetik atıksu ile beslenen reaktörlerde sabit 630 mg N/L.gün azot yüklemesi ile 48 saatlik hidrolik bekletme süresinde 35°C’de aklımasyon çalışmaları yürütülmüştür. Elde edilen azot giderim verimlerine göre amonyum giderimi yaklaşık olarak 35. gün başlamıştır. Amonyum gideriminde R2 reaktöründe 84. günde, R1 reaktöründe 105. günde ve kontrol reaktöründe 126. günde maksimum değerlere ulaşılmıştır.

Yin vd. (2016) tarafından evsel atıksu arıtma tesisinden temin edilen aktif çamur ile yukarı akışlı kolon reaktörde anammox kültürü aklime edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalarda indirgenmiş grafen oksit biyofilm taşıyıcı materyal olarak kullanılmıştır. Paralel yürütülen çalışmalarda 0,3 L hacmindeki R1 reaktörü kontrol reaktörü olarak, R2 reaktörü ise indirgenmiş grafen oksit içerecek şekilde hazırlanmıştır. Her iki reaktör de 35°C’de pH 7’de 50 mg/L amonyum ve 65 mg/L nitrit içeren sentetik atıksu ile beslenerek işletmeye alınmıştır. 6 saatlik hidrolik bekletme süresinde her iki reaktör de 460 gr N/m³.gün azot yükleme hızı ile sürekli beslenmiştir. Her iki reaktörde de ilk günlerde amonyum konsantrasyonu giriş amonyum konsantrasyonundan yüksek değerlerde ölçülmüştür. Ölçülen çıkış amonyum ve nitrit konsantrasyonu Bi vd. (2014) tarafından önerildiği şekilde fazlar olarak incelenmiştir. Bu incelemeye göre R1 reaktöründe hücre parçalanma fazı 19 gün, lag fazı 17 gün ve aktivite artış fazı 31 gün sürmüş böylece 67 günde aklımasyon süreci tamamlanmıştır. İndirgenmiş grafen oksitin kullanıldığı R2 reaktöründe ise her bir fazın süreci kısalmış ve aklımasyon süresi 49 günde tamamlanmıştır.

Guo vd. (2016) tarafından yürütülen çalışmalarda sentetik atıksu ile beslenen UASB tipi 2 reaktör kullanılarak anammox prosesinin aklımasyon süresinin kısaltılmasına dair çalışmalar yürütülmüştür. Denitrifikasyon çamuru ve anammox aşı çamuru 1. reaktöre 10:1 oranında 2. reaktöre ise 50:1 oranında eklenmiştir. Her iki reaktör de 7-7,5 pH’da 35°C’de aklımasyon süreci incelenmiştir. Çalışma süresince azot giderim verimi 0,23 kg/m³.gün’den 1. reaktörde 0,7 kg/m³.gün’e, 2. reaktörde ise 0,72 kg/m³.gün’e yükselmiştir. Çalışma sonuçlarına göre; anammox prosesine aşı çamuru olarak denitrifikasyon bakterileri eklenmesinin iyi bir işletmeye alma stratejisi olduğu

önerilmiştir. 1. reaktörde hücre parçalanma fazı 10 gün, lag fazı 8 gün ve aktivite artış fazı yaklaşık olarak 7 gün sürmüş böylece aklımasyon süresi 25 günde tamamlanmıştır. 2. reaktörde ise hücre parçalanma fazı 12 gün, lag fazı 8 gün ve aktivite artış fazı 8 gün sürmüş böylece aklımasyon süresi 28 günde tamamlanmıştır.

Sri Shalini vd. (2015) tarafından yürütülen çalışmalarda, anammox çamurunun düzenli depolama alanından temin edilen taze ve 3 yıldır depolanan evsel katı atık ile sızıntı suyunun aş çamuru olarak kullanımı ile ulaşılabilecek işletmeye alma süreleri araştırılmıştır. Sentetik atıksu ile kesikli besleme uygulanarak oda sıcaklığında işletilen anammox reaktörlerinde en uygun aş çamurunun 3 yıldır depolanan evsel katı atık olduğu ve bu aş çamuru ile işletmeye alma süresinin 65 günde gerçekleştiği belirlenmiştir.

Anammox çamurunun aklımasyonuna yönelik olarak yürütülen ve yukarıda özetlenen çalışmaların hepsinde anammox kültürü aklımasyonu için $35\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 7-7,5 pH'da, sentetik atıksu ile sürekli besleme uygulanmıştır. Aynı işletme koşullarının uygulandığı bu çalışmalarda, işletmeye alma sürelerini etkileyen faktörler, aş çamurunun türü ve uygulanan aklımasyon stratejisidir. Farklı aş çamurları ile farklı aklımasyon stratejileri uygulanması sonucunda rapor edilen anammox prosesini işletmeye alma süreleri Çizelge 2.1 'de özetlenmiştir.

2.8. Anammox Bakterilerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Yöntemler

Anammox bakterilerinin saptanması ve tanımlanmasında yaygın olarak 16S rRNA geninin PCR ile amplifikasyonu ve floresanlı yerinde hibritleşme (FISH) metodları uygulanmaktadır (Song ve Tobias 2011). Mullis vd. (1986) tarafından PCR tekniğinin kullanılmasından bu yana, su ve atıksu arıtımında hedeflenen genin kısa sürede çoğaltılmasıyla moleküler yöntemlerin daha yüksek verimle uygulanması mümkün olmuştur (Wang 2011). PCR, belirli bir DNA sekansının az miktarda DNA örneğinden çoğaltılabilmesini sağlayan hızlı bir DNA klonlama yöntemidir (Klug vd. 2009).

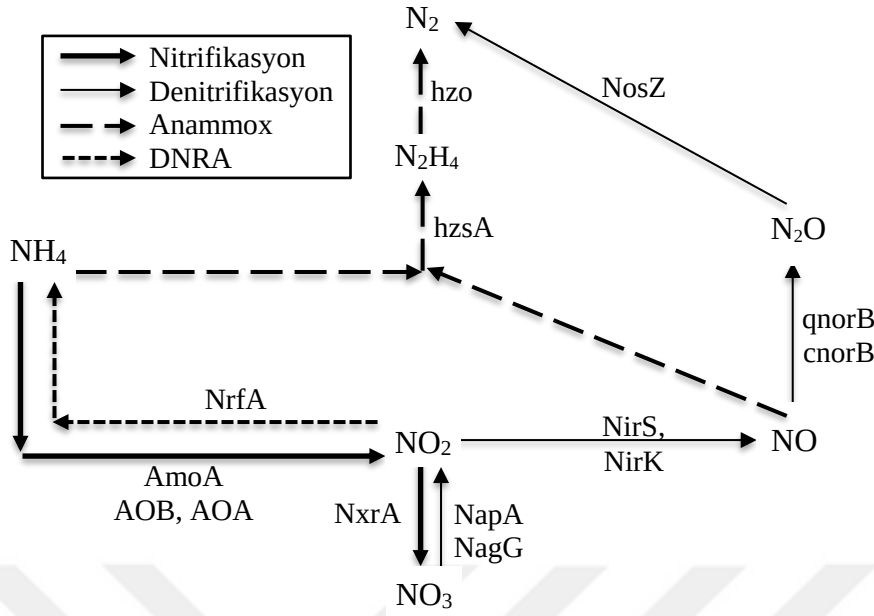
PCR tabanlı birçok moleküler teknik geliştirilmiş, teknikte daha iyi verimlilik ve kolay kullanım sağlayan modifikasyonlar yapılmıştır. Mikrobiyal ekolojide belirli bir türün veya genin sayısal olarak varlığını tespit etmek amacıyla gerçek zamanlı nicel PCR (qPCR) yaygın olarak kullanılmaktadır (Smith ve Osborn 2009). qPCR yöntemi belirlenmek istenen genin PCR ile çoğaltılması sırasında gerçek zamanlı olarak çoğalan genlerden yayılan floresan sinyallerin belirlenmesi ve sayılmasına dayalı bir tekniktir (Higuchi vd. 1993). Azot oksitleyen mikroorganizmaların belirlenmesine yönelik olarak yürütülen PCR çalışmaların birçoğu, belirlenmesi hedeflenen metabolik prosese özgü 16S ribozomal ribonükleik asit (rRNA) veya fonksiyonel genin çoğaltılmasına dayanmaktadır (Junier vd. 2010; Li vd. 2010).

Çizelge 2.1. Farklı aşı çamurları ve aklımasyon stratejileri ile elde edilen işletmeye alma süreleri

Aşı Çamuru	Aklımasyon stratejisi	İşletmeye Alma Süresi (gün)	Kaynaklar
Anaerobik granül çamur	HBS ve KOİ/N kademeli olarak azaltılmıştır.	120	Babaei vd. (2013)
Anaerobik aşı çamuru	-	70	Bi vd. (2014)
	0,06 mmol demir oksit	59	
	0,09 mmol demir oksit	50	
Anaerobik aşı çamuru	-	126	Ren vd. (2015)
	mikro sıfır değerlikli demir	105	
	nano sıfır değerlikli demir	84	
Aktif çamur	-	67	Yin vd. (2014)
	indirgenmiş grafen oksit	49	
Denitrifikasyon çamuru (D) ve anammox çamuru (A)	D:A aşı oranı: 10:1	25	Guo vd. (2016)
	D:A aşı oranı: 50:1	28	
3 yıldır depolanan evsel katı atık	-	65	Sri Shalini vd. (2015)

16S rRNA geni, türe özgü olduğu ve korunduğu için mikrobiyal kominite kompozisyonunun belirlenmesi amacıyla hedef olarak kullanılmaktadır. Anammox ve diğer mikrobiyal grupların sayısal olarak belirlenmesi ve anammox bakterilerinin tüm mikroorganizmalar içindeki oranının belirlenmesi amacıyla da 16S rRNA genini hedef alan moleküler çalışmalar yürütülmüştür (Schmid vd. 2001). Ancak, anammox proseslerini gerçekleştiren cinslerin 16S rRNA genleri arasında yüksek bir dizi benzerliği yoktur (Jetten vd. 2003). Bu nedenle, bilinen tüm anammox bakteri türlerini hedefleyen 16S rRNA gen primerleri geliştirmek zordur ve daha önemlisi, mevcut 16S rRNA genlerine ait primerler henüz bilinmeyen anammox cinslerini hedefleyemeyebilir.

Anammox bakterilerinin belirlenmesi ve diğer mikrobiyal gruplara oranının belirlenmesi amacıyla kullanılan diğer bir PCR'a dayalı yöntem fonksiyonel genlerin belirlenmesi ve sayılmasıdır. Fonksiyonel genler bir ortamda belirli bir mikrobiyal grubun rolü hakkında bilgi elde edilmesini sağlamaktadır (Rotthauwe vd. 1997). Ayrıca, anammox prosesi gibi belirli bir prosese özgü olan fonksiyonel genlerin belirlenmesi mikrobiyal gruplardan ziyade gerçekleşen prosesin diğer proseslere göre etkisini belirlemeyi sağlayabilmektedir. Anammox prosesinde azot giderimi sağlayan mikrobiyal grupların belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmalarda yaygın olarak amonyak monooksijenaz alt birimleri (amoA ve amoB), nitrit oksidoredüktaz (nxr), hidrazin dehidroksijenaz (hzo) ve hidrazin sentaz (hzsA) enzimlerini kodlayan fonksiyonel genler kullanılmaktadır. Bu genlerin mikrobiyal azot çevrimindeki rolleri Şekil 2.6'da görülmektedir.



Şekil 2.6. Mikrobiyal azot çevriminde fonksiyonel genlerin rolü

Şekil 2.6’da görüleceği üzere, mikrobiyal azot çevriminde nitrifikasyonun ilk adımı amonyumun nitrite oksidasyonu AOB veya AOA’lar tarafından amonyak monooksijenaz geni ile gerçekleştirilir. Nitrifikasyonun ikinci aşaması olan nitritin nitrata oksidasyonu ise nitrit oksitleyici bakteriler tarafından NxrA’ca kodlanan nitrit oksidoredüktaz enzimini tarafından katalizlenir. Denitrifikasyon prosesi nagG/napA tarafından kodlanan nitrat redüktaz enzimi ile nitratın nitrite indirgenmesi, nirK/nirS tarafından kodlanan nitrit redüktaz enzimi ile nitritin nitrik okside indirgenmesi, qnorB/cnorB tarafından kodlanan nitrik oksit redüktaz enzimi ile nitrik oksitin nitröz oksite indirgenmesi ve nosZ tarafından kodlanan nitröz oksit redüktaz enzimi ile nitröz oksitin azot gazına indirgenmesi olmak üzere dört enzimi gerektiren dört ardışık reaksiyon adımıyla gerçekleşir. Anammox prosesinde ise ilk aşamada nirK/nirS tarafından kodlanan nitrit redüktaz enzimi ile nitritin nitrik oksite indirgenmesinin ardından amonyum ve nitrit birleşerek hidrazin sentaz enzimi ile hidrazini oluşturur ve son adımda Hidroksilamin/hidrazin oksidoredüktaz enzimi ile hidrazin azot gazına dönüştürülür. Şekil 2.6’da görülen nitrit redüktaz enzimine ait gen NrfA ise nitratın amonyuma katabolik indirgenmesi prosesinde nitritin amonyuma indirgenmesini sağlamaktadır.

Hidroksilamin/hidrazin oksidoredüktaz, hidrazin sentaz ve nitröz oksit redüktaz enzimlerini kodlayan anammox genlerinin çoğaltılmasında kullanılan primerler ile yürütülen PCR çalışmaları bu genlerin aerobik ve anaerobik amonyum oksitleyen bakterilerin belirlenmesine yönelik mikrobiyal ekoloji çalışmaları için uygun olduğunu göstermiştir (Schmid vd. 2008; Quan vd. 2008; Li vd. 2010; Harhangi vd. 2012). Anammox bakterilerinin belirlenmesi amacıyla ilk geliştirilen fonksiyonel gen, bilinen tüm anammox bakterileri tarafından kodlanan ve hidrazini azot gazına oksitlemekte kullanılan hidrazin oksidoredüktaz genidir (Hooper vd. 1997). HZO ve HZS genleri için kullanılan primerlerin anammox bakteri türlerini 16S rRNA genleri için kullanılan

primerlere kıyasla daha iyi bir şekilde kapsadığı belirlenmiştir (Li vd. 2010; Harhangi vd. 2012).

Anammox bakterilerinin sayısal olarak belirlenmesine yönelik çalışmalar için güvenilir bir hedef olarak kullanılan diğer bir gen nirS genidir. Anammox bakterilerinde nitrit redüktaz enzimini içeren sitokrom cd1 nirS geni ile kodlanır. Nitrit redüktaz enzimi, nitritin hidrazin oluşturmak için amonyum ile reaksiyona giren nitrik oksite indirgenmesine aracılık eder (Li vd. 2011b). Doğal ekosistemlerde anammox bakterilerinin saptanması için yeni bir biyolojik indikatör olarak nirS geni önerilmiş ve bu genin aktif anammox bakterilerini qPCR ile sayısal olarak değerlendirmek için uygun bir araç olduğu doğrulanmıştır (Dong vd. 2009; Lam vd. 2009; Li vd. 2011b).

Gilbert vd. (2015) tarafından sentetik atıksu ile yürütülen çalışmada, anammox prosesine düşük sıcaklıkların etkisi araştırılmıştır. Çalışma kapsamında Anammox, AOB ve NOB türlerinin miktarı sırasıyla hidrazin sentaz geni (primer çifti hzsA1597F/hzsA1857R) (Harhangi vd. 2012), amonyak monooksijenaz geni (primer çifti: AmoA1/AmoA2r) (Rotthauwe vd. 1997), ve NOB genini (primer çifti: Nsr1113f/Nsr1264r) (Wittebolle vd. 2008) hedefleyen 16S rRNA genlerinin sayımı ile belirlenmiştir. Paralel olarak toplam bakteri 16S rRNA geninin de (primer çifti: 341f/518r) sayılmasının ardından farklı işletme koşullarında anammox, AOB ve NOB türlerinin toplam bakteri içerisindeki yüzdesi hesaplanmıştır. Çalışma başlangıcında 20°C olarak uygulanan sıcaklıkta anammox bakterilerinin askıda çoğalan sistemde toplam bakterinin %16'sını oluşturduğu belirlenmiştir. Sıcaklığın 10°C'ye düşürülmesi sonucunda ise anammox bakteri oranının azaldığı ve %0,8 gibi düşük oranlara indiği belirlenmiştir.

Hendrickx vd. (2014) tarafından anammox prosesinin 10°C'de uygulanabilirliğini araştırmaya yönelik olarak yürütülen çalışmada, deneysel olarak belirlenen anammox aktivitesi mikrobiyal analizler ile belirlenen anammox bakteri miktarı ile desteklenmiştir. 10°C'de işletilen reaktörden alınan numunelere anammox fonksiyonel geni olan hidrazin sentaz genini hedefleyen primer çifti ile (hzsA1597F/hzsA1859R) kantitatif PCR analizleri yürütülmüştür. PCR analizleri sonucunda anammox hücre sayısının $(1,06 \pm 0.3) \times 10^7$ hücre/ml ve çamur konsantrasyonuna göre $(2,12 \pm 0.6) \times 10^{10}$ hücre/g UKM (uçucu katı madde) olduğu belirlenmiştir.

Hu vd. (2013) tarafından yürütülen çalışmada, anammox reaktörünün işletmeye alınmasından itibaren AOB ve anammox türlerinin çoğalma süreci gerçek zamanlı PCR analizleri ile sayısal olarak bakteri miktarlarının belirlenmesi ile yorumlanmıştır. Anammox bakterileri için hidrazin sentaz geni (gen çifti: hzsA526F/hzsA1829R) ve AOB türleri için amonyak monooksijenaz geni (gen çifti: amoA-1F/amoA-2R) ile yürütülen çalışmada, reaktörün işletmeye alınmasından 20 gün sonra hzsA ve amoA gen miktarları yaklaşık 7×10^9 kopya/ml ve 4×10^7 kopya/ml olarak belirlenmiş olup, bu miktarlara göre AOB türlerinin çoğalmaya başladığı sonucuna varılmıştır. Reaktörün 200 günden fazla süre işletilmesinin ardından yapılan gerçek zamanlı PCR analizi sonucunda ise hzsA ve amoA gen miktarları yaklaşık 2×10^7 kopya/ml ve $8,6 \times 10^6$ kopya/ml olarak belirlenmiştir. Yukarı akışlı reaktörde yürütülen anammox prosesi ile birlikte denitrifikasyonun gerçekleştirilebilirliğinin araştırıldığı bir çalışmada ise biyokütlenin gerçek zamanlı PCR analizi sonucunda, deney sonuçlarına paralel olarak AOB türleri, anammox bakterileri ve denitrifikasyon bakterilerinin bir arada aktif olduğu belirlenmiştir (Keluskar vd. 2013).

2.9. Tezin Motivasyonu

Azot konsantrasyonu sucul ekosistemleri etkileyip halk sağlığı riski oluşturduğundan deşarjdan önce standartlara uygun hale getirilmelidir. Günümüzde azot giderimi geleneksel yöntemlerin yanı sıra yenilikçi prosesler ile de gerçekleştirilmektedir. Yenilikçi proseslerden olan Anammox kısmi nitrifikasyon ardından uygulandığında karbon ekleme maliyetini ortadan kaldırmaktadır. Ancak prosesin pratik uygulama için dezavantajları büyük reaktör hacmi, yüksek biyokütle alıkonma süresi ve Anammox bakterilerinin düşük spesifik çoğalma hızı nedeniyle uzun bir işletmeye alma dönemi gerektirmesidir. Anammox bakterisi içeren aşı çamuru ile sistem başlatılamadığı sürece uygun aşı çamuru seçimi ve uygun besleme koşullarının belirlenmesi önem kazanmaktadır.

Bu doğrultuda bu tez çalışmasında anaerobik ve aerobik çamur karışımı, katı atık numunesi ve anaerobik çamur/aerobik çamur/katı atık numunesi karışımı aşı çamuru olarak seçilmiştir. Aşı çamurlarına 1 dakida, 2 saat ve 12 saat besleme uygulanarak hangi besleme süresinin hangi aşı çamurunda Anammox bakterilerinin aklımasyonunu sağlayacağı gözlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Aşı Çamurlarının Temini ve Özellikleri

Antalya Hurma Atıksu Arıtma Tesisi'nde (AAT) atıksudan karbon, azot ve fosfor giderimi amacıyla anaerobik/anoksik/aerobik proseslerden oluşan aktif çamur sistemi uygulanmaktadır. Aklimasyon çalışmalarında kullanılmak üzere aerobik bakteriler ve nitrifikasyon bakterilerinden oluşan aşı çamuru, aktif çamur prosesi ardından arıtma çamurlarının son çökeltim tankına iletilmesi öncesinde yer alan geri devir hattından temin edilmiştir (Şekil 3.1a).

Hurma Atıksu Arıtma Tesisi'nde ön çökeltim ve son çökeltim tanklarından ayrılan arıtma çamurları yoğunlaştırıldıktan sonra anaerobik stabilizasyona tabi tutulmaktadır. Aklimasyon çalışmalarında kullanılan anaerobik aşı çamuru anaerobik çamur stabilizasyon tankı geri devir hattından temin edilmiştir (Şekil 3.1b).



(a)



(b)

Şekil 3.1. Hurma Atıksu Arıtma Tesisi (a) aktif çamur geri devir hattı ve (b) anaerobik çamur geri devir hattı

Aklimasyon çalışmalarında kullanılan katı atık numunesi Manavgat Katı Atık Ayrıştırma ve Düzenli Depolama Tesisi'nden temin edilmiştir. Depolama alanında katı atıklardan gaz üretimi sırasında kullanılan boruların tadilatı amacıyla katı atıklar arasında bir bölge kazılmıştır. Aşı çamuru olarak kullanılacak katı atık numunesi bu kazı alanından yaklaşık 5 metre derinlikten alınmıştır (Şekil 3.2).



(a)



(b)

Şekil 3.2. (a) Manavgat Katı Atık Ayrıştırma ve Düzenli Depolama Tesisi depolama alanı ve (b) aşı çamurunun temin edildiği bölge

3.2. Anammox Reaktörlerinin Kurulması ve İşletilmesi

Aşı çamuru olarak kullanılacak aerobik çamur ve anaerobik çamurun askıda katı madde (AKM) ve uçucu askıda katı madde (UAKM) analizleri yapılmış ve aşı çamurları eşit miktarda UAKM içerecek şekilde karıştırılmıştır. Katı atık numunesi ise, iyice parçalanmış ve su içerisinde çözünmüştür. Çözünmeyen kısımlar numuneden uzaklaştırılarak aklımasyon çalışmalarında kullanılacak aşı çamuru oluşturulmuştur. Aerobik ve anaerobik çamurdan oluşan aşı çamuru ve katı atıktan elde edilen aşı çamuru olmak üzere iki aşı çamuru ile 3 adet paralel işletilen aklımasyon reaktörü kurulmuştur. Birinci ve ikinci reaktöre aerobik ve anaerobik aşı çamuru karışımı, üçüncü reaktöre ise katı atık aşı çamuru başlangıç UAKM konsantrasyonları 1 mg/L olacak şekilde eklenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. (a) Aklımasyon çalışmalarında kullanılan aşı çamurları (b) aklımasyon reaktörleri

Reaktörler alüminyum folyo ile sarılarak ışık girişi ve böylece fototrofik bakterilerin çoğalması önlenmiştir. Su ceketli olan reaktörlerin etrafından su sirkülasyonu yapılarak reaktör sıcaklıklarının 35°C olması sağlanmıştır. Reaktörlerde pH'ın 7,5-8,0 civarında tutulması için günlük olarak pH ölçülmüş ve pH değişimi gözlemlendiğinde pH ayarı asit (1N H₂SO₄) ve alkali (1N NaOH) ilavesi ile yapılmıştır.

Reaktörler ardışık kesikli reaktör (AKR) düzeninde 24 saatlik çevrimlerle, bir AKR çevrimi 23 saat reaksiyon periyodu, 30 dakika çökeltme periyodu ve 30 dakika deşarj periyodundan oluşacak şekilde işletilmiştir. Reaktörler manyetik karıştırıcılar ile reaksiyon süreleri boyunca 100 rpm hızla karıştırılmıştır. Çökeltme periyodu başlangıcında manyetik karıştırıcılar kapatılarak biyokütlenin çökeltmesi sağlanmıştır. Reaktörlere farklı sürelerde besleme periyotları uygulanmıştır. Reaktörlerde hidrolik bekletme süresi (HBS) anammox bakterileri için uygun olduğu belirtilen 1,5 gün olarak uygulanmıştır. Bu amaçla, reaktörlerde toplam 1 litre olan aktif hacimden günlük olarak çökeltme periyodunun ardından 660 ml atıksu pompalar yardımıyla boşaltılmış ve besleme periyodunda 660 ml besleme çözeltisi günlük olarak eklenmiştir. Anammox bakterileri yavaş çoğalma hızına sahip olduğu için yaygın olarak uygulandığı gibi reaktörden çamur atılmamıştır.

Aklımasyon çalışmaları iki deney seti halinde yürütülmüş olup, ilk deney setinde farklı besleme sürelerinin anammox bakterilerinin aklımasyonuna etkisinin araştırılması için aynı aşı çamuru ile başlatılan ilk iki reaktörden birincisine 1 dakika süreyle ikincisine ise 2 saat süreyle aynı miktarda sentetik besleme çözeltisi ilave edilmiştir. Farklı aşı çamurlarının anammox bakterilerinin aklımasyonuna etkisinin araştırılması için ise 2. reaktöre paralel olarak 2 saat süreyle işletilen 3. Reaktör kurulmuş ve bu reaktöre aşı çamuru olarak katı atık numunesi eklenmiştir. İkinci deney setinde ise, besleme süresinin uzatılmasının aklımasyon sürecine etkisinin araştırılması amacıyla, tüm aşı çamurları karıştırılarak oluşturulan aşı çamurları ile iki reaktör kurulmuştur. Bu reaktörlerden birine 2 saat süreyle besleme uygulanırken, diğerine 12 saat süreyle besleme uygulanmıştır. Çizelge 3.1’de aklımasyon çalışmalarının uygulandığı 5 reaktörün başlangıç aşı çamuru ve besleme koşulları bilgileri verilmektedir.

Çizelge 3.1. Aklımasyon çalışmalarında kullanılan aşı çamurları ve besleme koşulları

Set No	Reaktör No	Aşı çamuru	Besleme Süresi
Set 1	R1	Aerobik + anaerobik çamur	1 dakika
	R2	Aerobik + anaerobik çamur	2 saat
	R3	Katı atık numunesi	2 saat
Set 2	R4	Aerobik + anaerobik çamur	2 saat
	R5	+ katı atık numunesi	12 saat

Aklımasyon reaktörleri Van de Graaf vd. (1996) tarafından Anammox bakterilerinin aklımasyonu için önerilen sentetik besleme çözeltisi, iz element 1 çözeltisi ve iz element 2 çözeltisi ile beslenmiştir. Sentetik atıksu çözeltisi, Van de Graaf vd. (1996) tarafından önerilen 1:1 oranından farklı olarak 1:1,3 oranında amonyum: nitrit içerecek şekilde hazırlanmıştır. Her bir litre sentetik atıksuya iz element 1 çözeltisinden 2 ml ve iz element 2 çözeltisinden 2 ml eklenmiştir. Sentetik besleme çözeltisinin kompozisyonu Çizelge 3.2’de, iz element çözeltilerinin kompozisyonları ise Çizelge 3.3’de verilmektedir.

Çizelge 3.2. Sentetik besleme çözeltisi kompozisyonu

Bileşenler	Konsantrasyon (mg/L)
Amonyum sülfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	3.540
Sodyum nitrit (NaNO ₂)	4.805
Potasyum hidrojen karbonat (KHCO ₃)	5.364
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	292
Kalsiyum klorit dihidrat (CaCl ₂ .2H ₂ O)	2.549
Magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	3.207

Çizelge 3.3. İz element 1 ve İz element 2 çözeltilerinin kompozisyonu

Ana Bileşenler	Konsantrasyon (mg/L)
İz Elementler 1	
EDTA disodyum dihidrat (Na ₂ EDTA.2H ₂ O)	10
Demir sülfat heptahidrat (FeSO ₄ .7H ₂ O)	9,14
İz Elementler 2	
EDTA disodyum dihidrat (Na ₂ EDTA.2H ₂ O)	15
Çinko sülfat heptahidrat (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0,434
Kobalt klorit hekzahidrat (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0,24
Mangan klorit tetrahidrat (MnCl ₂ .4H ₂ O)	0,99
Bakır sülfat pentahidrat (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,25
Sodyum molibdat dihidrat (NaMoO ₄ .2H ₂ O)	0,22
Nikel klorür (NiCl ₂ .6H ₂ O)	0,19
Sodyum selenit (Na ₂ SeO ₃)	0,08
Borik asit (H ₃ BO ₄)	0,014

Amonyum ve nitriti 1:1,3 oranında içerecek şekilde modifiye edilerek hazırlanan sentetik besleme çözeltisi başlangıçta 32,50 mg NH₄-N/L ve 42,50 mg NO₂-N/L olmak üzere toplam 75,00 mg N/L içerecek şekilde reaktörlere beslenmeye başlanmış, giriş amonyum ve nitrit konsantrasyonlarının azot giderim performansına etkisinin incelenmesi amacıyla, reaktörlerin işletilmesi sırasında amonyum ve nitrit konsantrasyonları değiştirilerek farklı azot yükleme hızları uygulanmıştır. Azot yükleme hızları (AYH) Eşitlik 3.1’de görülen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$AYH (mg/L.gün) = \frac{NH_4-N_g + NO_2-N_g}{\theta_H} \quad (3.1)$$

Burada NH₄-N_g reaktöre beslenen amonyum azotu konsantrasyonunu (mg N/L), NO₂-N_g reaktöre beslenen nitrit azotu konsantrasyonunu (mg N/L) ve θ_H hidrolik bekletme süresini (gün) ifade etmektedir.

Literatürde belirtildiği gibi anoksik koşulları korumak ve oksijeni uzaklaştırmak amacıyla reaktörlerin boşaltılmasından sonra besleme periyodu öncesinde reaktörlere, belirlenen konsantrasyonda besleme çözeltisi, iz element 1 ve iz element 2 içerecek şekilde hazırlanan 660 mL hacimdeki besleme çözeltilerine birer dakika süreyle (Ar/CO₂) (%95/%5; 10 mL/dk) gaz karışımı püskürtülmüştür.

Tüm reaktörler 86 gün süreyle işletilmiştir. Reaktörlerin işletilmesi sırasında her bir reaktörde amonyum ve nitrit giderimini izlemek amacıyla iki günde bir çıkış atıksuyunda kalan amonyum ve nitrit konsantrasyonları ölçülmüştür. Nitrifikasyonun gerçekleşmesiyle nitritin nitrata dönüşmediğinden emin olmak için ayda bir kere çıkış atıksuyunda nitrat konsantrasyonu ölçülmüştür. Nitrat konsantrasyonunun ölçüldüğü günler azot giderim hızları (AGH) ve azot giderim verimleri (AGV) sırasıyla Eşitlik 3.2 ve Eşitlik 3.3’de görülen formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$AGH (mg/L.gün) = \frac{(NH_4-N_g + NO_2-N_g) - (NH_4-N_c + NO_2-N_c + NO_3-N_c)}{\theta_H} \quad (3.2)$$

$$AGV (\%) = \frac{(NH_4-N_g + NO_2-N_g) - (NH_4-N_g + NO_2-N_g + NO_3-N_g)}{(NH_4-N_g + NO_2-N_g)} \quad (3.3)$$

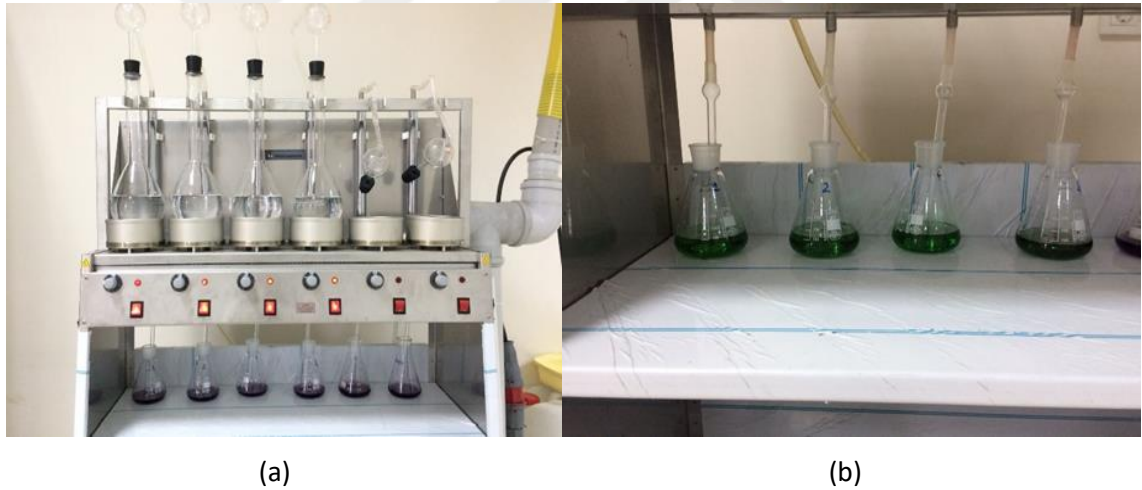
Burada NH_4-N_g , NO_2-N_g , ve NO_3-N_g sırasıyla AKR çevrimi sonunda ölçülen amonyum azotu, nitrit azotu ve nitrat azotu konsantrasyonlarını (mg/L) ifade etmektedir.

3.3. Analitik Yöntemler

3.3.1. Amonyum azotu analizleri

Aklımasyon reaktörleri çıkış atıksularındaki amonyum azotu konsantrasyonları iki farklı standart metot kullanılarak belirlenmiştir. Bu metotlar SM 4500-NH₃-C titrimetrik yöntem ve 4500 NH₃-F fenat yöntemidir.

Standart metotlara göre SM 4500-NH₃-C titrimetrik metodun uygulanması öncesinde SM 4500-NH₃ B distilasyon yöntemi uygulanmıştır (APHA 2005). Bu amaçla, amonyak azotu konsantrasyonuna göre belirlenen miktardaki numune cam balona koyulmuş ve distile su eklenerek numune 500 mL'ye seyreltilmiştir. Ardından balona 25 mL borat tampon çözeltisi eklenmiş ve makro kjeldahl düzeneğinde distilasyon işlemi uygulanmıştır. Distilasyon işlemi 250 mL distilat 50 mL borik asit ile karışık indikatör çözeltisi içeren erlene dolana kadar sürdürülmüştür (Şekil 3.4).



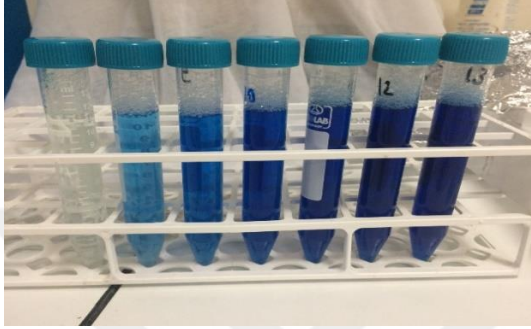
Şekil 3.4. (a) Makro kjeldahl düzeneği (b) distilatın toplanması

Erlen içerisinde toplanan distilattaki amonyak azotu miktarı, 0,02 N H₂SO₄ titrasyon çözeltisi ile açık leylak renk gözlenene kadar titre edilmesi ile belirlenmiştir. Son olarak numunenin amonyak azotu konsantrasyonu Eşitlik 3.4'te görülen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$N = \frac{(A - B) \times N \times 14 \times 1000}{V} \quad (3.4)$$

Burada; A numune için titrasyonda harcanan H₂SO₄ titrasyon çözeltisi hacmini (mL), B şahit için titrasyonda harcanan H₂SO₄ titrasyon çözeltisi hacmini (mL), N H₂SO₄ titrasyon çözeltisinin normalitesini ve V Numune hacmini (mL) ifade etmektedir.

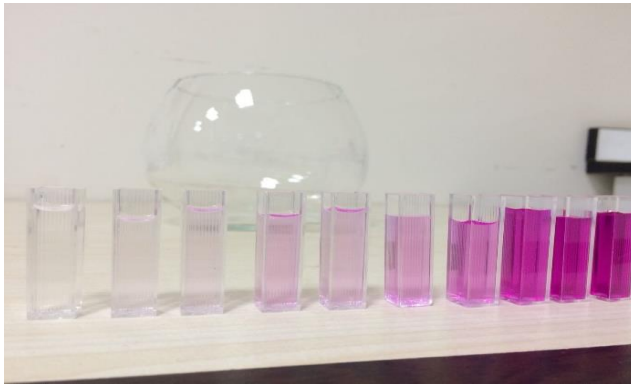
Fenat yöntemi (4500 NH₃-F), amonyak konsantrasyonun 0,02-2,0 mg NH₃-N/L gibi çok düşük konsantrasyonlarda olduğu durumlarda uygulanabilen, spektrofotometrik bir yöntemdir (APHA 2005). 10 mL numuneyi içeren tüplere 0,4 mL fenol çözeltisi ve 0,4 mL sodyum nitroprusid çözeltisi eklenmiş ve her eklemekten sonra tüplerin kapağı kapatılarak iyice çalkalanmıştır. Karanlıkta 2 saat reaksiyon süresinin gerçekleşmesinin ardından numunelerin amonyum azotu konsantrasyonları spektrofotometrede 640 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Amonyum azotu ölçümleri öncesinde 0-2 mg/L arasında belirli konsantrasyonlarda amonyum azotu içeren standart çözeltiler ile spektrofotometre kalibre edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Fenat metodu amonyum azotu standart çözeltileri

3.3.2. Nitrit analizleri

Aklımasyon reaktörleri çıkış atıksuyunun nitrit analizleri standart metot 4500 NO₂-B kolorimetrik yöntemle göre yapılmıştır (APHA 2005). Kolorimetrik yöntemde, nitrit asidik koşullarda, sülfanilamid ve N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorit ile reaksiyona girerek kırmızımsı-mor azo boyası oluşturur ve bu rengin yoğunluğu spektrofotometre ile ölçülerek numunenin nitrit konsantrasyonu belirlenir. Nitrit analizlerinde beherlere 100 mL numune koyulmuş ve 2 mL renklendirme reaktifi eklenmiştir. Numuneler iyice karıştırılıp, reaksiyonun gerçekleşmesi için 10 dakika beklenmiştir. Ardından numunelerin nitrit konsantrasyonları spektrofotometrede 543 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Nitrit azotu ölçümleri öncesinde 0-1 mg/L arasında belirli konsantrasyonlarda nitrit azotu içeren standart çözeltiler ile spektrofotometre kalibre edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Kolorimetrik yöntem nitrit azotu standart çözeltileri

3.3.3. Nitrat analizleri

Nitrat analizleri, Alman standart metotlarına göre (DIN, 2001) nitratın spektrofotometrik belirlenmesi için Merck test kitleri ile yapılmıştır. Bu yöntemde nitrat, 4-nitro-2,6-dimetilfenol oluşturmak üzere 2,6-di-metilfenol (DMP) ile reaksiyona girer ve reaksiyon sonucu açığa çıkan renk yoğunluğu spektrofotometrede ölçülür. Reaksiyon tüpüne 1 mL numune koyulmuş ve tüplere metotta belirtilen şekilde 1 mL reaktif eklenmiştir. 10 dakika reaksiyon süresinin ardından numunelerin nitrat azotu konsantrasyonu spektrofotometrede 365 nm dalga boyunda belirlenmiştir.

3.3.4. Askıda katı madde ve uçucu askıda katı madde analizleri

Toplam askıda katı madde miktarı gravimetrik ölçüm esasına dayanan yöntem ile belirlenmiştir (APHA 2005). Bu ölçüm ilkesine göre, standart cam elyaf tarafından tutulan ve 103-105°C'de kurutma sonrası oluşan bakiye askıda katı madde olarak tanımlanmaktadır. Askıda katı madde numunelerinin daha sonrasında 500-550 °C'de yakılması sonucunda karbondioksit ve suya dönüşen organik bölümü ise uçucu askıda katı madde olarak tanımlanmaktadır.

AKM analizi için darası alınmış filtre kağıdı vakumlu süzme setine yerleştirilmiş ve iyice karıştırılıp homojen hale getirilerek numune filtre kağıdından süzölmüştür. Filtre kâğıdı 103-105°C sıcaklığa sahip etüvde 2 saat kurutulduktan sonra sabit tartıma gelmesi için desikatörde 30 dakika bekletilmiş ve hassas terazide tartımı yapılmıştır. AKM konsantrasyonu Eşitlik 3.5'de görölen formöl ile hesaplanmıştır:

$$AKM (mg/L) = \frac{A-B}{V} \quad (3.5)$$

Burada A etüvde kurutma sonrası filtre kağıdı ağırlığını (g), B filtre kağıdının ilk ağırlığını (g) ve V numune hacmini (mL) göstermektedir.

AKM analizi yapılan filtre kâğıdı tartıldıktan sonra 500-550°C olan kül fırınında 35-40 dakika yakılmış ve ardından sabit tartıma gelmesi için desikatörde 30 dakika beklendikten sonra tartılmıştır. UAKM konsantrasyonu Eşitlik 3.6'da görölen formöl ile hesaplanmıştır:

$$UAKM (mg/L) = \frac{A-C}{V} \quad (3.6)$$

Burada A kül fırınında yakmadan önceki filtre kağıdı ağırlığını (g), C kül fırınında yakma sonrası filtre kağıdı ağırlığını (g) ve V numune hacmini (mL) göstermektedir.

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizleri

3.4.1. DNA izolasyonu

200 mg örnek, içerisinde 0,1 mm çaplı cam boncuk ve 400 µL parçalama çözeltisi (CTAB -hexadecyltrimethylammonium bromide-, TrisHCl pH 8, EDTA, NaCl) bulunan tüplere transfer edilmiş ve 1 dk 6000 rpm'de homojenize edilmiştir. Yeni bir tüpe transfer edilecek numunenin üzerine 400 µL bağlama çözeltisi (Guanidine thiocyanate, Tris-HCl,

pH 8) eklenmiş, 10 dk 95°C’de inkübe edilmiş, 400 µL 2-propanol eklenmiş ve silika kolona yüklenmiştir. 10000 g’de 1 dk santrifüj ile kolondan geçirilen numunedeki DNA’lar silika kolonda tutulmuş, daha sonra iki defa yıkama çözeltisi (NaCl, Tris-HCl, pH 8; Etanol) ile yıkanmıştır. Silika kolon santrifügasyonla kurutulmuştur. Silika kolonda tutulan DNA’lar 100 µL nükleaz içermeyen, steril, deiyonize su (pH 7) ile kolondan alınmış ve analize kadar -20 °C’de saklanmıştır. DNA izolasyonu tamamlanmış örneklerdeki DNA’nın miktarı ve kalitesi spektrofotometrik yöntemlerle ölçülerek sonraki basamaklara uygunluğu test edilmiştir. OD260/OD280 oranı 1.8-2.0, OD260/OD230 oranı 2.0-2.2 aralığında ve en az 10 ng/ µL (tercihen 50-300 ng/µL) konsantrasyonuna sahip DNA’lar ile diğer moleküler işlemler gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qPCR)

Çalışma kapsamında anammox prosesinin gerçekleşme durumunu belirlemek amacıyla hidrazin sentaz geni, amonyum gideriminde nitrifikasyon prosesinin katkısının olup olmadığını belirlemek amacıyla amonyak monooksijenaz geni ile gerçek zamanlı kantitatif PCR analizleri yapılmıştır. Nitrit azotunun giderimi ise çeşitli prosesler sonucu gerçekleşebileceği için nitritin; nitrifikasyon yol iziyle nitrate oksidasyonu nitrit oksidoredüktaz geni, denitrifikasyon yol iziyle nitrit oksite indirgenmesi nitrit redüktaz genleri ve amonyuma katabolik indirgenme yol iziyle amonyuma indirgenmesi bu proseste rol olan nitrit redüktaz geni incelenerek belirlenmiştir. Hedef mikrobiyal grupların sayımı için kullanılan oligonükleotit setlerinin adları ve ilgili kaynaklar Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Azot giderim proseslerinde rol oynayan enzimlere ait primerler

Hedef	Primer Adı	Kaynak
Bakteri, 16S rRNA	Bac519f - Bac519r	Kolukırık vd. 2011
Bakteri, amonyak monooksijenaz (amoA) geni	amoA-1F- amoA-2R	Yu vd. 2018
Arke, amonyak monooksijenaz (amoA) geni	Cren-Arch-amoAF- Cren-Arch-amoAR	Francis vd. 2005
Hidrazin sentaz (hzs) geni	hzsA1597F- hzsA1857R	Harhangi vd. 2012
Nitrit oksidoredüktaz (nxrA) geni	NxrAF1370F- F2843R	Langone vd. 2014
Nitrit redüktaz (nirK) geni	nirK-876F - nirK-1040R	Henry vd. 2006
Nitrit redüktaz (nirS) geni	nirS-F - nirS-1622R	Thróback vd. 2004
Nitrit redüktaz (nrfA) geni	nrfAF2aw - nrfAR1	Yu vd. 2018

QPCR 15 s 95°C (ilk döngüde 3 dk), 50 s 50°C, 5 s 78°C, floresan okuma koşullarında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan tüm primer çiftlerinin primer dimer erime sıcaklıkları 76 °C'den düşük ve ürün erime sıcaklıkları 80°C'den yüksek olduğu için okumalar 78°C'de gerçekleştirilmiştir. Böylelikle her okumada primer dimer kaynaklı floresan ışıma elenmiştir. İşletim sonunda 65-95°C arasında erime eğrisi analizi yapılarak, primer dimer oluşumu ayrıca test edilmiştir. Reaksiyonlar 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 1x Reaksiyon Tamponu, 0.1U High Fidelity Hot Start Taq DNA Polimeraz, 1x EvaGreen-I, 5 ng/μL kalıp DNA ve her bir primerden 0.5 μM içeren 10 μL'lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir. QPCR verileri CFX Manager Software 3.0'da analiz edilmiştir. 2^{-ΔCt} yöntemi ile hedef mikrobiyal grupların nispi miktarları hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen 2001).



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

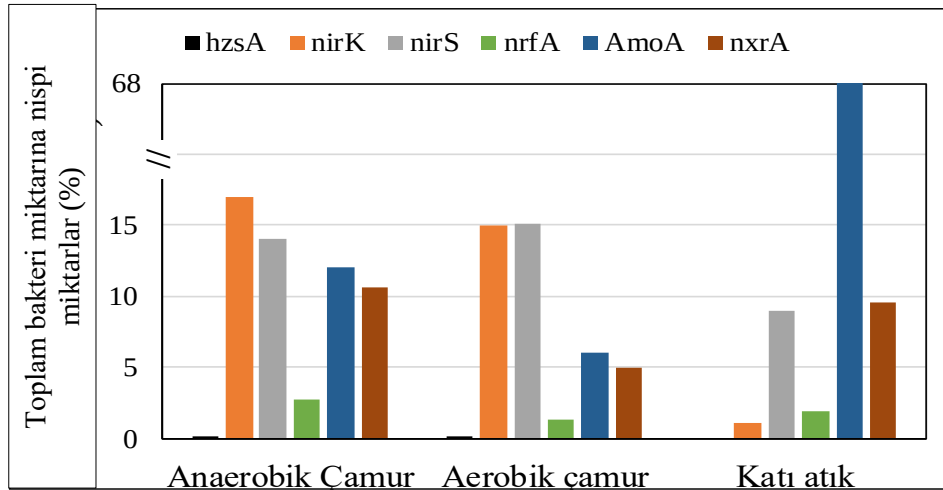
4.1. Aşı Çamuru ve Besleme Koşullarının Azot Giderim Verimine Etkisi (Set 1)

Paralel olarak işletilen ilk üç aklımasyon reaktörü bir hafta süreyle aşı çamurunun uygulanan koşullara adapte olması ve aşı çamurlarında bulunan organik madde ve azot bileşiklerinin tüketilmesi amacıyla 32,50 mg NH₄-N/L ve 42,50 mg NO₂-N/L olmak üzere toplam 75 mg N/L azot konsantrasyonu ile azot yükleme hızı 49,54 mg/L.gün olacak şekilde beslenmiştir. 2. haftadan itibaren besleme çözeltisi azot yükleme hızı yaklaşık toplam 132,8 mg N/L.gün olacak şekilde arttırılmıştır. Yaklaşık bir ay süreyle azot yükleme hızı 132,80 mg N/L.gün ile yürütülen aklımasyon çalışmalarının ardından azot yükleme hızı 165,92 mg N/L.gün'e arttırılmıştır. Bu azot yükleme hızında işletim sırasında reaktörlerde nitritin birikmesi nedeniyle 20. günün sonunda azot yükleme hızı 130,77 mg N/L.gün'e indirilmiştir. Aklımasyon sürecinin son periyodu olan 8 günlük sürede ise azot yükleme hızı 82,35 mg N/L.gün olarak uygulanmıştır. Aklımasyon sürecinde mikroorganizmalara beslenen azot konsantrasyonları Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Set 1 aklımasyon çalışmalarında reaktörlere beslenen azot konsantrasyonları

Besleme Fazı	Uygulanan günler	NH ₄ -N Konsantrasyonu (mg/L)	NO ₂ -N Konsantrasyonu (mg/L)	AYH (mg N/L.gün)
1	8 – 37	87,24	113,91	132,76
2	37 – 56	109,0	142,4	165,92
3	56 – 82	85,93	112,21	130,77
4	82 – 86	54,12	70,66	82,35

Reaktörlerde azot gideriminin hangi prosesler ile gerçekleştirildiğinin belirlenmesi amacıyla proseslere özgü genlerin toplam bakteri miktarına nispi miktarlarının uygulanan azot yükleme hızları ile değişiminin incelenmesi amacıyla aşı çamurlarında bulunan gen miktarları belirlenmiştir. Bu amaçla yürütülen gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon analizleri sonunda elde edilen gen miktarları toplam bakteri miktarına nispi miktarlar olarak hesaplanmıştır. Aşı çamurlarında bulunan azot giderimine özgü genlerin toplam bakteri miktarına nispi miktarları Şekil 4.1'de görülmektedir.



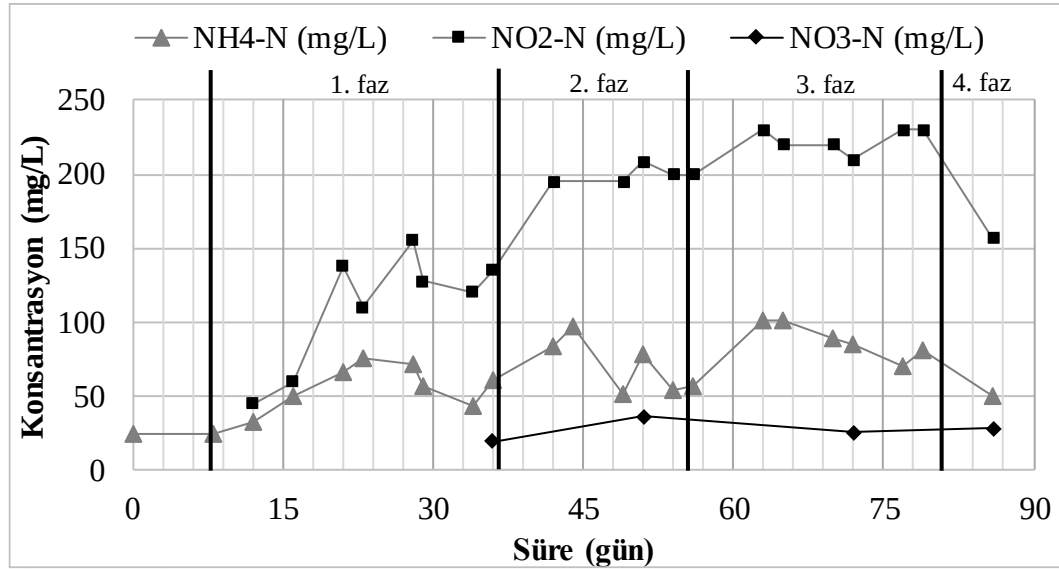
Şekil 4.1. Aşı çamurlarında bulunan genlerin toplam bakteri miktarına nispi miktarları

Şekil 4.1’de görüleceği üzere, katı atıkta bulunan mikroorganizmaların yaklaşık %68’i amonyum oksidasyonunu gerçekleştiren AmoA genine sahiptir. Anaerobik aşı çamuru ve aerobik aşı çamurunda en fazla bulunan genler ise nitritin nitrik oksite indirgenmesini sağlayan nitrit redüktaz enzimine ait NirS ve NirK genleridir. Anammox bakterilerinin varlığını tespit etmek için kullanılan, nitrik oksit ve amonyumun hidrazine dönüşümden sorumlu olan hidrazin sentaz geninin katı atık numunesindeki mikroorganizmalarda bulunmadığı tespit edilmiştir. Aerobik ve anaerobik aşı çamurlarında ise bakterilerin sırasıyla %0,034 ve %0,028’nin hzsA genine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum anammox bakterilerinin çoğaltılması için aerobik ve anaerobik aşı çamurunun katı atık numunesinden daha uygun bir aşı çamuru olduğunu göstermektedir.

4.1.1. Aerobik ve anaerobik aşı çamuruna kısa süreli besleme uygulanmasının azot giderimine etkisi (R1)

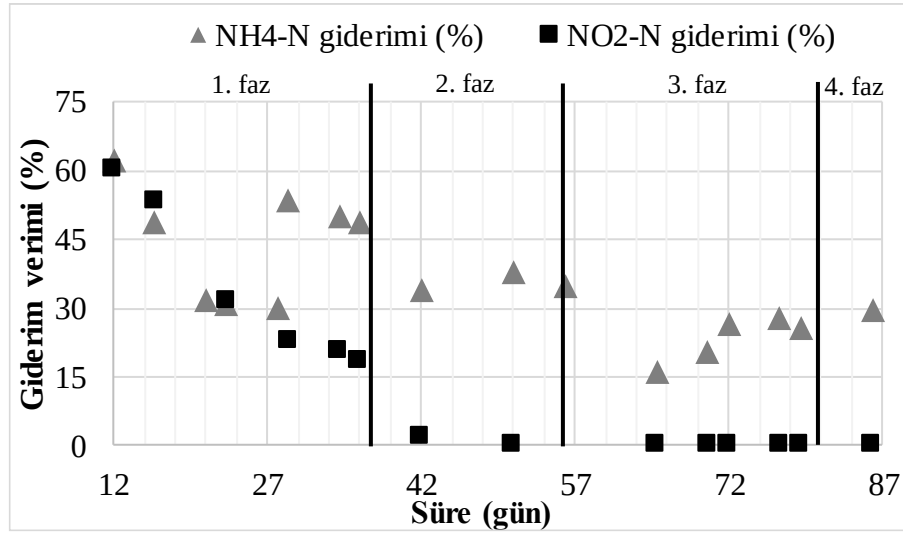
Aerobik ve anaerobik aşı çamurlarının karıştırılmasıyla aklımasyon çalışmalarının başlatıldığı 1. Reaktörde 1 dakikalık besleme süresi ile farklı periyotlarda farklı azot konsantrasyonlarının beslenmesi sonucunda 86 günlük aklımasyon sürecinde elde edilen çıkış $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ ve nitrat azotu ($\text{NO}_3\text{-N}$) konsantrasyonları Şekil 4.2’de görülmektedir.

R1 reaktörünün işletilmeye alınmasının ardından oldukça düşük amonyum azotu ve nitrit azotunun beslendiği ilk haftanın sonunda sistemde %62 amonyum ve %60 nitrit giderim verimi elde edilirken, reaktöre beslenen amonyum azotu konsantrasyonunun artırılması çıkış amonyum azotu konsantrasyonunun artmasına sebep olmuştur. Beslenen nitrit konsantrasyonunun artırılması ise 1. fazdan itibaren nitritin giderilemeden reaktörde birikmesine sebep olmuştur.



Şekil 4.2. R1 reaktöründe aklımasyon sürecinde çıkış azot konsantrasyonları

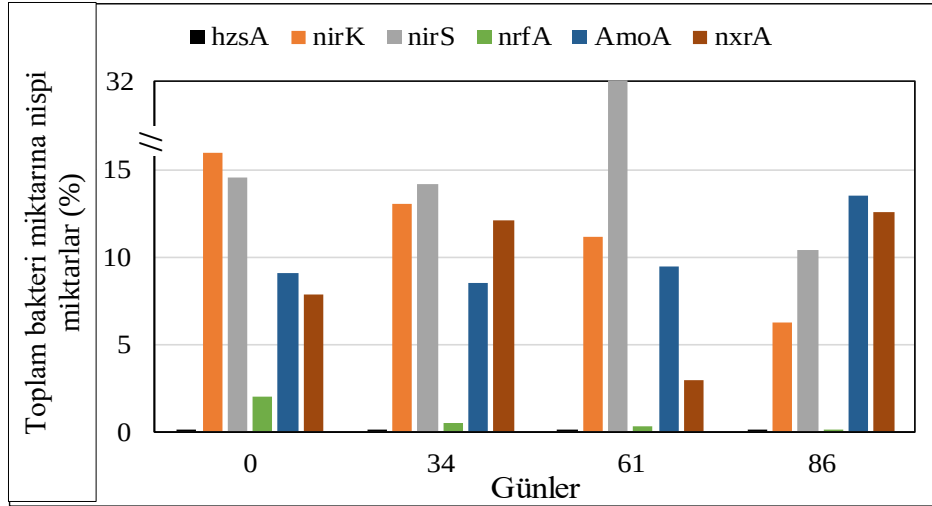
Reaktörde elde edilen amonyum ve nitrit giderim verimleri her iki azot türünün de ortamda biriken miktarları göz önüne alınarak hesaplanmıştır. Reaktörlerden günde 660 mL hacim boşaltıldığı için geriye 340 mL hacim kalmaktadır. Bu durumda, herhangi bir gün çıkış suyunda ölçülen azot konsantrasyonunun %34'ü reaktörde kalmaktadır. Bu doğrultuda günlük azot giderim verimleri hesaplanırken, giriş azot konsantrasyonu o gün sisteme beslenen azot konsantrasyonu ve bir önceki ölçümde elde edilen azot konsantrasyonunun %34'ü toplanarak belirlenmiştir. Hesaplanan giriş azot konsantrasyonu ile o gün ölçülen çıkış azot konsantrasyonuna göre azot giderim verimleri hesaplanmıştır. Besleme yapılmayan cumartesi ve pazar günlerinin ardından ölçülen azot konsantrasyonları diğer günler ölçülen azot konsantrasyonlarından oldukça düşük olmuştur. Bu durum mikroorganizmaların yeterli süre verildiğinde beslenen amonyum azotu ve nitrit azotunu giderebilecek potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Sistemin genel giderim verimini görebilmek için pazartesi günleri ölçülen azot konsantrasyonları için giderim verimleri hesaplanmamıştır. R1 reaktöründe, yukarıda bahsedilen hesaplamalara göre belirlenen amonyum azotu ve nitrit azotu giderim verimleri Şekil 4.3'de görülmektedir.



Şekil 4.3. R1 reaktöründe aklımasyon sürecinde azot giderim verimleri

1. fazın sonu itibariyle reaktörde yaklaşık %49 amonyum azotu ve %18 nitrit azotu giderimi gerçekleşmiştir. 2. fazda giriş amonyum azotu ve nitrit azotu konsantrasyonlarının artırılması sonucunda amonyum azotu giderim verimi bir miktar azalarak ortalama %38'e inerken, nitrit azotu giderimi azalmış ve 2. fazın sonunda nitrit giderimi gerçekleşmediği gözlenmiştir. 3. ve 4. fazlarda giriş azot konsantrasyonlarının azaltılması sonucu amonyum azotu gideriminde bir miktar daha azalma gözlenirken, nitrit azotunun giderilmediği ve ortamda biriktiği gözlenmiştir.

Elde edilen amonyak giderim verimlerinin hangi prosesler ile gerçekleştiğinin belirlenmesi amacıyla, 1. fazın sonunda (34. gün), 2. fazın ortasında (61. gün) ve aklımasyon sürecinin sonunda (86. gün) numuneler alınarak qPCR ile azot giderim proseslerindeki genlerin toplam bakterileri miktarına nispi miktarları belirlenmiştir (Şekil 4.4). Aerobik ve anaerobik aşı çamurlarının karıştırılması ile oluşturulan R1 aşı çamurunda bakterilerde en fazla mevcut olan gen nitritin nitrik okside dönüşümünü gerçekleştiren bakır içeren nitrit redüktaz enzimine ait nirK geni olmuştur. R1 reaktörünün işletilmesi sırasında nirK geninin toplam bakteriye nispi miktarı kademeli olarak azalmıştır. Reaktörde azot yükleme hızının artırılmasına paralel olarak sitokrom cd1 içeren nitrit redüktaz enzimine ait nirK geni miktarı artmış ve 4. fazda azot yükleme hızının azaltılmasıyla nirS geni miktarı azalmıştır. Aklımasyon sürecinin 1. fazında yapılan gen ölçümlerine göre amonyum oksidasyonunu sağlayan amonyak monooksijenaz enzimine ait AmoA geni nispi miktarı azalırken, diğer fazlarda azot yükleme hızının artırılması ile AmoA gen sayısı artmıştır.



Şekil 4.4. R1 - azot gideriminden sorumlu genlerin nispi miktarındaki değişim

Anammox prosesinde rol alan hidrazin sentaz enzimine ait hzsA geninin miktarı ise aklımasyon süreci boyunca azalmıştır. Nitrifikasyon ile nitritin nitrate oksidasyonu durumunu belirlemek amacıyla incelenen nitrit oksidoredüktaz enzimine ait nxrA geninin bakterilere nispi miktarının ise 1. fazda artarken, azot yükleme hızının artırılması sonucu azaldığı ve ardından azot yükleme hızının azaltılması ile arttığı belirlenmiştir. Nitratin amonyuma katabolik indirgenmesi prosesinin gerçekleşme durumunu belirlemek amacıyla incelenen nitrit redüktaz enzimine ait nrfA geninin bakterilere nispi miktarı ise R1 reaktörünün işletilmesi sırasında azot yükleme hızından bağımsız olarak azalmıştır.

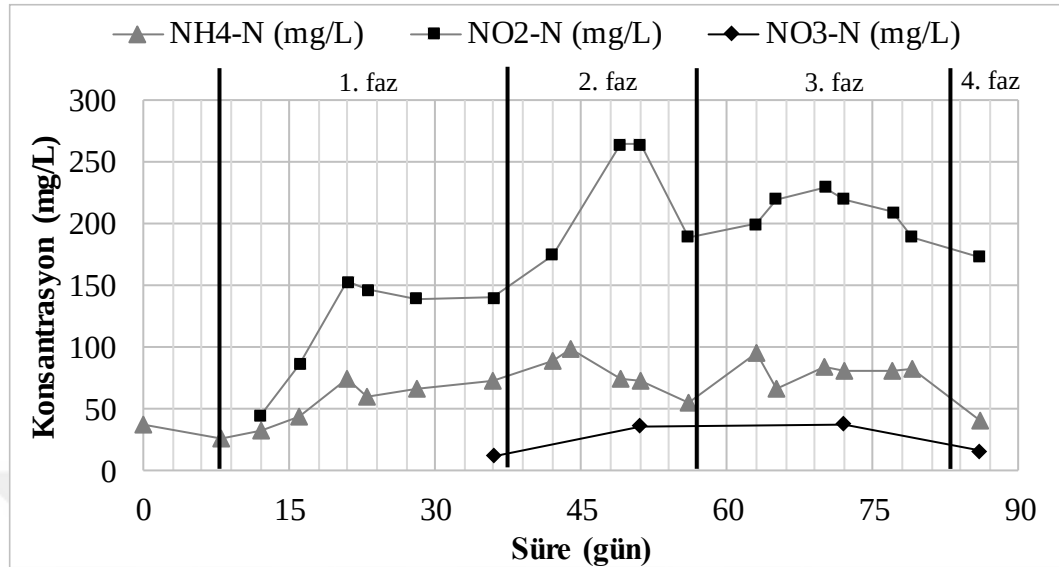
Moleküler analiz sonuçlarına göre aerobik ve anaerobik aşı çamurları ile oluşturulan reaktöre 1 dakika süreyle azot beslemesi yapılması sonucunda bakteriler anammox yol izi yerine amonyumu gidermek için amonyum oksidasyonuna yönelerek amonyak monooksijenaz enzimini üretmişlerdir. Yüksek konsantrasyondaki nitrit azotunu gidermek için ise bakteriler tarafından sitokrom cd1 içeren nitrit redüktaz enzimi üretildiği sonucuna varılmıştır.

4.1.2. Aerobik ve anaerobik aşı çamuruna 2 saat süreli besleme uygulanmasının azot giderimine etkisi (R2)

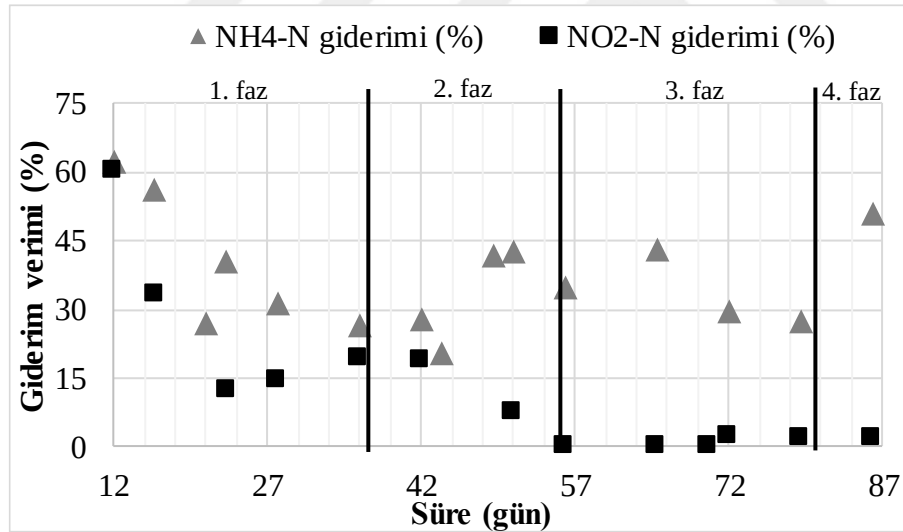
Aerobik ve anaerobik aşı çamuru ile oluşturulan aşı çamurunun 2 saat süreyle beslenmesi ile 86 gün boyunca yürütülen aklımasyon çalışmaları sırasında R2 reaktöründe reaktör çıkışında ölçülen $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ ve $\text{NO}_3\text{-N}$ konsantrasyonları Şekil 4.5’de görülmektedir.

R2 reaktörüne 132,76 mg N/L.gün azot yükleme hızının uygulandığı 1. fazın başında R1 reaktörüne benzer şekilde nitrit azotu birikimi gözlenmiştir. Ancak, yaklaşık ilk on günün ardından mikroorganizmalar sabit miktarda nitrit azotu giderimi gerçekleştirmiştir. 2. fazda azot yükleme hızının 165,95 mg N/L.gün’e artırılması sonucunda amonyum azotu konsantrasyonunda değişim gözlenmez iken çıkış nitrit azotu konsantrasyonları önemli ölçüde artmıştır. Bu fazdan itibaren reaktörde sürekli nitrit azotu birikimi gözlenmiştir. R2 reaktöründe çıkış akımında ölçülen amonyum azotu konsantrasyonları ise farklı azot yükleme hızlarının uygulanması sonucunda çok fazla

etkilenmemiştir. R2 reaktörü için hesaplanan azot giderim verimleri Şekil 4.6’da görülmektedir.



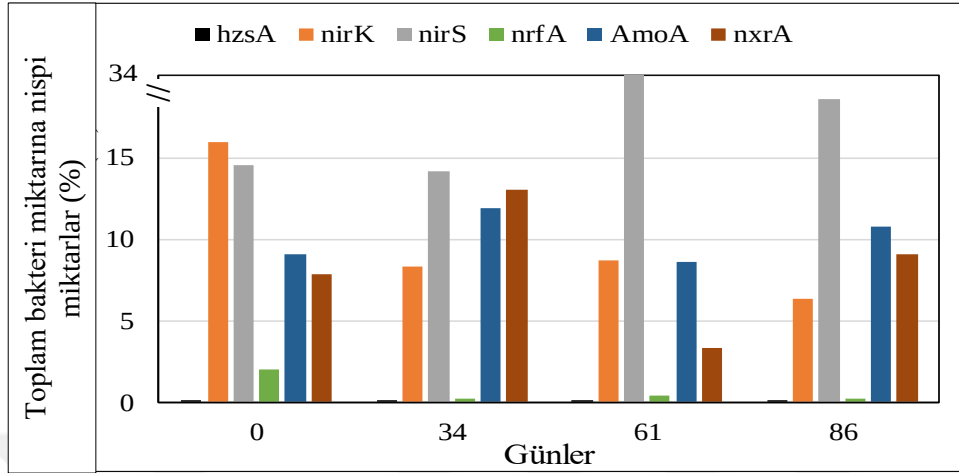
Şekil 4.5. R2 reaktöründe aklımasyon sürecinde çıkış azot konsantrasyonları



Şekil 4.6. R2 reaktöründe aklımasyon sürecinde azot giderim verimleri

R2 reaktöründen aklımasyon süresinin farklı fazlarından alınan numuneler ile yürütülen qPCR analizleri sonucu elde edilen nispi gen miktarları Şekil 4.7’de görülmektedir. R2 reaktöründe anaerobik ve aerobik aşı çamurunun karışımı ile oluşturulan aşı çamurunda en çok bulunan nirK geni nispi miktarı aklımasyon süresi boyunca azalırken, R1 reaktörüne benzer şekilde nirS geninin nispi miktarı azot yükleme hızının artırılmasına paralel olarak artmış ve azot yükleme hızının azaltılması ile azalmıştır. Nitrifikasyon ile nitritin nitrata oksidasyonu durumunu belirlemek amacıyla incelenen nitrit oksidoredüktaz enzimine ait nxrA geninin bakterilere nispi miktarı da R1 reaktörüne benzer şekilde, nirS geninin tersine 1. fazda artmış, azot yükleme hızının

arttırılması sonucu azalmış ve ardından azot yükleme hızının azaltılması ile tekrar artmıştır. AmoA geninin bakterilere nispi miktarı nxrA geni ile benzer şekilde azot yükleme hızı ile ters orantılı olarak değişmiştir.



Şekil 4.7. R2 - azot gideriminden sorumlu genlerin nispi miktarındaki değişim

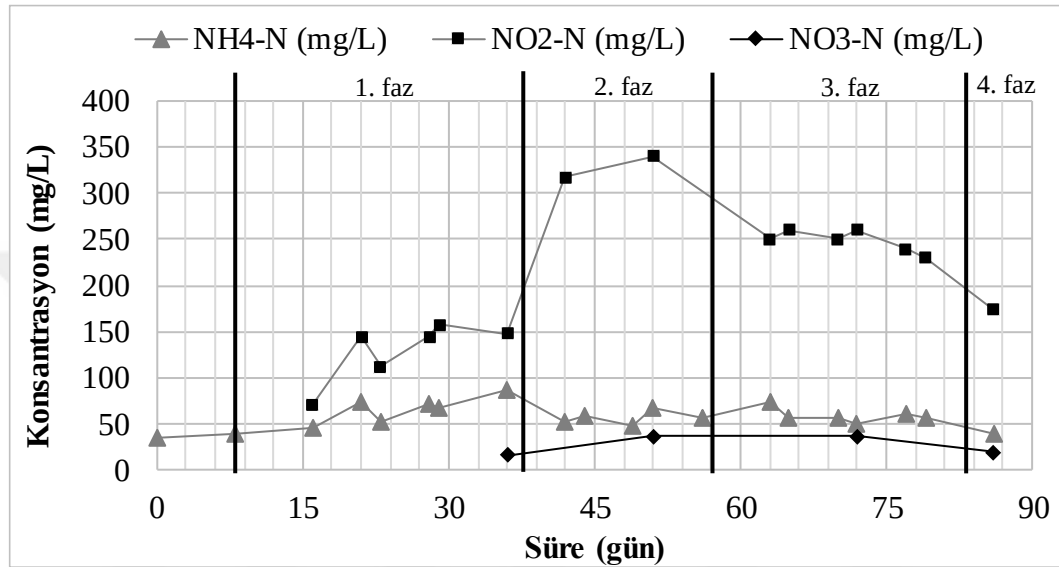
DNRA prosesinde rol oynayan nitrit redüktaz enzimine ait nrfA geninin bakterilere nispi miktarı ise R1 reaktöründen farklı olarak 1. fazın sonunda %0,239'a azalırken, yüksek azot yükleme hızının uygulandığı ikinci fazda yaklaşık %64 artarak %0,39 olmuştur. Anammox prosesinin göstergesi olarak incelenen hzsA geninin aşı çamurunda bulunan bakterilere nispi miktarı %0,03 iken, 1. fazın sonunda %0,1'e artarak yaklaşık 4 katına ulaşmıştır. Ancak, azot yükleme hızının 165,95 mg N/L.gün'e çıkarılması sonucunda hzsA geni miktarı azalmıştır. Hidrazin sentaz enzimini kodlayan hzsA geninin nispi miktarındaki azalmanın yüksek nitrit konsantrasyonu nedeniyle mikroorganizmaların inhibe olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu doğrultuda, aerobik ve anaerobik aşı çamuru kullanılarak aklimasyon sürecinin 132,76 mg N/L.gün azot yükleme hızında 2 saat süreyle besleme ile uzun süre yürütülmesi sonucunda anammox bakterilerinin aklime edilebileceği görülmektedir.

Moleküler analiz sonuçları, 1. fazda mikroorganizmaların azot giderimi için anammox prosesini gerçekleştirmek için gerekli enzimi üretmeye başladığını, ancak azot yükleme hızının arttırılması sonucunda, DNRA yol izi ile nitriti amonyuma indirgemek için gerekli nitrit redüktaz enzimini üretmeye başladığını göstermektedir. Aklimasyon sürecinin sonunda ise ortamda aşırı nitrit birikimi nedeniyle nitrit giderimi için nitritin nitrata oksidasyonunu sağlayan nitrat oksidoredüktaz enziminin üretildiği sonucuna varılmıştır.

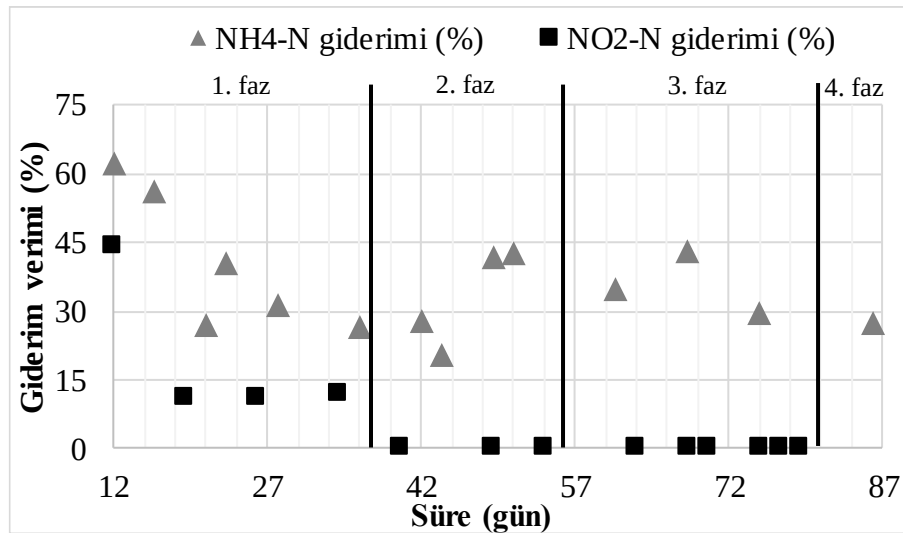
4.1.3. Katı atık aşı çamuruna 2 saat süreli besleme uygulanmasının azot giderimine etkisi (R3)

Düzenli depolama sahasından temin edilen katı atık numunesinin aşı çamuru olarak kullanıldığı ve 2 saatlik besleme süresinin uygulandığı R3 reaktöründe 86 günlük aklimasyon süresi boyunca ölçülen çıkış $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ ve $\text{NO}_3\text{-N}$ konsantrasyonları Şekil 4.8'de görülmektedir. Katı atık numunesinin aşı çamuru olarak kullanıldığı R3

reaktöründe 1. fazın başlangıcında yüksek amonyum ve nitrit giderim verimi elde edilirken, yaklaşık 18. günden itibaren reaktörde nitrit birikimi gözlenmiştir. Amonyum gideriminin ise R1 ve R2 reaktöründen daha fazla olduğu gözlenmiştir. R3 reaktöründe aklımasyon süresi boyunca hesaplanan amonyum ve nitrit giderim verimleri Şekil 4.9’da görülmektedir. Amonyum giderimi 1. fazda ortalama %30 olarak hesaplanırken, azot yükleme hızının artırılması ile %44 civarına yükselmiştir. Nitrit azotu giderimi ise 1. fazın sonunda %15 iken, azot yükleme hızının artırılması ile R3 reaktöründe 2. fazdan itibaren nitrit gideriminin gerçekleşmediği belirlenmiştir.



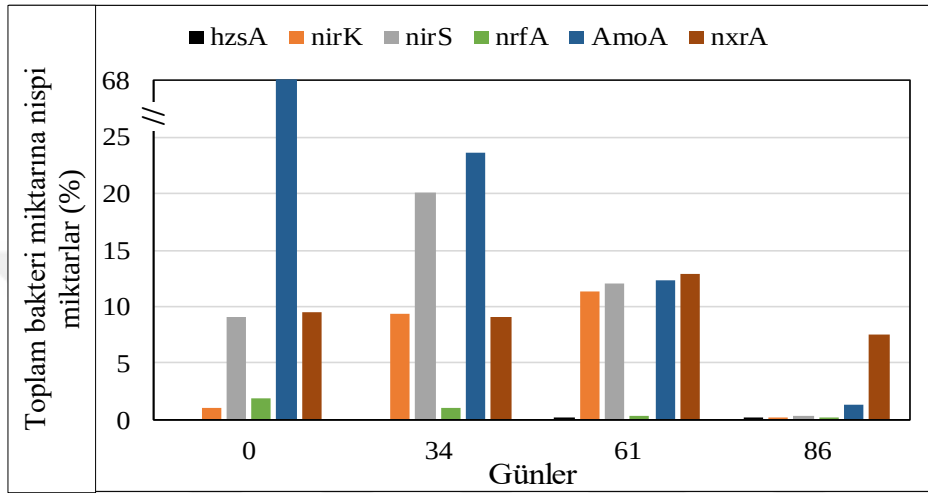
Şekil 4.8. R3 reaktöründe aklımasyon sürecinde çıkış azot konsantrasyonları



Şekil 4.9. R3 reaktöründe aklımasyon sürecinde azot giderim verimleri

R3 reaktöründen aklımasyon süresi sırasında alınan numuneler ile yürütülen qPCR analizleri sonucu elde edilen nispi gen miktarları Şekil 4.10’da görülmektedir. R3 reaktöründe diğer reaktörlerden farklı olarak aklımasyon süresince amonyum

oksidasyonunu katalizleyen AmoA geni sayısı azalırken 1. fazın sonunda nitritin nitrik oksite indirgenmesini sağlayan nitrit redüktaz enzimine ait nirS geni sayısı artmıştır. Azot yükleme hızının arttırılması sonucunda ise bakterilere nispi miktarı en fazla olan gen nitrit oksidoredüktaz enzimine ait nxrA geni olmuştur. Ayrıca R3 reaktöründe, başlangıçta aşı çamurunda bulunmayan hidrazin sentaz enzimi bakteriler tarafından üretilmiş ve hzsA geninin bakterilere nispi miktarı %0,06'ya ulaşmıştır. Ancak yüksek azot yükleme hızı sonucu, hzsA geninin bakterilere nispi miktarı aklımasyon süreci sonunda %0,015'e inmiştir.



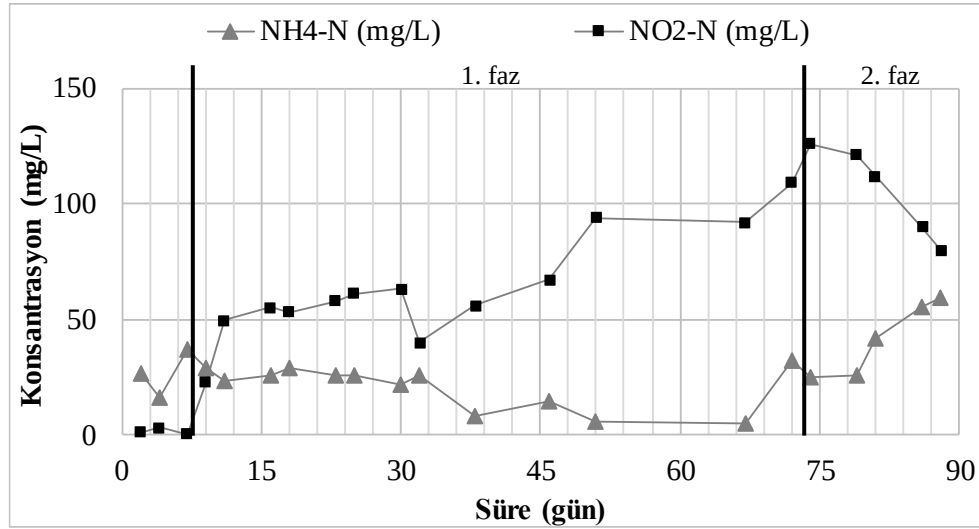
Şekil 4.10. R3 - azot gideriminden sorumlu genlerin nispi miktarındaki değişim

4.2. Besleme Koşullarının Azot Giderim Verimine Etkisi (Set 2)

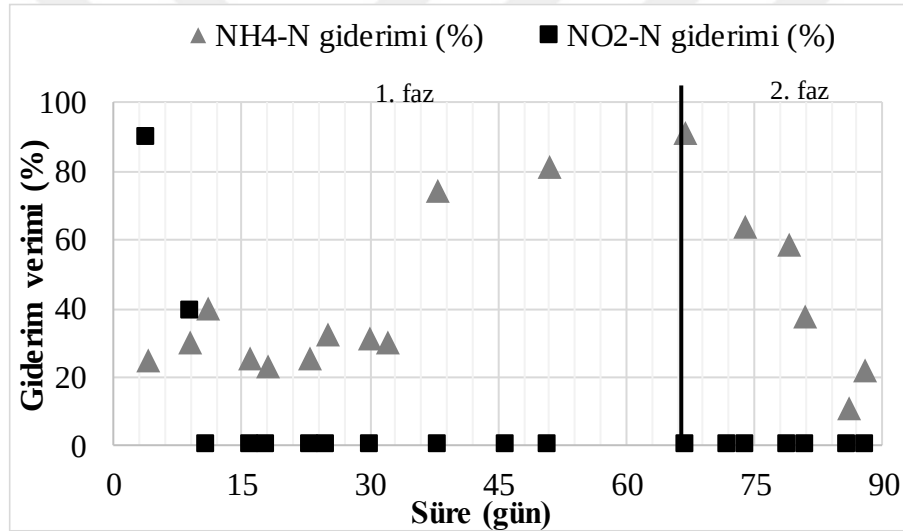
İlk set deneylerin ardından tüm aşı çamurları birleştirilerek oluşturulan aşı çamuru ile iki aklımasyon reaktörü oluşturulmuştur. Bu reaktörlerden birincisine 2 saat süreyle besleme uygulanırken, 2. reaktöre 12 saat süreyle besleme uygulanmıştır. İlk set deneylerde elde edilen deneyimlere göre 2. set deneylerde daha düşük azot konsantrasyonları uygulanmıştır. Bu amaçla, reaktörlere 2. haftadan itibaren 28,64 mg NH₄-N/L ve 37,40 mg NO₂-N/L olmak üzere toplam 66 mg N/L azot konsantrasyonu ile azot yükleme hızı 43,59 mg N/L.gün olarak 60 gün boyunca uygulanmıştır. Ardından çıkış nitrit konsantrasyonunun artması nedeniyle besleme düzeni aynı konsantrasyonun iki günde bir beslenmesi yapılacak şekilde değiştirilmiştir. Set 2 deneyleri 66 mg N/L azot beslemesinin yapıldığı 1. faz ve aynı konsantrasyonun iki günde bir uygulanarak azot yükleme hızının yarıya indirildiği 2. fazdan oluşmaktadır.

4.2.1. Karışık aşı çamuruna 2 saat süreli besleme uygulanmasının azot giderimine etkisi (R4)

Karışık aşı çamurunun 2 saatlik besleme süresiyle beslendiği R4 reaktöründe 86 günlük aklımasyon süresi boyunca ölçülen çıkış NH₄-N ve NO₂-N konsantrasyonları Şekil 4.11'de giderim hızları ise Şekil 4.12'de görülmektedir.



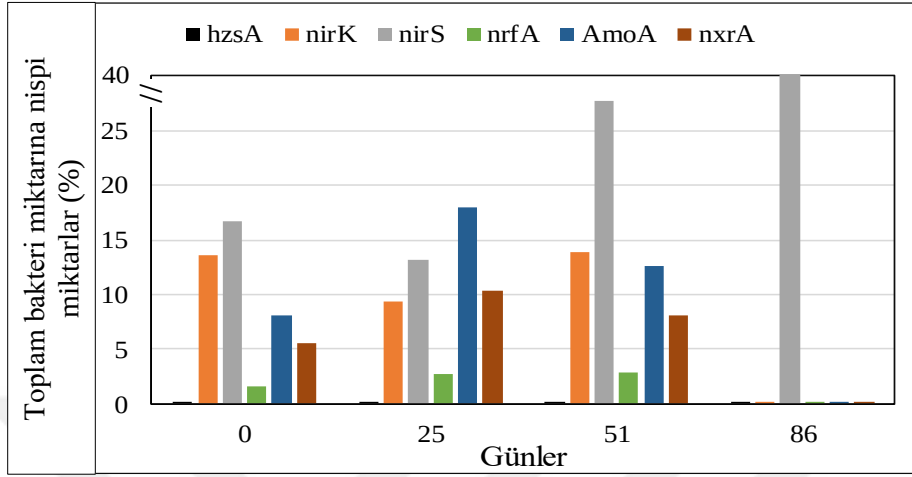
Şekil 4.11. R4 reaktöründe aklımasyon sürecinde çıkış azot konsantrasyonları



Şekil 4.12. R4 reaktöründe aklımasyon sürecinde azot giderim verimleri

R4 reaktöründe karışık aşı çamuruna 43,59 mg N/L.gün azot yükleme hızı uygulanması ile yürütülen aklımasyon sırasında ilk 30 gün nispeten benzer çıkış amonyum ve nitrit konsantrasyonları ölçülmüştür. İlk 30 gün %40 amonyum azotu giderim verimi elde edilirken, nitrit azotunun reaktörde biriktiği ve nitrit gideriminin olmadığı belirlenmiştir. Ancak, 30. günden sonra çıkış amonyum azotu konsantrasyonları azalırken, çıkış nitrit azotu konsantrasyonları artmıştır. Amonyum azotu giderim verimi %90'a ulaşırken, çıkış nitrit azotu konsantrasyonu giriş konsantrasyonlarından daha fazla ölçülmüştür. 70. gün itibariyle beslemenin iki günde bir olarak yapılması ile azot yükleme hızının 21,8 mg N/L.gün olarak uygulanması çıkış amonyum azotu konsantrasyonunun artmasına ve çıkış nitrit azotu konsantrasyonunun azalmasına sebep olmuş ve aklımasyon sürecinin sonunda amonyum azotu giderim verimi %22'ye kadar inmiştir.

R4 reaktöründe aklımasyon süreci başlangıcı ile 25., 50. ve 86. günlerde yapılan qPCR analizlerine göre incelenen genlerin bakterilere nispi miktarları Şekil 4.13’de görülmektedir.

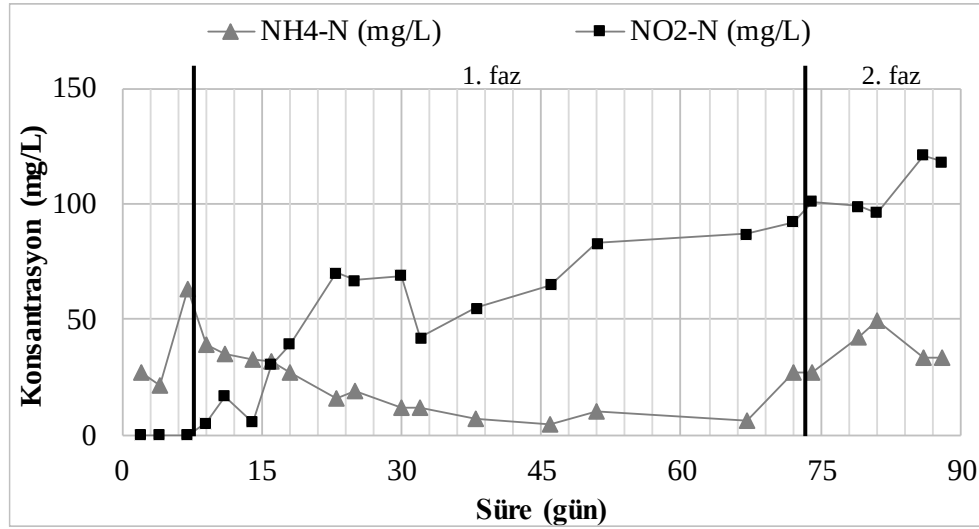


Şekil 4.13. R4 - azot gideriminden sorumlu genlerin nispi miktarındaki değişim

R4 reaktöründe karışık aşı çamuruna 2 saat süreyle besleme uygulanması sonucunda 25. Gün itibariyle bakterilerdeki nitritin nitrik oksite indirgenmesini katalizleyen nirS ve nirK genlerinin miktarı azalmış, buna karşılık nitritin amonyuma katabolik indirgenmesini sağlayan enzime ait nrfA geni ile amonyum oksidasyonunu sağlayan enzime ait AmoA geninin nispi miktarları artmıştır. nrfA geninin artmasının bakterilerin katı atıkta bulunan organik maddeyi aklımasyon süreci boyunca organik karbon kaynağı olarak kullanarak nitriti katabolik nitrit indirgenmesi yol iziyle gidermeye yönelmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. En yüksek amonyum giderim verimine ulaşılan 50. gün itibariyle ise bakterilerdeki nrfA geninin nispi miktarı nispeten sabit kalırken, AmoA geninin nispi miktarı azalmıştır. Buna karşılık nirS ve nirK genlerinin nispi miktarları artmıştır. Aklımasyon sürecinin sonunda incelenen bakterilerin en yüksek oranda nirS genine sahip olduğu belirlenmiştir. Anammox aktivitesi açısından değerlendirildiğinde aşı çamurunda hzsA geni nispi miktarı %0,026 iken 50 günün sonunda bu miktar %0,0066’ya inmiş, ancak organik yükleme hızının azaltılması sonucu hzsA geni nispi miktarı yaklaşık altı kat artarak %0,04’e çıkmıştır.

4.2.2. Karışık aşı çamuruna 12 saat süreli besleme uygulanmasının azot giderimine etkisi (R5)

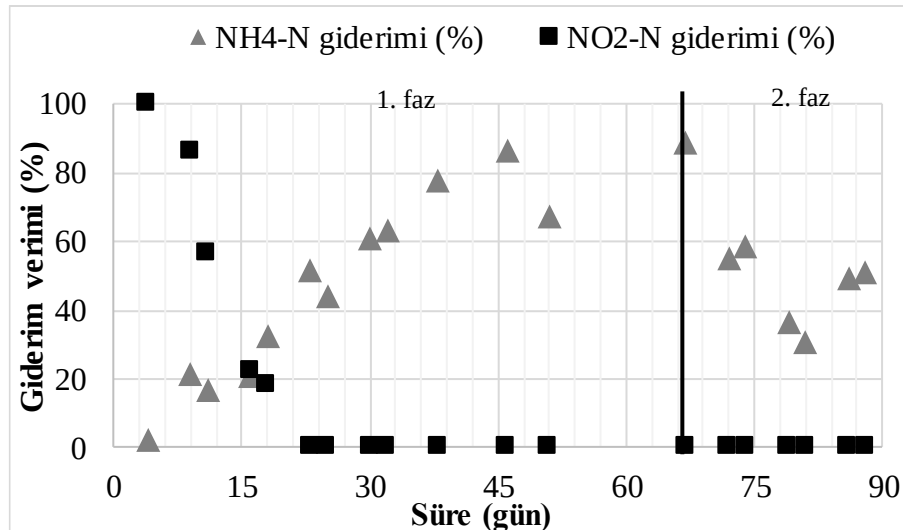
Karışık aşı çamurunun 12 saatlik besleme süresiyle beslendiği R5 reaktöründe 86 günlük aklımasyon süresi boyunca ölçülen çıkış $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ ve $\text{NO}_3\text{-N}$ konsantrasyonları Şekil 4.14’te görülmektedir.



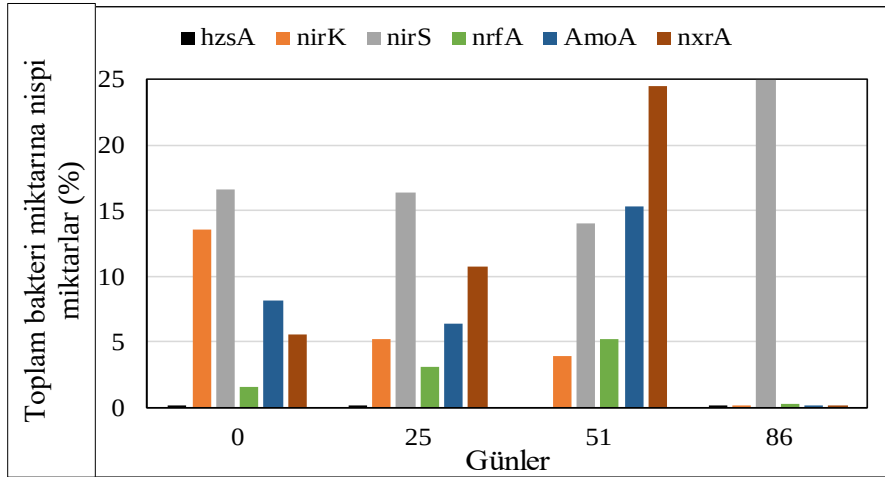
Şekil 4.14. R5 reaktöründe aklımasyon sürecinde çıkış azot konsantrasyonları

R5 reaktörüne R4 reaktöründen farklı olarak 12 saat süreyle beslenme uygulanması sonucunda 1. fazda nitrit giderimi daha uzun süre ile elde edilmiştir. R4 reaktöründe nitrit giderimi 12. gün itibariyle sona ererken R5 reaktöründe nitrit giderimi yaklaşık 21. güne kadar devam etmiştir. Şekil 4.15’de görülen amonyum azotu giderim verimlerine göre R5 reaktöründe aklımasyon sürecinin başlangıcında yaklaşık %2 olan amonyum giderim verimi 1. Fazın sonunda %80’e ulaşmıştır. 2. fazda azot yükleme hızının azaltılmasıyla amonyum giderim verimi azalmış ve aklımasyon süresi sonunda azot giderim verimi yaklaşık %50 olarak hesaplanmıştır.

R5 reaktöründen alınan numunelerde moleküler analiz sonuçlarına göre incelenen genlerin toplam bakteri miktarına göre nispi miktarları Şekil 4.16’da görülmektedir.



Şekil 4.15. R5 reaktöründe aklımasyon sürecinde azot giderim verimleri



Şekil 4.16. R5 - azot gideriminden sorumlu genlerin nispi miktarındaki değişim

R5 reaktöründe karışık aşı çamuruna 12 saat süreyle besleme uygulanması ile yürütülen aklimasyon çalışmasında uzun besleme süresi uygulanması sonucunda nitritin nitrik oksite indirgenmesini sağlayan nitrit redüktaz enzimine ait nirS ve nirK gen sayılarının 1. faz sonunda azaldığı, aklimasyon süresi sonunda ise bakterilerin yüksek miktarda nirS geni içerdikleri belirlenmiştir. R5 reaktöründe R4 reaktöründen farklı olarak aklimasyon sürecinin 1. fazından AmoA ve nrfA gen miktarlarının arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, anammox bakterilerine ait gen olan hzs geninin bakterilere nispi miktarı 1. fazın sonunda sıfıra inmiş, ancak 2. fazın sonunda %1'e yükselmiştir. Bu durum anammox bakterilerinin aklimasyonu için uzun besleme süresi uygulanmasının uygun olduğu sonucunu desteklemektedir.

5. SONUÇLAR

Anaerobik amonyum oksidasyonu, anaerobik koşullar altında elektron alıcısı olarak nitritin varlığında amonyumun oksitlenerek azot gazının üretildiği prostestir. Oksijen ve harici karbon gerektirmeyen düşük maliyetli Anammox prosesinin en büyük sorunu Anammox bakterilerinin oldukça düşük çoğalma hızına sahip olmasıdır. Bu nedenle, en uygun aşı çamurunun seçimi veya reaktörde Anammox bakterileri birikimini elde etmek için en verimli reaktör sisteminin seçimi işletmeye alma sürecinde son derece önemlidir. Anammox prosesinin işletmeye alma süresini kısaltmak için uygun koşulları belirlemek amacıyla farklı reaktör konfigürasyonlarında aktif çamur, nitrifikasyon bakterisi ve anaerobik çamur gibi farklı başlangıç aşı çamurları ile araştırmalar yürütülmüştür.

Bu doğrultuda, tez kapsamında, aynı aşı çamuruna farklı besleme koşullarının uygulanması ve farklı aşı çamurlarına aynı besleme koşullarının uygulanması ile anammox bakterilerinin aklımasyonu için en uygun aşı çamuru ve besleme koşulları belirlenmiştir. Uygun aşı çamuru ve besleme koşullarının belirlenmesi amacıyla azot giderim verimleri ile birlikte azot giderim proseslerini gerçekleştiren enzimlere ait genlerin nispi miktarları da incelenmiştir.

Farklı aşı çamurları ile farklı besleme süreleri uygulanarak yürütülen aklımasyon çalışmaları sonucunda aşı çamuru türünün ve besleme süresinin azot türlerinin gideriminde hangi prosesin rol oynayacağına öneme sahip olduğu belirlenmiştir. Deneysel çalışmalar aerobik ve anaerobik aşı çamuru ile bir dakika gibi kısa bir sürede besleme uygulanması durumunda Anammox prosesinde rol alan hzsA geninin miktarının azaldığını, aynı aşı çamuruna 2 saat süreyle beslenme uygulanması durumunda ise hzsA gen sayısının arttığını ortaya koymuştur. Bu artış, yüksek azot yükleme hızı uygulandığında, muhtemelen yüksek nitrit konsantrasyonu nedeniyle mikroorganizmaların inhibe olması nedeniyle azalmıştır.

Sri Shalini vd. (2015) tarafından yürütülen çalışmalarda 3 yıldır depolanan evsel katı atık ile sızıntı suyunun aşı çamuru olarak kullanılması durumunda anammox bakterilerinin kısa sürede aklime edilebileceği belirlenmiştir. Ancak, bu çalışmada, moleküler analiz sonuçlarına göre katı atığın aşı çamuru olarak kullanımı azot giderim proseslerinin gerçekleşmesi açısından elverişli olmamıştır. Farklı aşı çamurlarına aynı besleme koşulları uygulanırken, oldukça farklı azot giderim verimleri ve gen miktarları elde edilmesi aşı çamurunun azot gideriminin hangi prosesle gerçekleştirileceğinde büyük öneme sahip olduğunu göstermektedir. Genel olarak, Anammox prosesinde rol alan hzsA geninin nispi miktarının en fazla olduğu bakterilerde en fazla üretildiği koşullar uzun besleme sürelerinin uygulandığı koşullar olmuştur. Bunun sonucunda, anammox bakterilerinin aklımasyonu için anaerobik ve aerobik çamurların uygun aşı çamuru olduğu ve uzun süreli besleme uygulanmasının anammox bakterilerinin aklımasyonuna katkı sağladığı belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Almutairi, A., Weatherley, L.R. 2015. Intensification of ammonia removal from waste water in biologically active zeolitic ion exchange columns. *Journal of Environmental Management*, 160, 128-138.
- APHA, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation.
- Babaei, A.A., Azadi, R., Jaafarzadeh, N., Alavi, N. 2013. Application and kinetic evaluation of upflow anaerobic biofilm reactor for nitrogen removal from wastewater by Anammox process. *Iranian Journal of Environmental Health Sciences & Engineering*, 10, 20-26.
- Betlach, M.R., Tiedje, J.M. 1981. Kinetic Explanation for Accumulation of Nitrite, Nitric Oxide, and Nitrous Oxide During Bacterial Denitrification. *Applied and Environmental Microbiology*, 42, 1074-1084.
- Bi, Z., Qiao, S., Zhou, J., Tang, X., Zhang, J. 2014. Fast start-up of Anammox process with appropriate ferrous iron concentration. *Bioresource Technology*, 170, 506-512.
- Bothe, H., Jost, G., Schlöter, M., Ward, B.B., Witzel, K.P. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 673-690.
- Broda, E. 1977. Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 17(6), 491-493.
- Cai, C., Hu, S.H., Guo, J.H., Shi, Y., Xie, G.J., Yuan, Z.G. 2015. Nitrate reduction by denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms can reach a practically useful rate. *Water Research*, 87, 211-217.
- Capodaglio, A.G., Hlavínek, P., Raboni, M. 2015. Physico-chemical technologies for nitrogen removal from wastewaters: A review. *Revista Ambiente & Água*, 10, 481-498.
- Cema, G., Raszka, A., Stachurski, A., Kunda, K., Surmacz-Górska, J., Płaza, E. 2009. A one-stage system with partial nitrification and Anammox processes in Rotating Biological Contactor (RBC) for treating landfill leachate. In: Proceedings of the IWA Conference Processes in Biofilms: Fundamentals to Applications, Davis, USA, 13-16 September 2009.
- Cole, J. 1996. Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation. *FEMS Microbiology Letters*, 136, 1-11.
- Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.H., Wagner, M. 2001. In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5273-5284.
- Dalsgaard, T., Canfield, D.E., Petersen, J., Thamdrup, B., Acuna-González, J. 2003. N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica, *Nature*, 422, 606-608.
- Dalsgaard, T., Thamdrup, B., Canfield, D.E. 2005. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Research in Microbiology*, 156(4), 457-464.

- Dapena-Mora, A., Van Hulle, S.W.H., Campos, J.L., Mendez, R., Vanrolleghem, P.A., Jetten, M. 2004. Enrichment of anammox biomass from municipal activated sludge: Experimental and modelling results. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(12), 1421-1428.
- Dapena-Mora, A., Fernández, I., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Méndez, R., Jetten, M.S.M. 2007. Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 859-865.
- Date, Y., Isaka, K., Ikuta, H., Sumino, T., Kaneko, N., Yoshie, S., Tsuneda, S., Inamori, Y. 2009. Microbial diversity of anammox bacteria enriched from different types of seed sludge in an anaerobic continuous-feeding cultivation reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, 281-6.
- Ding, Z.W., Ding, J., Fu, L., Zhang, F., Zeng, R. 2014. Simultaneous enrichment of denitrifying methanotrophs and anammox bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-11.
- Dong, L.F., Smith, C.J., Papaspyrou, S., Stott, A., Osborn, A.M., Nedwell, D.B. 2009. Changes in benthic denitrification, nitrate ammonification, and anammox process rates and nitrate and nitrite reductase gene abundances along an estuarine nutrient gradient (the Colne estuary, United Kingdom). *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 3171-3179.
- Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P.J.J., Siegrist, H., Van der Meer, J.R., Zehnder, A.J.B. 2001. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Archives of Microbiology*, 175, 198-207.
- Ehrich, S., Behrens, D., Lebedeva, E., Ludwig, W., Bock, E. 1995. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Archives of Microbiology*, 164, 16-23.
- Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M.M., Schreiber, F., Dutilh, B.E., Zedelius, J., De Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H.J.C.T., Van Alen, T., Luesken, F., Wu, M.L., Van de Pas-Schoonen, K.T., Op den Camp, H.J.M., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.-J., Stunnenberg, H., Weissenbach, J., Jetten, M.S.M., Strous, M. 2010. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 464, 543-8.
- Ettwig, K.F., Van Alen, K., Van de Pas-Schoonen, K.T., Jetten, M.S.M., Strous, M. 2009. Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 3656-62.
- Francis, C.A., Roberts, K.J., Beman, J.M., Santoro, A.E., Oakley, B.B. 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 14683-14688.
- Francis, C.A., Beman, J.M., Kuypers, M.M.M. 2007. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME Journal*, 1, 19-27.

- Gilbert, E.M., Agrawal, S., Schwartz, T., Horn, H., Lackner, S. 2015. Comparing different reactor configurations for Partial Nitritation/Anammox at low temperatures. *Water Research*, 81, 92-100.
- Guo, J., Wang, S., Lian, J., Ngo, H.H., Guo, W., Liu, Y., Song, Y. 2016. Rapid start-up of the anammox process: Effects of five different sludge extracellular polymeric substances on the activity of anammox bacteria. *Bioresource Technology*, 220, 641-646.
- Güven, D., Sözen, S. 2010. Biyolojik azot giderimi için yenilikçi teknolojiler; Anammox ve Sharon prosesleri. *İtùdergisi/e*, 20(2), 48-56.
- Harhangi, H.R., Le Roy, M., Van Alen, T., Hu, Bao-Ian, Groen, J., Kartal, B., Tringe, S.G., Quan, Zhe-Xue, Jetten, M.S.M., Camp, Huub J.M. Op den. 2012. Hydrazine Synthase, A Unique Phylomarker With Which To Study The Presence And Biodiversity Of Anammox Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 752-758.
- Haroon, M.F., Hu, S., Shi, Y., Imelfort, M., Keller, J., Hugenholtz, P., Yuan, Z. Tyson, G.W. 2013. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature*, 500(7464), 567-570.
- Härtig, E., Schiek, U., Vollack, K.U., Zumft, W.G. 1999. Nitrate and Nitrite Control of Respiratory Nitrate Reduction in Denitrifying *Pseudomonas stutzeri* by a Two-Component Regulatory System Homologous to NarXL of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181, 3658-3665.
- He, Z.F., Geng, S., Pan, Y.W., Cai, C.Y., Wang, J.Q., Wang, L.Q., Liu, S., Zheng, P., Xu, X.H., Hu, B.L. 2015. Improvement of the trace metal composition of medium for nitrite-dependent anaerobic methane oxidation bacteria: Iron (II) and copper (II) make a difference. *Water Research*, 85, 235-243.
- Head, I.M., Hiorns, W.D., Embley, T.M., McCarthy, A.J., Saunders, J.R. 1993. The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Journal of General Microbiology*, 139, 1147-1153.
- Hellinga, C., Schellen, A.A.J.C., Mulder, J.W., Van Lossdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. 1998. The Sharon process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater. *Water Science and Technology*, 34, 135-142.
- Hendrickx, T.L., Kampman, C., Zeeman, G., Temmink, H., Hu, Z., Kartal, B., Buisman, C.J. 2014. High specific activity for anammox bacteria enriched from activated sludge at 10°C. *Bioresource Technology*, 163, 214-221.
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., Philippot, L. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5181-5189.
- Henze, M., Harremoës, P., LaCour, J., Jansen, J., Arvin, E. 1997. Wastewater treatment. Biological and chemical processes, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Hernandez, D., and Rowe, J.J. 1987. Oxygen regulation of nitrate uptake in denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 745-750.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. 1993. Kinetic PCR Analysis Real Time Monitoring Of DNA Amplification Reactions. *Bio/ Technology*, 11, 1026-1030.

- Hooper, A.B., Vannelli, T., Bergmann, D.J., Arciero, D.M. 1997. Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. 71, 59-67.
- Hovanec, T.A., Taylor, L.T., Blakis, A., DeLong, E.F. 1998. Nitrospira-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 258-264.
- Hu, S.H., Zeng, R.J., Burow, L.C., Lant, P., Keller, J., Yuan, Z.G. 2009. Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms. *Environmental Microbiology Reports*, 1, 377-384.
- Hu, Z. 2014. New insights into the physiology and application of anammox bacteria. PhD thesis. Radboud University Nijmegen.
- Hu, Z., Lotti, T., de Kreuk, M., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M., Kruit, J., Jetten, M.S.M., Kartal, B. 2013. Nitrogen removal by a nitrification-anammox bioreactor at low temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 2807-2812.
- Jeong, G., Jung, J.H., Lim, J.H., Won, Y.S., Lee, J.K. 2014. A computational mechanistic study of breakpoint chlorination for the removal of ammonia nitrogen from water. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 47(3), 225-229.
- Jetten, M.S.M., Sliekers, O., Kuypers, M., Dalsgaard, T., van Niftrik, L., Cirpus, I., van de Pas-Schoonen, K., Lavik, G., Thamdrup, B., Le Paslier, D., Op den Camp, H.J.M., Hulth, S., Nielsen, L.P., Abma, W., Third, K., Engström, P., Kuenen, J.G., Jørgensen, B.B., Canfield, D.E., Sinninghe Damsté, J.S., Revsbech, N.P., Fuerst, J., Weissenbach, J., Wagner, M., Schmidt, I., Schmid, M., Strous, M. 2003. Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 107-114.
- Jetten, M.S.M., Horn, S.J., Van Loosdrecht, M.C.M. 1997. Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. *Water Science and Technology*, 35, 171-190.
- Jetten, M., Schmid, M., van de Pas-Schoonen, K., Damsté, J.S.S., Strous, M., 2005b. Anammox organisms: enrichment, cultivation, and environmental analysis. *Environmental Microbiology*, 397, 34-57.
- Jetten, M.S.M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L.A., deVries, S., van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen, J.G. 1997b. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 71(1-2), 75-93.
- Jetten, M.S.M., Wagner, M., Fuerst, J., van Loosdrecht, M., Kuenen, G., Strous, M. 2001. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 283-288.
- Jin, R.C., Yang, G.F., Yu, J.J., Zheng, P. 2012. The inhibition of the Anammox process: a review. *Chemical Engineering Journal*, 197, 67-79.
- Jin, R.C., Yu, J.J., Ma, C., Yang, G.F., Zhang, J., Chen, H., Zhang, Q.Q., Ji, Y.X., Hu, B.L. 2014. Transient and long-term effects of bicarbonate on the Anammox process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 1377-1388.
- Junier, P., Molina, V., Dorador, C., Hadas, O., Kim, O.-S., Junier, T., Witzel, K.-P., Imhoff, J.F. 2010. Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing

microorganisms (AOM) in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 425-440.

Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.H., Pommerening- Röser, A., Koops, H.P., Wagner, M. 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: Nitrosococcus mobilis and Nitrospira-like bacteria as dominant populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3042-3051.

Kampman, C., Hendrickx, T.L.G., Luesken, F.A., van Alen, T.A., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Zeeman, G., Buisman, C.J.N., Temmink, H. 2012. Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria for application after direct low-temperature anaerobic sewage treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 227–228(0), 164-171.

Kartal, B., Rattray, J., van Niftrik, L., van de Vossenberg, J., Schmid, M., Webb, R.I., Schouten, S., Fuerst, J.A., Sinninghe Damsté, J.S., Jetten, M.S.M., Strous, M. 2007b. Candidatus “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 30, 39-49.

Kartal, B., Rattray, J., van Niftrik, L.A., van de Vossenberg, J., Schmid, M.C., Webb, R.I., Schouten, S., Fuerst, J.A., Damste, J.S., Jetten, M.S., Strous, M. 2007. Candidatus “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 30(1),39-49.

Kartal, B., van Niftrik, L., Rattray, J., van de Vossenberg, J.L., Schmid, M.C., Sinninghe Damste, J., Jetten, M.S., Strous, M. 2008. Candidatus ‘Brocadia fulgida’: an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(1), 46-55.

Kartal, B., Kuenen, J.G., Van Loosdrecht, M.C.M. 2010. Sewage Treatment with Anammox. *Science*, 328, 702-702.

Kartal, B., Maalcke, W.J., De Almeida, N.M., Cirpus, I., Gloerich, J., Geerts, W., Op den Camp, H.J.M., Harhangi, H.R., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.-J., Stunnenberg, H.G., Keltjens, J.T., Jetten, M.S.M., Strous, M. 2011. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature*, 479, 127-30.

Kartal, B., van Niftrik, L., Keltjens, J.T., den Camp, H. and Jetten, M.S.M., 2012. Anammox-growth physiology, cell biology, and metabolism. *Advances in Microbial Physiology*, 60, 211-262.

Keluskar, R., Nerurkar, A., Desai, A. 2013. Development of a simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonia oxidation and denitrification (SNAD) bench scale process for removal of ammonia from effluent of a fertilizer industry. *Bioresource Technology*, 130, 390-397.

Kimura, Y., Isaka, K., Kazama, F., 2011. Effect of inorganic carbon limitation on anaerobic ammonium oxidation (anammox) activity. *Bioresource Technology*, 102, 4930-4394.

King, D., Newdwell, D.B., 1985. The influence of nitrate concentration upon the end-products of nitrate dissimilation by bacteria in anaerobic salt marsh sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(1), 23-28.

- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Palladino, M.A. 2009. *Concepts of Genetics*. Pearson International Edition, San Francisco.
- Kolukirik, M., Ince, O., Ince, B. K. 2011. Increment in anaerobic hydrocarbon degradation activity of halic bay sediments via nutrient amendment. *Microbial ecology*, 61(4), 871-884.
- Koops, H.P., Pommerening-Röser, A. 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*, 37,1-9.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A Model for molecular microbial ecology. *Annual Review Of Microbiology*, 55, 485-529.
- Köenneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., Stahl, D.A. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437, 543-546.
- Kraft, B., Strous, M., Tegetmeyer, H.E. 2011. Microbial nitrate respiration- Genes, enzymes and environmental distribution. *Journal of Biotechnology*, 155, 104-117.
- Kuenen, J.G. 2008. Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 320-326.
- Kuypers, M.M.M., Sliekers, A.O., Lavik, G., Schmid, M., Jorgensen, B.B., Kuenen, J.G., Damste, J.S.S., Strous, M., Jetten, M.S.M. 2003. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the black sea. *Nature*, 422(6932), 608-611.
- Lam, P., Lavik, G., Jensen, M.M., van de Vossenberg, J., Schmid, M., Woebken, D., Gutiérrez, D., Amann, R., Jetten, M.S.M., Kuypers, M.M.M. 2009. Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone. *Proceedings of the national academy of sciences*, 106, 4752-7.
- Langone, M., Yan, J., Haaijer, S. C. M., Op Den Camp, H. J., Jetten, M., Andreottola, G. 2014. Coexistence of nitrifying, anammox and denitrifying bacteria in a sequencing batch reactor. *Frontiers in microbiology*, 5, 28.
- Lebedeva, E.V., Alawi, M., Fiencke, C., Namsaraev, B., Bock, E., Spieck, E. 2005. Moderately thermophilic nitrifying bacteria from a hot spring of the Baikal rift zone. *FEMS Microbiology Ecology*, 54, 297-306.
- Li, H., Chen, S., Mu, B.Z., Gu, J.D. 2010. Molecular Detection of Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Bacteria in High-Temperature Petroleum Reservoirs. *Microbial Ecology*, 60, 771-783.
- Li, M., Gu, J.D. 2011. Advances in methods for detection of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4),1241-1252.
- Li, M., Ford, T., Li, X., Gu, J.D. 2011b. Cytochrome cd1-containing nitrite reductase encoding gene nirS as a new functional biomarker for detection of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria. *Environmental Science & Technology*, 45, 3547-3553.
- Liang, Z., Liu, J. 2008. Landfill leachate treatment with a novel process: Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) combined with soil infiltration system. *Journal of Hazardous Materials*, 151, 202-212.

- Liao, D., Li, X., Yang, Q., Zeng, G., Guo, L., Yue, X. 2008. Effect of inorganic carbon on anaerobic ammonium oxidation enriched in sequencing batch reactor. *Journal of environmental sciences*, 20, 940-4, China.
- Liu, S.T., Yang, F.L., Gong, Z., Meng, F.G., Chen, H.H., Xue, Y., Furukawa, K.J. 2008. Application of anaerobic ammonium-oxidizing consortium to achieve completely autotrophic ammonium and sulfate removal. *Bioresource Technology*, 99, 6817-6825.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- Δ Ct method. *Methods*. 25(4), 402-408.
- Lotti, T., Van der Star, W.R.L., Kleerebezem, R., Lubello, C., Van Loosdrecht, M.C.M. 2012b. The effect of nitrite inhibition on the anammox process. *Water research*, 46, 2559-69.
- Lotti, T., Kleerebezem, R., Abelleira-Pereira, J.M., Abbas, B., van Loosdrecht, M.C.M. 2015. Faster through training: The anammox case. *Water Research*, 81, 261-268.
- Lotti, T., van der Star, W.R.L., Kleerebezem, R., Lubello, C., van Loosdrecht, M.C.M. 2012. The effect of nitrite inhibition on the anammox process. *Water Research*, 46(8), 2559-2569.
- Luesken, F.A., Sánchez, J., van Alen, T.A., Sanabria, J., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Kartal, B. 2011. Simultaneous Nitrite-Dependent Anaerobic Methane and Ammonium Oxidation Processes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 6802-6807.
- Matheson, F.E., Nguyen, M.L., Cooper, A.B., Burt, T.P. 2003. Short-term nitrogen transformation rates in riparian wetland soil determined with nitrogen-15. *Biology and Fertility of Soils*, 38, 129-136.
- Meyer, R.L., Risgaard-Petersen, N., Allen, D.E. 2005. Correlation between anammox activity and microscale distribution of nitrite in a subtropical mangrove sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6142-6149.
- Mulder, A., van de Graaf, A.A., Robertson, L.A., Kuenen, J.G. 1995. Anaerobic Amonium Oxidation Discovered in a Denitrifying Fluidized Bed Reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, 16, 177-183.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 263-273.
- Nozhevnikova, A.N., Simankova, M.V., Litt, Y.V. 2012. Application of the microbial process of anaerobic ammonium oxidation (anammox) in biotechnological wastewater treatment. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(8), 667-684.
- Paredes, D., Kusch, P., Mbvette, T.S.A., Stange, F., Müller, R.A., Köser, H. 2007. New Aspects of Microbial Nitrogen Transformations in the Context of Wastewater Treatment. *Engineering in Life Sciences*, 13-25.
- Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M.C., Koops, H.P., Wagner, M. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5368-5382.

- Pynaert, K., Smets, B., Wyffels, S., Beheydt, D., Siciliano, S., Verstraete, W. 2003. Characterization of an Autotrophic Nitrogen-Removing Biofilm from a Highly Loaded Lab-Scale Rotating Biological Contactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 3626-3635.
- Quan, Z.X., Rhee, S.K., Zuo, J.E., Yang, Y., Bae, J.W., Park, J.R., Lee, S.T., Park, Y.H. 2008. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environmental Microbiology*, 10(11), 3130-3139.
- Raghoebarsing, A.A., Pol, A., Van de Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J., Ettwig, K.F., Rijpstra, W.I.C., Schouten, S., Damste, J.S.S., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Strous, M. 2006. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*, 440, 918-921.
- Ren, L.F., Ni, S.Q., Liu, C., Liang, S., Zhang, B., Kong, Q., Guo, N. 2015. Effect of zero-valent iron on the start-up performance of anaerobic ammonium oxidation (anammox) process. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 2925-2934.
- Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P., Liesack, W. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4704-4712.
- Schmid, M., Schmitz-Esser, S., Jetten, M., Wagner, M. 2001. 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. *Environmental Microbiology*, 3, 450-459.
- Schmid, M., Twachtman, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, J.W., Schleifer, K.H., Wagner, M. 2000. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Systematic and Applied Microbiology*, 23(1), 93-106.
- Schmid, M., Walsh, K., Webb, R., Rijpstra, W.I., van de Pas-Schoonen, K., Verbruggen, M.J., Hill, T., Moffett, B., Fuerst, J., Schouten, S., Damste, J.S., Harris, J., Shaw, P., Jetten, M., Strous, M. 2003. Candidatus "Scalindua brodae", sp. nov., Candidatus "Scalindua wagneri", sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(4), 529-38.
- Schmid, M.C., Hooper, A.B., Klotz, M.G., Woebken, D., Lam, P., Kuypers, M.M., Pommerening-Roeser, A., Op den Camp, H.J., Jetten, M.S. 2008. Environmental detection of octahem cytochrome c hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Environmental Microbiology*, 10(11), 3140-3149.
- Schmidt, I., Look, C., Bock, E., Jetten, M.S.M., 2004. Ammonium and hydroxylamine uptake and accumulation in Nitrosomonas. *Microbiology Society Journals*, 150, 1405-1412.
- Shi, Y., Hu, S., Lou, J., Lu, P., Keller, J., Yuan, Z. 2013. Nitrogen Removal from Wastewater by Coupling Anammox and Methane-Dependent Denitrification in a Membrane Biofilm Reactor. *Environmental Science & Technology*, 47(20), 11577-11583.

- Sliekers, A.O., Third, K.A., Abma, W.R., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. 2003. CANON and Anammox in a gas-lift reactor. *FEMS Microbiology Letters*, 218, 339-344.
- Smith, C.J. and Osborn, A.M. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67, 6-20.
- Smith, M.S. and Zimmerman, K. 1981. Nitrous oxide production by non-denitrifying soil nitrate reducers. *Soil Science Society of America Journal*, 45, 865-871.
- Song, B. and Tobias, C.R. 2011. Molecular and stable isotope methods to detect and measure anaerobic ammonium oxidation (anammox) in aquatic ecosystems. *Methods in Enzymology*, 496, 63-89.
- Spieck, E. and Bock, E. 2005. Nitrifying Bacteria. Bergery's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition Two, The Proteobacteria (Part A, Introductory Essays), 137-140.
- Sri Shalini, S., Kurian, J., Wong, J.W.C. 2015. Aerobic and anaerobic ammonium-oxidising bacterial enrichment from municipal solid waste. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12, 1107-1122.
- Strous, M., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. 1999b. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 3248-3250.
- Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M.W., Horn, M., Daims, H., Bartol-Mavel, D., Wincker, P., Barbe, V., Fonknechten, N., Vallenet, D., Segurens, B., Schenowitz-Truong, C., Médigue, C., Collingro, A., Snel, B., Dutilh, B.E., Op den Camp, H. J. M., van der Drift, C., Cirpus, I., van de Pas-Schoonen, K.T., Harhangi, H.R., van Niftrik, L., Schmid, M., Keltjens, J., van de Vossenberg, J., Kartal, B., Meier, H., Frishman, D., Huynen, M.A., Mewes, H.-W., Weissenbach, J., Jetten, M.S.M., Wagner, M., Le Paslier, D. 2006. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, 440, 790-794.
- Strous, M., Jetten, M.S.M. 2004. Anaerobic oxidation of methane and ammonium. *Annual Review of Microbiology*, 58, 99-117.
- Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. 1998. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(5), 589-596.
- Strous, M., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. 1999. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3248-3250.
- Strous, M., van Gerven, E., Kuenen, J.G., Jetten, M. 1997. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2446-2448.
- Sundermeyer, H., Bock, E. 1981. Energy-metabolism of autotrophically and heterotrophically grown cells *Nitrobacter winogradsky*. *Archives of Microbiology*, 130(3), 250-254.
- Szatkowska, B., Cema, G., Plaza, E., Trela, J., Hultman, B. 2007. A one-stage system with partial nitrification and Anammox processes in the moving-bed biofilm reactor. *Water Science and Technology*, 55(8-9), 19-26.

- Tang, C.J., Zheng, P., Mahmood, Q., Chen, J.W. 2009. Start-up and inhibition analysis of the Anammox process seeded with anaerobic granular sludge. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 1093-1100.
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Stensel, H.D. 2013. Wastewater engineering: Treatment and resource recovery. Metcalf, Inc E, Metcalf, Eddy, McGraw-Hill Education.
- Tchobanoglous, G., Burton F.L., Stensel, H.D. 2003. Wastewater Engineering Treatment and Reuse, Metcalf and Eddy Inc. McGraw-Hill, New York.
- Throback, I.N., Enwall, K., Jarvis, A., Hallin, S. 2004. Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 401-417.
- Tiedje, J.M. 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. New York, USA, 179-244.
- Tiedje, J.M., Sextstone, A.J., Myrold, D.D., Robinson, J.A. 1982. Denitrification: ecological niches, competition, and survival. 48, 569-583.
- Toh, S.K., Ashbolt, N.J. 2002. Adaptation of anaerobic ammonium-oxidizing consortium to synthetic coke-ovens wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 344-352.
- US EPA. 1993. Manual: Nitrogen Control. Washington DC: US Environmental Protection Agency.
- van de Graaf, A.A., de Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M., Kuenen, J.G. 1997. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 143(1), 2415-2421.
- van de Graaf, A., Mulder, A., de Bruijn, P., Jetten, M., Robertson, L., Kuenen, J. 1995. Anaerobic Oxidation of Ammonium is a Biologically Mediated Process. *Applied and Environmental Microbiology*, 1246-1251.
- van de Graaf, A.A., de Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S., Kuenen, J.G. 1996. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 142(8), 2187-2196.
- van der Star, W.R.L., Miclea, A.I., van Dongen, L.G.J.M., Muyzer, G., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., 2008. The membrane bioreactor: a novel tool to grow anammox bacteria as free cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2), 286-294.
- van Dongen, U., Jetten, M.S.M., Van Loosdrecht, M.C.M. 2001. The SHARON-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Science and Technology*, 44, 153-160.
- Van Hulle, S.W.H., Vandeweyer, H.J.P., Meesschaert, B.D., Vanrolleghem, P.A., Dejana, P., Dumoulin, A. 2010. Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams. *Chemical Engineering Journal*, 162(1), 1-20.
- Van Loosdrecht, M.C.M., Jetten, M.S.M. 1998. Microbiological conversions in nitrogen removal. *Water Science and Technology*, 38, 1-7.
- Van Niftrik, L., Geerts, W.J.C., van Donselaar, E.G., Humbel, B.M., Yakushevskaya, A., Verkleij, A.J., Jetten, M.S.M., Strous, M., 2008a. Combined structural and chemical

analysis of the anammoxosome: a membrane-bounded intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *Journal of Structural Biology*, 161, 401-410.

Vesilind, P.A., Morgan, S.M., Heine, L.G. 2014. Çevre Mühendisliğine Giriş, Üçüncü Basımdan Çeviri, Çeviri Editörü; Prof. Dr. İsmail Toröz, 606 s.

Wang, C.C., Kumar, M., Lan, C.J., Lin, J.G. 2011. Landfill-leachate treatment by simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process. *Desalination and Water Treatment*, 32, 4-9.

Ward, B.B. and O'Mullan, G.D. 2002. Worldwide distribution of *Nitrosococcus oceanii*, a marine ammonia-oxidizing gamma-proteobacterium, detected by PCR and sequencing of 16S rRNA and *amoA* genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4153-4157.

Ward, B.B., Arp, D.J., Klotz, M. G. 2011. Nitrification. ASM Press. Washington.

Watson, S.W. 1971. Taxonomic considerations of the family Nitrobacteraceae Buchanan. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 21, 254-270.

Watson, S.W., Bock, E., Valois, F.W., Waterbury, J.B., Schlosser, U. 1986. *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. *Archives of Microbiology*, 144, 1-7.

Watson, S.W., Mandel, M., 1971. Comparison of the morphology and deoxyribonucleic acid composition of 27 strains of nitrifying bacteria. *Journal of Bacteriology*, 107, 563-569.

Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., Tru, H.G. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 463-464.

Wett, B. 2007. Development and implementation of a robust deammonification process. *Water Science and Technology*, 56, 81-8.

Wiesmann, U. 1994. Biological nitrogen removal from wastewater. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 51, 113-154.

Winogradsky, S. 1982. Contributions a` la morphologie des organismes de la nitrifications. *Archivio Di Scienze Biologiche*, 1, 86-137.

Wittebolle, L., Vervaeren, H., Verstraete, W., Boon, N. 2008. Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 286-293.

Xie, G. J., Cai, C., Hu, S., Yuan, Z. 2017. Complete Nitrogen Removal from Synthetic Anaerobic Sludge Digestion Liquor through Integrating Anammox and Denitrifying Anaerobic Methane Oxidation in a Membrane Biofilm Reactor. *Environmental Science & Technology*, 51(2), 819-827.

Yang, J., Zhang, L., Daisuke, H., Takahiro, S., Ma, Y., Li, Z., Furukawa, K. 2010. High rate partial nitrification treatment of reject wastewater. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(4), 436-440.

Yin, X., Qiao, S., Zhou, J., Tang, X. 2016. Fast start-up of the anammox process with addition of reduced graphene oxides. *Chemical Engineering Journal*, 283, 160-166.

Yu, T., Li, M., Niu, M., Fan, X., Liang, W., Wang, F. 2018. Difference of nitrogen-cycling microbes between shallow bay and deep-sea sediments in the South China Sea. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 447-459.

Zeng, L., Mangan, C., Li, X. 2006. Ammonia recovery from anaerobically digested cattle manure by steam stripping. *Water Science and Technology*, 54(8), 137-145.

Zhang, J.X., Zhang, Y.B., Li, Yang., Zhang, L., Qiao, S., Yang, F.L., Quan, X., 2012. Enhancement of nitrogen removal in a novel anammox reactor packed with Fe electrode. *Bioresource Technology*, 114, 102-108.

Zhao, Q.B., Ma, J., Zeb, I., Yu, L., Chen, S., Zheng, Y.M., Frear, C. 2015. Ammonia recovery from anaerobic digester effluent through direct aeration. *Chemical Engineering Journal*, 279, 31-37.

Zumft, W.G. 1997. Cell Biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 533-616.



ÖZGEÇMİŞ

SELİN ÇOBANSOY

selincobansoy@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2016 – 2018	Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Antalya
Lisans 2012 – 2016	Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Antalya