

2004-350



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

PROJE NO: 103I001

İÇTAG-A/036

2004-350

İnşaat ve Çevre Teknolojileri Araştırma Grubu
Construction and Environmental Technologies
Research Grant Committee

**SÜREKLİ pH ve ORP TAKİBİNE DAYALI BİYOLOJİK AZOT GİDERİMİ
SİSTEMİNDE NİTRİFİKASYON BAKTERİLERİNİN DAĞILIMININ
MOLEKÜLER TEKNİKLERLE İNCELENMESİ**

PROJE NO: 103I001

İÇTAG-A/036

2004-350

Öğr. Grv. Dr. Barış ÇALLI (Yürütücü)

Doç. Dr. Mehmet Ali YÜKSELEN (Araştırmacı)

Araş. Grv. Bülent MERTOĞLU (Araştırmacı)

Emine GİRGİN (Araştırmacı)

MART 2004

İSTANBUL

ÖNSÖZ

Bu projede, anaerobik olarak arıtılmış katı atık depo sahası sızıntı suyundaki yüksek amonyak azotunun nitrifikasyon ve denitrifikasyon ile biyolojik olarak giderimi araştırılmıştır. Sürekli pH ve ORP takibine göre otomatik olarak işletilen nitrifikasyon ve denitrifikasyon sistemlerinin verimini tespit etmek için, klasik işletme parametrelerine ilave olarak reaktörlerdeki mikrobiyal çeşitlilik izlenmiş ve değişen şartların etkileri incelenmiştir. Mikrobiyal çeşitliliği ve değişimi belirlemek için 16S rDNA bazlı flüoresan in situ hibridizasyon (FISH), denatüre gradyan gel elektroforezi (DGGE), klonlama ve DNA dizi analizi gibi moleküler mikrobiyoloji teknikleri kullanılmıştır.

Sürekli pH ve ORP Takibine Dayalı Biyolojik Azot Giderimi Sisteminde Nitrifikasyon Bakterilerinin Dağılımının Moleküler Tekniklerle İncelenmesi isimli bu proje Tübitak Araştırma Altyapısını Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	2
TABLO LİSTESİ	4
ŞEKİL LİSTESİ	5
ÖZET	6
ABSTRACT	7
GİRİŞ	8
GEREÇ ve YÖNTEM	9
<i>Reaktörlerin İşletilmesi</i>	9
<i>DNA izolasyonu ve PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) amplifikasyonu</i>	11
<i>DGGE (Denatüre Gradyan Gel Elektroforezi) ve Klonlama</i>	12
<i>Flüoresan In-situ Hibridizasyon (FISH)</i>	12
BULGULAR ve TARTIŞMA	13
<i>Nitrifikasyon</i>	13
<i>Denitrifikasyon</i>	17
SONUÇLAR	18
REFERANSLAR	20

TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. Flüoresan in-situ hibridizasyon da kullanılan oligonükleotit proplar	13
Şekil 1. DNA'da bir nükleotid grubunun yapısal sınıflandırılması	14
Şekil 2. Nükleotidlerin bir DNA zincirinde emilimi (5' ucu/3' ucu)	15
Şekil 3. Oligonükleotidlerin 3' ve 5' uçlarında atılacak primer nükleotidlerin yapıları (A, T, C, G ve 3' ucu/5' ucu)	16
Şekil 4. Oligonükleotidlerin bir DNA zincirinde emilimi (5' ucu/3' ucu)	17
Şekil 5. Oligonükleotidlerin bir DNA zincirinde emilimi (5' ucu/3' ucu)	18
Şekil 6. Oligonükleotidlerin bir DNA zincirinde emilimi (5' ucu/3' ucu)	19
Şekil 7. Oligonükleotidlerin bir DNA zincirinde emilimi (5' ucu/3' ucu)	20

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Sürekli pH takibine dayalı laboratuvar ölçekli nitrifikasyon düzeneği	10
Şekil 2. Sürekli pH ve ORP takibi ile çalışan denitrifikasyon düzeneği	11
Şekil 3. Nitrifikasyon tankından 221 ve 284. günlerde alınan çamur numunelerinde DAPI boyama (a, c, e, g, i, k) ve FISH (b, d, f, h, j, l) sonuçları (1000 x)	14
Şekil 4. Nitrifikasyon tankı giriş ve çıkış amonyak değerleri	15
Şekil 5. 185. günde nitrifikasyon tankında ölçülen amonyak, nitrit, nitrat (a) ve on-line pH değerleri (b)	16
Şekil 6. Denitrifikasyon tankı giriş ve çıkış NO _x -N (nitrit + nitrat) değerleri	18
Şekil 7. 136. günde denitrifikasyon tankında ölçülen on-line pH (a), nitrit, nitrat ve değerleri (b)	19

ÖZET

Bu çalışmada, yüksek miktarda amonyak içeriğine sahip bir sızıntı suyu ile beslenen laboratuvar ölçekli nitrifikasyon ve denitrifikasyon sistemlerinde klasik işletme verimi kontrol parametrelerine ilave olarak mikrobiyal çeşitlilik DGGE, klonlama ve FISH gibi moleküler teknikler kullanılarak incelenmiştir. Nitrifikasyon tankı, gerekli olan alkaliniteyi kullanıldıkça kesikli olarak ilave etmek için, sürekli pH takibine bağlı olarak alkalinite dozlayan bilgisayar kontrollü bir sistem ile işletilmiştir. Bu sistem ile pH 7.0 civarında sabit tutularak, yaklaşık %99 verim ve 0.16 mgNH₄⁺-N/mgUAKM.gün nitrifikasyon hızı elde edilmiştir. Aynı zamanda, amonyak oksitleyen *Nitrosomonas* ve nitrit oksitleyen *Nitrobacter* benzeri nitrifikasyon bakterileri yoğun olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, aerobik denitrifikasyon bakterileri olan *Thauera* türleri de tanımlanmıştır. pH ayarlamasının kaldırılmasından sonra anaerobik reaktörlerdeki verim düşüşüne paralel olarak, nitrifikasyon tankı daha fazla biyolojik olarak ayrışabilir KOİ ile yüklenmiştir. Mikrobiyal çeşitlilik bu değişiklikten hemen etkilenmiş ve karbon gideren heterotrofik bakteriler ve aerobik denitrifikasyon bakterileri çoğunluk haline gelmiştir. Daha önceki, yüksek verimleri tekrar elde edebilmek için, hidrolik bekletme süresi 24' den 48 saate çıkarılmış ve otomatik kontrol sistemine HCl dozlayan ikinci bir pompa ilave edilmiştir. Bu önlemlerden sonra, amonyak (Nso190) ve nitrit (NIT3) oksitleyen bakterilerin sayısı oldukça artmıştır. Denitrifikasyon sisteminde, karbon kaynağı olarak sodyum asetat ilavesi ile 2000 mg/l NO_x-N seviyelerinde bile %98 verim elde edilmiştir. Aynı zamanda, 20 g/l UAKM değerlerinde yaklaşık 1.34 mgNO_x-N/mgUAKM.gün denitrifikasyon hızları elde edilmiştir. Alınan tüm çamur numunelerinde benzer DGGE bant dağılımı görülmüş ve *Paracoccus* benzeri türler baskın denitrifikasyon bakterisi olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Sızıntı suyu, nitrifikasyon, denitrifikasyon, klonlama, DGGE, FISH

ABSTRACT

Molecular analysis of microbial populations in two bench-scale nitrification and denitrification reactors fed with high ammonia landfill leachate were conducted in this study by using DGGE, cloning, and FISH techniques additional to classical efficiency control parameters. Nitrification tank was operated with a computer-controlled alkalinity dosing system to supply the alkalinity intermittently as consumed on the basis of on-line pH monitoring. By keeping the pH at 7.0 with this system, 99% nitrification efficiencies and rates of about $0.16 \text{ mgNH}_4^+\text{-N/mgVSS.day}$ were obtained. Meanwhile, as ammonia oxidizing bacteria *Nitrosomonas*-like cells and as nitrite oxidizing bacteria *Nitrobacter*-related cells were intensively indicated. Moreover, some aerobic denitrifiers as *Thauera* species were also identified. After the termination of pH adjustment in the preceding anaerobic reactors, nitrification tank was loaded with more biodegradable COD as a result of reduced COD removal in anaerobic reactors. Microbial diversity was immediately affected from this alteration and heterotrophic carbonaceous bacteria and aerobic denitrifiers have dominated. To provide the former high efficiencies, retention time has increased from 24 to 48 hours and a second pump dosing HCl was included to the automatic control system. Subsequent to these precautions, the numbers of ammonia (Nso190) and nitrite oxidizing bacteria (NIT3) were comparatively increased. In denitrification system, about 98% denitrification efficiencies were obtained at $2000 \text{ mg/l NO}_x\text{-N}$ concentrations if sodium acetate was supplied as carbon source. Meanwhile, with 20 gVSS/l biomass concentration, denitrification rates of about $1.34 \text{ mgNO}_x\text{-N/mgVSS.day}$ were obtained. All sludge samples have represented similar DGGE patterns and *Paracoccus*-related species were identified as dominant denitrifying bacteria.

Keywords: Landfill leachate, nitrification, denitrification, cloning, DGGE, FISH

GİRİŞ

Genç depp sahalarında oluşan sızıntı suları, yüksek konsantrasyonda amonyak azotu içermektedir (Inanc vd., 2000). Bu nedenle, sızıntı suyu arıtımında deşarj standartlarını sağlamak için, amonyak giderimi şarttır. Amonyak gideriminde en uygun yöntem yaygın olarak kullanılan nitrifikasyon-denitrifikasyon prosesidir. Sızıntı sularında biyolojik azot gideriminin incelendiği çeşitli çalışmalarında, 200 ile 2200 mg/l aralığında amonyak azotu konsantrasyonları denenmiş, dört aşamalı Bardenpho, modifiye Lutzack-Ettinger, dönen biodisk ve ardışık-kesikli reaktörler olmak üzere farklı reaktör tipleri kullanılarak yaklaşık % 99 nitrifikasyon verimi elde edilmiştir (Bae et al., 1997; Schiskowski & Mavinic, 1997; Yilmaz and Ozturk, 2001; Doyle et al., 2001; Ilies and Mavinic, 2001).

Amonyak azotunu sızıntı suyundan tamamen uzaklaştırılması için, nitrifikasyon prosesini denitrifikasyon adımının takip etmesi gerekir. Denitrifikasyon, amonyağın oksitlenmesiyle oluşan nitrit ve nitrat azotunun giderildiği aşamadır. Welander ve arkadaşları (1998), sızıntı suyu ile yaptıkları denitrifikasyon deneylerinde karbon kaynağı olarak metanol kullanmışlar ve yaklaşık 55 mg NO_x-N/l.sa giderim hızı elde etmişlerdir. Yılmaz ve Öztürk (2001) ise, karbon kaynağı olarak ham sızıntı suyu ve kalsiyum asetat kullanarak, sırasıyla 45.7 mg NO_x-N/l.sa ve 125.7 mg NO_x-N/l.sa denitrifikasyon hızları tespit etmişlerdir. Ayrıca, literatürde KOİ giderimi ile denitrifikasyonun aynı reaktörde denendiği çalışmalar da mevcuttur. Yüksek KOİ gideriminin yanında, Bae ve arkadaşları (1997) anaerobik filtre ile %80, Borzaconi ve arkadaşları de (1999) yukarı akışlı havasız çamur yatağı ile %87 denitrifikasyon verimi elde etmişlerdir.

Fakat, ortalama debisi yaklaşık 1000 m³/gün amonyak azotu konsantrasyonu da 2500 mg/l olan İstanbul Kömürcüoda Katı Atık Depo Sahası sızıntı suyunda yukarıda bahsedilen giderim verimlerini sağlamak gerçekten zordur. Bu sızıntı suyunun, detaylı bir karakterizasyonu ve anaerobik arıtılabilirlik sonuçları, daha önceki çalışmalarda verilmiştir (Inanc vd., 2000; Calli vd., 2002).

Aşırı derecede yüksek amonyak konsantrasyonları altında nitrifikasyon-denitrifikasyon prosesini uygun bir şekilde işletebilmek için, pH, ORP, amonyak, nitrit, nitrat, toplam ve uçucu katı madde gibi bazı klasik işletme kontrolü parametrelerine ek olarak, biyokütle

içindeki mikrobiyal aktivite ve çeşitlilik de izlenmelidir. Daha yüksek ve sabit reaktör performansları elde etmek için çamur yaşı, geri devir miktarı ve havalandırma debisi gibi işletme parametreleri mikrobiyal aktivite ve çeşitlilik izlenerek optimize edilebilir. Biyolojik azot gideren sistemlerdeki bakterilerin doğru olarak tanımlanması, türler arası zorunlu etkileşimler, düşük büyüme hızları, uygun seçici besi yerlerinin tam olarak bilinmemesi gibi bir çok sebepten dolayı yapay besi yerinde saflaştırmaya bağlı metotlarla mümkün değildir. Son 10 yılda yaygınlaşan 16S rRNA/DNA bazlı moleküler mikrobiyoloji tekniklerini kullanarak, biyolojik azot gideriminde rol alan nitrifikasyon ve denitrifikasyon bakterilerini besi yerinde saflaştırmaya ihtiyaç duymadan sistem içindeki doğal şartlarında tanımlamak ve takip etmek mümkündür. (Mobarry et al., 1996; Wagner et al., 1996).

Bu projede, Kömürcüoda Katı Atık Depo Sahası sızıntı suyu ile beslenen nitrifikasyon ve denitrifikasyon reaktörlerindeki mikrobiyal dağılım, arıtım verimi kontrol parametrelerine ek olarak denatüre gradyan jel elektroforezi (DGGE), klonlama ve flüoresan in-situ hibridizasyon (FISH) teknikleri kullanılarak araştırılmıştır ve zamana bağlı değişimler incelenmiştir.

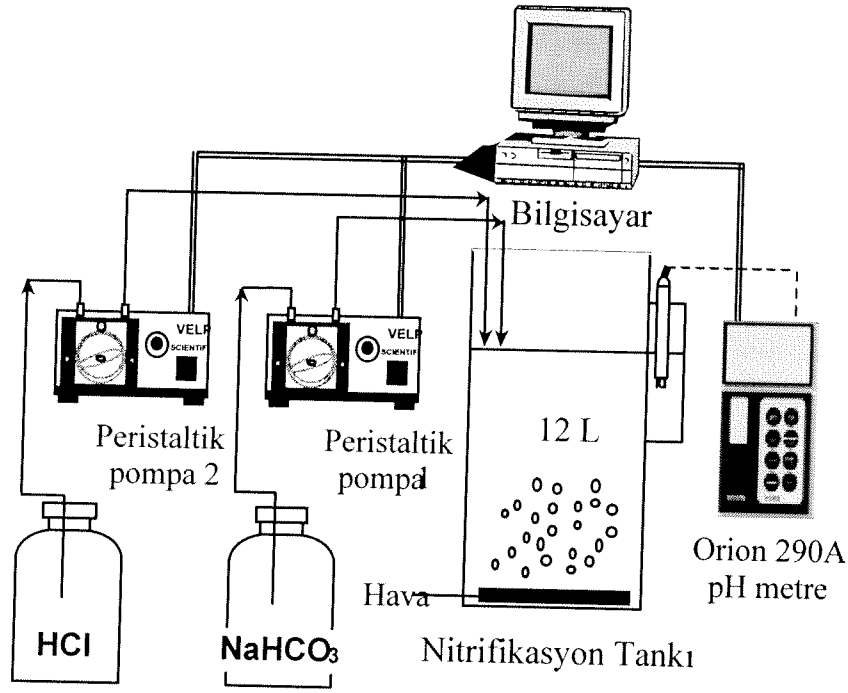
GEREÇ ve YÖNTEM

Reaktörlerin İşletilmesi

Anaerobik olarak arıtılmış Kömürcüoda Katı Atık Depo Sahası sızıntı suyunun nitrifikasyon ve denitrifikasyonu, iki ayrı laboratuvar ölçekli ardışık kesikli reaktörde gerçekleştirilmiştir. Deney başlangıcında reaktörler, alkol distilasyon atıksuyu arıtan bir aktif çamur tesisinin havalandırma tankından alınan çamur ile aşılansmıştır.

Nitrifikasyon deneyleri, tabana yerleştirilmiş difüzörler ile havalandırılan 12 litrelik bir pleksiglas tankta yapılmıştır. Nitrifikasyon tankının ön yüzünde, farklı yüksekliklere konmuş üç adet numune alma ve bir adet deşarj vanası bulunmaktadır. Nitrifikasyon tankında pH değerini düzenli olarak 7.0 - 8.0 aralığında tutmak için on-line pH takibine dayalı ve bilgisayar kontrollü alkalinite dozlama sistemi kullanılmıştır. On-line pH takip ve ayarlama sistemi; bilgisayar, Orion 290A ion metre, WTW Sentix pH elektrotu, Velp sp

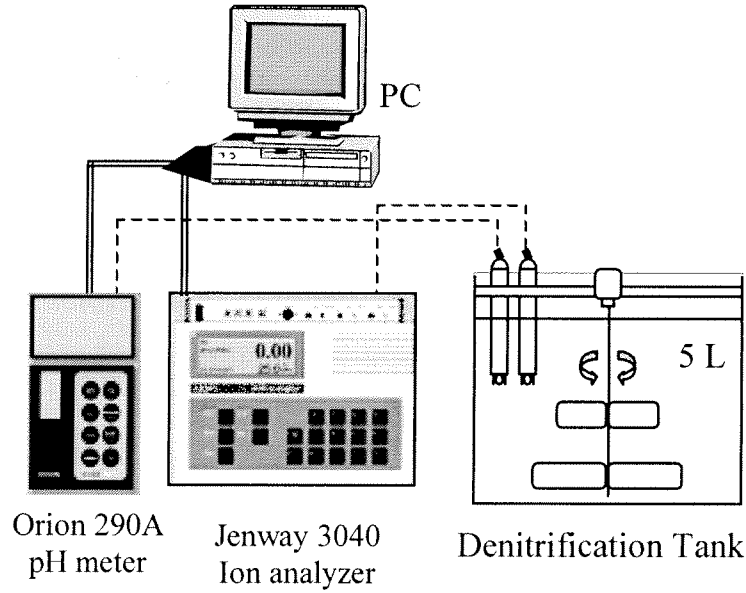
311 peristaltik pompa ve AD/DA çeviriciden oluşmaktadır. Sızıntı suyunun anaerobik olarak arıtıldığı reaktörlerde pH ayarlaması durdurulunca, nitrifikasyon tankında pH değerleri 9.0'a kadar yükselmiştir. Bu sebeple, pH değerini 8.5' un altına indirmek için, otomatik kontrol sistemine, asit dozlayan ikinci bir pompa eklenmiştir. Nitrifikasyon deney düzeneği Şekil 1'de görülmektedir.



Şekil 1. Sürekli pH takibine dayalı laboratuvar ölçekli nitrifikasyon düzeneği

Denitrifikasyon deneyleri, zaman kontrolü ile karıştırılan 5 litrelik bir pleksiglas tank içinde nitrifikasyon tankı çıkışı kullanılarak yapılmıştır. pH ve ORP değerleri, Orion 290A ve Jenway 3040 iyon metreler ile on-line ölçülerek bilgisayara kaydedilmiştir. Şekil 2'de deney düzeneği görülmektedir. Uygun karbon kaynağını belirlemek için denitrifikasyon tankına sırasıyla metanol, glikoz ve sodyum asetat ilave edilmiştir.

On-line pH ve ORP takibine ek olarak, nitrifikasyon ve denitrifikasyon tanklarında reaktör performansını belirlemek amacıyla, amonyak, nitrat, nitrit, alkalinite, KOİ, toplam ve uçucu askıda katı madde (AKM ve UAKM) ölçümleri yapılmıştır. Yapılan deneylerde standart metotlar kullanılmıştır.



Şekil 2. Sürekli pH ve ORP takibi ile çalışan denitrifikasyon düzeneği

Mikrobiyal dağılımı takip etmek ve değişimleri incelemek için, nitrifikasyon ve denitrifikasyon tanklarından, bütün deney süresini temsil edecek şekilde farklı günlerde çamur numuneleri alınmış ve bu numuneler, DNA izolasyonuna kadar derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edilmiştir.

DNA izolasyonu ve PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) amplifikasyonu

DNA'ları izole edilecek çamur numuneleri, 0.1 mm zirconia/silica boncuklar kullanılarak mekanik olarak dağıtılmış ve dağılan bakteri hücreler patlatılmıştır. Mekanik parçalamadan sonra ortaya çıkan DNA, Oude Elferink ve arkadaşları (1997) tarafından kullanılan prosedüre göre izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. İzole edilen DNA'ların 16S rDNA geni üzerindeki V6-V8 bölgesi, GC-968 For ve UNI-1401 Rev primerleri ile DGGE analizinde kullanılmak üzere PCR ile çoğaltılmıştır. PCR amplifikasyonları Progene Termocycler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA geninin tamamını çoğaltmak için kullanılan PCR programı şöyledir: ön denatürasyon (94°C , 5 dak), 25 devir denatürasyon (94°C , 30 sn), annealing (52°C , 20 sn) ve elongasyon (68°C , 40 sn) döngüsü ve son elongasyon (68°C , 7dak). Aynı program 16S rRNA geni üzerindeki V6-V8 bölgesini çoğaltmak için de kullanılır ancak döngü sayısı 35, annealing sıcaklığı da 56°C ' dir. Tüm PCR programları $+4^{\circ}\text{C}$ ile sonlanır. Klonlanma ve DGGE'de kullanılacak PCR ürünleri önce etidyum bromür boyalı agaroz gellerde kontrol edilir.

DGGE (Denatüre Gradyan Gel Elektroforezi) ve Klonlama

PCR ürünlerinin DGGE' si, BioRad D-Code Universal Mutation Detection System (BioRad) ile, Nübel ve arkadaşları (1996) tarafından verilen prosedüre göre yapılmıştır. Poliakliramat konsantrasyonu %8'dir ve %35-55'lik denatüre gradyan kullanılmıştır. Elektroforez 16 saat süreyle 85 V' da gerçekleştirilmiş sıcaklık 60°C de sabit tutulmuştur. Gel, Sanguinetti ve arkadaşlarının (1994) prosedürüne göre gümüşle nitrat ile boyanmıştır.

Çoğaltılan 16S rRNA genleri QIAquick PCR saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırılıp, ampicilin duyarlılığı ve mavi/beyaz renk özelliği olan pGEM®-T Easy Vector sistemi (Promega) kullanılarak *E. coli* (JM109) hücrelerine aktarılmıştır. Klonlanan 16S rRNA genleri *MspI* (Fermentas) enzimi kullanılarak yapılan RFLP (restrüksiyon fragman dizi farklılığı) analizi ile birbirinden ayırt edilmiş ve denatüre gradyan gel üzerinde yürütülerek temsil ettiği bant tespit edilmiştir. Seçilen klonlar Wizard Plus SV Miniprep DNA saflaştırma kiti (Promega) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan DNA'ların dizi analizleri yurt dışında, özel bir dizi analizi laboratuvarında (SeqLab, Almanya) yapılmıştır. Elde edilen DNA dizileri, NCBI (National Center for Biotechnology Information)'nin veri tabanında bulunan diziler ile karşılaştırılmış ve benzerlikleri kurulmuştur.

Flüoresan In-situ Hibridizasyon (FISH)

Çamur numuneleri %4'lük paraformaldehit-PBS solüsyonu içinde bir gece 4°C' de bekletilerek sabitlenmiştir. Sabitlenen hücreler teflon slaytlara konularak steril kabinde kurutulmuştur (Raskin et al.,1994). İşaretlenmiş problemleri (Cy3 için 30 ng/kuyu, Fluos için 50 ng/kuyu) (MWG Biotech, Ebersberg) içeren hibridizasyon solüsyonu (0.9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, %0.01 SDS) kullanılarak numuneler 2 saat boyunca 46°C de hibridize edilir. Optimum hibridizasyon kalitesini elde etmek için Tablo 1 de verilen konsantrasyonlara göre formamit eklenmiştir. Hibridizasyondan sonra, yıkama solüsyonu (probsuz hibridizasyon solüsyonu) ile bağlanmayan oligonükleotitler yıkanmıştır. DNA'ları boyamak için yıkama solüsyonuna 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (100 µl of %0.1 DAPI) eklenmiştir. Daha sonra slaytlar 48°C de 10 dakika boyunca yıkama solüsyonunda bekletilir, su ile durulandıktan sonra hemen kurumaya bırakılır. Slaytlar Olympus BX50 mikroskop ile incelenmiş ve mikroskoba bağlı bir dijital kamera ile görüntülenmiştir.

Tablo 1. Flüoresan in-situ hibridizasyon da kullanılan oligonükleotit proplar

Probun adı	Kullanılan Boya	Formamit (%)	Nükleotid Dizisi (5'- 3')	Hedef mikroorganizma	Ref.
EUB 338	Fluos	20	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Tüm Bakteriler	1
ALF 1b	Cy3	35	CGT TCG Y TCT GAG CCA G	α <i>Proteobacteria</i>	2
BET 42a	Cy3	35	GCC TTC CCA CTT CGT TT	β <i>Proteobacteria</i>	
GAM 42a	Cy3	35	GCC TTC CCA CAT CGT TT	γ <i>Proteobacteria</i>	
Nso 1225	Cy3	35	CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA	Amm. Oxid. β <i>Proteobacteria</i>	3
Nso 190	Cy3	35	CGA TCC CCT GCT TTT CTC C	Amm. Oxid. β <i>Proteobacteria</i>	
Nsm 156	Cy3	35	TAT TAG CAC ATC TTT CGA T	<i>Nitrosomonas spp.</i> <i>Nitrosococcus mobilis</i>	
Nsv 443	Cy3	35	CCG TGA CCG TTT CGT TCC G	<i>Nitrospira spp.</i>	
NIT 3	Cy3	35	CCT GTG CTC CAT GCT CCG	<i>Nitrobacter spp.</i>	

1. Amann *vd.*, 19902. Manz *vd.*, 19923. Mobarry *vd.*, 1996

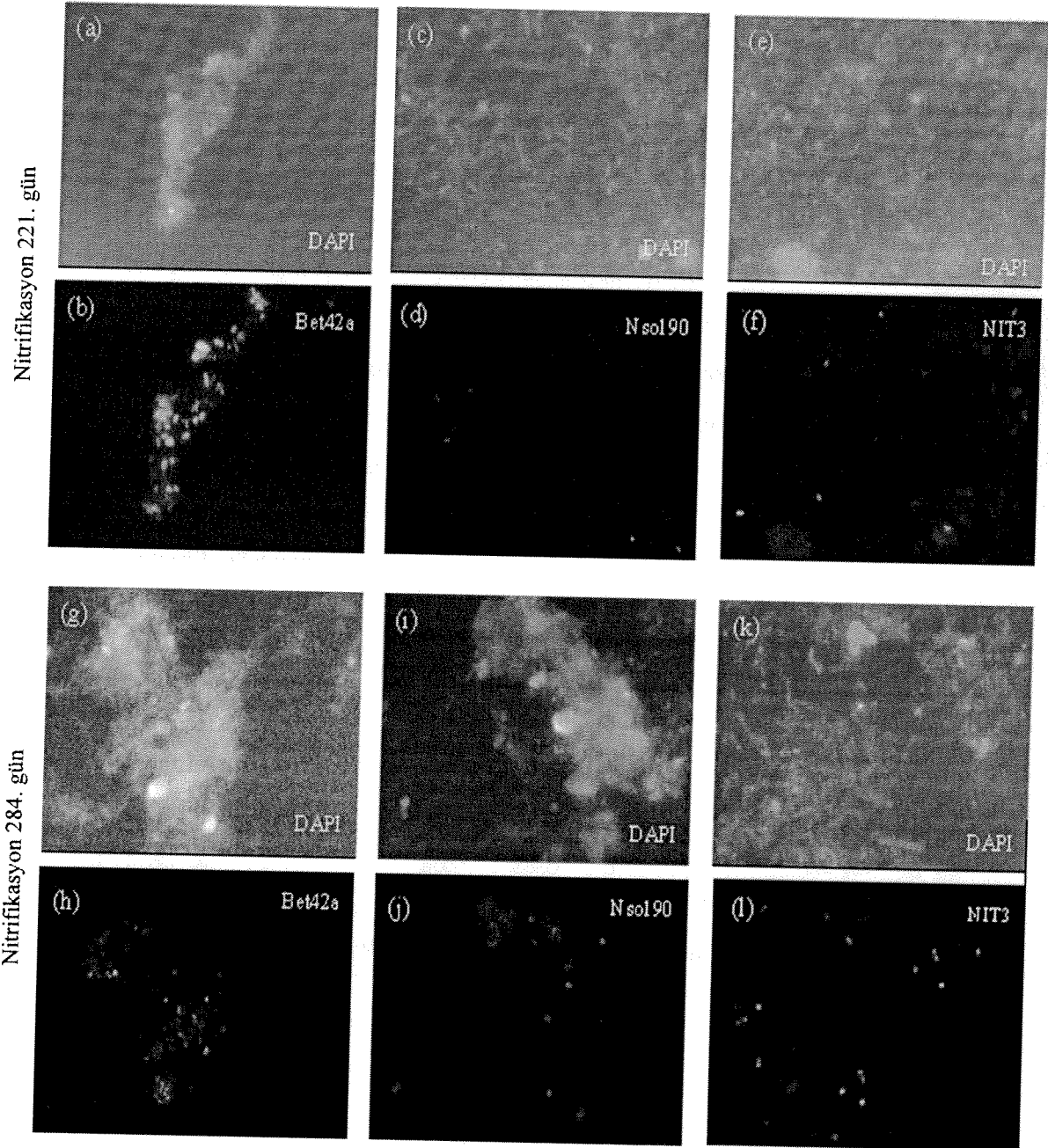
BULGULAR ve TARTIŞMA

Nitrifikasyon

Nitrifikasyon deneyleri süresince, gerekli alkaliniteyi sağlamak amacıyla, sodyum bikarbonat, başlangıçta tek seferde ve pH'a bağlı olarak sürekli olmak üzere iki farklı şekilde dozlanmıştır. Alkalinite ihtiyacı pratik verilere göre hesaplanıp sodyum bikarbonat tek seferde ilave edildiği zaman, pH değeri nitrifikasyonun gerçekleşmesini engelleyecek yüksek seviyelere çıkmıştır (1. periyot). Bu nedenle, pH dengesini bozmadan, ihtiyaca göre azar azar dozlama yapabilmek için, on-line pH takibine dayalı bilgisayar kontrollü alkalinite dozlama sistemi geliştirilmiştir. Bu sistem sayesinde, pH değerini 7 de tutarak, 0,16 mg NH₄⁺-N/mgUAKM.gün civarında nitrifikasyon hızları elde edilmiştir (2. periyot).

2. periyodun sonuna doğru, 142. günde alınan çamur numunesinde, DAPI boyama ile tespit edilen mikroorganizmaların yaklaşık %70'i EUB338 (tüm bakteriler) probu ile de sinyal vermiştir. Beklenmedik bir şekilde, geriye kalan %30'luk kısmı, uzun iplikli yapılarıyla muhtemelen anaerobik reaktörlerden kaçan ve aktif olmayan *Methanosaeta* benzeri metanojenler oluşturmuştur.

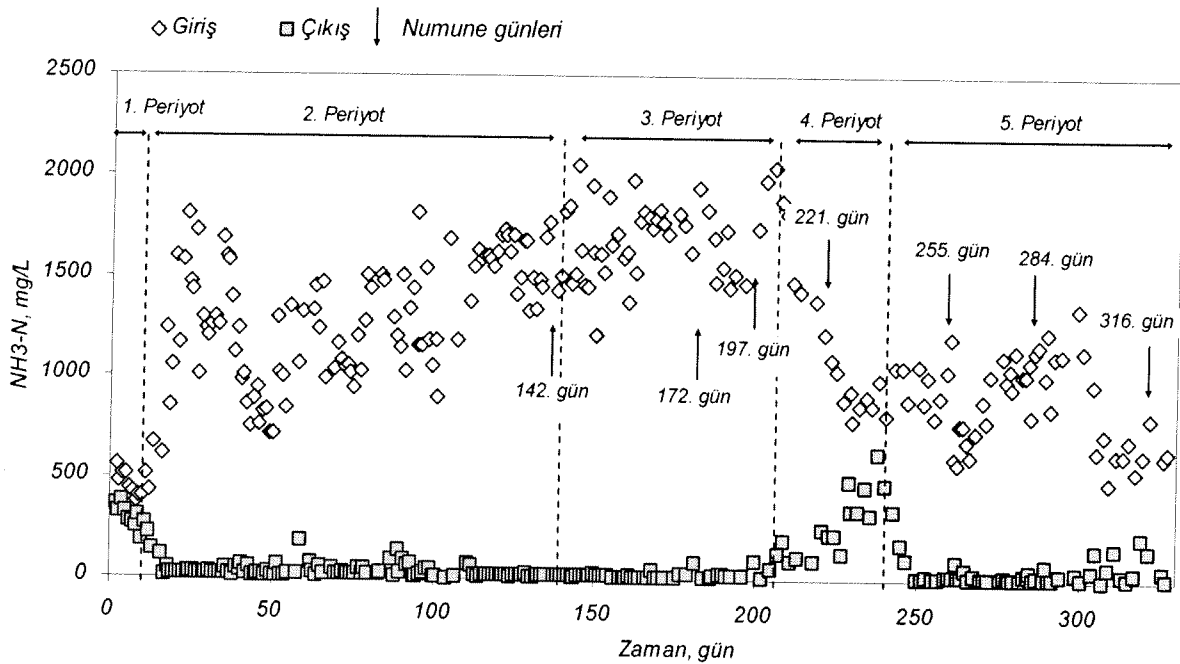
Bakteri popülasyonu içinde Proteobacteria' nin sadece alfa (Alf1b) ve beta (Bet42a) alt grupları tanımlanmıştır. Bundan başka, beta alt grubundan *Nitrosomonas* ve *Nitrosococcus mobilis*-benzeri (Nsm156) amonyak oksitleyen bakteriler ve alfa alt grubunda da *Nitrobakter*-benzeri (NIT3) nitrit oksitleyen bakteriler belirlenmiştir (Şekil 3).



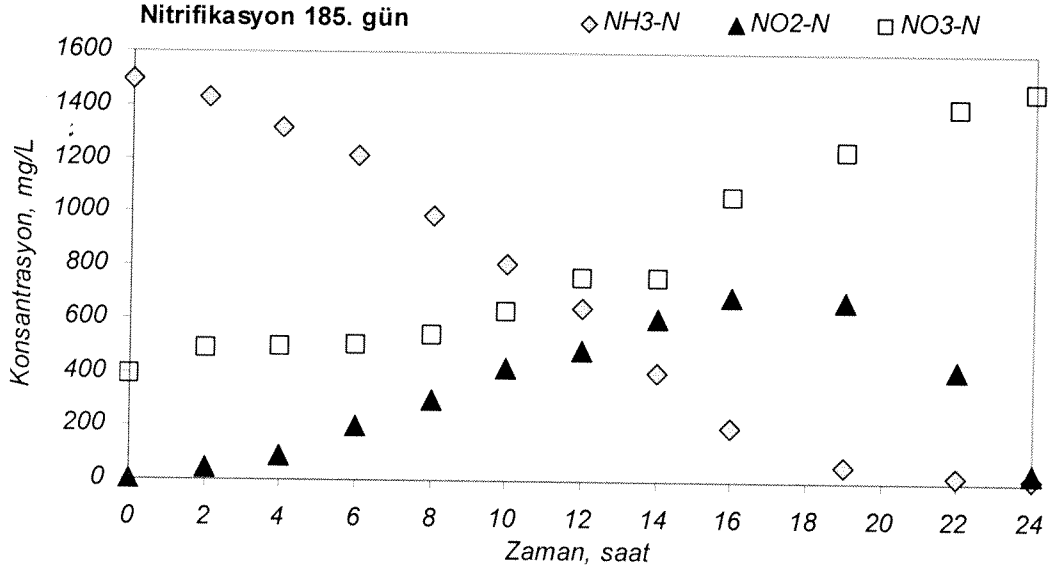
Şekil 3. Nitrifikasyon tankından 221 ve 284. günlerde alınan çamur numunelerinde DAPI boyama (a, c, e, g, i, k) ve FISH (b, d, f, h, j, l) sonuçları (1000 x). Mikroskop ile çekilen DAPI boyama ve FISH fotoğrafları aynı alanı göstermektedir.

DGGE jeli üzerinde bazı belirgin bantlar, beta *Proteobacteria* grubunun *Rhodocyclus* ailesine ait *Thauera terpenica* (% 99) ve *Thauera mechernichii* (% 98) gibi aerobik denitrifikasyon bakterileri olarak tanımlanmıştır. *Thauera mechernichii*'nin sızıntı suyu arıtan aerobik bir sistemden izole edildiği düşünülürse, nitrifikasyon tankında *Thauera*-benzeri bakterilerin varlığı normal bulunmuştur (Sholten vd., 1999).

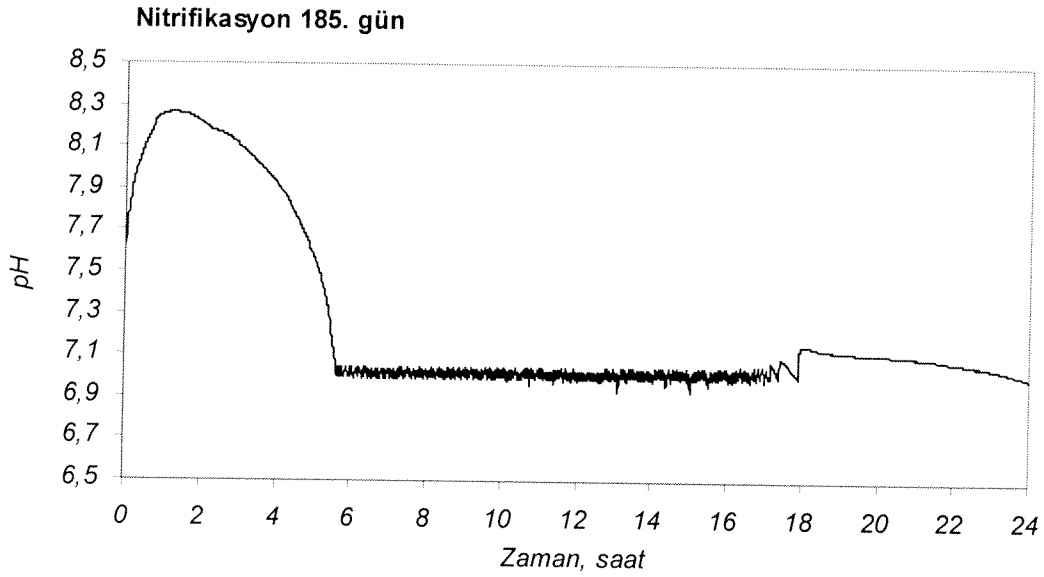
pH ayarlaması bırakılınca, anaerobik reaktörlerdeki KOİ giderimi azalmış ve bu yüzden nitrifikasyon sistemine daha fazla biyolojik olarak ayrışabilir KOİ gelmeye başlamıştır. 3. periyotta, girişteki yüksek KOİ, pH ve alkalinite değerleri sebebiyle daha az sodyum bikarbonat dozlaması gerçekleşmiş, bu yüzden ortalama nitrifikasyon hızı $0.11 \text{ mg NH}_4^+ \text{-N/mgUAKM.gün'e}$ düşmüştür. Bu periyotta, düşük nitrifikasyon hızlarına rağmen, 2. periyottaki gibi % 99 civarında nitrifikasyon verimi elde edilmiştir (Şekil 4). 185. günde yaklaşık 1500 mg/l amonyak azotu, 20l doz 15,8 mg/l sodyum bikarbonat ilavesi ile nitrifiye edilmiştir. 2. ve 3. periyotları temsil eden 185. gündeki nitrifikasyon deneyinin nitrit, nitrat, amonyak ve on-line pH değerleri Şekil 5a ve 5b' de verilmiştir. 172. ve 197. günlerin (3. periyot) DGGE ve FISH sonuçları, 142. günün (2. periyot) sonuçları ile önemli derecede benzerlik göstermiştir.



Şekil 4. Nitrifikasyon tankı giriş ve çıkış amonyak değerleri



(a)



(b)

Şekil 5. 185. günde nitrifikasyon tankında ölçülen amonyak, nitrit, nitrat (a) ve on-line pH değerleri (b)

3. periyottun sonunda başlayan ve 4. periyotta belirginleşen verimdeki düşüş, nitrifikasyon tankında pH değerinin yükselmesine neden olan alkalinite birikmesiyle örtüşmektedir. Bu şartlarda, önceki periyotlardaki nitrifikasyon verimini sağlamak için, hidrolik bekletme süresi 24 saatten 48 saate çıkarılmıştır. Bunun yanında, havalandırmanın başlamasıyla hızla yükselen pH'ı ayarlamak için, hidroklorik asit dozlayan ikinci bir pompa sisteme

dahil edilmiştir. Bu değişiklikten sonra, 5. periyotta, 1000 mg/L amonyak ve 4000 mg/L KOİ konsantrasyonlarında, yaklaşık %98-99 nitrifikasyon verimlerine ulaşılmıştır (Şekil 4). Nitrifikasyon hızı 0,08 ve 0,11 mgNH₄-N/mgUAKM.gün aralığında değişmiştir.

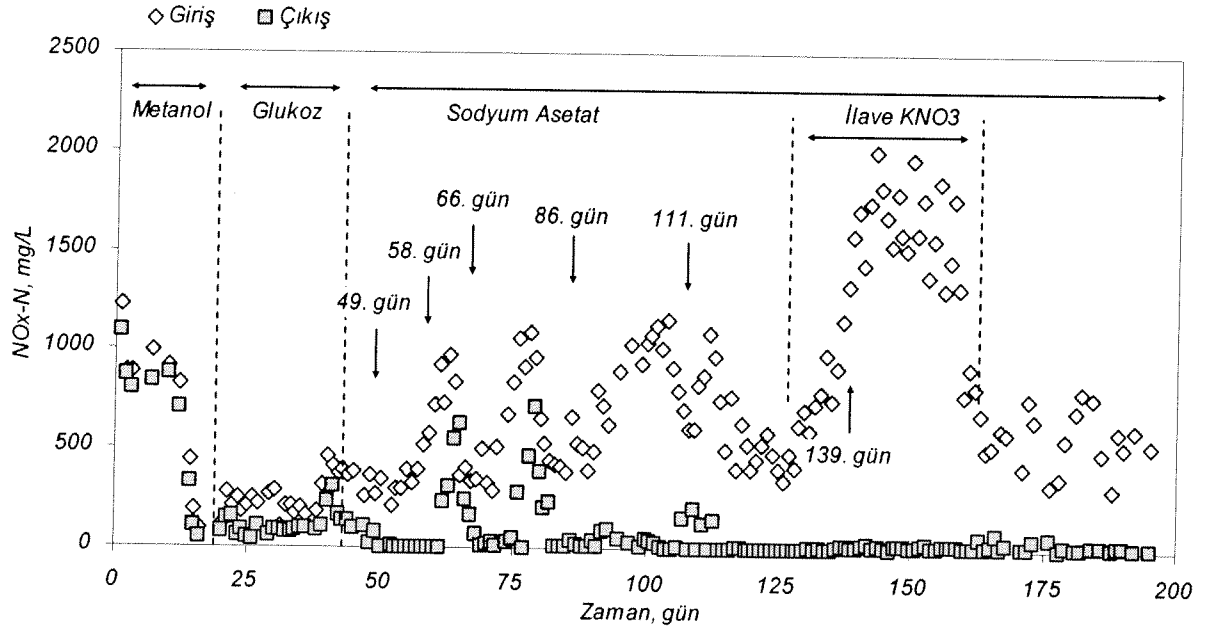
4. periyotta, nitrifikasyon tankındaki mikrobiyal çeşitlilik, giriş pH değerindeki artışa paralel olarak hemen etkilenmiştir. DAPI boyama ve FISH sonuçlarına göre, 221. günde Bet42a ile sinyal verip Nso190 ve NIT3 problemleri ile hibridize olmayan bakteri türlerinde aşırı bir artış olmuştur (Şekil 3a-f). DGGE ile 221. günden önce açıkça görünmeyen yoğun bantlar ve daha önce *Thauera*-benzeri türler olarak tanımlanan aerobik denitrifikasyon bakterilerine ait daha yoğun bantlar, mikrobiyal çeşitlilikteki değişimi desteklemiştir. Son periyotta, tankta kalma süresi 48 saate çıkarıldıktan ve pH'daki artış online asit dozlaması ile önlendikten sonra; 255., 284. ve 316. günlerde amonyak (Nso190) ve nitrit (NIT3) oksitleyen bakterilerin sayısında orantılı bir artış gözlenmiştir (Şekil 3g-l).

Denitrifikasyon

Anaerobik olarak arıtılan ve nitrifiye edilen Kömürcüoda Katı Atık Depo Sahası sızıntı suyunun denitrifikasyonu sırasında, organik karbon ihtiyacını karşılamak için üç farklı madde denenmiştir. Öncelikle, 45. güne kadar denitrifikasyon tankına karbon kaynağı olarak sırasıyla metanol ve glikoz eklenmiş ve fakat elde edilen düşük verim nedeniyle, daha sonraki dönemde sodyum asetat kullanılmıştır. Bazı işletme problemleri dışında, 1200 mg/l' den yüksek NO_x-N konsantrasyonlarında bile, 8-12 saat içinde, %97-99 civarında verimler elde edilmiştir (Şekil 6). 130 ve 165. günler arasında, daha yüksek nitrat konsantrasyonlarındaki denitrifikasyon performansını incelemek amacıyla, tanka ekstra nitrat kaynağı olarak potasyum nitrat (KNO₃) eklenmiştir. Bu sayede 2000 mg/l' ye kadar çıkan NO_x-N değerlerinde bile, yeterli miktarda organik karbon ilavesi ile denitrifikasyon hızlı ve verimli bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Yüksek UAKM değerlerinde (20 g/l) çalıştırılan sistemde yaklaşık 1,34 mgNO_x-N/mgUAKM.gün denitrifikasyon hızı elde edilmiştir. Üstelik, online pH ve ORP takibiyle, denitrifikasyon prosesinin bitiş süresi ve denitrifikasyon hızı daha kolay ve kesin olarak belirlenmiştir (Şekil 7c ve d).

Denitrifikasyon tankından alınan çamur numuneleri ile yapılan DGGE analizlerinde birbirine çok benzeyen tür dağılımları görülmüştür. Bununla birlikte, alfa Proteobacteria grubunun *Rhodobacter* ailesine ait *Paraccocus* benzeri türler, baskın denitrifikasyon

bakterileri olarak tespit edilmiştir. Bazı DGGE bantları, *Paracoccus alcaliphilus* (%98), *Paracoccus solitivorans* (%98), *Paracoccus denitrificans* (%97) ve *Paracoccus alkenifer* (%97) olarak tanımlanmıştır. DAPI boyalı hücrelerin Alf1b ile kuvvetli sinyaller vermesi genellikle alfa-Proteobacteria grubuna mensup olan denitrifikasyonların sistemde bol miktarda bulunduğunu göstererek DGGE sonuçlarını desteklemiştir.

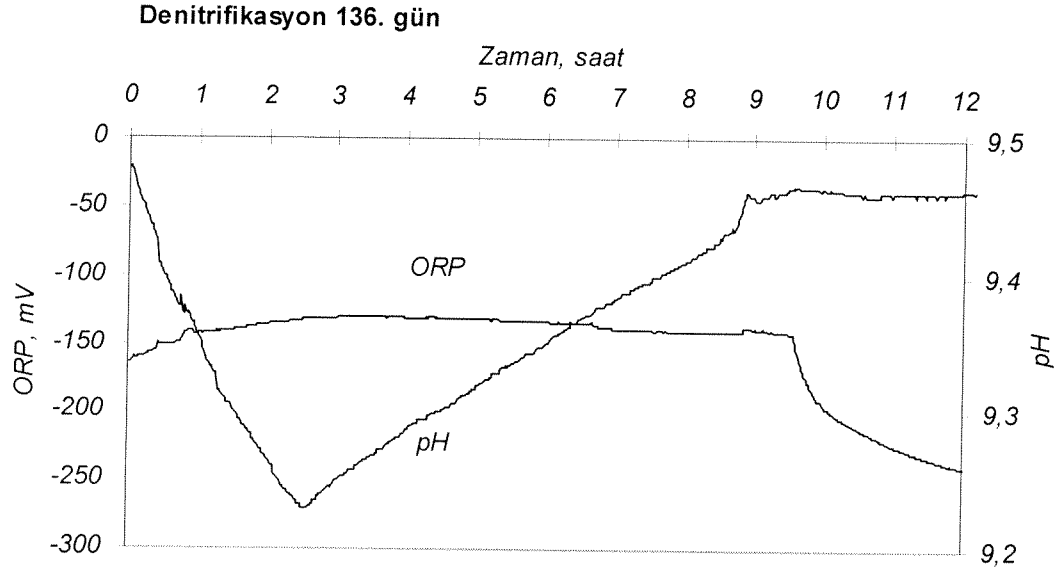


Şekil 6. Denitrifikasyon tankı giriş ve çıkış NOx-N (nitrit + nitrat) değerleri

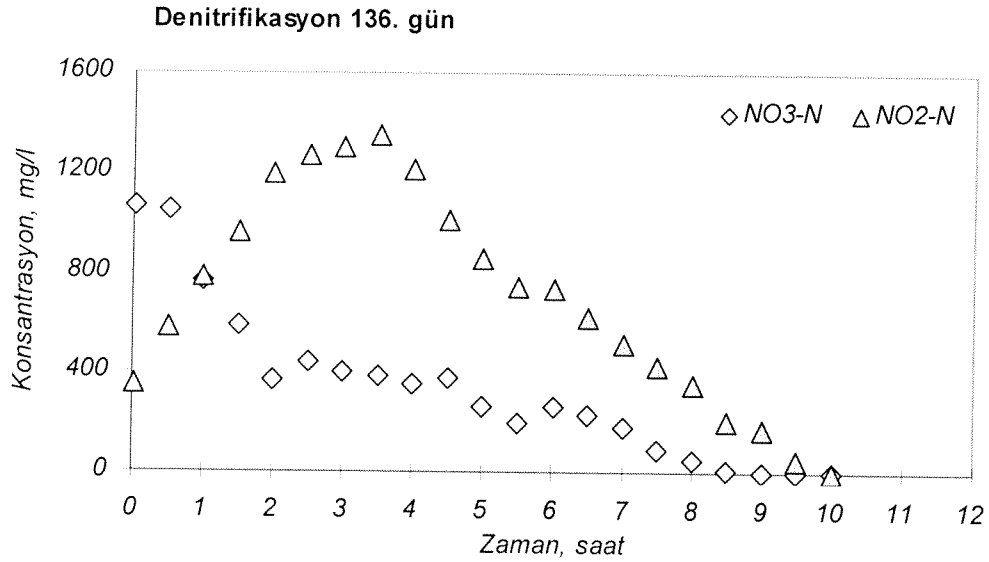
SONUÇLAR

Elde edilen sonuçlar, yüksek amonyak içeriğine sahip ve anaerobik olarak artırılmış sızıntı suyunun nitrifikasyonunun, gerekli olan alkaliniteyi tüketildikçe pH takibine bağlı olarak dozlayan bilgisayar kontrollü bir sistem ile başarıyla gerçekleştirileceğini göstermektedir. Otomatik kontrol ile yaklaşık $0,16 \text{ mgNH}_4^+-\text{N/mgUAKM.gün}$ seviyelerinde yüksek nitrifikasyon hızları elde edilmiştir. Ayrıca, nitrifikasyon sisteminin önünde bulunan anaerobik reaktörlerdeki KOİ giderim verimlerinin, nitrifikasyon hızı ve verimi üzerinde doğrudan etkili olduğu belirlenmiştir. Nitrifikasyon tankına daha fazla miktarda biyolojik olarak ayrıştırılabilir KOİ yükü geldiğinde, karbon kullanan heterotrofik bakteriler ve *Thauera* türleri gibi aerobik denitrifikasyon bakterileri, daha önce yoğun olan *Nitrosomonas* ve *Nitrobacter* - benzeri nitrikasyon bakterilerine oranla miktarsal olarak

baskın hale gelmişlerdir. İlave karbon kaynağı olarak sodyum asetat eklenince, denitrifikasyon sisteminde % 98' in üzerinde verim ve yaklaşık 1,34 mgNO_x-N/mgUAKM.gün seviyelerinde tüketim hızları elde edilmiştir. Tüm deney periyodu süresince, *Paraccoccus*-benzeri türler baskın denitrifikasyon bakterileri olarak tanımlanmıştır.



(a)



(b)

Şekil 7. 136. günde denitrifikasyon tankında ölçülen on-line pH (a), nitrit, nitrat ve değerleri (b)

REFERANSLAR

1. Amann R. I., Binder B. J., Olson R. J., Chisholm S. W., Devereux R., and Stahl D. A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microb*, 56, 1919-2007.
2. Bae, J. H., Kim, S.K. and Chang, H.S. (1997) Treatment of landfill leachates: ammonia removal via nitrification and denitrification and further cod reduction via fenton's treatment followed by activated sludge. *Water Sci Technol*, 36(12), 341-348.
3. Borzacconi L., Ottonello G., Castello E., Pelaez H., Gazzola A. and Vinas M. (1999) Denitrification in a carbon nitrogen removal system for leachate treatment: performance of an upflow sludge blanket (USB) reactor. *Water Sci Technol*, 40(8), 145-151.
4. Doyle J., Watts S., Solley D. and Keller J. (2001) Exceptionally high-rate nitrification in sequencing batch reactors treating high ammonia landfill leachate. *Water Sci Technol*, 43(3), 315-322.
5. Ilies P. and Mavinic D.S. (2001) Effect of decreased ambient temperature on the biological nitrification and denitrification of high ammonia landfill leachate. *Water Res* 35(8), 2065-2072.
6. Inanc B., Calli B. and Saatci A. (2000) Characterization and anaerobic treatment of the sanitary landfill leachate in İstanbul. *Water Sci Technol*, 41(3), 223.
7. Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K-H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclass of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol*, 15, 593-600.
8. Mobarry, B.K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B.E. and Stahl, D.A. (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl Environ Microb* 62, 2156-2162.
9. Nübel U., B. Engelen, A. Felske, J. Snajdr, A. Wieshuber, R.I. Amann, W. Ludwig, and H. Backhaus. (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* 178, 5636.
10. Oude Elferink S.J.H.W., Rinia H. A., Bruins M. E., de Vos W. M. and Stams A. J. M. (1997) Detection and quantification of *Desulforhabdus amnigenus* in anaerobic

REFERANSLAR

1. Amann R. I., Binder B. J., Olson R. J., Chisholm S. W., Devereux R., and Stahl D. A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microb*, 56, 1919-2007.
2. Bae, J. H., Kim, S.K. and Chang, H.S. (1997) Treatment of landfill leachates: ammonia removal via nitrification and denitrification and further cod reduction via fenton's treatment followed by activated sludge. *Water Sci Technol*, 36(12), 341-348.
3. Borzacconi L., Ottonello G., Castello E., Pelaez H., Gazzola A. and Vinas M. (1999) Denitrification in a carbon nitrogen removal system for leachate treatment: performance of an upflow sludge blanket (USB) reactor. *Water Sci Technol*, 40(8), 145-151.
4. Doyle J., Watts S., Solley D. and Keller J. (2001) Exceptionally high-rate nitrification in sequencing batch reactors treating high ammonia landfill leachate. *Water Sci Technol*, 43(3), 315-322.
5. Ilies P. and Mavinic D.S. (2001) Effect of decreased ambient temperature on the biological nitrification and denitrification of high ammonia landfill leachate. *Water Res* 35(8), 2065-2072.
6. Inanc B., Calli B. and Saatci A. (2000) Characterization and anaerobic treatment of the sanitary landfill leachate in İstanbul. *Water Sci Technol*, 41(3), 223.
7. Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K-H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclass of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol*, 15, 593-600.
8. Mobarry, B.K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B.E. and Stahl, D.A. (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl Environ Microb* 62, 2156-2162.
9. Nübel U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R.I. Amann, W. Ludwig, and H. Backhaus. (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* 178, 5636.
10. Oude Elferink S.J.H.W., Rinia H. A., Bruins M. E., de Vos W. M. and Stams A. J. M. (1997) Detection and quantification of *Desulforhabdus amnigenus* in anaerobic

- granular sludge by dot-blot hybridization and PCR amplification. *J Appl Microbiol*, 83, 102-112.
11. Raskin L., Poulsen L. R., Noguera D. R., Rittman B. E. and Stahl D.A. (1994) Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microb*, 60, 1241.
 12. Sanguinetti C. J., Dias Neto E. and Simpson A.J. (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques*, 17, 914.
 13. Scholten E., Lukow T., Auling G., Kroppenstedt R.M., Rainey F. A. and Diekmann H. (1999) *Thauera mechernichensis* sp. nov., an aerobic denitrifier from a leachate treatment plant. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 49, 1045-1051.
 14. Shiskowski D.M. and Mavinic D.S. (1998) Biological treatment of a high ammonia leachate: influence of external carbon during initial startup. *Water Res*, 32(8), 2533-2541.
 15. Wagner, M., Rath, G., Koops, H-P., Flood, J. and Amann, R. (1996) In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci Technol*, 34, 237-244.
 16. Welander U., Henrysson T. and Welander T. (1998) Biological nitrogen removal from municipal landfill leachate in a pilot scale suspended carrier biofilm process. *Water Res*, 32(5), 1564-1570.
 17. Yilmaz G. and Ozturk I. (2001). Biological ammonia removal from anaerobically pre-treated landfill leachate in sequencing batch reactors (SBR). *Water Sci Technol*, 43(3), 307-314.

PROJE KAPSAMINDA OLUŞAN YAYINLAR

Calli B., Tas N., Mertoglu B., Inanc B. and Ozturk I. (2003) Molecular analysis of microbial communities in nitrification and denitrification reactors treating high ammonia leachate. *J. of Environmental Science and Health-Part A*, 38(10): 1997-2007

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu : İÇTAG A036 (103I001)

Proje Başlığı : SÜREKLİ pH ve ORP TAKİBİNE DAYALI BİYOLOJİK AZOT GİDERİMİ SİSTEMİNDE NİTRİFİKASYON BAKTERİLERİNİN DAĞILIMININ MOLEKÜLER TEKNİKLERLE İNCELENMESİ

Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar :

Öğr. Grv. Dr. Barış ÇALLI (Yürütücü)
Doç. Dr. M. Ali YÜKSELEN (Araştırmacı)
Araş. Grv. Bülent MERTOĞLU (Araştırmacı)
Çevre Müh. Emine GİRGİN (Araştırmacı)

Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi :

Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 34722 Göztepe, İSTANBUL

Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi :

Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri : Nisan 2003 – Nisan 2004

Öz : (en çok 70 kelime)

Bu projede, anaerobik olarak arıtılmış sızıntı suyundaki yüksek amonyak azotunun nitrifikasyon ve denitrifikasyon ile giderimi araştırılmıştır. Sürekli pH ve ORP takibine göre otomatik olarak işletilen nitrifikasyon ve denitrifikasyon sistemlerinin verimini tespit etmek için, klasik işletme parametrelerine ilave olarak reaktörlerdeki popülasyon dinamiği izlenmiştir. Mikrobiyal çeşitliliği belirlemek için 16S rDNA bazlı flüoresan in situ hibridizasyon (FISH), denatüre gradyan gel elektroforezi (DGGE), klonlama ve DNA dizi analizi gibi moleküler mikrobiyoloji teknikleri kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler:

Sızıntı suyu, nitrifikasyon, denitrifikasyon, klonlama, DGGE, FISH

Projeden Kaynaklanan Yayınlar :

Calli B., Tas N., Mertoglu B., Inanc B. and Ozturk I. (2003) Molecular analysis of microbial communities in nitrification and denitrification reactors treating high ammonia leachate. *J. of Environmental Science and Health-Part A*, 38(10): 1997-2007

Bilim Dalı :

Doçentlik B. Dalı Kodu :