

# Çamur bekletme süresinin nitrifikasyon sistemlerindeki bakteriyel çeşitliliğe ve sistem stabilitesine etkisi

Orhan İnce<sup>1\*</sup>, Özge Eyice<sup>1,2</sup>, Bahar Kasapgil İnce<sup>3</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Teknik Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 34469, Maslak-İstanbul

<sup>2</sup>İstanbul Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 34469, Maslak-İstanbul

<sup>3</sup>Boğaziçi Üniversitesi, Çevre Bilimleri Enstitüsü, 34342, Bebek-İstanbul

## Özet

*Bir arıtma tesisinin başarısı büyük ölçüde arıtma işini yapacak mikrobiyal komünitenin oluşumuna bağlıdır. Fonksiyonel öneme sahip popülasyonların kaybolması veya aktivitesini yitirmesi arıtma sisteminde verim kaybına yol açar. Kısaca, bir sistemin kararlı halde çalışması sahip olduğu mikroorganizma türlerinin sistemde kararlı halde tutulabilmesine bağlıdır. Yeterli miktarda ve çeşitlilikte mikroorganizmanın sistemde tutulabilmesi, optimum çamur yaşının belirlenebilmesi ile mümkündür. Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalarla, çevre veya işletme koşullarında bir farklılık olmadığı durumlarda dahi arıtma sistemlerinin bir süre sonra stabilitesini kaybettiği gösterilmiştir; ancak stabil (kararlı) arıtma verimi elde etmek için, kararlı bir komünite yapısına sahip olmak gerektiği hala kesinlik kazanmamıştır. Bu durum, düşük büyüme hızına sahip nitrifikasyon bakterileri için daha fazla önem arz etmektedir. Bu çalışmada nitrifikasyon prosesi model olarak seçilmiş ve bu sistemlerin kararlı yapısı üzerine araştırma yapılmıştır. Büyüme hızı ile doğrudan ilişkilendirilmesi nedeniyle çamur yaşı bifürkasyon parametresi olarak seçilmiş ve laboratuvar ölçekli atıksu arıtma reaktörleri farklı iki çamur yaşında işletilmiştir. Kimyasal analizler yanında moleküler analizler kullanılarak reaktörlerdeki nitrifikasyon bakterilerinin sayısı ve yapısındaki değişimler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, replika reaktörlerde toplam amonyağı oksitleyici bakteri (AOB) sayısı açısından anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir. Bunun yanında; 3 gün çamur yaşına sahip tüm reaktörlerde, 10 gün çamur yaşına sahip reaktörlere göre AOB çeşitliliğinin daha fazla olduğu, ancak zamana bağlı olarak çeşitliliğin azaldığı görülmüştür. Çeşitlilikteki bu azalma, yüksek çamur yaşında işletilen reaktörlerde daha fazla gözlenmiştir. Dizi analizi sonucu baskın olan türlerin Nitrosomonas türleri ve henüz kültüre alınmamış beta-proteobakteri olduğu bulunmuştur.*

**Anahtar Kelimeler:** Atıksu arıtma, nitrifikasyon, stabilite, FISH, DGGE.

\*Yazışmaların yapılacağı yazar: Orhan İNCE. oince@ins.itu.edu.tr; Tel: (212) 285 65 70.

Bu çalışma İTÜ Rektörlüğü, Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin, 11\_06\_244 numaralı “Çamur yaşının nitrifikasyon sistemlerindeki bakteriyel çeşitliliğe ve sistem stabilitesine etkisi” isimli projesi kapsamında Prof. Dr. Orhan İnce’nin yürütücülüğünde gerçekleştirilmiştir. Makale metni 23.05.2008 tarihinde dergiye ulaşılmış, 29.05.2008 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 31.12.2008 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

## Effect of sludge age on the diversity of nitrification bacteria and reactor stability

### Extended abstract

Variations in the relative abundance of microbial species are proved responsible of problems in biological treatment reactors. Quantitative ecology of wastewater treatment processes is the way of understanding these variations in community composition. In this point of view, many studies have been performed not only to understand the microbial structure of a wastewater treatment plants, but also to link microbial community dynamics to process stability. There are studies which investigated the instability caused by environmental conditions using lab- and full-scale treatment reactors. However, it is still unclear that functional stability implies a persistent community. Purkhold et al. (2000) found, for example, that few of the nitrifying bacteria classically studied in the laboratory were present in full-scale nitrification systems and functionally stable ecosystem. Saikaly et al. (2005) studied the stability of the treatment performance of laboratory scale sequencing batch reactors operated under different sludge ages. Results of the work by Fernandez et al. (1999) revealed that an extremely dynamic community sustains a more reliable treatment performance in terms of stable efficiency. However, similar studies revealed differences in the community structure of any changes in AOB community structure. However, it is not clear whether persistent community composition secures to get stable treatment performance. This is especially important for the microorganisms which have lower growth rate (e.g. nitrifiers) as they would be less abundant compared to others (e.g. heterotrophs). Loss or alteration of key functional groups might cause unstable treatment performance. Therefore, nitrification process is selected as a main investigation subject in the present study. Samples were collected for chemical analysis and also for molecular analysis. FISH and DGGE were applied to reveal total AOB numbers and any changes in community composition.

To achieve this, two sets of replicate reactors were operated under identical conditions under two different sludge ages (3 and 10 days) with the same external conditions.

During the whole investigation period, reactor 1 and 2 (3 days sludge age) achieved more than 88% COD removal whilst reactor 3 and 4 (10 days sludge age) achieved more than 96% COD removal. Results also showed that replicate reactors with high sludge age performed more stable nitrification performance than the reactors with low sludge age. Nitrification performance was assessed with ammonium, nitrite and nitrate concentrations. In reactor 1 and 2, nitrate concentrations were in a range of 0 and 28.48 mg/l; whilst it was up to 40 mg/l in reactor 3 and 4. Nitrite concentration was maximum 10 mg/l in reactor 1 and 2; whereas no higher than 2.5 mg/l in reactor 3 and 4 during the first 30 days of experiment.

FISH quantification revealed no correlation in total AOB numbers within replicate reactors. DGGE analysis also revealed decreasing similarities between replicate reactors over time. This was more obvious in reactors with higher sludge. On the day 32, the similarity values were 70.6% and 26.7% between reactor 1-2 and reactor 3-4, respectively. Beside statistical analysis, predominant bands were excised from DGGE gels and sequenced. Results showed that they match to the following sequences: *Nitrosomonas oligotropha* (97.6 % similarity; accession number: AF272422); *Nitrosomonas* sp. IS79A3 (97.4% similarity, accession number: AJ621026) and uncluttered beta-proteobacteria (higher than 97.7% similarity; accession numbers: AY062126, DQ413103, DQ376558, AY064177). Sequencing results were in agreement with the literature which states that *Nitrosomonas* species are dominant in wastewater treatment reactors.

This study is of particular importance as there is still a gap in knowledge on performance stability and community composition in wastewater treatment reactors. Since, replicate reactors were run under identical conditions, our findings could be helpful to solve the link between performance and microbial diversity. Furthermore, we hope that our findings would be in use for designing treatment reactors with new strategy.

**Keywords:** Wastewater treatment, nitrification, stability, FISH, DGGE.

## **Giriş**

Arıtma sistemlerinin performansı çevresel etkilerin yanısıra sahip olduğu mikroorganizma topluluğunun çeşitliliğine ve mikrobiyal türlerin miktarına bağlıdır. Bir sistem ne kadar farklı türde mikroorganizma içerirse, gelen atıksu tipindeki farklılık ya da çevre koşullarında oluşabilecek değişikliklerle o kadar iyi mücadele edebilir (Rowan vd, 2003). Sonuç olarak, bir sistemin kararlı halde çalışması sahip olduğu mikroorganizma türlerinin sistemde kararlı halde tutulabilmesine bağlıdır. Bu nedenle, son yıllardaki çalışmalar sadece arıtma sistemlerinin sahip olduğu mikrobiyal yapının tanımlanması üzerine değil, aynı zamanda mikrobiyal komünite dinamiğinin proses stabilitesiyle ilişkilendirilmesi üzerine yoğunlaşmaya başlamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla, çevre veya işletme koşullarında bir farklılık olmadığı durumlarda dahi arıtma sistemlerinin bir süre sonra stabilitesini kaybettiği gösterilmiştir (Kargı ve Eker, 2006; Kaufman vd., 2005; Kargı ve Uygur, 2002; Pollice vd., 2002). Yapılan diğer araştırmalarda, bu durumun bakterilerin lineer olmayan çoğalma dinamiğinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Curtis vd., 1998; Fernandez, 1999; Kaewpipat ve Grady, 2002); ancak stabil (kararlı) arıtma verimi elde etmek için, kararlı bir komünite yapısına sahip olmak gerektiği hala kesinlik kazanmamıştır. Bu durum, düşük büyüme hızına sahip mikroorganizmalar (örneğin; nitrifikasyon bakterileri) için daha fazla önem arz etmektedir. Bu mikroorganizma grupları, heterotroflara göre çok daha az miktarlarda bulunacağı için, olası kayıpları ya da sayıca azalmaları arıtma veriminde stabil yapının bozulmasına neden olacaktır. Son yıllarda arıtma sistemi stabilitesine ilişkin yürütülen sınırlı sayıda çalışmada, çamur yaşının mikrobiyal komünite ve stabilite üzerine etkisine yoğunlaşmıştır. Saikaly ve diğerleri (2005) laboratuvar ölçekli ardışık kesikli bir reaktörde mikrobiyal komünite yapısının farklı çamur yaşlarında stabilitesini değerlendirmiştir. Farklı çamur yaşlarında çalıştırılan replika reaktörlerden alınan numuneler üzerinde moleküler analizler yapılmış ve bakterilerin komünite yapısının dinamik olduğu, işletme koşulları ve sistem

performansı değişmese bile komünite yapısının devamlı bir değişim içinde olduğu gösterilmiştir. Çalışma sonuçları ayrıca, replika reaktörlerdeki bakterilerin aynı şekilde sınıflandığını ve işletme başlangıcından itibaren aynı şekilde sapmalar gösterdiğini ortaya koymuştur. Ancak yapılan benzer çalışmalar, aynı şartlar altında çalıştırılan laboratuvar ölçekli replika reaktörler arasında, bakteriyel komünite bakımından zamanla farklılaşmalar olduğunu göstermiştir. Özellikle laboratuvar ölçekli reaktörlerde daha fazla rastlanan bu durum, küçük hacimlerde daha az bakteri çeşitliliğinin bulunması ve bakteri çoğalmasının lineer olmamasıyla açıklanmıştır (Forney vd., 2001; Kaewpipat ve Grady, 2002). Saikaly ve Oerther'in (2004) yaptığı bir diğer çalışmada ise farklı çamur yaşlarının 6 saf kültürün bulunduğu bir komünite yapısı üzerine etkisi çalışılmış ve bir model geliştirilmiştir. Bu modele göre, 2.28 gün çamur yaşında işletilen bir reaktör, 5.66 gün çamur yaşı değerine sahip bir reaktörden daha fazla sayıda farklı bakteri içermektedir. Bunun nedeni olarak, yüksek çamur bekletme sürelerinde, bakteriler arasındaki rekabetin ortama daha uygun olan türler tarafından kazanılması ve sistemin tür kaybına uğraması, dolayısıyla da çeşitliliğin azalması gösterilmiştir. Hallin ve diğerleri (2005) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise 2 farklı çamur yaşında işletilen gerçek ölçekli bir tesisten numune alınmış, moleküler yöntemler kullanılarak, 10 günden fazla 2 ayrı çamur yaşı değerinin amonyacı oksitleyici bakteri (AOB) yapısı üzerine etkisi incelenmiştir. Farklı çamur yaşlarında, AOB sayıları arasında bir farklılık görülmezken, araştırma süresinin başından sonuna doğru gidildikçe AOB miktarında belirgin bir artış gözlenmiştir. Ancak bu çalışma gerçek ölçekli bir tesisten alınan numuneler üzerinde yapıldığı için, AOB sayısındaki bu artışın araştırma boyunca artan sıcaklıktan mı yoksa bakteri çoğalmasının kendi lineer olmayan yapısından mı kaynaklandığı belirlenmemektedir.

Bu çalışmada nitrifikasyon prosesi model olarak seçilmiş ve bu sistemlerin kararlı yapısı üzerine araştırma yapılmıştır. Büyüme hızıyla doğrudan

ilişkilendirilmesi nedeniyle çamur yaşı bifürkasyon parametresi olarak seçilmiş ve laboratuvar ölçekli atıksu arıtma reaktörleri farklı iki çamur yaşında işletilmiştir. Sistem nitrifikasyon verimi yanısıra amonyağı oksitleyici bakteri populasyonlarının sayısı ve çeşitliliği açısından da incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda son yıllarda geliştirilen moleküler yöntemler büyük avantaj sağlamaktadır. Bu yöntemlerin başında floresanlı yerinde hibritleşme tekniği (FISH), polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), denatüran gradyent jel elektroforezi (DGGE) ve gerçek zamanlı PZR (qPZR) gelmektedir. FISH ve qPZR, bakterilerin sadece türlerinin değil miktarlarının da tayinine imkan tanınması bakımından son yıllarda öne çıkan yöntemler arasındadır. Bunun yanında DGGE, klonlama çalışmalarıyla birleştirildiğinde bir sistemin barındırdığı bütün mikroorganizma topluluklarının belirlenebilmesine olanak sağlaması nedeniyle önem arz etmektedir. Aynı şartlar altında eş zamanlı olarak işletilen replika reaktörlerin stabilitesinde meydana gelen değişimlerin nedenleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar sistem verimi ve stabilitesinin sağlıklı bir şekilde değerlendirilmesine, böylece sistem tasarımına öneriler getirilmesine ve maliyetin düşürülmesine imkan tanıyacak olması bakımından önemlidir.

## Materyal ve yöntem

### Reaktör işletilmesi

6 L toplam, 4 L dolu hacime sahip 4 adet (2 replika) laboratuvar ölçekli ardışık kesikli reaktör (AKR) 3 ve 10 gün çamur yaşlarında; 2'şer ay süreyle 15°C sabit sıcaklıkta 6 saatlik 4 döngü şeklinde işletilmiştir (Kargı ve Uygur, 2002). Reaktörler Yu *vd.* (2004) tarafından tarif edildiği gibi, basit organik karbon kaynağı içeren sentetik atıksu ile beslenmiştir (Tablo 1). Aşı çamuru olarak, gerçek ölçekli bir ileri evsel atıksu arıtma tesisinin geri devir hattından alınan aktif çamur kullanılmıştır.

### Analitik yöntemler

Reaktörlerin işletilmesi sırasında sıcaklık ve pH sürekli olarak izlenmiş ve EnviroMon (Pico Envirotec Inc., Kanada) bilgisayar programı

kullanılarak kaydedilmiştir. Askıda katı madde ve uçucu askıda katı madde miktarları Standard Metodlar'a göre (APHA, 1993); kimyasal oksijen ihtiyacı ve amonyak konsantrasyonları ise Spectroquant COD ve Spectroquant NH<sub>3</sub>-N Cell Test kitleri kullanılarak tayin edilmiştir (Merck & Co., Inc., USA). NO<sub>3</sub>-N ve NO<sub>2</sub>-N miktarları ise iyon kromatograf ile ölçülmüştür (Dionex Ltd., UK).

Tablo 1. Sentetik atıksuyu oluşturan bileşenler ve miktarları

Kimyasal madde	Atıksudaki konsantrasyon
Glukoz	590 mg/l
Pepton	10,0 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	65,9 mg/l
NH <sub>4</sub> Cl	152,9 mg/l
CaCl <sub>2</sub>	13,85 mg/l
MgCl <sub>2</sub>	36,16 mg/l
ZnCl <sub>2</sub>	0,208 mg/l
CuSO <sub>4</sub>	0,251 mg/l
MnSO <sub>4</sub>	0,275 mg/l

### Floresanlı yerinde hibritleşme

Çalışma boyunca alınan numuneler, laboratuara soğuk zincirde getirilmiş ve aynı gün fikse edilmiştir. Bu amaçla, %4'lük paraformaldehit (PFA) solüsyonu içerisinde 4°C'de 3 saat süreyle inkübe edilmiştir. Fiksasyondan sonra hücreler fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkanıp PBS-Etanol (1:1, v/v) karışımı içerisinde -20°C'de saklanmıştır (Harmsen *vd.*, 1996). Fikse edilmiş hücreler hibridizasyondan önce artan etanol konsantrasyonlarında (%50, 80, 100) dehidre edilmiştir. Hücreler %35 deiyonize formamid içeren hibritleşme tamponu (0.9M NaCl, 2mg/ml Ficoll, 2mg/ml Bovine Serum Albumen, 2mg/ml polivinil piroidon, 5mM EDTA, pH 8.0, 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0, 0.1% SDS, 2.5 ng/μl hibritleşme probu) içerisinde, 46°C'de 4 saat inkübe edilmiştir (Amann *vd.*, 1990a; Manz *vd.*, 1992). Bu çalışmada kullanılan problemler ve spesifik oldukları gruplar Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan probalar; spesifik bağlandıkları gruplar ve dizilimleri

Prob adı	Hedef grup	Dizilim (5'→3')
Eub338i	Çoğu bakteri grupları	GCT GCC TCC CGT AGG AGT
Eub338ii	Planctomycetales	GCA GCC ACC CGT AGG TGT
Eub338iii	Verrucomicrobiales	GCT GCC ACC CGT AGG TGT
Nonbact338	Nonsense	CGA CGG AGG GCA TCC TCA
Nso1225	β-Proteobakteriyel AOB	CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA
Neu	Halofilik <i>Nitrosomonas sp</i>	CCC CTC TGC TGC ACT CTA
CTE	Neu probu rakibi	TTC CAT CCC CCT CTG CCG
6a192	<i>N. oligotropha</i> grubu	CTT TCG ATC CCC TAC TTT CC
c6a192	6a192 probu rakibi	CTT TCG ATC CCC GAC TTT CC

AOB problemleri Cy5 boyası ile işaretliken bütün bakterilere özgü problemler ise Cy3 boyası ile işaretlidir. Hibridizasyonu takiben, hücreler 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.01% SDS, 0-5 mM EDTA ve 200 mM NaCl içeren yıkama çözeltisi ile iki defa 48 °C'de yıkanmışlardır (Manz *vd.*, 1992). 10 µl numune, teflon kaplı mikroskop lamına damlatılıp, kurutulmuş ve lamelle kapatılmıştır.

Görüntüleme amacıyla Leica TSP2 konfokal lazer taramalı mikroskop (CSLM) (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) Argon-İyon ve Helyum-Neon lazerleri ile birlikte kullanılmıştır. Her iki proba da işaretli bölgeler AOB kolonisi olarak kabul edilmiş ve her numune için 10 tane 1-2 µm arası optik kesitlere sahip görüntü alınmıştır. AOB mikrokolonilerinin çapları ise DAIME görüntü analiz programı yardımıyla ölçülmüş ve analiz edilmiştir (Daims *vd.*, 2005). Bu program yardımıyla elde edilen sonuçlar ise toplam AOB sayısı belirlenmek üzere Coşkun *vd.* (2005) tarafından tanımlanan yöntemde kullanılmıştır. Bu yöntem, birim UAKM başına bulunan AOB mikrokoloni hacimine dayanır. Burada dikkat edilmesi gereken nokta; bu yöntemde, AOB kolonilerinin küresel olduğu kabul edilir ve ortalama hacim  $4/3 \pi r^3$  formülüne göre hesaplanır. Yöntemin uygulanması sırasında gerekli bütün istatistiksel analizler Minitab v11 bilgisayar programı ile yapılmıştır (Minitab Inc., State College, Pa.).

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Öncelikle numunelerde bulunan genomik DNAlar (GNA) FAST DNA Spin Kit for Soil

(Q-Biogene, Belçika) kullanılarak izole edilmiştir. GDNA'ların izolasyonunu takiben yuvalanmış PZR yöntemiyle önce bütün bakterilere özgü primerlerle hedef bölgeler çoğaltılmış, sonra bağlanma sıcaklığı 57°C olan AOB'lere özgü primerlerle 16S rRNA bölgeleri çoğaltılmıştır. Aşağıdaki Tablo3'te çalışmada kullanılan primer dizileri gösterilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan primerler ve dizilimleri

Primerin Adı	Dizilim (3'→5')
pA	GA GTT TGA TCC TGG CTC AG
pH'	AG GAG GTG ATC CAG CCG CA
CTO654r	TAGCYTTGTAGTTTCAAACGC
CTO189f* (A+B+C)	AGRAAAGYAGGGGATCG

Bu çalışmada, PZR reaksiyonları 0,2'şer pmol/µl primer, 0.2 mM dNTP, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02U/µl taq polimeraz enzimi ve 1X PZR tamponu içeren çözeltilerde gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonları TECHNE-TC 412 m Termal Döndürücü'de (İngiltere)1 döngü 5 dk, 94 °C, 30 döngü (45 sn, 94 °C-45 sn spesifik bağlanma sıcaklığı-45 sn 72°C), 1 döngü 10 dk 72°C olarak yapılmıştır.

### Denatüran gradyan jel elektroforezi (DGGE)

Amonyacı oksitleyici bakterilere özgü 16S rDNA'ların V3 bölgeleri DGGE ekipmanı

kullanılarak (Bio-Rad DCode™, İngiltere), 200 V'da, 60 °C'lik 1XTAE (40 mM Tris, 20 mM asetat, 1 mM EDTA) içerisinde, %35-60 denatüran konsantrasyonuna sahip (%100 denatüran 7 M üre ve %40 v:v formamid içerir) poliakrilamid jel kullanılarak 6 saat süreyle koşturulmuştur. Elektroforez işleminin ardından jeller 20 dakika 1xSybrGold içerisinde bekletildikten sonra, UV altında jel görüntüleme sisteminde fotoğrafları çekilmiş ve Bionumerics Vers.4.1 yazılım paketi (Applied Maths, Belçika) ile analiz edilmiştir. İstatistiksel analizler ise Minitab v11 yazılımı (Minitab Inc., State College, Pa.) ile gerçekleştirilmiştir. DGGE jellerinde her bir numuneye ait sınırlı sayıda bant elde edildiği için klonlama yerine DGGE jelinden bant kesme ve dizileme analizine gönderme yolu tercih edilmiştir. Dizi analizi sonuçları Chromas programı ile incelenmiş (Chromas Lite 2.01, Technelysium Pty Ltd.) ve "http://www.ebi.ac.uk/fasta33/nucleotide.html" internet sitesi kullanılarak tür tanımlamaları yapılmıştır.

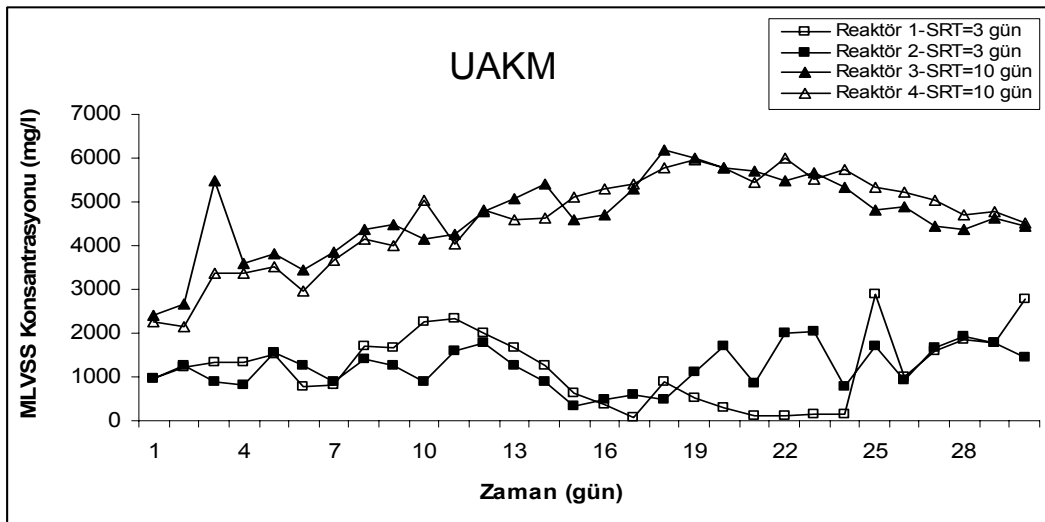
## Deneysel çalışma sonuçları

### Kimyasal analiz sonuçları

Tablo 2'den de görülebileceği gibi, çamur yaşı 3 gün olan reaktörlerin UAKM konsantrasyonları  $1199 \pm 803$  mg/l ve  $1218 \pm 485$  mg/l iken 10 gün olan reaktörlerinki ise  $4671 \pm 916$  ve  $4605 \pm 1056$  mg/l değerlerini almıştır.

Öncelikle, aynı koşullar altında çift çalışılan reaktörlerin sahip olduğu UAKM değerleri arasında bir korelasyon olup olmadığına bakılmıştır. Yapılan istatistik analizler sonucu 10 gün çamur yaşına sahip reaktörlerde pearson korelasyon katsayısının 0.892 olduğu bulunmuştur. Bu değer istatistiksel olarak yüksek korelasyon olarak değerlendirilebilecek bir değerdir. Ancak, 3 gün çamur yaşına sahip reaktörlerde bu değer 0.598'e düşmüştür. Bu sonuç bize düşük çamur yaşlarında işletilen reaktörlerde, yüksek çamur yaşıyla işletilen reaktörlere göre, dışsal bir etki olan çamur yaşı gibi bir işletme parametresinin, içsel etki olarak değerlendirilen; bakterilerin büyüme dinamiğinden daha etkili olabileceğini göstermektedir.

Arıtma verimleri değerlendirildiğinde, reaktör 1 ve 2'de (çamur yaşı 3 gün)  $88 \pm 14.5$  ve  $88 \pm 14.75$  KOİ giderim verimi elde edilirken bu değer reaktör 3 ve 4'te (çamur yaşı 10 gün)  $96 \pm 1.7$  ve  $96 \pm 1.8$ 'ye ulaşmıştır. Nitrifikasyon verimini ölçmek amacıyla  $\text{NH}_3\text{-N}$ , nitrit ve nitrat konsantrasyonları ölçülmüştür. 3 gün çamur yaşına sahip reaktör 1 ve 2'de nitrat konsantrasyonları 0 ila 28.48 mg/l ve 0 ila 25.0 mg/l arasında değişirken; 10 gün çamur yaşına sahip reaktör 3 ve 4'te ise sırasıyla 40 ve 34 mg/l'ye kadar yükselmiştir. Nitrit konsantrasyonları incelendiğinde reaktör 1 ve 2'de en fazla 10 mg/l değeri elde edilmiştir. Reaktör 3 ve 4'te ise bu değer ilk 30 gün



Şekil 1. Çalışma süresi boyunca reaktörlerin sahip olduğu UAKM değerleri

Tablo 4. Reaktörlerdeki toplam AOB sayılarının zamana bağlı değişimi

Zaman (Gün)	Reaktör 1 (hücre/ml)	Reaktör 2 (hücre/ml)	Reaktör 3 (hücre/ml)	Reaktör 4 (hücre/ml)
12	5.13E+08	9.13E+08	3.77E+08	7.13E+08
21	6.08E+07	7.87E+08	5.41E+08	5.76E+08
30	2.51E+08	6.53E+07	3.20E+08	1.77E+08
41	3.87E+08	9.75E+07	9.56E+07	9.03E+08
59	8.00E+07	1.06E+08	1.60E+08	2.86E+08

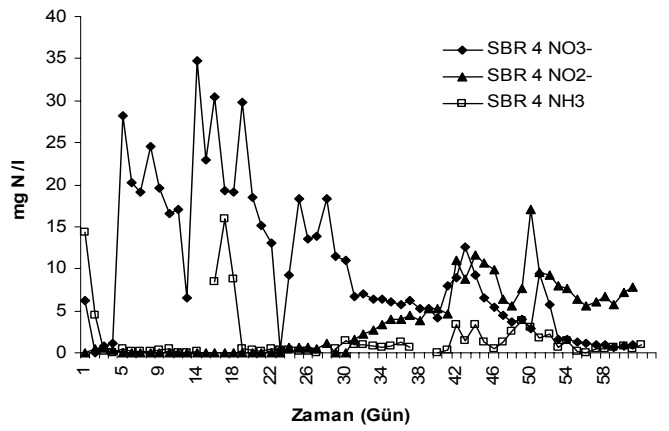
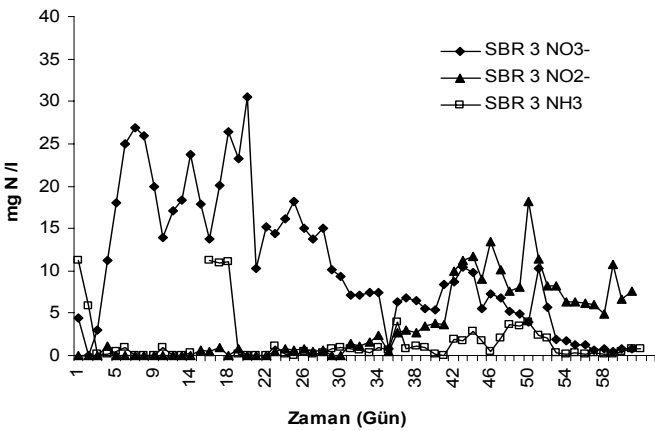
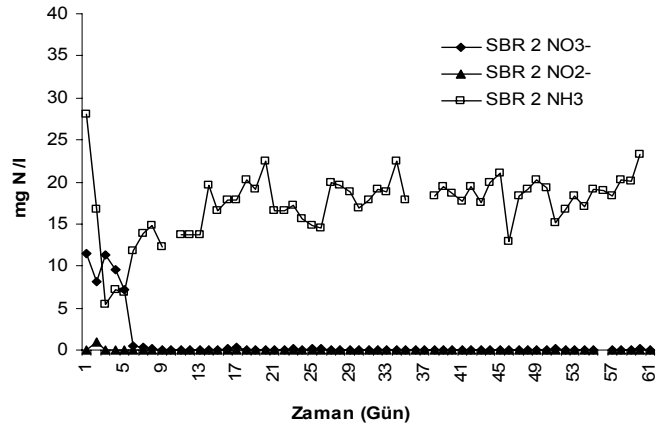
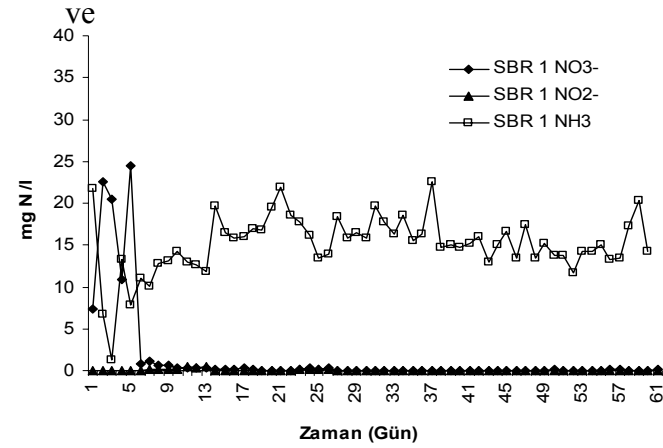
boyunca 2.5 mg/l'nin altında kalırken çalışmanın ilerleyen aşamalarında 18 mg/l ve 17 mg/l'ye kadar yükselmiştir (Şekil 2).

### FISH Sonuçları

Çalışma süresince alınan 5 numunede toplam amonyağı oksitleyici bakteri (AOB) sayısı FISH yöntemi kullanılarak bulunmuştur. FISH yöntemi sonucu elde edilen mikroskop görüntüleri kullanılarak, her bir numunedeki mikrokoloni sayısı tespit edilmiş ve Coşkuner

diğerleri (2005) tarafından tanımlanan yöntemle toplam AOB sayısı bulunmuştur.

Hesaplamalar sonucunda Tablo 4'te verilen sonuçlar elde edilmiştir. Toplam AOB sayıları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, gerek 3 gün gerekse 10 gün çamur yaşıyla işletilen eş reaktörler arasında bir uyum görülmemiştir. Bu sonuçlar, reaktörlerde lineer olmayan büyüme dinamiğinin etkili olabileceği sonucunu akla getirmiştir.



Şekil 2. Reaktörlerdeki amonyak, nitrit ve nitrat konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimi (a) Reaktör 1, (b) Reaktör 2, (c) Reaktör 3, (d) Reaktör 4

Özellikle 10 gün çamur yaşı ile işletilen reaktörlerde nitrifikasyon verimi oldukça yüksek ve stabildir. Buna rağmen, her iki reaktördeki AOB sayıları arasında bir ilişki mevcut değildir. Bu sonuç, komünite stabilitesi yanında fonksiyonel stabilite üzerinde de durulması gerektiğini göstermiştir. Toplam sayı açısından farklılık gösteren eş iki reaktör çalışma süresi boyunca fonksiyonel olarak kararlı yapısını sürdürmeyi başarmıştır.

### **Denatüran gradyen jel elektroforezi sonuçları**

Toplam AOB sayısı yanında AOB komünitesindeki değişiklikleri ve varsa eş reaktörler arasındaki benzerliği ortaya koyabilmek için alınan numuneler üzerinde DGGE analizleri yapılmış ve jel görüntüleri bilgisayar programı yardımıyla analiz edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu %35-60 denatüran konsantrasyonunun DGGE analizi için uygun olduğu görülmüş, PZR ürünleri bu denatüran konsantrasyonuna sahip jellerde yürütülmüş ve Şekil 3'de gösterilen görüntüler elde edilmiştir. Jel görüntülerinden de anlaşılacağı üzere, genel olarak 10 gün çamur yaşında işletilen reaktörler, 3 gün çamur yaşında işletilen reaktörlere göre daha az tür çeşitliliğine sahiptir. Benzer şekilde; Saikaly ve arkadaşlarının (2005) yaptığı bir çalışmada, laboratuvar ölçekli ardışık kesikli reaktörler 2 ve 8 gün çamur yaşlarında işletilmiş ve düşük çamur yaşına sahip olan sistemde yüksek çamur yaşına göre daha yüksek bir çeşitlilik elde edilmiştir. Bunun sebebi olarak, yüksek çamur yaşına sahip sistemlerde belli türlerin baskın hale gelmesi ve diğerlerinin sistemden yıkanması gösterilebilir. Burada dikkat çeken diğer bir nokta, 10 gün çamur yaşına sahip reaktörlerden elde edilen DGGE bantlarının hepsi 3 gün çamur yaşında işletilen reaktörlerde mevcuttur. Jel görüntüleri bilgisayar programı kullanılarak incelendiğinde ve istatistiksel analizleri yapıldığında ise, her iki çamur yaşı değerinde işletilen eş reaktörlerin sahip olduğu AOB türlerinin benzerliği açısından zamana bağlı olarak bir azalma görülmüştür; ancak bu azalma 10 gün çamur yaşına sahip reaktörlerde

daha fazladır. 3 gün çamur yaşına sahip eş reaktörlerde, en düşük benzerlik 33. günde alınan numunede görülürken (%70.6), 10 gün çamur yaşında işletilen reaktörlerde ise bu değer 41. günde %26.7'ye düşmüştür. Bu durum düşük çamur yaşına sahip reaktörlerin zamana bağlı olarak stabil yapılarını yüksek çamur yaşında işletilen reaktörlere kıyasla daha iyi koruyabildiklerini göstermektedir.

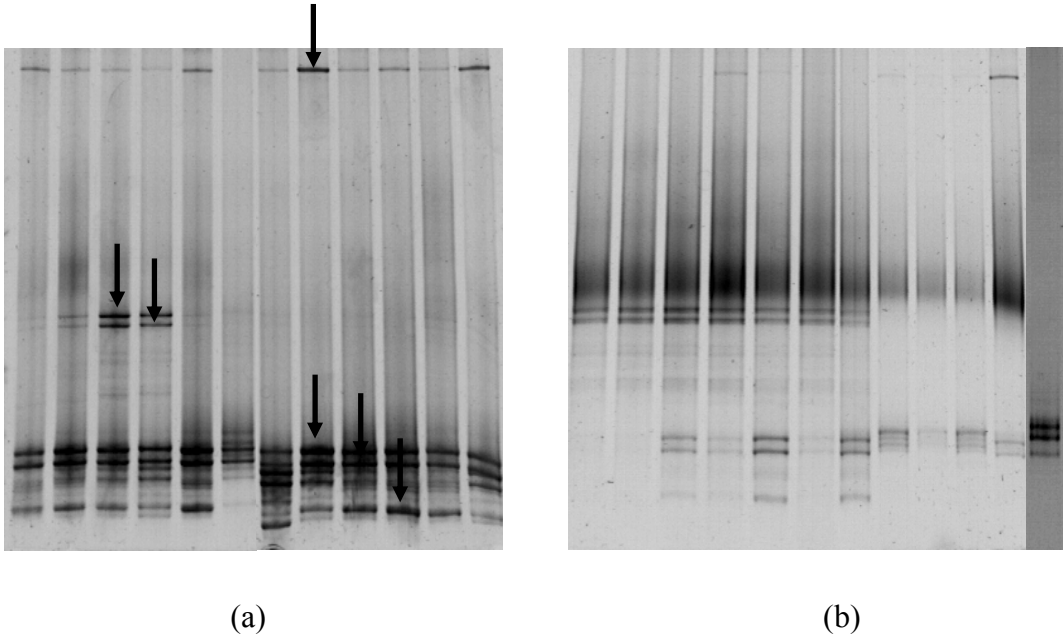
Her bir reaktörün AOB çeşitliliğindeki değişim kendi içinde incelendiğinde, yine aynı şekilde düşük çamur yaşına sahip her iki reaktörde de kendine benzerlik değeri yüksek çamur yaşında işletilen reaktörlere göre daha fazladır. 10 gün çamur yaşına sahip her iki reaktörde de özellikle 32. günden sonra başlangıç zamanında alınan ilk numuneye göre (10. gün) benzerlik %0'a kadar düşmüştür. 3 gün çamur yaşında işletilen reaktörlerde ise bu değer en düşük %75 olmuştur.

Bu sonuçlar, reaktörlerin nitrifikasyon performansı ile birlikte değerlendirildiğinde, daha az çeşitliliğe sahip olsa ve stabil bir AOB popülasyonunu sürdürmese bile 10 gün çamur yaşıyla işletilen sistemin nitrifikasyon veriminin daha stabil olduğu görülmüştür. Bu bulgular, Fernandez vd. (1999) tarafından elde edilen sonuçlarla uyumludur. Araştırmacılar, bir yıldan uzun süreyle laboratuvar ölçekli bir anaerobik reaktör işletmişlerdir ve stabil verim elde ettikleri halde mikrobiyal popülasyonun yüksek oranlarda dinamik olduğunu göstermişlerdir.

AOB profillerinin istatistiksel analizinin yanında, baskın olan bantlar kesilip, 16S rRNA bölgeleri çoğaltılmış ve dizi analizine gönderilmiştir. Elde edilen diziler bilgi bankasıyla karşılaştırıldığında; bantların %97.6 benzerlik ile *Nitrosomonas oligotropha*'ya (EBI erişim numarası: AF272422); %97.4 benzerlik ile *Nitrosomonas sp.*'ye IS79A3 (EBI erişim numarası: AJ621026); %97.7'nin üzerinde benzerliklerle henüz kültüre alınmamış olan beta-proteobakterilere (EBI erişim numaraları: AY062126, DQ413103, DQ376558, AY064177) ait olabileceği görülmüştür.



### Çamur yaşının nitrifikasyon bakterileri üzerine etkisi



Şekil 3. Reaktörlerin sahip olduğu AOB komünitelerinin DGGE profilleri. Şerit 1-2: 10. gün; 3-4: 24. gün; 5-6: 33. gün; 7-8: 40. gün; 9-10 48. gün; 11-12: 56ç gün  
(a) 3 gün çamur yaşıyla işletilen Reaktör 1 ve 2; (b) 10 gün çamur yaşıyla işletilen Reaktör 3 ve 4

Daha uzun 16S rRNA dizi analizi daha fazla bilgi sağlayacaktır ancak edinilen bilgiler literatürle uyum içerisindedir. *Nitrosomonas* türleri nitrifikasyon reaktörlerinde en fazla rastlanan türlerdir ve bu çalışmada da 4 reaktörde bütün çalışma boyunca görülmüşlerdir (Purkhold vd., 2000).

### Sonuçlar

Bu çalışma farklı çamur yaşlarında işletilen eş reaktörler arasında, toplam AOB sayısı ve AOB komünitesi açısından benzerlikleri ortaya koymak; elde edilecek sonuçları nitrifikasyon verimi ve stabilitesi ile ilişkilendirmek amacıyla yürütülmüştür. Sonuçlar, düşük çamur yaşında işletilen nitrifikasyon reaktörlerinin, yüksek çamur yaşında işletilenlere oranla daha yüksek bir AOB çeşitliliğine sahip olduğunu göstermiştir. Ancak, elde edilen bulgular nitrifikasyon verimi ile ilişkilendirildiğinde, yüksek AOB çeşitliliğine sahip olsa bile 3 gün çamur yaşının stabil bir nitrifikasyon verimi elde etmeye yeterli olmadığı bir kez daha gösterilmiştir. FISH analizi ile elde edilen toplam AOB sayıları da benzer şekilde stabil bir AOB popülasyonunun sistemde var olmadığını

ortaya koymuştur. Eş reaktörler arasında toplam AOB sayısı açısından bir korelasyon görülmemiştir.

Yapılan çalışma, bu konuda literatürde mevcut olan bilgi eksikliği dikkate alındığında önem az etmektedir. Arıtma reaktörlerinin stabilitesi ve popülasyon dinamiği ile ilişkilendirilmesi konularında henüz kesin bilgiler elde edilmemiştir. Bu çalışma, ileride yapılacak arıtma sistemi tasarımlarına yeni bir bakış açısı getirmektedir.

### Teşekkür

Yazarlar, bu çalışmanın gerçekleştirilmesine olan katkılarından dolayı İngiltere, Newcastle Üniversitesi'nden Prof. Tom Curtis, Prof. Ian Head ve Dr. Emma Bowen'a teşekkürlerini sunar.

### Kaynaklar

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. ve Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry

- for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1919-1925.
- APHA., (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater, 19<sup>th</sup> Ed., Washington D.C.
- Coskuner, G, Ballinger, S. J., Davenport, R. J., Pickering, R.L., Solera R. R., Head, I. M. ve Curtis, T.P. (2005) Agreement between theory and measurement in the quantification of ammonia oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(10), 6325-6334.
- Curtis, T.P. ve N.G. Craine. (1998). The comparison of the diversity of activated sludge plants, *Water Sci and Tech.***37**:71-78.
- Daims, H., Lücker, S. ve Wagner, M. (2005) Daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. *Environ. Microbiol.* **8**, 200-213.
- Fernandez, A., S. Huang, S. Seston, J. Xing, R. Hickey, C. Criddle ve J. Tiedje. (1999). How stable is stable? Function versus community composition. *App and Env Microbiol.* **65**(8):3697-3704.
- Forney, L.J., W.T. Liu, J.B.Guckert, Y. Kumagai, E. Namkung, T. Nishihara, ve R.J. Larson. (2001). Structure of microbial communities in activated sludge: Potential implications for assessing the biodegradability of chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **49**: 40-53.
- Hallin, S., P. Lydmark, S. Kokalj, M. Hermansson, F. Sorensson, A. Jarvis ve P.E. Lindgren. (2005). Community survey of ammonia-oxidizing bacteria in full-scale activated sludge processes with different solids retention time. *J App Microbiol.* **99**:629-640.
- Kaewpipat, K. ve C.P.L.Grady. (2002). Microbial population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors. *Wat. Sci. Technol.* **46**:19-27.
- Kargi, F. ve A. Uygur. (2002). Nutrient removal performance of a sequencing batch reactors as a function of the sludge age. *Enzyme and Microb. Technol.* **31**:842-847.
- Kargi, F. ve S. Eker. (2006). Effect of sludge age on performance of an activated sludge unit treating 2,4 dichlorophenol-containing synthetic wastewater. *Enzyme and Microb. Technol.* **38**:60-64.
- Kaufman, M.K., H. Majcherek, E. Klaczynski. (2005). Factors affecting the biological nitrogenremoval from wastewater. *Process Biochem.* **41**(5), 1015-1021.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. ve Schleifer, K.H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**, 593-600.
- Pollice, A., V. Tandoi ve C. Lestingi. (2002). Influence of aeration and sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate. *Water Res.* **36**:2541-2546.
- Purkhold, U., A. Pommerening-Roser, S. Juretschko, vd. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amo* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 5368-5382.
- Rowan, A.K., J.R. Snape, D. Fearnside, vd. (2003). Composition and diversity of ammonia-oxidizing bacterial communities in wastewater reactors of different design treating identical wastewater. *FEMS Microbial Ecol.* **41**:195-206.
- Saikaly, P.E. ve D.B. Oerther. (2004). Bacterial competition in activated sludge: Theoretical analysis of varying solids retention times on diversity. *Microb. Ecol.* **48**:274-284
- Saikaly, P.E., P.G.Stroot ve D.B. Oerther. (2005). Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *App and Env Microbiol.* **71**(10):5814-5822.