

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KESİKLİ BİYOREAKTÖRDE KISMİ DENİTRİFİKASYON İLE N₂O ÜRETİMİ İÇİN
ORTAM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU VE BAKTERİYEL TÜRLERİN
KARAKTERİZASYONU

OYA GÜRHAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEBZE

2017

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KESİKLİ BİYOREAKTÖRDE KİSMİ
DENİTRİFİKASYON İLE N₂O ÜRETİMİ İÇİN ORTAM
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU VE BAKTERİYEL
TÜRLERİN KARAKTERİZASYONU

OYA GÜRHAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. PINAR ERGENEKON

GEBZE

2017

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**OPTIMIZATION OF BIOREACTOR CONDITIONS
FOR N₂O PRODUCTION VIA PARTIAL
DENITRIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
BACTERIAL SPECIES**

OYA GÜRHAN
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING

THESIS SUPERVISOR
ASSOC. PROF. DR. PINAR ERGENEKON

GEBZE

2017

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 22/06/2017 tarih ve 2017/34 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 19/07/2017 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Oya GÜRHAN'ın tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Doç. Dr. Pınar ERGENEKON

ÜYE

: Prof. Dr. Melek ÖZKAN

ÜYE

: Doç. Dr. Burcu ONAT

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/.....sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

Doç. Dr. Arif Çağdaş AYDINOĞLU
Gebze Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

İklim değişimine neden olan önemli faktörlerden biri insan faaliyetleri sonucu atmosfere salınan sera gazlarıdır. Son yıllarda dünyada ve Türkiye'deki sera gazı emisyonlarının izlenmesi ve azaltılması hususunda çalışmalar artmıştır. Başlıca sera gazlarından olan N_2O gazı, CO_2 'den çok daha uzun ömürlü olup ısınma potansiyeli CO_2 'nin 310 katıdır. Adipik ve nitrik asit üretimi sırasında olduğu gibi atık su arıtma tesisleri gibi denitrifikasyonun gerçekleştiği süreçlerden sera gazı N_2O salınımı olabilmektedir. Denitrifikasyon sırasında ortam parametrelerine göre, (karbon ve azot kaynağı, besi içeriği ile O_2 konsantrasyonu gibi) kısmi denitrifikasyon meydana gelmesiyle denitrifikasyonun son ürünü azot gazı yerine N_2O salınımında artış ve denitrifikasyon yapan bakterilerin çeşitliliğinde değişimler olduğu bilinmektedir. Bu tezin amacı denitrifikasyon sırasında salınan bir sera gazı olan N_2O gazının üretimini zenginleştiren kısmi denitrifikasyon şartlarını ve bu şartlardaki bakteri profilini belirlemektir. Böylece azot kaynağı olarak nitrik oksit gazının veya nitrat/nitrit gibi gazların denitrifikasyon ile indirgenme proseslerinde üretiminin artırılması ve enerji üretimi amacıyla kullanılmasına yönelik verimli süreçler tasarlanması mümkün olabilecektir. Tez kapsamında uzun süre nitritle sentetik olarak beslenen biyoreaktörden aşılana 100 ml'lik kesikli reaktörde düşük ve yüksek azot/karbon oranı ile farklı fosfat miktarlarında denitrifikasyon süreci izlenmiştir. Ortama salınan N_2O ve N_2 gazları GC/TCD ile ölçülmüştür. Farklı koşullarda beslenen kesikli reaktörlerden alınan denitrifikasyon bakterileri izole edilerek tanımlanmıştır. Yapılan kesikli biyoreaktör deneylerinde yüksek fosfat (100 mg/l) konsantrasyonu ile düşük C: N oranı N_2O üretimini artırmıştır. Nitratla ve nitritle beslenen her iki C: N oranında *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi teşhis edilen tek baskın tür olmuştur. Bu sonuçlar temelinde sürekli biyoreaktörde daha uzun süreli besleme ve farklı kaynaklardan aşılama ile kısmi denitrifikasyon şartları optimize edilip daha geniş bir bakteri çeşitliliği belirlenebilir.

Anahtar Kelimeler: Denitrifikasyon, Nitröz oksit, kısmi denitrifikasyon, kesikli biyoreaktör, sera gazı, denitrifikasyon bakterileri

SUMMARY

One of the important factors that cause climate change is the greenhouse gases released into the atmosphere as a result of human activities. In recent years, efforts have been made to monitor and reduce greenhouse gas emissions in the world and in Turkey. N_2O gas, which is one of the main greenhouse gases, has a life time much more than CO_2 and also its warming potential is up to 310 times of CO_2 . Adipic and nitric acid production as well as denitrification processes taking place in the wastewater treatment plants are among the main anthropogenic N_2O sources. It is known that during the denitrification, depending on the environmental conditions partial denitrification can occur and cause changes in N_2O emission instead of the end product of denitrification (N_2 gas) and in the diversity of denitrifying bacteria. The aim of this thesis is to specify the conditions of partial denitrification enriching the production of N_2O gas during the intended denitrification and the profile of the bacteria in these conditions. Thus, it would be possible to design efficient processes for increasing N_2O formation and subsequent use for energy production by using nitric oxide gas or nitrate/nitrite as a nitrogen source in the denitrification involving systems. In the thesis, denitrification process at low and high C:N ratio with different phosphate concentrations was observed in a 100 ml cut-off reactor, which was inoculated from synthetically fed by nitrite for a long time for produced N_2O and N_2 gas concentrations from the reactor was determined by GC/TCD. Denitrification bacteria profile from cut-off reactors fed on different conditions have been identified by isolating them. In the batch bioreactor experiments the low C:N ratio with high phosphate (100 mg/l) concentration increased N_2O production. *Pseudomonas aeruginosa* bacteria was identified as the only predominant species in both C:N ratios fed with both nitrate and nitrite. Based on these results, the conditions of partial denitrification and diversity of denitrifiers can be further investigated in the continuous bioreactor systems inoculated from different sources

Keywords: Denitrification, N_2O , partial denitrification, batch bioreactor, greenhouse gas, denitrifiers.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgi birikimi ve deneyimleri itibarı ile bir yol gösterici ve sağlamış olduğu motivasyon ile her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Pınar ERGENEKON'a teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Ayrıca değerli hocam Prof. Dr. Melek ÖZKAN'a yoğun katkılarından dolayı, çalışmalarım boyunca desteğini hiç esirgemeyen sevgili eşim Emre GÜRHAN'a, yapılan bütün çalışmalarda benimle birlikte emek harcayan, maddi ve manevi desteği gösteren Ar. Gör. Faruk CAN'a, Hilal YILMAZ'a ve Osman Cahit DEMİR'e teşekkür ederim.

Ayrıca bu tez çalışması TÜBİTAK 110Y125 nolu proje ile GTÜ 2016-A-24 nolu Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. DENİTRİFİKASYON ARA ÜRÜNÜ OLARAK N ₂ O GAZI	2
2.1. N ₂ O Gazı ve Sera Etkisi	2
2.1.1. N ₂ O Gazı Kaynakları	3
2.1.1.1. Nitröz Oksit Emisyonları: İnsan Kaynakları	4
2.1.1.2. Nitröz Oksit Emisyonları: Doğal Kaynaklar	7
2.1.2. N ₂ O Emisyonlarının Kontrol Yöntemleri	9
2.1.3. Türkiye’ de N ₂ O Emisyonları ve İlgili Düzenlemeler	9
2.2. Denitrifikasyon Prosesi ve N ₂ O	13
2.2.1. Arıtma Teknolojilerinde Denitrifikasyon	14
2.2.2. Denitrifikasyonu Etkileyen Faktörler	15
2.3. Kısmi Denitrifikasyon ile N ₂ O Birikimi	17
2.3.1. N ₂ O Üretimini Etkileyen Faktörler	18
2.3.2. Kısmi Denitrifikasyon Yapan Türler	18
2.3.3. Son Ürün N ₂ O’nun Enerji Amaçlı Kullanımı	18
3. MATERYAL METOT	20
3.1. Deneysel Sistem	20
3.1.1. Kesikli Biyoreaktör	20

3.1.2. Biyoreaktörün Aşılması ve Besiyeri ile Ortam Koşullarının Hazırlanması	21
3.2. Kesikli Biyoreaktörün Çalışma Şartları ve Süreleri	21
3.3. Kesikli Biyoreaktörde Sürekli İzlenen Parametreler	24
3.3.1. AKM Ölçümü	24
3.3.2. KOİ Ölçümü	25
3.3.3. pH Ölçümü	26
3.3.4. Nitrat Ölçümü	26
3.3.5. Nitrit Ölçümü	27
3.3.6. Gaz Ölçümleri	27
3.4. Kesikli Biyoreaktördeki Türlerin Teşhisi	28
3.4.1. Türlerin İzolasyonu	29
3.4.2. Genomik DNA izolasyonu ve Tür teşhisi	29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1. Besiyeri ve Ortam Koşullarının Bakteri Büyüme Kinetiğine Etkisi	31
4.1.1. Nitrit ile Beslenen Kesikli Biyoreaktörde Bakteri Büyüme Kinetiği	31
4.1.2. Nitrat ile Beslenen Kesikli Biyoreaktörde Bakteri Büyüme Kinetiği	35
4.2. Karbon Kaynağının Denitrifikasyon Kinetiğine Etkisi	38
4.2.1. Karbon Kaynağının Nitrit İndirgenmesine Etkisi	38
4.2.2. Karbon Kaynağının Nitrat İndirgenmesine Etkisi	41
4.3. Besiyeri ve Ortam Koşullarının N ₂ O Gazı Çıkışına Etkisi	42
4.4. Bakteri Profili	45
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
CFC	: Kloroflorokarbon
AKM	: Askıda katı madde
SBR	: Ardışık Kesikli Reaktör
AKAKDO	: Arazi Kullanım Değişikliği ve Ormancılık
DO	: Çözünmüş Oksijen
OD	: Optik Density
KOİ	: Kimyasal oksijen ihtiyacı
ΔH	: Kimyasal enerji
TCD	: Termal İletkenlik Dedektörü
SMP	: Çözünmüş mikrobiyal hücre ürünleri
STR	: Çamur alıkonma süresi (saat)
WWTP	: Atıksu Arıtma Tesis

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1:	2009 yılı sektörel sera gazı emisyonları. 10
2.2:	Sektörel sera gazı emisyonları 1990-2009. 10
2.3:	Toplam emisyonların sera gazları türlerine göre payları (1990-2009). 11
2.4:	Toplam emisyonların sera gazları türlerine göre payları (1990-2009). 12
2.5:	1990 ve 2009 yıllarında N2O emisyonlarının sektörel dağılımı. 12
2.6:	1990 ve 2009 yılları N2O emisyonları sektörel payları. 13
3.1:	Kesikli biyoreaktör düzeneği. 20
3.2:	Kesikli biyoreaktörlerin argon gazı ile oksijensizleştirilmesi. 21
3.3:	Aneorobik kabin içerisinde türlerin ekimi. 29
4.1:	Set 1- Nitrit 1. C: N=1 olan kesikli biyoreaktördeki mikroorganizma büyüme grafiği. 32
4.2:	Set 2-Nitrit 1 C: N=1 olan kesikli biyoreaktördeki mikroorganizma büyüme grafiği. 33
4.3:	Set3-Nitrit 2. C: N=2,5 olan kesikli biyoreaktördeki mikroorganizma büyüme grafiği. 34
4.4:	Set 4-Nitrit 2 C: N=2,5 olan kesikli biyoreaktördeki mikroorganizma büyüme grafiği. 34
4.5:	Kesikli biyoreaktörlerdeki Mikroorganizmaların büyüme grafiği. 35
4.6:	Nitrat 1 C: N=1 olan kesikli biyoreaktördeki mikroorganizma büyüme grafiği. 36
4.7:	Nitrat 1 C: N=2.5 olan kesikli biyoreaktördeki mikroorganizma büyüme grafiği. 37
4.8:	Nitrat beslemeli ortamda mikroorganizma büyüme grafiği. 37
4.9:	Set 1 C: N=1 olan kesikli biyoreaktördeki karışık bakteri profili. 39
4.10:	Set 2 C: N=1 olan kesikli biyoreaktördeki karışık bakteri profili. 39

4.11:	Set 3 C: N=2.5 olan kesikli biyoreaktördeki karışık bakteri profili.	40
4.12:	Set 4 C: N=2.5 olan kesikli biyoreaktördeki karışık bakteri profili.	40
4.13:	Kesikli biyoreaktörlerdeki Nitrit Konsantrasyon grafiği.	40
4.14:	Nitrat konsantrasyonunu C: N=1.	41
4.15:	Nitrat konsantrasyonu C:N=2.5.	42
4.16:	Yüzdelik gaz ölçüm grafiği.	44
4.17:	Karışık mikroorganizma kolonileri.	45
4.18:	İzole edilen mikroorganizma kolonileri	46
4.19:	Genomik DNA izolasyonu.	47

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Kesikli biyoreaktörlerdeki nitrit beslemeli besiyeri ve ortam koşulları.	22
3.2: Kesikli biyoreaktörlerdeki nitrat beslemeli besiyeri ve ortam koşulları.	24
4.1: Kontrollü ikişer grup halinde 4 deney seti şeklindeki kesikli biyoreaktörlerdeki büyüme kinetiği.	32
4.2: Nitrat beslemeli kesikli biyoreaktör deney setinin büyüme kinetiği.	36
4.3: Farklı C: N oranlarına göre kesikli biyoreaktördeki nitrit konsantrasyonu.	38
4.4: Farklı C: N oranlarına göre kesikli biyoreaktördeki nitrat konsantrasyonu.	41
4.5: Kesikli biyoreaktördeki nitrit beslemeli besiyeri.	43
4.6: Kesikli biyoreaktörlerdeki gaz ölçümleri.	44
4.7: 16SrRNA benzerliğine göre izolatların tür analizi.	48

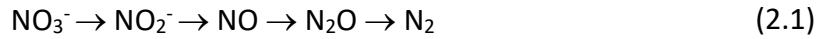
1. GİRİŞ

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Gebze Teknik Üniversitesi'nde Çevre Mühendisliği bölümünde hava kirliliği kontrol teknolojilerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar 2007'den bu yana başlamış olup, bu kapsamda SO₂ ve NO_x gazları için kontrol sistemleri tasarlayan projeler gerçekleştirilmiştir. Son beş yılda, biyolojik yöntemlerle kirletici gazların arıtımı ile ilgili, NO_x gazlarının denitrifikasyon yoluyla N₂ gazına indirgenmesini sağlayan biyoreaktörler denenmiştir. Denitrifikasyon ile NO gazı, önce N₂O'ya sonra da N₂'ye indirgenmektedir. N₂O gazının ısıtma potansiyeli yüksek bir sera gazı olması tam denitrifikasyon sağlanarak N₂ şeklinde sistemi terk etmesine uygun olarak sistemler çalıştırılmıştır. Ancak N₂O'nun aynı zamanda enerji amaçlı kullanımını gösteren çalışmalar mevcuttur. Özellikle arıtma tesislerinden kaynaklanan N₂O'nun bu şekilde ısı ayrışma ile enerjiye çevrilerek arıtma tesislerinden kaynaklanan sera gazı salınımlarını azaltması hedeflenmiştir. Denitrifikasyon kısmi olarak gerçekleşirse ara ürün N₂O denitrifikasyondaki son ürün olmaktadır. Böylece bir sonraki basamağa geçmek için gereken karbon kaynağından tasarruf edilerek, enerji üretimi gerçekleştirilebilecektir. Çalışmalarda kısmi denitrifikasyon için gereken optimum şartların farklı zamanlarda nitrat ve karbon kaynağı beslemesi ile maksimum düzeyde sağlanabileceği gösterilmiştir. Belirli bir azot kaynağına karşılık hangi besleme şartlarının N₂O üretimini artıracak ve nasıl bir mikroorganizma çeşitliliği sağlayacak bu proje kapsamında yapılacak kesikli biyoreaktördeki denemelerle belirlenmeye çalışılmıştır. Denitrifikasyon sürecinin gerçekleştiği pilot bir biyoreaktörden aşılacak belirlenmiş şartlarda farklı karbon ve azot oranı (C:N) ile farklı besi yeri içeriğine maruz bırakılan mikroorganizmalarca zenginleştirilmiş kültürün kesikli biyoreaktörlerde oluşturdukları denitrifikasyon ürünleri takip edilecek, N₂O üretiminin fazla olduğu şartlar ve farklı şartlarda biyoreaktörde bulunan mikroorganizmaların izolasyonu ve teşhisi gerçekleştirilecektir.

2. DENİTRİFİKASYON ARA ÜRÜNÜ OLARAK N₂O GAZI

Genel anlamda denitrifikasyon, nitrat veya nitritin NO, N₂O veya N₂ gazlı azot türlerine indirgenmesini sağlayan bir grup süreç olarak tanımlanabilir. Bu tanımla, çeşitli abiyotik reaksiyonlar, mikroplarla solunum, NO₃⁻ indirgemesi ve solunumsuz N₂O proüdüksiyonuna denitrifikasyon adı verilmektedir. Denitrifikasyon, azot oksit indirgemesinin elektron taşıma fosforilasyonuna bağlandığı bakterilerde bir anaerobik solunum şeklini tanımlar. Denitrifikasyon N₂O ve NO üreten ve tüketebilen tek biyotik veya abiyotik süreçtir. Dolayısıyla bu bakteriyel süreç, küresel N⁻ iz gaz dinamiklerinde merkezi bir rol oynamaktadır. Bu tartışma için, N-oksit indirgemesi için aşağıdaki sırayı kullanacağız:



Denitrifikasyon sırasında üretilen azot dizisi birkaç yıldan beri bilinmekle birlikte, NO₂'nin N₂O'ya indirgenmesinde yer alan tam indirgeyici dizilim ve enzimoloji, güncel tartışmalara konu olmaktadır. Bununla birlikte, önerilen tüm yollarda, N₂O bir ara maddedir ve NO, indirgeyici sırada bir ara madde gibi davranır [1].

2.1. N₂O Gazı ve Sera Etkisi

Dünyanın ışınlam bütçesi dünyaya ulaşan, yansıtılan ve tutulan ışıma akılarının hesabından oluşur ve uzun vadede dengede olduğu öngörülür. Güneş enerjisi kısa dalga boyu ışınlam olarak yeryüzüne ulaşır. Gelen ışınlamların bir kısmı, yeryüzü ve atmosfer tarafından geri yansıtılır. Büyük kısmı ise, atmosferden geçerek yeryüzünü ısıtır. Yeryüzü ısınan bir kütle olarak, uzun dalga boyu, kızılötesi ışınlam yapar (başka bir deyişle onu uzaya geri yansıtır). Dünyanın yüzeyi tarafından yukarıya salınan kızılötesi ışınlamının büyük kısmı atmosferdeki karbondioksit, su buharı ve doğal yollarla oluşan diğer “sera gazları” tarafından soğrulur. Bu gazlar enerjinin, dünya yüzeyinden geldiği gibi doğrudan uzaya yansımalarını engeller. Birbiriyle bağlantılı

olan birçok olgular dizisi (ışınım, hava akımları, bulut oluşumu, buharlaşma, ve yağış dahil) enerjiyi atmosferin daha üst tabakalarına taşır ve oradan uzaya böylece daha yavaş ve dolaylı bir süreçle aktarır; yeryüzünün yüzeyi enerjiyi uzaya tamamıyla gönderseydi dünya soğuk ve yaşanmaz bir yer olurdu [2].

Atmosfer çeşitli gazlardan oluşur. Güneş ışınları atmosferi geçerek yeryüzünü ısıtır. Atmosferdeki CO₂, CH₄, N₂O, O₃, CFC gibi gazlar, ısınan, yeryüzünden salınan ısının bir kısmını tutarak yeryüzünün belirli sıcaklık derecesinde kalmasını sağlar. Atmosferin ısıyı tutma özelliği sayesinde denizlerin, okyanusların donması önlenmiş olur. Atmosferin bu ısınma ve ısıyı tutma özelliğine sera etkisi denir [3].

Atmosferde en çok sera etkisi yapan gazlar sırasıyla Karbondioksit (CO₂), Metan (CH₄), Diazotoksit –azotprotoksit veya nitröz oksit-(N₂O), Ozon (O₃), Karbon monoksit (CO) ve Halokarbonlar (CFC gibi)’dir. Ayrıca su buharı da sera etkisi yapan gazlar arasında sayılmaktadır. Nitröz oksit güçlü bir sera gazıdır. N₂O 'nun küresel ısınma potansiyeli (GWP) 100 yıllık bir zaman diliminde CO₂'den 298 kat daha fazladır ve N₂O'nun sera gazı kaynaklı küresel ısınma etkisinin yaklaşık %6'sına katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir. Stratosferde, N₂O oksitlenerek NO ve NO₂ oluşur. Bu azot oksitler, ozonun tahrip edilmesini katalize eder, 21. yüzyılda N₂O en önemli ozon tüketen emisyon haline gelmiştir. Sanayi Devriminden bu yana bu gazlar %17 oranında bir artış göstermiştir. Sera etkisinin %15'inin diazotoksit gazından kaynaklandığı düşünülmektedir Stratosferde kısa dalga boylu güneş ışığının etkisiyle fotokimyasal olarak atomlarına ayrılarak N₂O atmosferden eksilmektedir [2].

2.1.1. N₂O Gazı Kaynakları

Nitröz oksit emisyonları hem doğal hem de insan kaynakları tarafından üretilir. Önemli doğal kaynaklar doğal bitki örtüsünün altında kalan toprakları ve okyanusları kapsar. Doğal kaynaklar toplam emisyonların %62'sini oluşturur. Önemli insan kaynakları tarım, fosil yakıt yanması ve endüstriyel süreçlerden gelir. İnsan kaynaklı kaynaklar toplam emisyonların %38'inden sorumludur. Bu, nitröz oksit emisyonlarını endüstriyel öncesi seviyelere göre yaklaşık %40-50 oranında arttırmıştır.

Sanayi Devrimi'nden önce nitröz oksitin atmosferik konsantrasyonu, doğal yutaklar nedeniyle, güvenli bir seviyede kalmıştır. Fakat uzun süredir insan faaliyetleri, Dünya'nın onları kaldıracabileceğinden çok daha hızlı emisyon üretmektedir. Günümüzde nitröz oksit seviyeleri son 800.000 yılda diğer zamanlara göre daha yüksektir.

2.1.1.1. Nitröz Oksit Emisyonları: İnsan Kaynakları

Sanayi Devrimi'nden bu yana insan kaynaklı nitröz oksit emisyonları artmaktadır. Tarım, fosil yakıt yakma ve endüstriyel prosesler gibi faaliyetler, atmosferdeki artan nitröz oksit konsantrasyonlarının başlıca nedenidir. Bununla birlikte bu kaynaklar nitröz oksit emisyonlarının %77'sinden sorumludur. Diğer kaynaklar arasında biokütle yakma (%10), atmosferik çökeltme (%9) ve kanalizasyonlardan olan salınımlar (%3)'ü oluşturmaktadır [4].

- Tarım

Nitröz oksit emisyonlarının en büyük insan yapımı, tarımdan elde edilen kısım %67'dir. Tarım doğrudan ve dolaylı emisyonlar yaratır. Doğrudan emisyonlar gübrelenmiş tarım topraklarından ve hayvan gübresinden gelir (%42). Dolaylı emisyonlar gübrelerin akışı ve sızıntısından kaynaklanırken (%25). Tarım, yılda 4,5 milyon ton nitröz oksit oluşturmaktadır.

Bitkiler ve hayvanlar tarafından azot alımının verimsizliği nedeniyle, sadece reaktif azotun yaklaşık %10-15'i gıda olarak bir insan tarafından besin olarak alınır. Gerisi çevre içinde kaybolur. Sanayileşmiş tarım uygulamaları bu kayıpları daha da kötüleştirmiş ve sonuç olarak emisyon artmıştır. Bu nedenle, tarım, nitröz oksit emisyonlarının en önemli insan yapımı kaynağıdır [4].

- Gübrelenmiş Tarım Toprakları

Tarım için sentetik gübre kullanımı, nitröz oksit emisyonlarının önemli bir kaynağıdır. Gübreler doğrudan topraklara azot ilave ederek bitkilere yardım eder. Fakat; topraktaki bakteriler bu fazladan azotu kullanır, yaşamak ve büyümek gibi

faaliyetlerinde ihtiyaç duyduğu enerjiyi üretmek için kullanır. Nitrifikasyon ve denitrifikasyonun mikrobiyal süreçleri, daha sonra atmosfere salınacak olan nitröz oksit üretir. Benzer şekilde, gübreyi gübre olarak kullanmak da tarım topraklarından emisyonlara neden olur. Nitröz oksit, topraklar sıcak ve nemli olduğunda hızlı bir şekilde oluşabilir ve hazır bir reaktif azot kaynağı da içerir. Sentetik gübreler, üretilen gıdanın kalitesinin yanı sıra çevre üzerinde ağır bir gerilime neden olur. Bu sentetik kimyasallar, bitkiler tarafından absorbe edilir. Bunun dışında, ana madde olduğu için sentetik gübrelerin üretilmesi için büyük miktarlarda doğal gaz kullanılır. Üretim süreci de çok miktarda enerji gerektiren ve bu nedenle iklim değişikliği üzerindeki etkilerinin daha büyük oluyor olmasına sebep olur [4].

- Hayvancılık Gübresi

Hayvancılık gübresinin depolanması ve taşınması, tarımsal nitröz oksit emisyonlarının doğrudan bir kaynağıdır. Hayvancılık gübresi, gübre olarak kullanılmadığında veya otlatma sırasında arazilerde bırakıldığında, hayvan atık yönetim sistemlerinde arıtmak ve bertaraf etmek için saklanmalıdır. Bu sistemlerin birçoğu, nitröz oksit üreten bakteriler için uygun koşullar yaratır. Topraklarda azotlu oksit üretmekle sorumlu olan aynı mikrobiyolojik süreçler, nitrifikasyon ve denitrifikasyonda, gübrede azot ayrışması esnasında ortaya çıkan nitröz oksitten sorumludur. Dolayısıyla tavuk, sığır eti ve süt çiftlikleri gibi yerlerde önemli miktarlarda nitröz oksit üretilir.

Yoğun hayvancılık sistemleri azot kullanım verimliliğine sahiptir ve büyük miktarlarda kayıp yaratır. Hayvan yeminde yutulan azotun yalnızca küçük bir kısmı (yaklaşık %5-30) süt, et ve yumurta da tutulur. Toplu kısım, %70-95, hayvan atığı ile kaybedilmiş olur. Bu fazladan azot, çevreye eklenir ve nitröz oksit emisyonlarında artışa neden olur [4].

- Sızıntı ve Gübreleme

Tarımsal topraklardan çıkan gübrelerin akması ve süzülmesi, dolaylı olarak nitröz oksit kaynağıdır. Yağış ya da sulama suyu, gübrelerde reaktif azotun bir kısmının ya yeraltı sularına sızmasına ya da drenaj hendeklerine yıkılmasına, sonuçta akan nehirlerle, nehir ve kıyı bölgelerine akmasına neden olur. Bu durum alanlardaki

azot seviyelerini arttırır ve mikroorganizmalar nitröz oksit emisyonlarına neden olan azot oksitlerin parçalanmasına yardımcı olur. Gübrelerin aşırı kullanımı ya da yağışın aşırı derecede artması, sızıntının etkilerini daha da kötüleştirir.

Nehirler, nehir ve kıyı suları kaynaklı nitröz oksit emisyonları genellikle insan kaynaklı olarak kabul edilir, çünkü bu ekosistemlere giren reaktif azotun büyük kısmı tarımsal faaliyetlerle ilişkilendirilmiştir [4].

- Fosil Yakıt Yakma ve Endüstriyel Prosesler

Fosil yakıt yakma ve endüstriyel prosesler, diazot oksit emisyonlarının önemli bir kaynağıdır. İnsan emisyonlarının %10'unu oluştururlar ve yılda yaklaşık 700,000 ton diazot oksit bu kaynaklardan havaya verilir.

Nitröz oksit, mobil ve sabit kaynaklarda yakıt yanmasının bir yan ürünüdür. Herhangi bir fosil yakıt yakıldığında, yakıtta ve çevredeki havadaki azotun bir kısmı oksidize olur ve diazot oksit emisyonu oluşturur. Sabit emisyonların çoğu kömürle çalışan elektrik santrallerinden gelmektedir. Mobil emisyonlara gelince, hemen hemen hepsi, ulaşım ve taşımacılık faaliyetleri için kullanılan arabalar ve kamyonlardan gelir.

Endüstriyel prosesler ayrıca diazot oksit emisyonlarına neden olur. İki ana sanayi kaynağı, nitrik ve adipik asit üretimidir. Nitrik asit, sentetik gübreler için önemli bir katkı maddesi iken, adipik asit esas olarak sentetik lifler yapmak için kullanılır. Bu asitlerden her ikisi için, üretim süreci boyunca nitrojen bileşiklerinin oksidasyonu nitröz oksit oluşturur [4].

- Biyokütle Yakma

Az miktarda nitröz oksit, insan kaynaklı emisyonların %10'unu oluşturan biyokütle yakılmasından kaynaklanır. Biyokütle yakma, canlı ve ölü bitki örtüsünün yakılmasıdır. Bu yangınlarda, biyokütledeki azotun bir kısmı ve çevreleyen hava oksidize edilerek diazot oksit emisyonu oluşur.

Büyük açık yangınlar temel olarak insanlar tarafından tarımsal veya diğer kullanımlar için ürün atığı yok etmek ve temiz arazi kullanmak için kullanılır. Doğal orman yangınları buna katkıda bulunabilirken, biyokütle yakmanın büyük çoğunluğu insandan kaynaklanmaktadır. Yılda 700,000 ton diazot oksit oluşturmaktadır [5].

- Atmosferik Birikim

Atmosferik çökelme, Nitröz oksit emisyonlarının önemli bir insani kaynağıdır. İnsan faaliyetleri azot bileşiklerini havaya bırakır ve sonuçta dünya yüzeyine geri düşer. Bununla birlikte, artan emisyonlara neden olan nitrifikasyon ve denitrifikasyon mikroorganizmaları uyaran mevcut azot kaynağı ile ekosisteme katkı sağlanmış ve insan kaynaklı emisyonlarında %9'unu oluşturmuş olmaktadır. Gübrelerden kaynaklanan buharlar ve fosil yakıt ya da biyokütle yakma kaynaklı duman reaktif nitrojen gazı içerir. Bu gazlar sonunda atmosfere geçer yağmur ile birlikte toprağa düşerek toza ve polenlere tutunmuş olur. Atmosferik birikim, yılda 700,000 ton diazot oksit üretmektedir [4].

- Kanalizasyon Sistemleri

Hayvan atıklarında olduğu gibi, insan atıkları da nitröz oksit emisyonlarının önemli bir kaynağıdır. Atık su depolamak ve arıtmak için kanalizasyon tesisleri ve fosseptik tankları kullanılır. Bu sistemlerin birçoğu, nitröz oksit üreten bakteriler için uygun koşullar yaratır. İnsan kanalizasyonu insan emisyonlarının %3'ünü üretir.

Bakteriler insan atıklarında (üre, amonyak ve proteinler) bulunan azot bazlı organik maddeleri parçalamak için nitrifikasyon ve denitrifikasyon işlemlerini kullanırlar. Yılda 200.000 ton diazot oksit bu şekilde oluşur [4].

2.1.1.2. Nitröz Oksit Emisyonları: Doğal Kaynaklar

İnsan faaliyetleri tarafından yaratılmasının yanı sıra, nitröz oksit de doğal süreçlerle atmosfere salınır. Dünya'nın toprakları, okyanuslar ve atmosfer, doğal olarak diazot oksit emisyonlarının doğal kaynağıdır.

Nitröz oksit insan kaynakları, doğal emisyonlardan daha küçük olmakla beraber, Sanayi Devrimi'nden sonra mevcut olan azot döngüsündeki dengelerin bozulduğu gözlenmiştir Doğal kaynaklardan üretilen diazot oksit miktarı binlerce yıldır tamamen doğal yutaklarla dengelenir. İnsanın etkisi olmadan önce, bu doğal dengeden dolayı diazot oksit seviyeleri oldukça sabitti.

Doğal bitki örtüsü altındaki topraklar, doğal olarak üretilen emisyonların %60'ını oluşturan diazot oksit için önemli bir kaynaktır. Diğer doğal kaynaklar okyanusları (%35) ve atmosferik kimyasal reaksiyonları (%5) içermektedir [4].

- Doğal Bitki Örtüsü Altındaki Topraklar

Diazot oksidin en büyük doğal kaynağı, doğal bitki örtüsü altındaki topraklardan gelmektedir. Bu, doğal emisyonların %60'ını üretir. Yani doğal bitki örtüsü altındaki topraklarda azotu parçalayan mikroorganizmalar tarafından üretilen diazot oksit doğal kaynaklar olarak kabul edilir.

Riparian ve tropikal yağmur ormanı toprakları, besin elementinin bulunabilirliği ve nem seviyesi daha yüksek olduğu için mikroorganizmalara besin kaynağı olmasında önemli katkıda bulunmaktadır. Bu, mikrobiyal nitrifikasyon ve denitrifikasyonu kolaylaştırır. Doğal vejetasyon altındaki topraklar her yıl 6.6 milyon ton diazot oksit oluşturur [4].

- Okyanuslar

Nitröz oksit emisyonlarının önemli bir doğal kaynağı okyanuslardan gelir. Okyanusta yaşayan diazot oksit üreten mikroorganizmalar bu emisyonları yaratmaktadır. Bu da yılda 3,8 milyon ton diazot oksit yani doğal emisyonların %35'ini üretmektedir.

Okyanuslardaki diazot oksidin büyük kısmı, dışkı parçacıkları gibi batan parçacıklardaki ve çevresinde bulunan mikrobiyolojik aktiviteden kaynaklanmaktadır. Bu parçacıklar denitrifikasyon için gerekli anaerobik koşulları sağlar, bu da yan ürün olarak diazot oksit oluşturur [4].

- Atmosferik Kimyasal Reaksiyonlar

Atmosferdeki kimyasal reaksiyonlar, önemli miktarda diazot oksit emisyonu üretir. Atmosfer, emisyonların %5'ini oluşturan amonyak oksidasyonu yoluyla azot oksit için bir kaynak görevi görür. Atmosfer amonyağı doğal bir gaz olarak oluşturur. Okyanuslar, vahşi hayvanlardan elde edilen gübre, yaşlanma ve çürümekte olan bitkiler, havadaki amonyak açısından en önemli doğal kaynakları oluşturmaktadır.

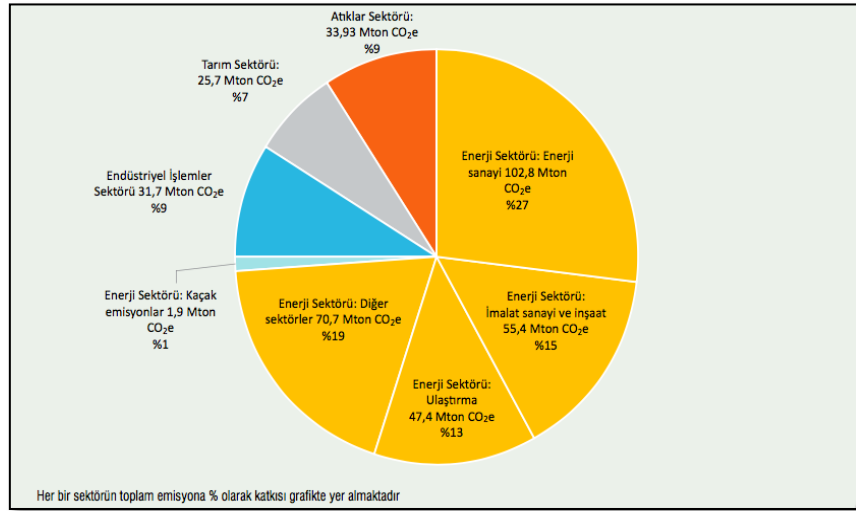
Amonyakın doğal kaynaklardan oksitlenmesi, yılda 600.000 ton diazot oksit oluşturur [4].

2.1.2. N₂O Emisyonlarının Kontrol Yöntemleri

Nitrit, nitrit yoluyla nitrojenin giderilmesinin avantajlarını zayıflatan N₂O üretimine neden olan önemli bir faktör olarak yaygın olarak bilinmektedir. Atık su arıtma tesislerinden N₂O üretimini azaltmak ve kontrol altına almak için gerçek evsel atık suyun nitritle azot giderme sırasında N₂O üretiminin ana kaynağını ve yollarını araştırmak için uzun süreli ve toplu testler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, nitrit yoluyla nitrojenin giderilmesi sırasında N₂O üretiminin, nitrat yoluyla azot uzaklaştırma sırasında N₂O üretiminin 1,5 katı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, amonyak oksidasyonunun, evsel atık sudan azot uzaklaştırılması sırasında N₂O üretiminin ana kaynağı olduğu gösterilmiştir; Nitrit oksitlenmesi ve anoksik denitrifikasyon sırasında hemen hemen hiç N₂O üretilmemiştir. Nitrit yoluyla azot giderimi sırasında N₂O üretimi, N₂O üretiminin öncüllerinden nitritin ve amonyakın etkin kontrolü sayesinde kademeli besleme SBR uygulanarak yaklaşık %50 azalmıştır. Bu nedenle, kademeli besleme sistemi, evsel atık sudan nitrit yoluyla nitrojen giderimi sırasında N₂O üretimini azaltmak için etkili bir yöntem olarak önerilir [6].

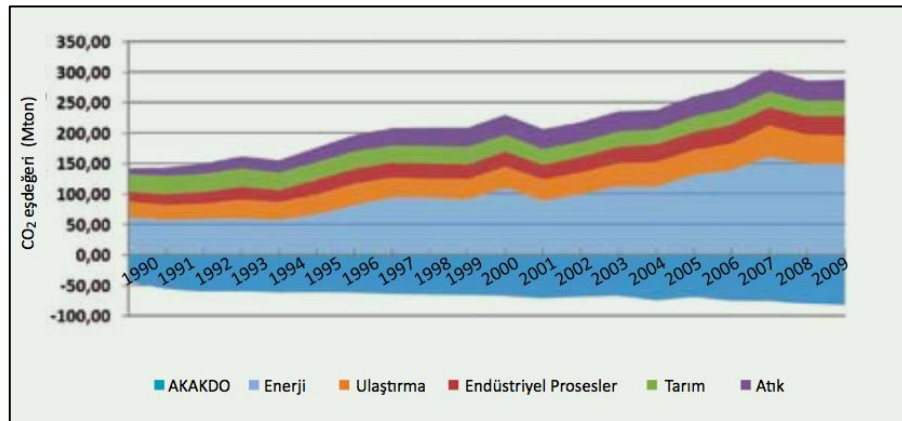
2.1.3. Türkiye’ de N₂O Emisyonları ve İlgili Düzenlemeler

T.C. Çevre ve Şehircilik Bakanlığı’nın yayınladığı Türkiye İklim Değişikliği 5. Bildirimi raporunda sera gazlarından N₂O gazı emisyon düzenlemeleri sunulmuştur. Sera Gazı Emisyonlarının Takibi Hakkında Yönetmelik (17 Mayıs 2014 tarihli ve 29003 sayılı Resmî Gazete) ve bu yönetmelikteki kapsamı detaylandıran Sera Gazı Emisyonlarının İzlenmesi ve Raporlanması Hakkında Tebliğ (22 Temmuz 2014 tarihli ve 29068 sayılı Resmî Gazete) yayımlanmıştır. Bu mevzuatın yürürlüğe girmesini takiben, Sera Gazı Emisyonlarının Doğrulanması ve Doğrulamayı Kuruluşların Yetkilendirilmesi Tebliği (02.04.2015 tarihli ve 29314 sayılı Resmî Gazete) yayınlanmıştır.



Şekil 2.1: 2009 yılı sektörel sera gazı emisyonları.

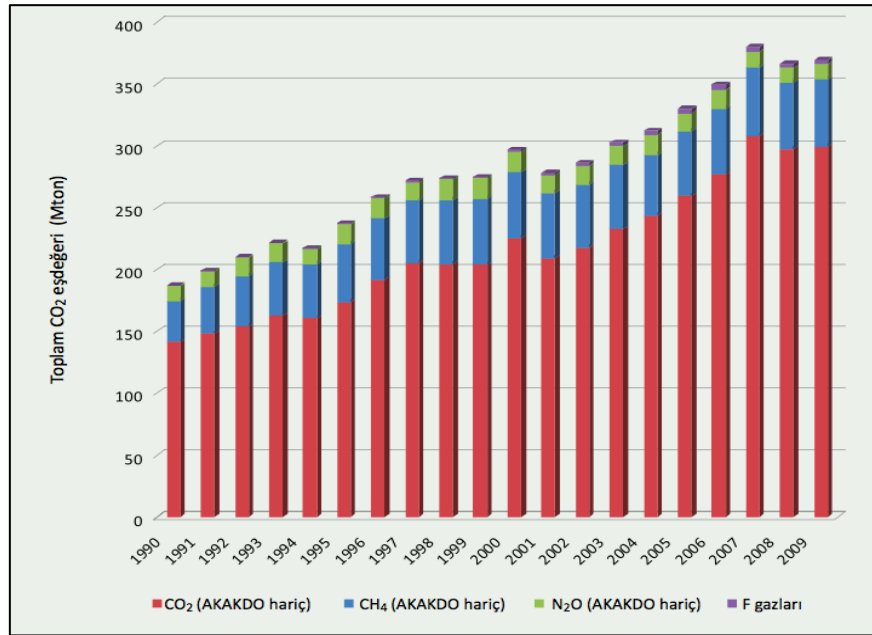
Türkiye'nin 2009 yılı toplam sera gazı emisyonu arazi kullanımı, arazi kullanım değişikliği ve ormancılık (AKAKDO hariç CO₂ eş değeri cinsinden 369,65 milyon ton'dur. Bunun %75,3'ü enerji, %9,2'si atık, %8,6'sı endüstriyel işlemler ve %7'si tarım sektöründen kaynaklanmaktadır (Şekil 2 .1) [7]. Enerji sektörü emisyonlarının büyük çoğunluğu yakıtların yanmasından kaynaklanmakta olup, yakıt yanmasından kaynaklı sera gazı emisyonlarının toplam enerji emisyonları içerisindeki payı %36,94 enerji, %20,39 konut ve hizmetler, %19,91 imalat, %17,04 ulaştırma ve %5 tarım alt sektörleridir. Kişi başı sera gazı emisyonu 1990 yılında 3,39 ton CO₂ eş değeri iken, 2009 yılında 5,13 ton CO₂ eş değerine çıkmıştır (AKAKDO hariç). Ancak bu değer, dünya ortalaması olan 4,29 ton CO₂ eş değeri/kişi değerine ise yakındır.



Şekil

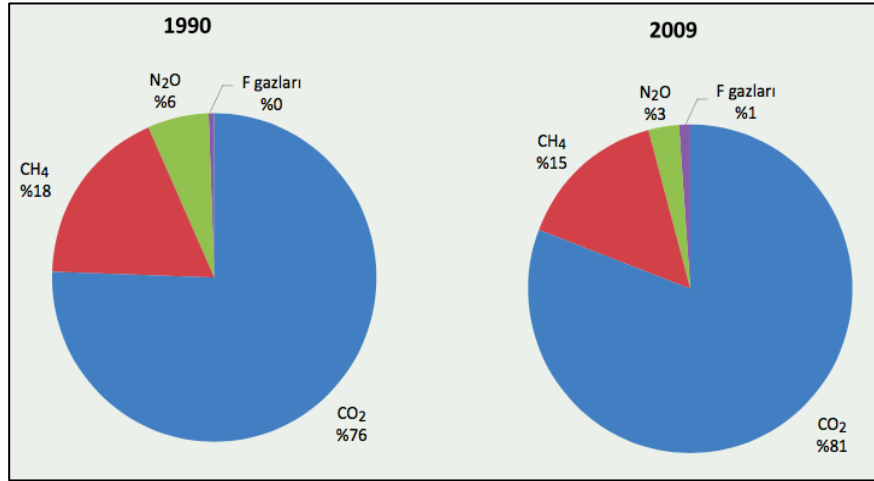
2.2: Sektörel sera gazı emisyonları 1990-2009.

Şekil 2 .2’de farklı kaynaklardan yayılan CO₂ miktarlarının 1990’dan itibaren değişimine bakıldığında genel olarak tüm sektörlerde artan bir emisyon eğilimi gözlenmektedir (Şekil 2.2) [7]. 1990 yılı verileri ile karşılaştırıldığında 2009 yılında en yüksek artış %250 ile atık sektöründe gözlenirken sadece tarım sektöründe %14’lük bir azalma görülmektedir.



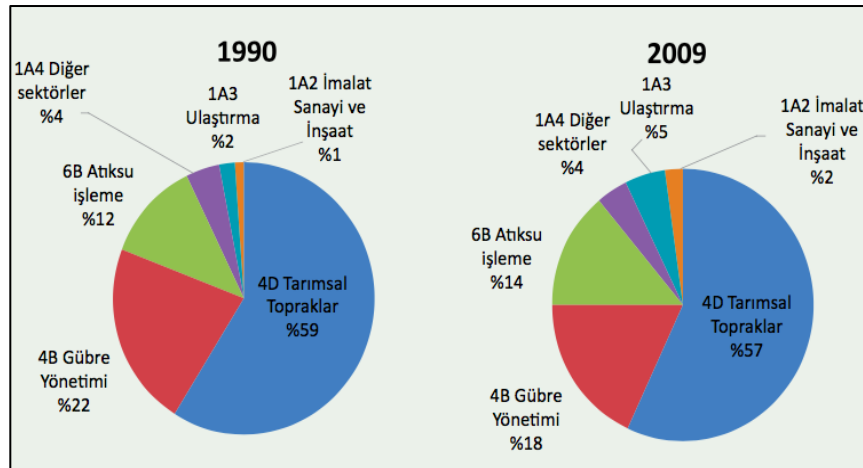
Şekil 2.3: Toplam emisyonların sera gazları türlerine göre payları (1990-2009).

1990-2009 yılları arasında emisyon değeri en yüksek olan sera gazı karbondioksit olup bunu CH₄, N₂O ve F-gazları takip etmektedir. Emisyonlarda genel olarak yıllar içinde artış gözlenirken, N₂O emisyonlarında 2000 yılından itibaren hafif bir azalma eğilimi görülmektedir (Şekil 2.3) [7]. 2009 yılı için CO₂ emisyonları 299,11 Mton CO₂ eş değeri (%80,92), CH₄ emisyonları 54,37 Mton CO₂ eş değeri (%14,71), N₂O emisyonları 12,53 Mton CO₂ eş değeri (%3,39) ve F-gazları emisyonları 3,64 Mton CO₂ eş değeri (%0,99) olarak verilmiştir.



Şekil 2.4: Toplam emisyonların sera gazları türlerine göre payları (1990-2009).

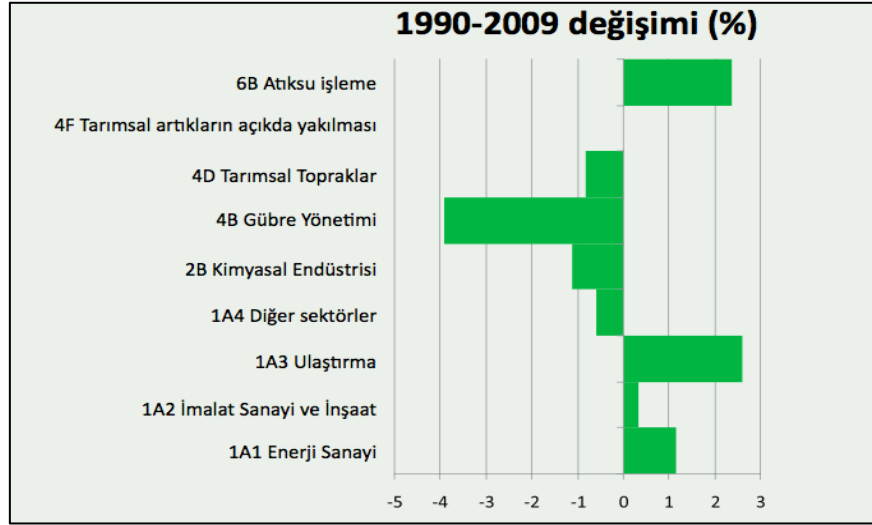
1990-2009 döneminde, CO₂ emisyonlarının tüm emisyonlar içindeki payı %76'dan %81'e ve F gazlarının payı %0,4'den %1'e çıkmış, aynı dönemde metan emisyonlarının payı %18'den %15'e, diazot oksit emisyonlarının payları ise %6'dan %3'e düşmüştür (Şekil 2 .4) [7]. Ancak miktar olarak 1990 yılında 37,31 Gg olan diazotmonoksit emisyonu 2009 yılında %8,3 oranında bir artış göstererek 40,42 Gga olmuştur [7].



Şekil 2.5: 1990 ve 2009 yıllarında N₂O emisyonlarının sektörel dağılımı.

En önemli diazot oksit kaynağını, tarım alanlarında azotlu gübre kullanımı ve hayvansal atıklar oluşturmaktadır [7]. Hem 1990 hem 2009 yılı için önemli diazot

oksit kaynaklarının payları sırasıyla tarımsal topraklar, gübre yönetimi ve atık su işleme olmuştur. (Şekil 2.5) ve (Şekil 2.6) [7]. 2008 yılında artan gübre fiyatı ve aynı yıl gözlenen kuraklık nedeniyle ekili tarım arazi varlığında azalmaya ve dolayısıyla da azalan sentetik gübre miktarına bağlı olarak diazot monoksit emisyonlarında 2009 yılında %8,3 önemli bir azalış görülürken Atıksu işleme, ulaştırma ve enerji sanayi Sektörlerinde %1-3 arasında bir artış görülmüştür.



Şekil 2.6: 1990 ve 2009 yılları N₂O emisyonları sektörel payları.

2.2. Denitrifikasyon Prosesi ve N₂O

Denitrifikasyon, anoksik koşullar altında nitratın(NO₃⁻) nitrite(NO₂⁻), nitritin nitrik okside(NO) ve nitroz okside(N₂O) ve son olarak azot gazına (N₂) indirgenmesi olayıdır. Denitrifikasyon bir solunum olayı olduğundan, enerji kaynağı olarak oksitlenebilir bir substrata ya da elektron vericiye ihtiyaç duyar [8].

Denitrifikasyonun, prokaryotlara özgü bir özellik olduğu uzun zamandır düşünülmektedir. Çok sayıda bakteri, anaerobik solunum için temel elektron alıcısı olarak nitrat veya nitriti kullanarak denitrifikasyon yapar. Ayrıca, pek çok ipliksi mantar ve mayaların denitrifikasyon aktivitesi gerçekleştirdiği bulunmuştur. Ancak mantarların yaptığı denitrifikasyon bakterilerinkinden farklı ve eksiktir. Mantarlar,

N_2O redüktaz'ın yokluğundan dolayı, denitrifikasyon ürünü olarak dinitrojen (N_2) yerine nitroz oksit (N_2O) üretirler [9].

N_2O , denitrifikasyon işleminde bir ara madde olduğu için, kısmi denitrifikasyon N_2O emisyonuna neden olabilir. Birçok denitrifikasyon yapan mikroorganizma, yüksek enerji verimi nedeniyle tercihen oksijeni elektron alıcısı olarak kullanan fakültatif denitrifikatörlerdir. Bazı mikroorganizmalar hem aerobik hem de anoksik koşullar altında denitrifikasyon yapabilir, bu süreç aerobik denitrifikasyon olarak bilinir. Genellikle bu mikroorganizmalar heterotrofik nitrifikasyonu da katalize edebilir [10].

Denitrifikasyon bakterileri nitratı azot gazına çevirerek büyümeleri için gerekli enerjiyi elde ederler. Ancak hücre sentezi için bir karbon kaynağı gerekir. Heterotrofik denitrifikasyonda karbon kaynağı olarak metanol, etanol, glikoz, asetik asit ve formik asit gibi organik maddeler kullanılmaktadır [11].

2.2.1. Arıtma Teknolojilerinde Denitrifikasyon

Atık su arıtımında denitrifikasyon, serbest oksijen yerine elektron alıcısı olarak nitrat ve nitritin, kullanıldığı ve azot gazına indirgendiği çok basamaklı bir prosestir. Oluşan azot gazı, kabarcıklar halinde suyu terk eder. Biyolojik denitrifikasyon, atık su arıtımında önemli bir basamaktır. Azot gideriminde kullanılan amonyak sıyırma, kırılma noktası klorlaması ve iyon değişimi gibi bazı çeşitli yöntemlere karşın denitrifikasyon daha düşük maliyetle azot giderimi sağladığı için sıkça kullanılır. Denitrifikasyon sırasında nitrit ve nitratlar hücre sentezinde kullanılabilir. Ortamda NH_4-N (amonyum azotu) mevcut değilse, bakteriler nitratı amonyaka çevirerek yeni hücrelerin yapısına katarlar. Nitratın bu şekilde indirgendiği proseslere asimilasyon prosesi denir. Bundan başka, ortamda serbest oksijen olmadığı durumlarda, bakteriler nitratı bir elektron alıcısı olarak kullanır ve azot gazına indirgerler. Bu prosese de disimilasyon prosesi denir. Denitrifikasyon prosesi iki şekilde olabilmektedir. Bunlardan ilki, denitrifikasyon tankının, havalandırma tankından sonra yerleştirildiği sistemlerdir. Bu durumda, nitrifikasyonun gerçekleştiği havalandırma tankından denitrifikasyon tankına doğru yüksek miktarda nitrit ve nitrat ile az miktarda organik maddede geçiş yapar. Bu tip proseslere son-

anoksik (postanoxic) prosesler denmektedir. Bir diğ er denitrifikasyon prosesi ise  n-anoksik (pre-anoxic) proseslerdir.  n-anoksik proseslerde, giriş suyu öncelikle bir anoksik tanka alınır. Havalandırma işlemi ise anoksik tanktan sonra gerçekleştirilir. Son-anoksik ve  n-anoksik denitrifikasyon prosesleri olarak adlandırılır. Son-anoksik proseste nitrifikasyon, havalandırma tankında gerçekleşir. Nitrifikasyon prosesi neticesinde oluşturulan nitrit ve nitrat ise havalandırma tankını müteakip bir anoksik tankta denitrifikasyon prosesi ile giderilmektedir. Bu durumda, organik maddenin hemen hemen tamamı aerobik tankta oksitlendiğinden, denitrifikasyon tankında ihtiyaç duyulan organik madde dışarıdan verilmelidir. Dışarıdan verilen karbon, metil alkol ya da etil alkol formunda olabilir. Bu işlem ise tesisin işletme maliyetini büyük oranda etkileyeceğinden, anoksik tankta denitrifikasyon prosesinin i  solunumla gerçekleşmesi de sağlanabilmektedir. Ancak bu yöntem ile son-anoksik proseslerde elde edilen denitrifikasyon hızı,  n-anoksik proseslere göre çok daha düşük olmaktadır.

 n-anoksik proseste denitrifikasyon sırasında kullanılan elektron verici orjinal atık suda bulunan organik maddelerdir. Orijinal atık suda nitrat bulunmadığından, ortamda bir elektron alıcısı olması için, havalandırma tankı çıkışından anoksik tankın girişine nitrat geri devri yapılmak zorundadır. Denitrifikasyon işlemini gerçekleştiren mikroorganizmalar genellikle fakültatif aeroblardır. Fakültatif aeroblar oksijenin varlığında aerobik oksidasyon yaparlarken, ortamda sadece bağlı oksijenin (nitrit ve nitrat) bulunması durumunda, nitrit ve nitratı da elektron alıcı olarak kullanabilmektedirler [12].

2.2.2. Denitrifikasyonu Etkileyen Faktörler

- Nitrat Konsantrasyonu

Denitrifikasyonda nitrat elektron alıcı olarak kullanıldığından, nitrat konsantrasyon artıkça denitrifikasyon hızı artacaktır.

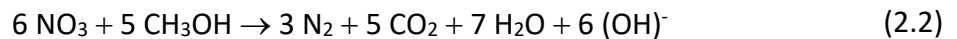
- Anoksik şartlar

Oksijen var ise, bakteriler elektron alıcı olarak oksijeni tercih eder. Çünkü daha fazla enerji üretebilirler. Örneğin aerobik glikoz oksidasyonunda 686 kcal/mol glikoz enerji üretilirken, anoksik şartlarda bu değer 570 kcal/mol glikozdur. Bu nedenle, denitrifikasyon sırasında oksijen mevcudiyeti verimi düşürecektir. Fakat yüksek oksijen konsantrasyonlarına sahip aktif çamur ünitelerinde bile denitrifikasyon gözlenebilir. Bunun nedeni ise, biyo-yumaklar içerisinde, derin noktalarda oksijen konsantrasyonu düşük olup bu noktalarda nitrat elektron alıcı olarak kullanılır.

Denitrifikasyon bakterileri fakültatif aeroblar olduklarından, serbest oksijenin varlığında onu kullanarak enerji gereksinimlerini karşılarlar. O halde denitrifikasyonun gerçekleşmesi için daha önce de belirtildiği gibi, serbest oksijenin olmaması ya da çok düşük konsantrasyonlarda olması gerekmektedir. Serbest oksijenin varlığında nitrat redüktaz enzimi (denitrifikasyonda nitratın nitrite indirgenmesinde rol alan enzim) inhibe olmaktadır.

- Organik Madde Varlığı

Denitrifikasyon bakterileri için organik madde şarttır. Çünkü organik madde elektron verici olarak kullanılacaktır. Birçok madde elektron verici olarak kullanılabilir: asetat, metanol, sitrik asit gibi. Ayrıca, evsel ve endüstriyel atık suların bünyesinde bulunan organiklerde bu amaçla kullanılır. Ayrıca, Anammox prosesinde olduğu gibi amonyumda elektron alıcı olarak kullanılabilir. Tercih edilen substrat genellikle metanol olup, birçok arıtma tesisinde, denitrifikasyon basamağı sırasında metanol bu amaç için kullanılmaktadır. Ayrıca, biyogaz içinde bulunan metan da organik madde kaynağı olarak kullanılabilir. Metanotrofik bakteriler metanı metanole oksitler. metanol de denitrifikasyon bakterileri için karbon kaynağı olarak kullanılır. Denklem gere, bir mol nitrat giderimi için 5/6 mol metanol gerekmektedir. Fakat metanolün bir kısmı da bakteri büyümesi için kullanılacağından dolayı daha fazla metanol gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda optimum metanol/nitrat oranı 2,5 olarak bulunmuştur.



- İz elementlerin Etkisi

Bazı iz elementler denitrifikasyon bakterileri için gereklidir. Molibden nitrat redüktaz enziminin sentezi için gereklidir.

- Toksik Kimyasallar

Denitrifikasyon bakterileri toksik kimyasallara karşı çok hassastır [12].

2.3. Kısmi Denitrifikasyon ile N₂O Birikimi

Çeşitli araştırmalarda, biyolojik besin giderim sistemlerinin önemli bir N₂O kaynağı oluşturabileceğini gözlemlenmiş olup, atık suyun biyolojik arıtımı sırasında azot, ağırlıklı olarak nitrifikasyon ve denitrifikasyon prosesleri yoluyla uzaklaştırılmıştır. N₂O her iki proses tarafından da üretilebilmesine rağmen, denitrifikasyon ana kaynak olarak gösterilmiştir. Denitrifikasyon esnasında, NO₃⁻ önce nitrat redüktaz enzimi (NaR) ile NO₂⁻'ye indirgenir, daha sonra NO₂⁻ nitrit Redüktaz enzimi ile N₂O'ya (NiR) ve sonunda N₂O diazot oksit redüktazı (N₂OR) ile moleküler azot (N₂)'ye indirgenir. N₂O, denitrifikasyon yolunun zorunlu bir ara ürünüdür ve işlem sırasında N₂O üretilir ve tüketilir. Atık su arıtma sistemleri tarafından N₂O gaz emisyonunda yer alan mekanizmaların anlaşılmasını geliştirmek için birçok parametre araştırılmıştır. Nitritin varlığı veya düşük DO, SRT, düşük pH ve karbon/azot oranı, aktif çamurda denitrifikasyon sırasında N₂O birikimine neden olabileceği anlaşılmıştır. Ayrıca, bir ana son ürün olarak N₂O oluşturan denitrifikatörler karakterize edilmiştir. Buna ek olarak, N₂O net üretiminin nitritten daha fazla oksijenden etkilendiği görülmüştür. Aslında, N₂OR, önceki indirgeme adımlarına kıyasla oksijen tarafından kuvvetli bir şekilde engellenirken, nitrit, NaR ve NiR için daha önemli olduğu gözlemlenmiştir. NO₂ birikiminin tahmini ve N₂O emisyonunun denitrifikasyon verimliliği, denitrifikasyon yapan bakteri popülasyonunun optimizasyonu için göstergeler olarak kullanılabilir olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla kısmi denitrifikasyonda N₂O birikimini sağlayan şartların optimizasyonu için çalışmalara basamak oluşturmıştır [13].

2.3.1. N₂O Üretimini Etkileyen Faktörler

N₂O üretiminin ana kaynaklarını ve yollarını belirlemek, çalışmalarda, N₂O üretimine yol açan anahtar faktörler üzerinde yararlı olmuştur. N₂O üretimini kontrol etmek ve azaltmak için, atık su arıtma tesislerinin gerçekte işletilmesi sırasında (WWTP'ler) N₂O üretimine yol açan anahtar faktörler iyi yönetilmelidir. Dolayısıyla, atık sudan azot uzaklaştırılması sırasında N₂O emisyonuna neden olan başlıca faktörler literatürde DO, yüksek amonyak konsantrasyonu, nitrit konsantrasyonu, düşük KOİ/NO- NO_x oranı ve kısa SRT. Bu nedenle, sadece ana kaynakları tanımlarken ve ayrıca N₂O üretimine yol açan anahtar faktörleri belirlerken, düşük N₂O üretimi olan atıksu arıtma işlemleri geliştirilebilir [6].

2.3.2. Kısmi Denitrifikasyon Yapan Türler

Denitrifikasyon işlemini gerçekleştiren mikroorganizmalar genellikle fakültatif aeroblardır. Fakültatif aeroblar oksijenin varlığında aerobik oksidasyon yaparlarken, ortamda sadece bağlı oksijenin (nitrit ve nitrat) bulunması durumunda, nitrit ve nitratı da elektron alıcı olarak kullanabilmektedirler. Hem ototrofik hem de heterotrofik bakteriler denitrifikasyon yapabilmektedir. Denitrifikasyon yapabilen heterotrofik mikroorganizmaların başta gelen cinsleri *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Hypomicrobium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Spirillum* ve *Vibrio* olarak sayılabilmektedir [12]. Bunlardan *Pseudomonas* türleri atık su arıtma tesislerinde en yaygın olarak karşılaşılanlarıdır.

2.3.3. Son Ürün N₂O'nun Enerji Amaçlı Kullanımı

N₂O'nun başlıca insan yapımı kaynakları nitrik asit, glioksal asit ve adipik asit üretimi ile elektronik sanayisinde süpürücü gaz olarak kullanımıdır. N₂O gazının diğer önemli kaynağı yüksek miktarda nitrojen içerikli kirleticinin sudan arıtıldığı atık su arıtım tesisleridir. Birçok denitrifikasyon bakterisi aerobik koşullarda N₂ yerine

N₂O üretmektedir. Bu önemli sera gazının enerji kaynağı olarak kullanılarak hem salınımının azaltılması hem de enerji kaynağı olarak kullanılmasını öngören çalışmalar mevcuttur.

N₂O'nun ısı ayrışmasının ekzotermik olması aşağıdaki tepkimeyi;



Diğer bir enerji amaçlı kullanım N₂O'nun metan ile birlikte yakılması olarak tanımlanmıştır. Oksijenle yakılmaya oranla N₂O'nun kullanımı yaklaşık mol başına 300 kJ daha fazla enerji vermektedir.



Nitrojen gideriminde denitrifikasyondan önce anaerobik koşulların sağlanması amacıyla çözünmüş oksijenin tamamen ortamdan çekilmesi zordur, bu nedenle mevcut sistemlerde N₂O gazı açığa çıkmaktadır. Scherson et. al 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada katalitik olarak N₂ ve O₂'ye dönüştürerek veya CH₄'ün dekompozisyonunda kullanarak N₂O gazından enerji elde etmeyi başarmışlardır [14]. Bu çalışmalarda N₂O'nin N₂O ya kısmi heterotrofik indirgenmesinde bakteriler tarafından depolanan PHB elektron vericisi olarak yararlanılmıştır. Aktif çamurdan elde edilen bakteriler asetat ve nitrit ile farklı şekillerde beslenerek kısmi denitrifikasyonun başarısı takip edilmiştir. Bakterilerin sürekli olarak asetat ve nitrit ile beslendiğinde N₂O üretilmediği gözlenmiştir. Ortama verilen nitrojen kaynağı ve ne sıklıkla verildiği bakteri popülasyon dengesini etkilemektedir. Denitrifikasyon prosesinde ortamda bulunan denitrifikasyon bakterilerinin çeşidi ve oranı salınan N₂O gazının miktarını etkileyen bir faktördür. Bu bakterilerin belirlenmesi, üretimi ve saklanması sayesinde N₂O'nun etkin bir şekilde N₂'ye indirgenebildiği veya enerjiye dönüştürülmek üzere üretiminin amaçlandığı tam veya kısmi denitrifikasyon proseslerinde kullanılabilecek işlevsel ve etkin denitrifikasyon bakteri kaynağı oluşturulmuş olmayı sağlaması amaçlanmaktadır [14].

3. MATERYAL METOT

3.1. Deneysel Sistem

Bu çalışmada kısmi denitrifikasyon ile N_2O üretimini artıran besleme şartları ve oluşan mikroorganizma çeşitliliğini belirlemek amacıyla 100 ml'lik kesikli biyoreaktörler kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Kesikli Biyoreaktör

Kullanılan kesikli biyoreaktörler 100 ml.'lik septumlu cam şişeler olup, aktif kullanım hacmi 30 ml. olacak şekilde kontrollü 2 sistem şeklinde düzenlenmiştir. Kesikli biyoreaktörlerin karıştırma işlemi Shel Lab Shaking inkübatör ile 150 rpm de sıcaklığı 35 °C olarak sabitlenerek deneysel düzenek gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kesikli biyoreaktör düzeneği Şekil 3.1'de görülmektedir.



Şekil 3.1: Kesikli biyoreaktör düzeneği.

3.1.2. Biyoreaktörün Aşılması ve Besiyeri ile Ortam Koşullarının Hazırlanması

Kesikli biyoreaktör, Gebze Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği laboratuvarında anaerobik olarak çalıştırılan reaktörün çıkış suyundan 1 ml. alınıp aşılacak, belirlenmiş şartlarda farklı karbon azot oranlarına göre hesaplanarak hazırlanmış sentetik besiyeri ve bu şartlara alıştırmış mikroorganizmalarca zenginleştirilmiş kültür ile işletilmiştir. Anaerobik fazı oluşturmak için deneysel düzenden 30 dk. süre ile argon gazı geçirilerek ortam oksijensizleştirilmiştir. Kesikli biyoreaktörün oksijensizleştirme işlemi Şekil 3.2’ de görülmektedir.



Şekil 3.2: Kesikli biyoreaktörlerin argon gazı ile oksijensizleştirilmesi.

3.2. Kesikli Biyoreaktörün Çalışma Şartları ve Süreleri

Başlangıçta kararlı duruma ulaşmak için elektron vericisi olarak NaCH_3COO 532 mg KOİ L^{-1} ve elektron alıcısı olarak NaNO_2 ile işletildi.

Teorik olarak gereken KOİ için kullanılan sodyum asetat miktarını C: N oranı 1 ve C: N oranı 2.5 olacak şekilde ayarlanarak ikili sistem işletime konuldu. Kesikli biyoreaktörde denitrifikasyon bakterilerini zenginleştirmek için hazırlanan Minimal Besiyeri çözeltisi deneyleri aşağıda Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Kesikli biyoreaktörlerdeki nitrit beslemeli besiyeri ve ortam koşulları.

Deney Seti	Minimal Medium	İz Elementler (x10 ⁻³)	NO ₂ ⁻ -N (mg/L)	Sıcaklık (°C)	pH
1. C/N=1	0,3418 g CH ₃ COONa 1,360 g KH ₂ PO ₄ 1,097 g K ₂ HPO ₄ 0,100 g MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,49 g NaNO ₂ 1000 ml H ₂ O	0,2 g CaCl ₂ ·2H ₂ O 0,1 g FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,05 g MnSO ₄ ·H ₂ O 0,01 g CuSO ₄ ·5H ₂ O 100 ml 0,1 N HCl	100	35	7
2. C: N=2,5	0,8545 g CH ₃ COONa 1,360 g KH ₂ PO ₄ 1,097 g K ₂ HPO ₄ 0,100 g MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,49 g NaNO ₂ 1000 ml H ₂ O	0,2 g CaCl ₂ ·2H ₂ O 0,1g FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,05g MnSO ₄ ·H ₂ O 0,01g CuSO ₄ ·5H ₂ O 100 ml 0,1 N HCl	100	35	7

Tablo 3.1'deki gibi hazırlanan besiyeri ve ortam koşullarında oksijensiz ortamının sağlanması için 1 g sistein amino asiti (besiyerindeki konsantrasyon olarak) ve oksijen indikatörü olarak 1 ml resazurin ilave edilip sentetik besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan sentetik besiyerler, 100 ml.'lik septum kapaklı cam serum şişelere (kesikli biyoreaktörler) 30 ml. hacimde olacak şekilde konularak, 121 °C'da (15 psi basınçta) otoklavda sterilizasyonu yapıp dışarıdan gelecek mikroorganizma yükü azaltılmaya çalışılmıştır. Daha sonra kesikli biyoreaktörlerin içerisindeki

sentetik besiyerleri oksijensizleştirilmesi için argon gazı ile 30 dk. süpürme işlemi yapılmıştır. Sentetik besiyerlerin içerisine konan sistein ve resazurin ile ortamdaki oksijen varlığı tespit edilmiştir. İlk başta mavi renkte olan besiyerleri saf argon gazı ile süpürülmesinin ardından normal şeffaf rengine dönerek oksijensizleştirme işlemi tamamlanmıştır. Tamamıyla oksijensizleştirilen kesikli biyoreaktör deney setleri içerisine, Gebze Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği laboratuvarında anaerobik olarak çalıştırılan reaktörün çıkış suyundan 1 ml. alınıp aşılama yapılarak mikroorganizmalarca zenginleştirilmiş kültür ile 3 gün boyunca 35 °C' de 150 rpm de çalkalanarak işletilmiştir.

İki farklı C: N oranı kesikli biyoreaktör deney setleri inkübasyonun herbiri için üç gün boyunca belirli saat aralıklarında OD₆₀₀ 'de absorbans değerleri okunarak mikroorganizma yoğunluğu ölçülmüştür.

Kesikli biyoreaktör deney sistemindeki ikinci denemesinde başlangıçta kararlı duruma ulaşmak için yine elektron vericisi olarak NaCH₃COO 532 mg KOİ L⁻¹, elektron alıcısı olarak KNO₃ ile işletildi.

Teorik olarak gereken KOİ için kullanılan Sodyum Asetat miktarını C: N oranı 1 ve C: N oranı 2.5 olacak şekilde ayarlanarak ikili sistem işleme konuldu.

Tablo 3.2'deki gibi hazırlanan besiyeri ve ortam koşullarında oksijensiz ortamının sağlanması için yine Nitrit beslemeli hazırlanan besiyerlerinde olduğu gibi 1 g sistain ve 1 ml. resazurin ilave edilip sentetik besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan sentetik besiyerler, 100 ml.'lik septum kapaklı cam serum şişelere (kesikli biyoreaktörler) 30 ml. hacimde olacak şekilde konularak, 121 °C'da (15 psi basınçta) otoklavda sterilizasyon yapılmıştır. Daha sonra yine kesikli biyoreaktörlerin içerisindeki sentetik besiyerleri oksijensizleştirilmesi için argon gazı ile 30 dk. süpürme işlemi yapılmıştır. Sentetik besiyerlerin içerisine eklenen sistain ve resazurin indikatörleri ile ortamdaki oksijen varlığı tespit edilmiştir. Tamamen oksijensizleştirilen kesikli biyoreaktörler yine Gebze Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği laboratuvarında anaerobik olarak çalıştırılan reaktörün çıkış suyundan 1 ml alınıp aşılama yapılarak mikroorganizmalarca zenginleştirilmiş kültür ile 3 gün boyunca 35 °C' de 150 rpm de çalkalanarak işletilmiştir.

Tablo 3.2: Kesikli biyoreaktörlerdeki nitrat beslemeli besiyeri ve ortam koşulları.

Deney Seti	Minimal Medium	İz Elementler ($\times 10^{-3}$)	NO_3^- -N (mg/L)	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	pH
1. C/N=1	0,3418 g CH_3COONa 1,360 g KH_2PO_4 1,097 g K_2HPO_4 0,100 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,72 g KNO_3 1000 ml H_2O	0,2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,01 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 100 ml 0,1 N HCl	100	35	7
2. C: N=2,5	0,8545 g CH_3COONa 1,360 g KH_2PO_4 1,097 g K_2HPO_4 0,100 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,72 g KNO_3 1000 ml H_2O	0,2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,01g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 100 ml 0,1 N HCl	100	35	7

3.3. Kesikli Biyoreaktörde Sürekli İzlenen Parametreler

3.3.1. AKM Ölçümü

Uygun havalandırması yapılmış çamur homojen olacak şekilde karıştırılmıştır. Önceden desikatörde nemini almak için beklettiğimiz 0,45 por çapına sahip filtre kullanılarak 10 ml. numune süzülmüştür. KOİ ölçümü için süzüntü kullanılmıştır.

Filtre kâğıdı üzerinde kalan kalıntı 105 °C de 1 saat bekletilmiştir bu süre sonunda filtre kâğıdı tartılmıştır. Tartım değerinden filtre kağıdının boş ağırlık değeri çıkartılarak AKM miktarı hesaplanmıştır. AKM hesabı eşitlik (3.1)'de gösterilmiştir.

$$AKM \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{\text{son tartım-ilk tartım (mg)}}{\text{süzülen hacim (L)}} \quad (3.1)$$

3.3.2. KOİ Ölçümü

KOİ tayini AKM analizi sonucu elde ettiğimiz süzüntü kullanılarak yapılmıştır. KOİ>400 olduğunu tahmin ettiğimiz numunelere seyreltme yapılmıştır.

İki cam tüpe 2,5 ml. numune (2x2,5ml.), diğer ikisine 2,5 ml. saf su (2x2.5ml.) eklenmiştir. Tüplerin her birisine 1.5 ml. parçalama çözeltisi (0,01667 M potasyum dikromat), 3,5 ml. sülfirik asit reaktifi eklenip kapakları sıkıca kapatılmıştır. Daha sonra tüpler 150 °C' de 2 saat termoreaktöre konulmuştur. İki saat sonra alınan numuneler oda sıcaklığına soğutulmuştur. Tüpler titrasyonun kolay yapılması için cam beherlere boşaltılmıştır. İçerisine 0,10 ml. (2 damla) ferroin indikatörü ilave edilmiştir. Standardize edilmiş 0.025 M demir amonyum sülfat (FAS) ile titre edilirken karıştırılmıştır. Mavi-yeşilden kırmızımsı kahveye döndüğü an eklenen FAS miktarı not edilmiştir. KOİ hesaplaması eşitlik (3.2)'de gösterilmiştir.

$$KOİ \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{(A - B). M. 8000}{mL \text{ numune}} \quad (3.2)$$

Denklemden A, şahit için kullanılan FAS (ml); B, Numune için kullanılan FAS (ml); M, FAS' ın molaritesi (0,025 M) ve 8000 ise oksijenin miliequivalent ağırlığı x 1000 ml/L olarak belirtilmiştir.

3.3.3. pH Ölçümü

Numunenin pH ölçümü için WTW pH720 marka pHmetre kullanılmıştır. Ölçüm sırasında numune yavaşça karıştırılarak, elektrotlarla numunenin dengeye gelmesi sağlandı. Elektrotlar standart tampon çözeltilere veya diğer iyonik gücü yüksek olan çözeltilere batırıldıktan sonra temizlendi ve numuneye batırıldığında 1 dk. süreyle bekletildi. Bekletme işleminden sonra elektrotlar kurulanıp beherin içerisindeki bir miktar numunenin içerisine batırılarak, pH değeri okunmuştur.

3.3.4. Nitrat Ölçümü

Deney çalışmalarının ilk aşamasında nitrat konsantrasyonu Spektrofotometrik Nitrat Analizi yöntemi ile ölçülerek belirlenmiştir. Potasyum nitrat çözeltisi (10 mg. $\text{NO}_3\text{-N/L}$); 0,0722 g susuz KNO_3 saf su ile çözülerek 1L'ye tamamlanmıştır. Hidroklorik asit (1 N); %37'lik HCl'den 2,0725 ml. alınarak saf su ile 25 ml.'ye tamamlanmıştır.

Hazırlanan KNO_3 çözeltisinden 5 farklı balon jojeye sırasıyla 1, 2, 4, 7 ve 10 ml. alınarak her bir balon saf su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. (Her bir balonda sırasıyla 0,2-0,4-0,8-1,4 ve 2 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ olacak şekilde). Üzerlerine 1 ml. HCl eklenerek (asidifikasyon işlemi hidroksil ve karbonat iyonlarının analize girişim yapmasını önlemek için gereklidir). Çözeltiler iyice karıştırıldıktan sonra tek tek quartz küvete aktararak spektrofotometrede saf suya karşı 220 nm dalga boyunda okunmuştur. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak içinde okuma işlemleri bittikten sonra numune konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçilerek doğrusal bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Numune ölçümleri için balon jojeye numuneden aşırı seyreltikse 50 ml. konuldu, değilse bir miktar alınıp saf su ile 50 ml.'ye tamamlandı, üstüne 1 ml. HCl eklenerek 220 nm dalga boyunda absorbans değeri okundu. Numune ölçümünden elde edilen absorbans değeri kalibrasyon eğrisi denkleminde yerine konularak o absorbansa karşı gelen $\text{NO}_3\text{-N}$ konsantrasyonu belirlenmiştir.

Deney çalışmalarının ikinci aşamasında nitrat konsantrasyonu ölçümleri için iyon kromatografisi (Prominence HIC-SP, Shimadzu) ile analiz edildi. Kolon olarak

Shim-pack IC-SA2 (4 mm i.d. x 250 mm uzunluk, Shimadzu), 1.0 ml / dakika bir akış hızında ve sıcaklığı 30 ° C'de ayarlanmış bir iletkenlik dedektörü ile konsantrasyonu 1.8 mM Na₂CO₃ ve 1.7 mM NaHCO₃'lük elüsyon hazırlanarak deney setlerindeki numunelerin nitrat konsantrasyonu ölçümleri yapıldı.

3.3.5. Nitrit Ölçümü

Nitrit konsantrasyonu hem Spektrofotometrik Nitrit Analizi yöntemi hem de İyon kromatografisi ile ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Spektrofotometrik Nitrit Analizi yönteminde renk geliştirici ayraç (color reagent) olarak 800 ml. distile su içerisine 100 ml %85'lik fosforik asit ve 10 g sülfanilamid eklenmiştir. Sülfanilamid tamamiyle çözüldükten sonra 1 g N-(1 naphthyl)-etilendiamin dihidroklorid eklenmiştir. Çözülünceye kadar karıştırılır ve 1 litreye tamamlanmıştır. Stok nitrit çözeltisi için 1.232 g. NaNO₂ distile suda çözülmüştür ve 1000 ml.'ye tamamlanmıştır. Ara stok nitrit çözeltisi için Stok nitrit çözeltisinden 50 ml alarak distile su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır. 1.00 ml= 50.0 µg N. günlük olarak hazırlanmıştır. Standart nitrit çözeltisi nitrit çözeltisinden 10 ml. alınarak 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 1.00 ml= 0.5 µg N. Günlük olarak hazırlanmıştır.

Nitrit konsantrasyonu ölçümleri için iyon kromatografisi (Prominence HIC-SP, Shimadzu) ile analiz edildi. Kolon olarak Shim-pack IC-SA2 (4 mm i.d. x 250 mm uzunluk, Shimadzu), 1.0 ml / dakika bir akış hızında ve sıcaklığı 30 ° C'de ayarlanmış bir iletkenlik dedektörü ile konsantrasyonu 1.8 mM Na₂CO₃ ve 1.7 mM NaHCO₃'lük elüsyon hazırlanarak deney setlerindeki numunelerin nitrit konsantrasyonu ölçümleri yapıldı.

3.3.6. Gaz Ölçümleri

Deney çalışmalarımız aşamasında kesikli biyoreaktördeki kısmi denitrifikasyon sonucunda çıkan; CO₂, N₂O, O₂ ve N₂ gazların ölçülmesi işleminde, GC/TCD kullanıldı. GC/TCD metodu şu şekilde oluşturulmuştur:

Referans akım ArCH₄ ile sağlanarak Agilent 19095 P_ MSO Katalog numaralı (30m×530µm×50micron) Moleküler Sieve Kolonu ve 0.54mm çapında, 15m

uzunluğunda PlotQ Kolon, kullanılmıştır. Fırın sıcaklığı başlangıçta 35°C olarak ayarlandı ve 40°C/dk. ile 120 °C'ye ulaşıldı. Enjektör sıcaklığı 150 °C, detektör sıcaklığı 200 °C, mod split olarak ayarlanıp, kolondaki akış 10 ml/dk. 'da tutularak ölçüm yapılmıştır. Oluşturulan metodun valf açılış kapanış zamanları; 0.01 dk'da Valf 1 açık, 1.50 dk'da valf 1 kapalı, 3.20 dk'da valf 2 açık, 4.50'de valf 2 kapalı olarak ayarlanmıştır. Çıkan gazların çıkış süreleri şu şekilde sıralanmaktadır; CO₂ gazı 3.60 dk'da, N₂O gazı 3.90 dk'da, O₂ gazı 6.80 dk'da, N₂ gazı 8.10 dk'da olacak şekildedir.

3.4. Kesikli Biyoreaktördeki Türlerin Teşhisi

İlk aşamada Gebze Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü Labaratuvarında işletilen aneorobik reaktörü içerisinde yer alan bakteri profilini görmek için %0,9 NaCl izotonik çözeltide seri seyreltme yapılarak hazırladığımız katı besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Besiyeri bileşimine giren maddeler; CH₃COONa 1,28 g/L, KH₂PO₄ 0,092 g/L, K₂HPO₄ 0,7516 g/, MgSO₄·7H₂O 0,2 g/L, NaNO₂ 0,2 g/L, CaCl₂·2H₂O 0,2 g/L, FeSO₄·7H₂O 0,1 g/L, MnSO₄·H₂O 0,05 g/L, iz elementler olarak CuSO₄·5H₂O 0,01g/L, 0,2 gCaCl₂·2H₂O, 0,1g FeSO₄·7H₂O, 0,05g MnSO₄·H₂O, 0,01g CuSO₄·5H₂O 100 ml 0,1 N HCl ve agar 14g/L, ayrı ayrı tartılarak, su içinde çözüldü ve sterilize edilip, plastik pedri kaplarına dağıtılarak bir gün bekletildi. Anaerobik kesikli biyoreaktörden alınan örnek aneorobik kabin içerisinde 10⁻³,10⁻⁴ oranlarında seyreltilerek hazırlanan petrilerdeki katı besiyerlerine, yayma yöntemi ile ekilmiş ve 3- 4 gün 37 °C etüvde inkübe ederek koloni oluşumu gözlenmiştir. Aynı işlemi 72 saat nitrit ve karbon azot oranları farklı; C: N=1, C: N=2,5 olarak beslediğimiz (her birinden ikiyeşerli grup şeklinde 4 deney seti olacak şeklinde) kesikli biyoreaktörlerden alınan örnekler için de tekrarlanmıştır. C: N oranları farklılıklarının bakteri profili üzerindeki etkisi incelendi. Biyoreaktörlerden alınan örnekler anaerobik kabinde Şekil 3.3'de katı besiyerlerine ekilmiş ve farklı morfolojilere sahip koloniler izole edilmiştir.



Şekil 3.3: Aneorobik kabin içerisinde türlerin ekimi.

3.4.1. Türlerin İzolasyonu

Anaerobik kabinde katı besiyeri üzerinde büyüyen karışık koloniler incelenmiş ve birbirinden morfolojik olarak farklı olanlar steril kürdan kullanılarak yeni bir katı besiyerine çizme ekim yöntemi ile aktarılmıştır. 3-4 gün 37 C de inkübasyondan sonra büyüyen kültürlerin saf olup olmadığı kontrol edilmiş, safsızlık görülen kültürlerdeki koloniler tekrar taze katı besiyerine ekilerek mikroorganizmalar saf halde elde edilmiştir. Elde edilen bu saf kültürler tür tayini amacıyla sıvı besiyerinde üretilmiş ve genomik DNA'ları izole edilmiştir.

3.4.2. Genomik DNA izolasyonu ve Tür teşhisi

Genomik DNA izolasyonu için sıvı besiyerine aşılardan hücreler büyütüldü. Hücre konsantrasyonu yaklaşık 2×10^9 bakteri konsantrasyonuna ulaştığında sıvı besiyerinden 1,5 ml alınarak 10 dk. 5000×g'de çöktürüldü. Sıvı kısım atıldı katı kısmına(pelet) 180 µl parçalama çözeltisi eklendi ve 20µl proteinase K çözeltisi eklendi ve homojen olacak şekilde karıştırıcı ile karıştırıldı daha sonra numune 56 °C'de 30 dk. hücrelerin parçalanması için su banyosunda bekletildi. 20µl rndase A çözeltisi eklenerek 10 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 200µl lysis çözeltisi numuneninüzerine eklendi homojen çözeltisi elde edilerek (15 sn. kadar) karıştırıcıda karıştırıldı. 400 µl %50 etanol eklendi ve pipet ile numune karıştırıldı.

GeneJET genomik DNA saflaştırma kolonuna numune eklendi sonra bu kolon 6000×g'de 1 dk. santirifüj yapıldı. Sıvı kısım atılarak kolonun içine 500µl yıkama çözeltisi eklendi ve 8000×g'de 1 dk. santirifüj yapıldı. Sıvı kısım atıldı ve kolonun içine tekrar 500µl yıkama çözeltisi 2 (Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit marka çözeltileri kullanıldı) eklendi 12000×g'de 3dk. santirifüj yapıldı. Sonra kolonun üzerine elüsyon çözeltisi eklenerek 2 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. En son 8000×g'de 1 dk. santirifüj edilerek kolona tutunan genomik DNA indirildi. Bu sıvı kısım -20°C'de kullanıma hazır şekilde saklandı. Elektroforez de saflaştırılan genomik DNA'lerden 2 ul alınarak etidyum bromid içeren agoroz jelde yürütüldü. Genomik DNA konsantrasyonu UV altında incelendi Şekil 4.19'da görülmektedir. İzole edilen mikroorganizmalara ait bu genomik DNA'lar 16SrRNA tür tayini için Refgen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti. labaratuvarına gönderildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

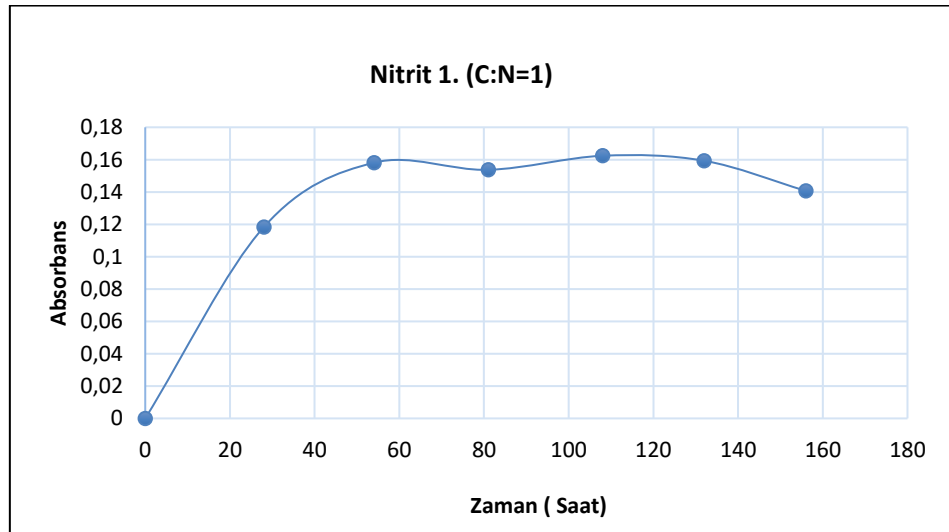
4.1. Besiyeri ve Ortam Koşullarının Bakteri Büyüme Kinetiğine Etkisi

4.1.1. Nitrit ile Beslenen Kesikli Biyoreaktörde Bakteri Büyüme Kinetiği

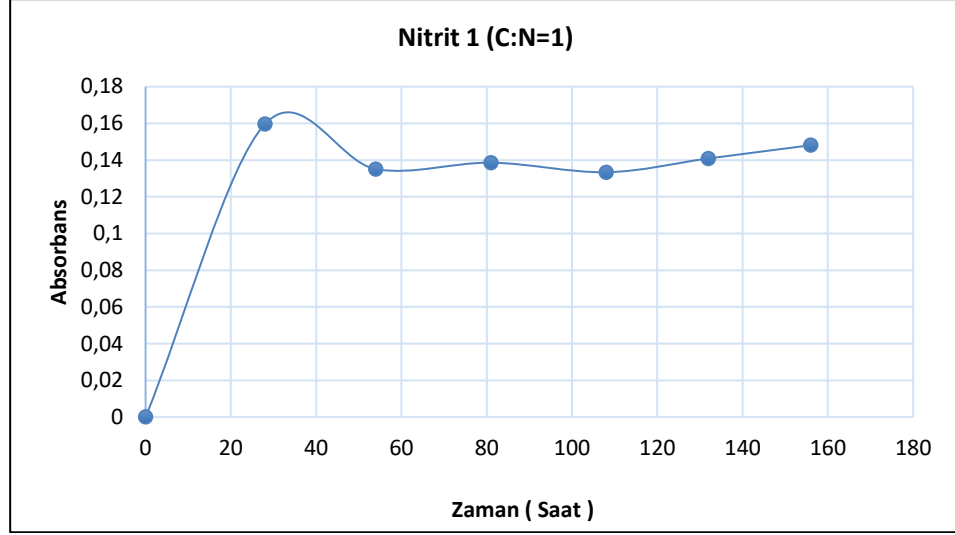
Kesikli biyoreaktörlerdeki besiyerleri belirlenmiş şartlarda; 30 ml. hacimli septumlu şişeler 30 dk. saf argon gazı ile süpürülerek besiyerlerinin çözünmüş oksijen miktarı azaltılmıştır. Ayrıca, azot kaynağı olarak nitritin varlığının N_2O gazının çıkmasına sebep olan etkenlerden olması nedeniyle nitrit beslemeli olacak şekilde, pH seviyeleri 7 olarak sabitlenmiş ve C: N farklı karbon azot oranlarına göre hesaplanarak hazırlanmış sentetik besiyerleri kontrollü ikişer grup şeklinde 4 deney seti (Nitrit1. – Nitrit1 C: N=1 ve Nitrit2. – Nitrit2 C: N=2.5) ve maruz bırakılan mikroorganizmalarca zenginleştirilmiş kültür ile işletilmiştir. Kesikli biyoreaktörlerdeki belirlenen bu ortam şartlarına göre mikroorganizmaların büyüme kinetiği, yaklaşık olarak 156 saat boyunca belli aralıklarla alınan örneklerle numune ölçümleri laboratuvarındaki spektrofotometre (Cintra 20 UV visible Spectrofotometr) ile ölçülmüş ve kısmi denitrifikasyon yapan mikroorganizmaların gelişmeleri gözlemlenmiştir. Kesikli biyoreaktörlerdeki büyüme kinetiği tablosu Tablo 4.1’de ve Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’de büyüme kinetiği grafikleri verilmiştir.

Tablo 4.1: Kontrollü ikişer grup halinde 4 deney seti şeklindeki kesikli biyoreaktörlerdeki büyüme kinetiği.

Zaman (saat)	Set 1 Nitrit 1. (C: N=1) Absorbans	Set 2 Nitrit 1 (C: N=1) Absorbans	Set 3 Nitrit 2. (C: N=2.5) Absorbans	Set 4 Nitrit 2 (C: N=2.5) Absorbans
0	0	0	0	0
28	0,1183	0,1596	0,2078	0,1258
54	0,1581	0,1351	0,2083	0,1481
81	0,1537	0,1386	0,2209	0,1756
108	0,1624	0,1334	0,2342	0,1244
132	0,1593	0,1409	0,2781	0,1352
156	0,1407	0,1481	0,2615	0,1218

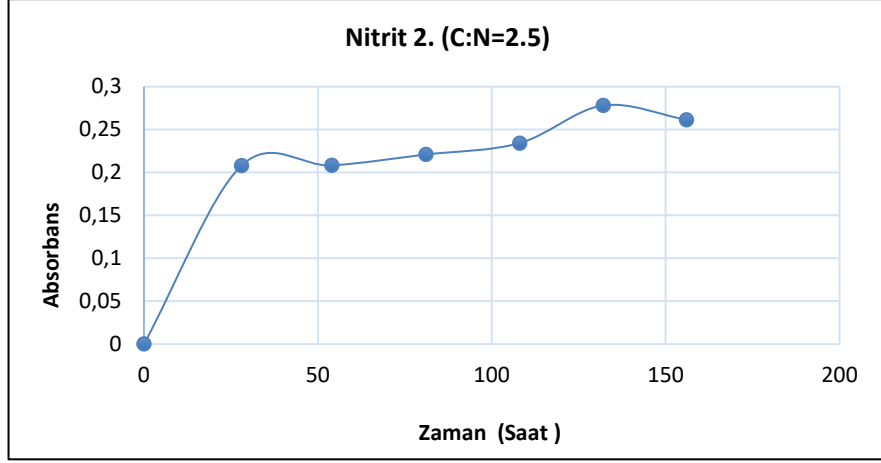


Şekil 4.1: Set 1- Nitrit 1. C: N=1 olan kesikli biyoreaktördeki mikroorganizma büyüme grafiği.



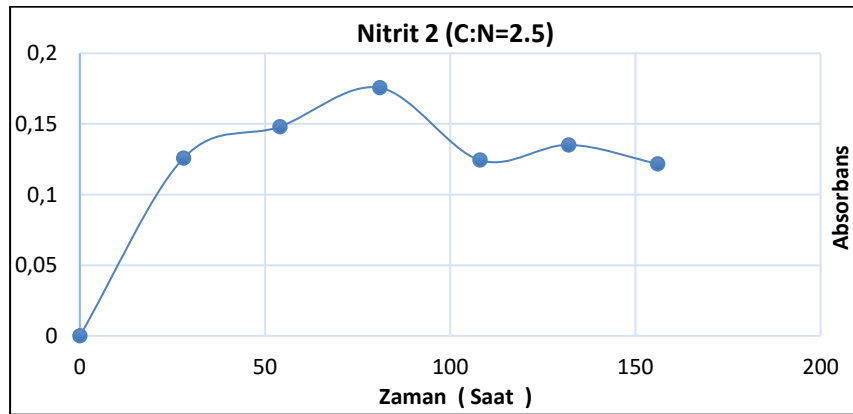
Şekil 4.2: Set 2-Nitrit 1 C: N=1 olan kesikli biyoreaktördeki mikroorganizma büyüme grafiği.

Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 de görüldüğü üzere, Set 1- Nitrit 1. C: N=1 olan kesikli biyoreaktördeki ve Set 2-Nitrit 1 C: N=1 olan kesikli biyoreaktördeki mikroorganizma büyüme aktivitesi 156 saat içerisinde mikroorganizmaların büyümesi belirli kurallara uymakta olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, bazı koşullar altında inkübasyon sonunda beklenen mikroorganizma büyümesi değişik evrelerde gerçekleşmiştir. Ancak başlangıçta yapılan bu deney setlerinde mikroorganizmaların büyümesi esnasında gerçekleşen evrelerden olan adaptasyon safhasına rastlanamamıştır. Bu safhanın mikroorganizmaların kesikli biyoreaktöre adaptasyon safhası olup işletilen biyoreaktörlerin hacimsel olarak küçük olmasından dolayı sıklıkla numune alımı gerçekleştirilemediğinden o safhayı gözlemleyemedik. Fakat adaptasyon safhası görülebilmesi için ikinci aşamada bir deney düzeneği daha hazırlanarak ve Azot kaynağı olarak potasyum nitrat kullanılıp Şekil 4.6’de, Şekil 4.7’de gözlemlenmiştir.

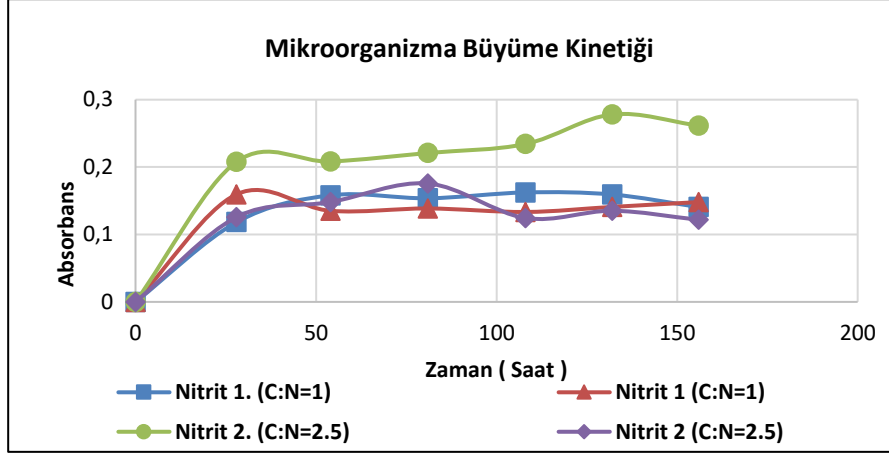


Şekil 4.3: Set3-Nitrit 2. C: N=2,5 olan kesikli biyoreaktördeki mikroorganizma büyüme grafiği.

Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de görüldüğü gibi Set 3-Nitrit 2. C: N=2,5 olan kesikli biyoreaktördeki ve Set 4-Nitrit 2 C: N=2,5 olan kesikli biyoreaktördeki mikroorganizma büyüme aktivitesi 156 saat içerisinde beklenen mikroorganizmaların büyümesi belirli kurallara uymakta olduğu gözlenmiştir. Farklı C: N oranlarından dolayı daha fazla hücre çoğalması gözlemlenmiştir, 28. saat sonunda C: N=2.5 olan deney Seti 2’de daha fazla hücre çoğalması ile absorbans değeri 0,21 olurken, C: N=1 olan deney Seti 1’de absorbans değeri 0,12 olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.4: Set 4-Nitrit 2 C: N=2,5 olan kesikli biyoreaktördeki mikroorganizma büyüme grafiği.



Şekil 4.5: Kesikli biyoreaktörlerdeki mikroorganizmaların büyüme grafiği.

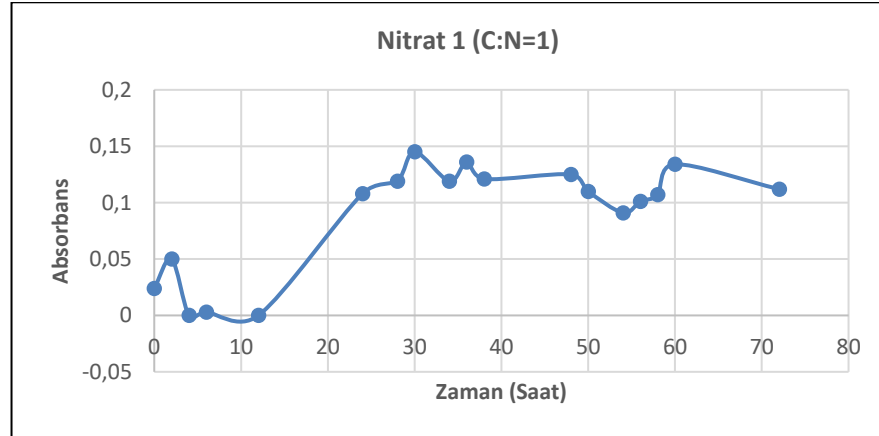
Şekil 4.5’de tüm deney setlerindeki kesikli biyoreaktörler için ölçülen absorbans değerleri mikroorganizmaların büyüme aktiviteleri olarak verilmiştir.

4.1.2. Nitrat ile Beslenen Kesikli Biyoreaktörde Bakteri Büyüme Kinetiği

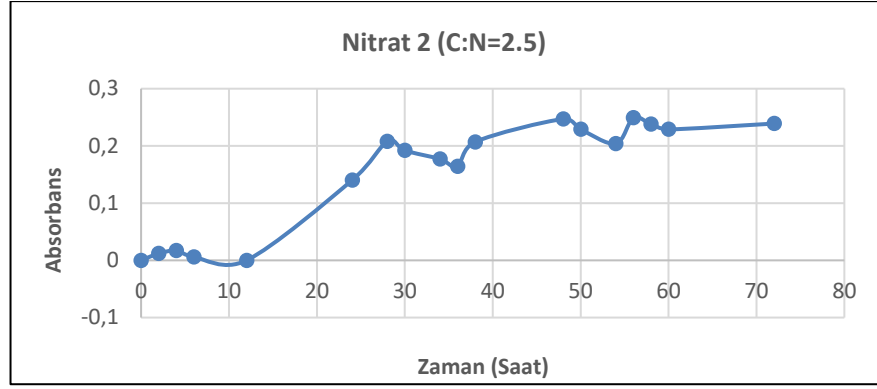
Kesikli biyoreaktör deney sistemindeki ikinci denemesinde C: N=1 ve C: N=2.5 oranlarında ve farklı azot kaynağı olarak KNO_3 kullanılarak kontrollü olacak şekilde 2 deney seti (Nitrat1 C: N=1 ve Nitrat2 C: N=2.5) tekrar aynı anaerobik ortam koşulları sağlanarak ve maruz bırakılan mikroorganizmalarca zenginleştirilmiş kültür ile işletilme konulmuştur. Kesikli biyoreaktörlerdeki belirlenen bu ortam şartlarına göre mikroorganizmaların büyüme kinetiği, yaklaşık olarak 72 saat boyunca belli aralıklarla alınan örneklerle numune ölçümleri laboratuvarındaki spektrofotometre (Cintra 20 UV visible Spectrafotometr) ile ölçülmüş ve kısmi denitrifikasyon yapan mikroroganizmaların gelişmeleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.6) ve (Şekil 4.7). Kesikli biyoreaktörlerdeki büyüme kinetiği tablosu Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Nitrat beslemeli kesikli biyoreaktör deney setinin büyüme kinetiği.

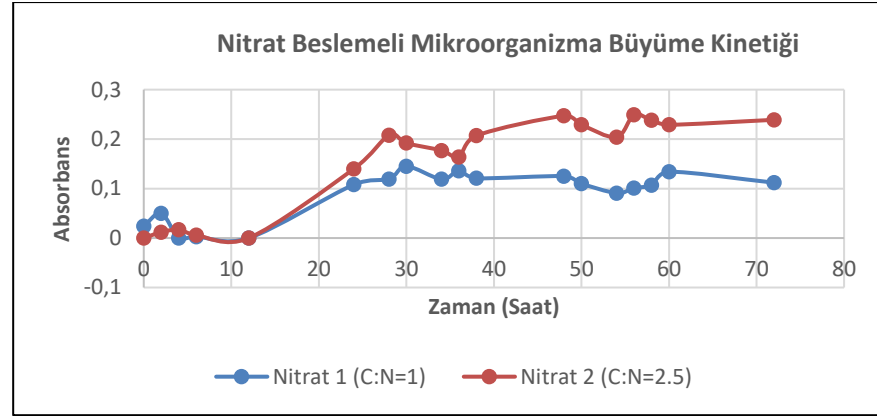
Zaman (saat)	Nitrat 1 (C: N=1)	Nitrat 2 (C: N=2.5)
0	0,024	0
2	0,05	0,012
4	0,00	0,017
6	0,003	0,006
12	0,00	0,00
24	0,108	0,14
28	0,119	0,208
30	0,145	0,192
34	0,119	0,177
36	0,136	0,164
38	0,121	0,207
48	0,125	0,247
50	0,11	0,229
54	0,091	0,204
56	0,101	0,249
58	0,107	0,238
60	0,134	0,229
72	0,112	0,239



Şekil 4.6: Nitrat 1 C: N=1 olan kesikli biyoreaktördeki mikroorganizma büyüme grafiği.



Şekil 4.7: Nitrat 1 C: N=2.5 olan kesikli biyoreaktördeki mikroorganizma büyüme grafiği.



Şekil 4.8: Nitrat beslemeli ortamda mikroorganizma büyüme grafiği.

Şekil 4.6'de, Şekil 4.7'de ve Şekil 4.8'de incelendiğinde C: N=1 olan nitrat 1 kesikli biyoreaktöründeki mikroorganizmaların C: N=2.5 olan nitrat 2 kesikli biyoreaktöründeki mikroorganizmalara kıyasla daha yavaş bir hızda üredikleri görülmektedir. Mikroorganizmalar her iki ortamda da yaklaşık 10 saat alışma fazından sonra logaritmik olarak büyümeye başlamışlardır. Logaritmik üreme fazı 15-20 saat civarında devam etmiş olmasına karşın mikroorganizma konsantrasyonunun yoğun olmadığı görülmektedir.

4.2. Karbon Kaynağının Denitrifikasyon Kinetiğine Etkisi

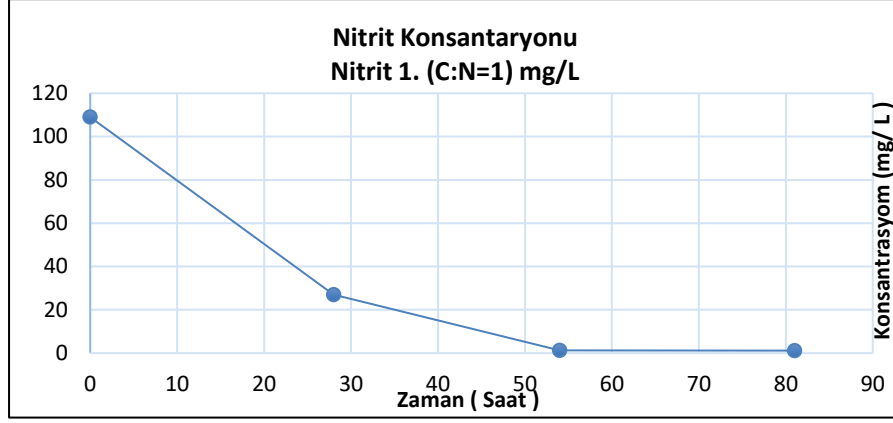
4.2.1. Karbon Kaynağının Nitrit İndirgenmesine Etkisi

Denitrifikasyon yeteneği olduğu düşünülen bakterilerin bulunduğu kesikli biyoreaktörlerdeki 4 deney setindeki nitrit içerikli ve C: N oranı farklı sentetik besiyerlerindeki aşılama yapılmış olup başlangıçtaki NO_2^- -N konsantrasyonu 100 mg/L ye sabitlenerek 156 saatlik inkübasyon sonucu NO_2^- -N giderimine ait bulgular Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Tablo 4.3: Farklı C: N oranlarına göre kesikli biyoreaktördeki nitrit konsantrasyonu.

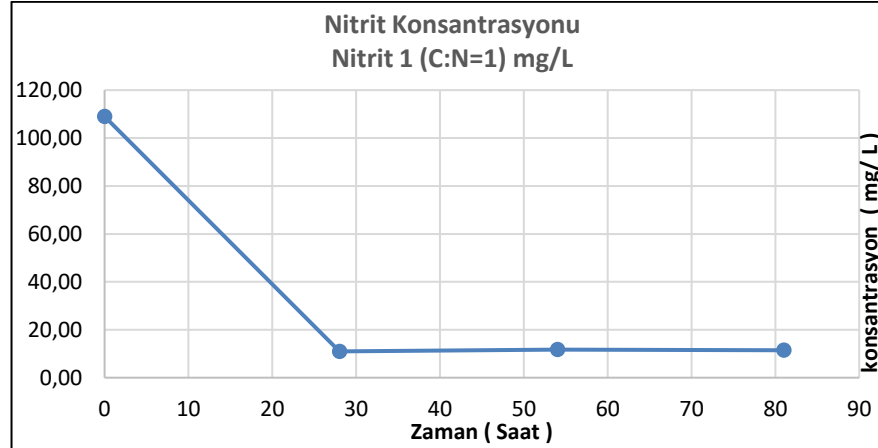
Zaman (saat)	Set 1 Nitrit1. (C: N=1) mg/L	Set 2 Nitrit 1 (C: N=1) mg/L	Set 3 Nitrit 2. (C: N=2.5) mg/L	Set 4 Nitrit 2 (C: N=2.5) mg/L
0	109,00	109,00	106,00	106,00
28	27,00	10,97	16,96	15,55
54	1,21	11,66	1,20	0,00
81	1,15	11,46	0,00	0,00
108	0,00	0,00	0,00	0,00
156	0,00	0,00	0,00	0,00

Kesikli biyoreaktörlerin işletim süresinde 108. Saatten sonra nitrit, NO_2 -N konsantrasyonu sıfırlanmış ortamdan da bulunan nitritin tamamı azot gazına dönüştüğü sonucu elde edilmiş oldu. Karbon kaynağı olarak sodyum asetat kullanıldığında ve farklı C: N oranlarının kısmi denitrifikasyon yapan bakteri türlerinin nitrit konsantrasyonu giderimi 4 deney seti için ayrı ayrı sırasıyla Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12’de ve ayrıca tüm deney setlerinin nitrit NO_2 -N konsantrasyonları da Şekil 4.13’de verilmiştir.

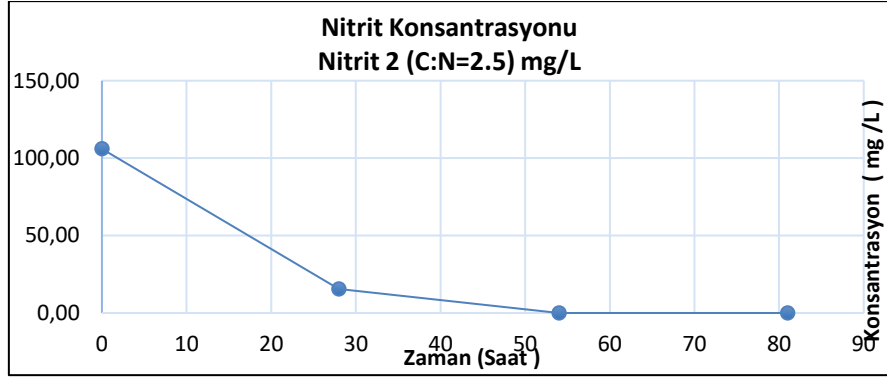


Şekil 4.9: Set 1 kesikli biyoreaktörlerdeki nitrit konsantrasyon grafiği.

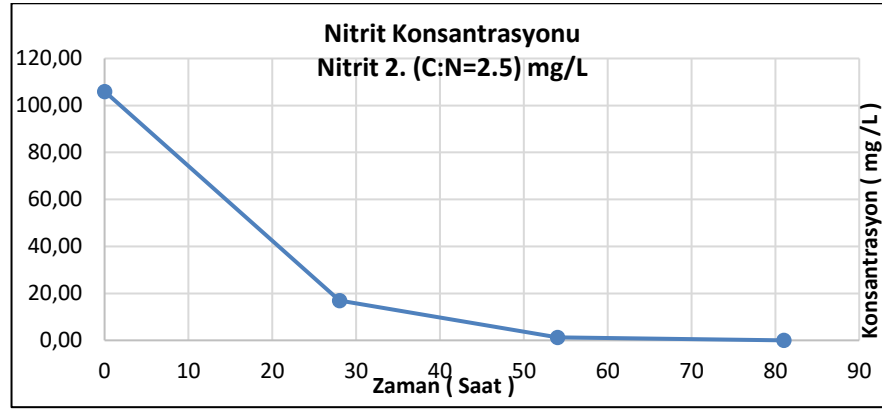
Biyolojik denitrifikasyon verimini arttırmak için uygun karbon kaynağının seçilmesinin önemine dikkat ederek ve aynı zamanda C: N oranının denitrifikasyon veriminin üzerinde etkili olduğu göz önünde bulundurularak ve özellikle birçok çalışmalarda tespit edilen kültürlerde düşünülerek bu deney setlerinde tek bir karbon kaynağı (sodyum asetat) kullanılmış ve C: N oranı olarak 1 ve 2,5 olarak ayarlanmış ve nitrit ve nitrat konsantrasyonlarındaki değişimlerine bakılmıştır.



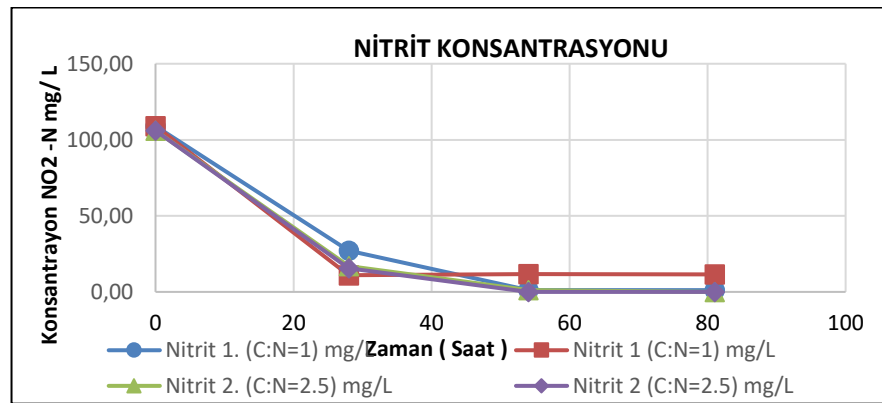
Şekil 4.10: Set 2 kesikli biyoreaktörlerdeki nitrit konsantrasyon grafiği.



Şekil 4.11: Set 3 kesikli biyoreaktörlerdeki nitrit konsantrasyon grafiği.



Şekil 4.12: Set 4 kesikli biyoreaktörlerdeki nitrit konsantrasyon grafiği.



Şekil 4.13: Kesikli biyoreaktörlerdeki Nitrit Konsantrasyon grafiği.

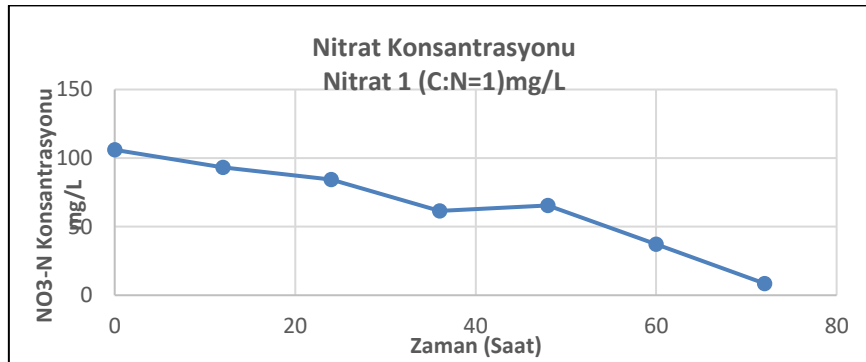
Nitrit konsantrasyonundaki azalmalar her bir deney setinde 28. saatten sonra sıfırlandığı gözlemlenmiştir.

4.2.2. Karbon Kaynağının Nitrat İndirgenmesine Etkisi

NO_3^- konsantrasyonunun fazla olması durumunda NO 'nun, N_2O 'ye dönüşümünü bile baskılandığı kaydedilmiştir[15], [16]. Bu durum dikkate alınarak deneyin ilk çalışmaları aşamasında azot kaynağı olarak sadece nitrit ile besleme yapılarak mikroorganizmaların adaptasyon süresi azaltılmasına ve nitrit sıfırlanması için geçen sürenin nasıl değişim gösterdiğine bakılmıştır daha sonra NO_3^- konsantrasyonunun farklılığının mikroorganizma adaptasyon süresine etkisine bakılmak üzere deney setleri C:N=1 ve C:N=2,5 olacak şekilde yeniden hazırlanarak nitrat konsantrasyonlarına Tablo 4.4'de görüldüğü gibi ölçülmüştür.

Tablo 4.4: Farklı C: N oranlarına göre kesikli biyoreaktördeki nitrat konsantrasyonu.

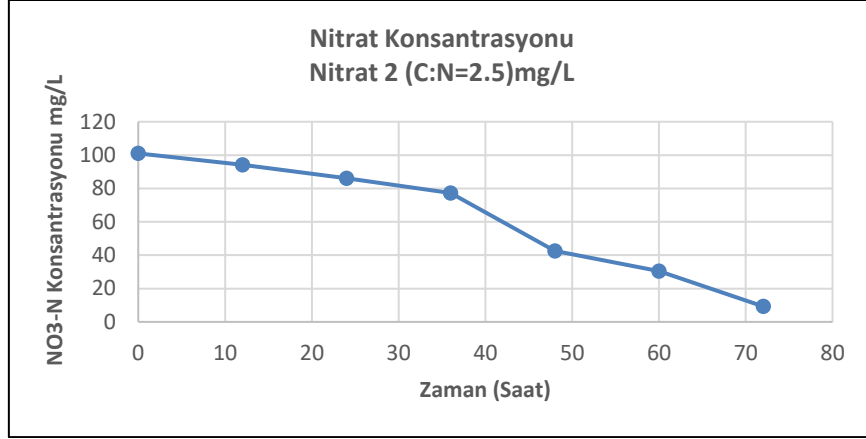
Zaman (saat)	Nitrat 1 (C: N=1) mg/L	Nitrat 2 (C: N=2.5) mg/L
0	106	101
12	93,3	94,2
24	84,4	86,1
36	61,4	77,2
48	65,5	42,5
60	37,3	30,5
72	8,6	9,3



Şekil 4.14: Nitrat konsantrasyonu C: N=1.

C: N oranlarına göre nitrat konsantrasyonlarındaki değişime bakıldığında Şekil 4.14 görüldüğü gibi C: N=1'deki nitrat konsantrasyonu 36. saate kadar kademeli

olarak düşüş göstermiş ancak 36. ve 48. saatler aralığında bir değişim göze çarpmamıştır 48. saatten sonra da kademeli olarak düşüş olmuştur.



Şekil 4.15: Nitrat Konsantrasyonu C: N=2.5.

C: N=2.5 oranlı deney setine bakıldığında Şekil 4.15’de karbon kaynağının fazlalığına göre nitrat konsantrasyonundaki düşüş orantılı bir şekilde görülmüştür.

4.3. Besiyeri ve Ortam Koşullarının N₂O Gazı Çıkışına Etkisi

Önceki yapılan çalışmalarımızda hazırlanan kesikli biyoreaktör düzeneklerinde ölçüm yapamadığımız N₂O gazı için, aynı şartları oluşturacak şekilde hazırlanan son 4 settteki besiyerlerin C: N oranlarının ve içeriğindeki PO₄⁻ -P miktarları değiştirilerek sadece çıkış gazı ölçümleri yapılmıştır. Hazırlanan 4 settin hesaplanan besiyeri içeriği Tablo 4.5’ de verilmiştir.

Tablo 4.5: Kesikli biyoreaktörlerdeki nitrit beslemeli besiyeri.

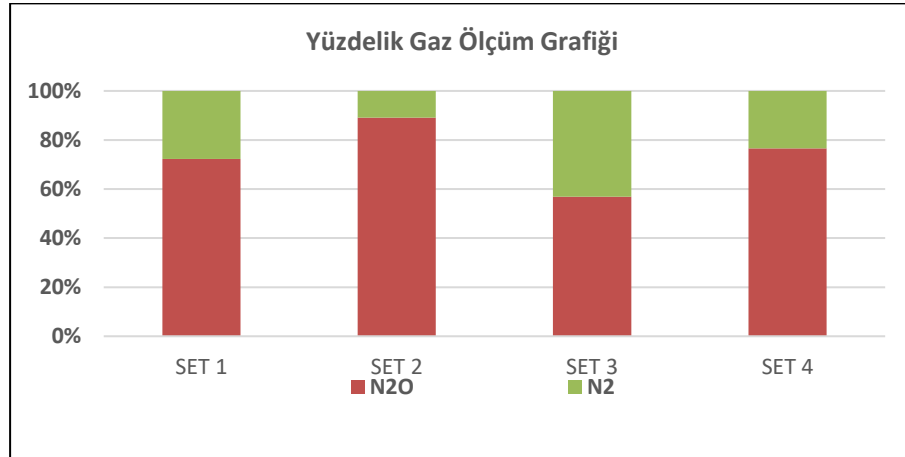
Set 1 (C: N=1) PO ₄ ⁻ P=10 mg C=100 mg NO ₂ ⁻ N=100mg	Set 2 (C: N=1) PO ₄ ⁻ P=150 mg C=100 mg NO ₂ ⁻ N=100 mg	Set 3 (C: N=2.5) PO ₄ ⁻ P=10 mg C=250 mg NO ₂ ⁻ N=100 mg	Set 4 (C: N=2.5) PO ₄ ⁻ P=150 mg C=250 mg NO ₂ ⁻ N =100 mg
0,342 g CH ₃ COONa 0,0269 g KH ₂ PO ₄ 0,0217 g K ₂ HPO ₄ 0,1g MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,493 g NaNO ₂ 1000 ml H ₂ O 1 ml iz elementler	0,342 g CH ₃ COONa 0,403 g KH ₂ PO ₄ 0,325 g K ₂ HPO ₄ 0,1 g MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,493 g NaNO ₂ 1000 ml H ₂ O 1 ml iz elementler	0,855gCH ₃ COONa 0,0269 g KH ₂ PO ₄ 0,0217 g K ₂ HPO ₄ 0,1 g MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,493 g NaNO ₂ 1000 ml H ₂ O 1 ml iz elementler	0,855g CH ₃ COONa 0,0269 g KH ₂ PO ₄ 0,0217 g K ₂ HPO ₄ 0,1g MgSO ₄ ·7H ₂ O 0,493 g NaNO ₂ 1000 ml H ₂ O 1 ml iz elementler

İz elementler olarak CuSO₄·5H₂O 0,01g/L, 0,2 gCaCl₂·2H₂O, 0,1g FeSO₄·7H₂O, 0,05g MnSO₄·H₂O, 0,01g CuSO₄·5H₂O 100 ml 0,1 N HCl konularak pH 7 olacak şekilde sabitlenmiş ve ortam koşullarının sıcaklığı 25°C olarak ayarlanmıştır. Daha sonra her bir 60 ml. hacimli besiyerlerine 2 ml. karışık kültür Gebze Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Laboratuvar'ında anaerobik olarak iletilen biyoreaktörden alınıp aşılama yapılarak işleme konulmuştur. 96 saat sonra N₂O gazı için ölçümler Termal İletkenlik Dedektöründe ölçülerek ölçüm sonuçları Tablo 4.6'de verilmiştir.

Tablo 4.6: Kesikli biyoreaktörlerdeki gaz ölçümleri.

	SET 1 C:N=1 C=100 mg N=100 mg PO ₄ -P=10 mg	SET 2 C:N=1 C=100 mg N=100 mg PO ₄ -P=150 mg	SET 3 C:N=2.5 C=250mg N=100mg PO ₄ -P=10 mg	SET 4 C:N=2.5 C=250 mg N=100 mg PO ₄ -P=150 mg
N ₂ O/N ₂	2,6	8,2	1,3	3,3
N ₂ O ppm	30050	23972	25266	13599
N ₂ ppm	11542	2920	19157	4163

Tablo 4.6'deki gaz ölçüm sonuçları grafiğe aktarılmış ve Şekil 4.16'da verilmiştir.

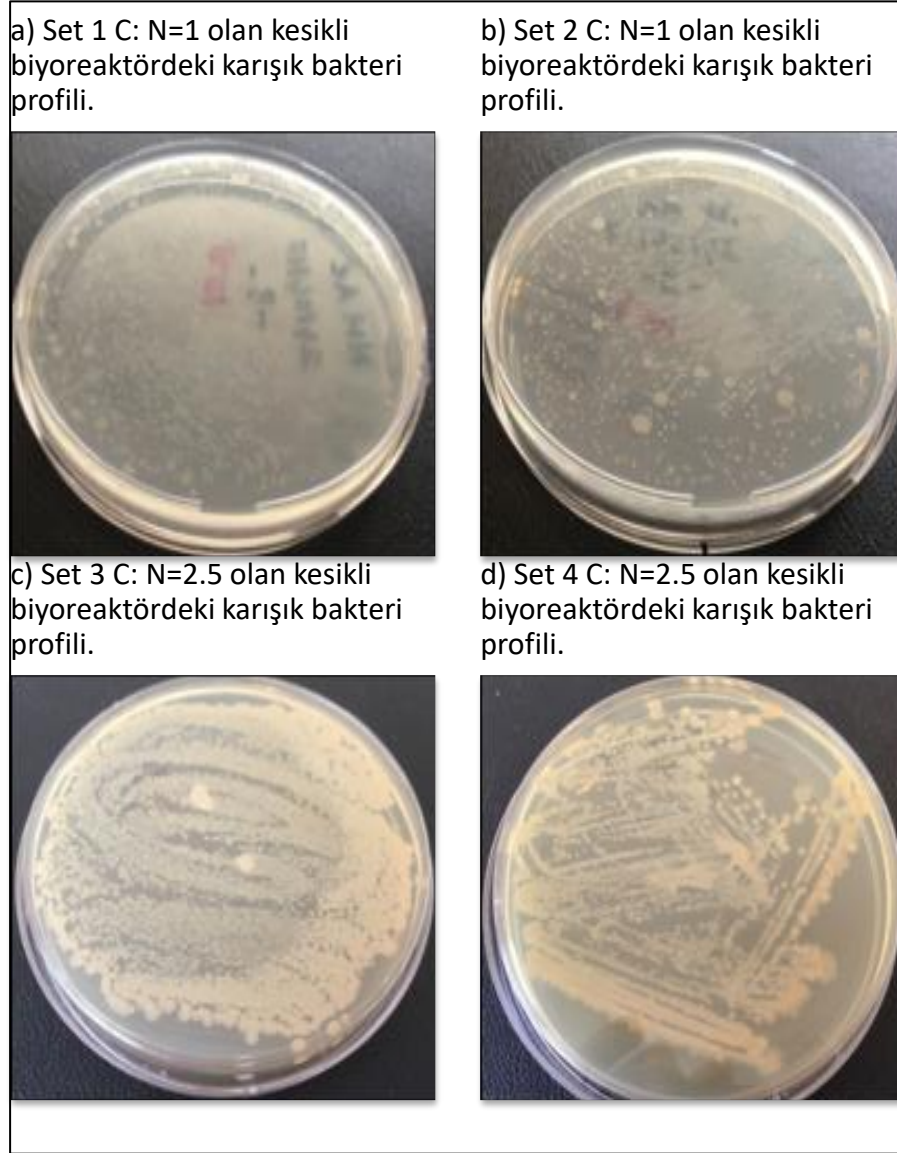


Şekil 4.16: Yüzdelik gaz ölçüm grafiği.

Yüksek fosfat konsantrasyonu ve düşük C:N oranında N₂O/N₂ oranı (8,2) en fazla olduğu görülmüştür. Aynı şekilde düşük fosfat konsantrasyonu ile yüksek C:N oranı N₂ üretiminde arttırıcı etki yapmış ve N₂O/N₂ oranı en düşük değerine gelmiştir.

4.4. Bakteri Profili

Farklı C: N oranına sahip biyoreaktörlerden ve anerobik biyoreaktörden alınan numunelerden elde edilen karışık mikroorganizma kolonileri Şekil 4.17'de görülmektedir.

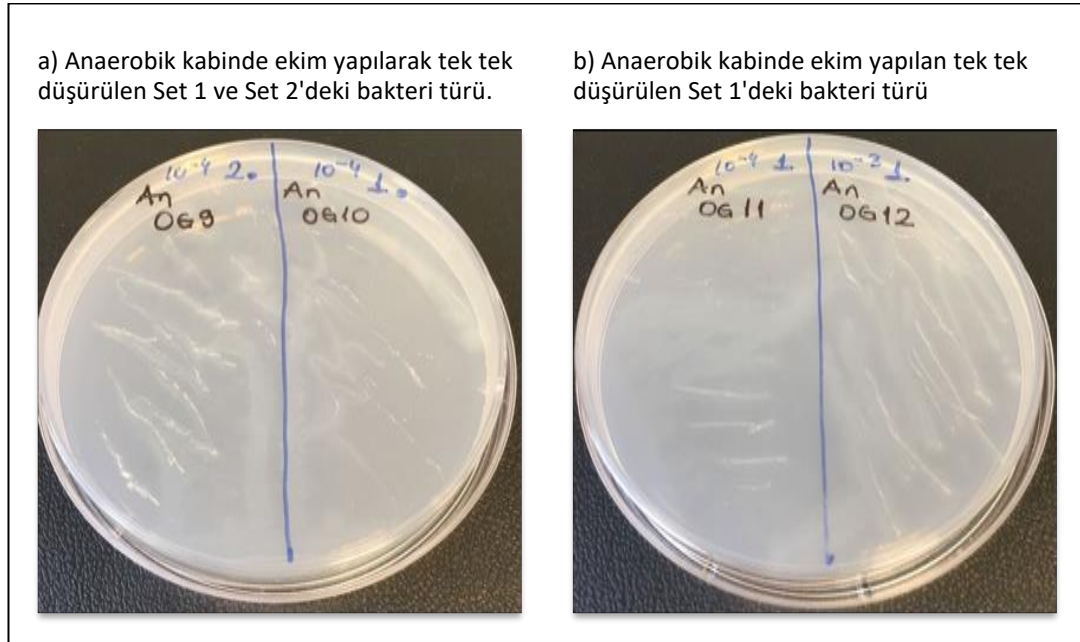


Şekil 4.17: Karışık mikroorganizma kolonileri.

Anaerobik kabinde üreyen farklı deney setlerinde elde edilen karışık mikrobiyel koloni çeşitliliğinin farklı olduğu gözlemlenmiştir. Bazı

mikroorganizmaların diğerlerine kıyasla daha baskın olduğu görülmüştür. Tür analizi için özellikle baskın türler seçilmiştir.

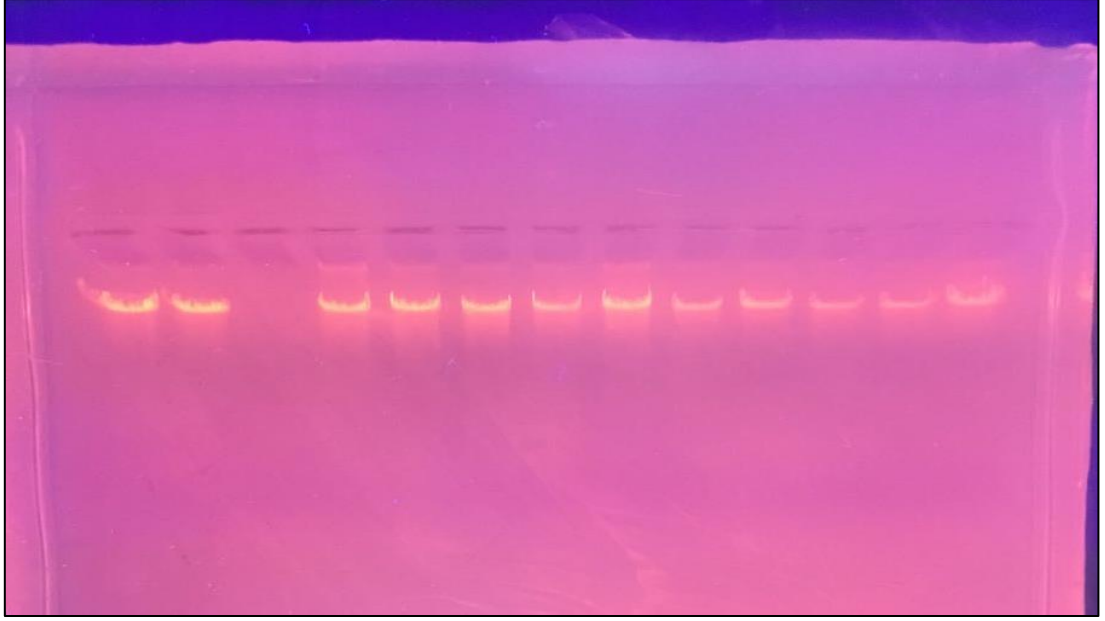
Şekil 4.17'deki deney seti 3 ve deney seti 4 de karışık olarak ekilen bakteri profilinde kendi aralarında benzerlik göstermiş ve deney seti 1 ve deney seti 2 dekinden farklı bakteri profilleri olduğu ve besin kaynağının mikroorganizmaların aktiviteleri etkilediği sonucunun ortaya çıkmasına sebep olmuştur.



Şekil 4.18: İzole edilen mikroorganizma kolonileri.

Daha sonra anaerobik kabin içerisinde bu karışık kültürlerdeki farklı koloniler steril kürdan yardımıyla taze katı besiyerine transfer edilerek izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzole edilen mikroorganizma kolonileri Şekil 4.18'de verilmektedir.

Ortam anaerobik olduğu için katı besiyerlerinde yoğun bir mikroorganizma üremesi gerçekleşmemiştir. Ancak üreyen mikroorganizmalar genomik DNA izolasyonu için yeterli olmuştur. Genomik DNA saflaştırma kiti (Thermo Scientific GeneJET) ile saflaştırılan genomik DNA ların jeldeki profili Şekil 4.19'da görülmektedir. Elde edilen koloniler incelendiğinde bu koloni morfolojilerinin bakteri kolonilerine benzediği saptanmıştır ve bu nedenle 16SrRNA analizi yaptırılarak tür tayini yapılmıştır.



Şekil 4.19: Genomik DNA izolasyonu.

Şekil 4.19'da görülen genomik DNA'ların tür analizlerinin sonuçları Tablo 4.7'de verilmektedir. Deney setlerinde görüldüğü üzere bu çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas sp.* Türü hem C: N=1 hem de C: N=2.5 olan oranlarının her ikisinde de görülmüştür. Bu iki tür hem aerobik hem de anaerobik koşullarda da gözlemlenmiş olup C: N oranlarının farklılıklarına rağmen fakültatif özellik göstermektedir. Ancak, *Stenotrophomonas acidaminiphila* türü sadece C: N=2.5 olan şartlarda ve aerobik ortamda gözlemlendiği görülmüştür aynı zamanda *Stenotrophomonas sp.* ve *Pseudomonas balearica*' da aerobik ortamda ağırlıklı olarak yer almıştır.

Tablo 4.7: 16SrRNA benzerliğine göre izolatların tür analizi.

Mikroorganizma kodu	Bulunduğu ortam şartları	Benzer olduğu bakteri türü	% Benzerlik
OG 1	C: N=2.5 Aerobik	Stenotrophomonas acidaminiphila	%97
OG 2	C: N=2.5 Aerobik	Pseudomonas aeruginosa	%96
OG 3	C: N=2.5 Aerobik	Stenotrophomonas sp.	%82
OG 4	C: N=1 Aerobik	Pseudomonas aeruginosa	%97
OG 5	C: N=2.5 Aerobik	Pseudomonas balearica	%96
OG 6	C: N=2.5 Aerobik	Pseudomonas sp. (balearica veya stutzeri)	%96
OG 7	C: N=1 Anaerobik	Pseudomonas aeruginosa	%97
OG 8	C: N=1 Anaerobik	Pseudomonas aeruginosa	%99
OG 9	C: N=2.5 Anaerobik	Pseudomonas aeruginosa	%99
OG 10	C: N=1 Anaerobik	Pseudomonas aeruginosa	%97
OG 11	C: N=1 Anaerobik	Pseudomonas aeruginosa	%96
OG 12	C: N=1 Anaerobik	Pseudomonas aeruginosa	%96
OG 13	C: N=1 Anaerobik	Pseudomonas aeruginosa	%98
OG 14	C: N=1 Anaerobik	Pseudomonas sp	%94

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada NO_x gazlarının denitrifikasyon yoluyla N₂ gazına indirgenmesini sağlayan biyoreaktörlerde kullanılmak üzere azot kaynaklarının farklı besleme şartlarında N₂ yerine kısmi denitrifikasyonla N₂O üretim süreci incelenmiştir. Denitrifikasyon ile NO gazı, önce N₂O'ya sonra da N₂'ye dönmektedir. N₂O gazının ısıtma potansiyeli yüksek bir sera gazı olması tam denitrifikasyon sağlanarak N₂ şeklinde sistemi terk etmesine uygun olarak sistemler çalıştırılmıştır. Ancak N₂O'nun aynı zamanda enerji amaçlı kullanımını gösteren çalışmalar mevcuttur. Özellikle arıtma tesislerinden kaynaklanan N₂O'nun bu şekilde ısı ayrışma ile enerjiye çevrilerek arıtma tesislerinden kaynaklanan sera gazı salınımlarını azaltılması hedeflenen konular arasındadır. Denitrifikasyon kısmi olarak gerçekleşirse ara ürün N₂O denitrifikasyondaki son ürün olmaktadır. Böylece bir sonraki basamağa geçmek için gereken karbon kaynağından da tasarruf edilerek, enerji üretimi gerçekleştirilebilecektir. Çalışmalarda kısmi denitrifikasyonun sağlanması için gereken optimum şartlar farklı zamanlarda nitrat ve karbon kaynağı beslemesi ile maksimum düzeyde olabileceği gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında kesikli biyoreaktördeki denemelerle iki farklı C: N oranı ile fosfat konsantrasyonunu N₂O üretimine etkisi ve nasıl bir mikroorganizma çeşitliliği oluşturduğu araştırılmıştır. Etkili bir denitrifikasyon için gerekli olan C:N oranının önemine birçok araştırmada rastlanmaktadır [17]-[18]. Genel olarak 0,5 ve 2,5 aralıklarındaki C: N oranları önerilmiştir. Biyolojik denitrifikasyon verimini arttırmak için uygun karbon kaynağının seçilmesinin önemine dikkat çeken araştırmacılar, aynı zamanda C: N oranının denitrifikasyon veriminin üzerinde etkili olduğu belirtmişlerdir [22]-[23]. Özellikle birçok çalışmada tespit edilen kültürler ile ve kolon tipi reaktörlerde yapılan ve mikroorganizma kaynağı olarak saf kültürler yerine hangi mikroorganizmaların bulunduğu tam olarak bilinmeyen çamurların kullanılması "hangi mikroorganizma ile hangi karbon kaynağı veya hangi C: N oranı" sorularını beraberinde getirdiğinden bu deney setlerinde çalışmada tek bir karbon kaynağı (sodyum asetat) kullanılmış ve C: N oranı olarak 1 ve 2,5 olarak seçilmiştir. Ayrıca *Pseudomonas aeruginosa* ile ilgili çalışmalarda türün yüksek PO₄

konsantrasyonlarında N_2O reduktaz enziminin inhibe edilmesi sonucu daha fazla N_2O üretimine yol açtığı modellenmiştir[20]. Bu tür için optimum fosfat miktarı, N_2O üretimindeki etkisine bakılmak amacıyla diğer bir parametre olarak kullanılmıştır.

Kesikli biyoreaktörler pilot olarak işletilen ve nitrit ile beslenen bir biyoreaktörden yapıldığından nitrit ile beslenen kesikli reaktör deneylerinde mikroorganizmaların aktivitelerine bakıldığında adaptasyon süresinde azalma olduğu (24 saat) gözlemlenmiştir. Her iki nitrat beslemeli deney setinde gözlemlenen azot kaynağı olarak nitrat beslemesi yapıldığında mikroorganizma aktivitelerinde görülen adaptasyon safhası biraz daha uzun olmaktadır (34saat).

Deneme sonuçları kesikli reaktör için kullanılan C: N oranlarında 48 saat içinde nitrit indirgemesi, 72 saat içinde de nitrat indirgemesinin incelenebileceği görülmüştür. C: N oranı nitrat ve nitritin indirgenme hızında anlamlı bir değişime neden olmamıştır. Kesikli biyoreaktörlerdeki hazırlanan NO_2-N içerikli ve her bir deney setinin denitrifikasyon yeteneği ayrı ayrı test edildiği araştırma bölümünde NO_2-N konsantrasyon düzeyinin 108. saat sonunda tükendiği gözlenmiştir. Sentetik atık suyun bakteri kültürleriyle yapılan inkübasyonu sonucunda başlangıçtaki sabit NO_2-N 100 mg/L giderimi tamamiyle sağlanmış ve bakterilerin yüksek denitrifikasyon yeteneğine sahip olduğu ortaya çıkmıştır.

Literatürde yapılan çalışmalarda ortaya çıkan sonuçlar göz önünde bulundurularak ortamda NO_3^- ve NO_2^- birlikte bulunması durumunda, mikroorganizmalar azot kaynağı olarak NO_3^- 'ı tercih ettiği gözlemlenmiştir [38]. Bu durum dikkate alınarak deneyin ilk çalışmaları aşamasında azot kaynağı olarak sadece nitrit ile besleme yapılarak mikroorganizmaların adaptasyon süresi azaltılmasına ve nitrit sıfırlanması için geçen sürenin kısaltılması ile nasıl değişiklik gösterdiğine bakılmıştır. Ve dolayısıyla nitrit ile beslemeli mikroorganizmaların aktivitelerine bakıldığında adaptasyon süresinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun akside düşünülerek ikinci aşamada yapılan deney setlerindeki çalışmalarda NO_3^- giderimindeki sonuçlarda en yüksek NO_3^- giderimi C: N=1 olan deney setinde 60. saat sonunda 37,3 mg/L'ye ve C: N=2.5 olan deney setinde nitrat konsantrasyonu 30,5 mg/L'ye düştüğü görülmüştür. Her iki nitrat

beslemeli deney setinde gözlemlenen azot kaynağı olarak nitrat beslemesi yapıldığında mikroorganizma aktivitelerinde görülen adaptasyon safhası biraz daha uzun olmuştur.

Kesikli biyoreaktörden oluşan N_2 ve N_2O gazları GC/TCD ile ölçülerek düşük ve yüksek C: N oranı ile düşük ve yüksek Fosfat konsantrasyonlarının etkisi belirlenmiştir. C: N oranının artması N_2 üretimini artırırken, düşük oranlarda N_2O içeriği daha yüksek çıkmıştır. Nitrozoksit reduktaz enzimini deaktive ettiği bilinen yüksek fosfat konsantrasyonları kesikli reaktör çıkış gaz konsantrasyonlarında bu etkiyi göstermiştir. Yüksek fosfat içeren biyoreaktörden çıkan gazın N_2O/N_2 oranı düşük fosfat içeriğine göre yaklaşık 3 kat daha çok olmuştur. Özetle 1 gibi düşük C: N oranı ve 100 mg/L gibi yüksek fosfat konsantrasyonu en fazla N_2O çıkışını ($N_2O/N_2 = 8$) sağlayan şartlar olarak belirlenmiştir.

Literatür araştırıldığında kısmi denitrifikasyonda görev alan birçok bakteri grubu bulunmaktadır. Anoksik tabakada görev alan heterotrofik mikroorganizmalar sanıldığı gibi aksine çok daha komplekstir. Bu mikroorganizmalar beş ayrı grup altında toplanabilir: Bu gruplardan dördü denitrifikasyon işlemine etkin bir şekilde katkıda bulunur, bir grup ise denitrifikasyon yapamayan mikroorganizmaları içerir (non-denitrifier). Bu gruplar, hem nitratı ve hem de nitriti indirgeyebilen bakteri grubudur ve gerçek denitrifikasyon bakterilerini, yalnızca nitratı nitrite dönüştürebilen yarı denitrifikasyon bakterileri, nitrat ve nitriti indirgedikleri halde nitrit indirgeme işlemleri nitrat tarafından engellenen yarı nitrit indirgeyicileri, yalnızca nitriti indirgeyebilen özel nitrit indirgeyiciler ve nitratı veya nitriti indirgeyemeyen yani denitrifikasyon yapamayan bakterileri içerir [21].

Bu tez çalışması sonucunda görülen NO_2^- -N Nitrit tüketimi, farklı C: N oranları farklılıklarına göre en yüksek C: N=2.5 olan deney setinde elde edildiği ve bununla birlikte en yüksek mikroorganizma konsantrasyonu C: N=2,5 olan deney setinde gerçekleşmiştir. Ancak tüm deney sistemlerinin inkübasyonu sırasında farklı birkaç koloni gözlemlenmiş olup deney seti C: N=2.5'de gözlemlenen küçük kolonilerin dominant olduğu görülmüştür. Tüm deney setleri için mikroorganizma üremelerinin 36. Saatten sonra dengeye ulaşmış olduğu görülmüştür. *Stenotrophomonas acidaminiphila*'da, aerobik bakterilerin birlikte var olduğu atık su, çamur ve organik katıların işlenmesi için kullanılan kompleks, insan yapımı biyotoplar olarak

bilinmektedir [25]-[26]-[27]. Bakteriyel popölasyon türleri üzerine yapılan araştırmalarda, bu ekosistemlerde aerobik, sporsuzlar, gram negatif, kamçılılar, kemo-organotrofik proteobakterilerin, kesinlikle solunum enerjisi üreten bir metabolizmaya sahip oldukları bilinmektedir [28]-[29]-[30]. *Stenotrophomonas* türleri, su, tortu, bitki kökleri, korozyona uğramış metal yüzeyler, atık gaz biyolojik filtreler, su ürünleri yetiştirme tankları, petrol sahaları, kanalizasyon ve anaerobik reaktörler gibi çok çeşitli doğal ve yapay çevrenin yaygın üyeleri arasında yer almaktadır [31]-[32]-[33]-[34]-[35].

Anaerobik olarak nitratla ve nitritle beslenen her iki C: N oranında *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi teşhis edilen tek baskın tür olmuştur. *Pseudomonas aeruginosa* sporsuz, polar flagellalı, hareketli, gram negatif, genellikle kapsülsüz tam denitrifikasyon yapabilen bir mikroorganizmadır. Kùltürlerde bazen ikiyeşitli, ancak çoğunlukla tek tek görùlen ince düz, çomaklar olup *P. aeruginosa* genel besiyerlerinde kolaylıkla ürer. *Pseudomonas aeruginosa* ile ilgili çalışmalarda türün yüksek PO₄ konsantrasyonlarında N₂O reduktaz enziminin inhibe edilmesi sonucu daha fazla N₂O üretimine yol açtığı modellenmiştir. Aerobik ortamda denitrifikasyon yaptığı son çalışmalarda anlaşılan *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi hem aerobik hem de anerobik ortam koşullarında optimal metabolizma olarak aerobik solunumu (oksijenle birlikte) kullanan ancak nitrat veya diğer alternatif elektron alıcısı üzerinde anaerobik olarak solunum yapabilen bir türdür. *P. aeruginosa*, benzoat gibi organik bileşikler de dahil olmak üzere çok çeşitli organik molekülleri katabolize edebilir. Bu durumda *P. aeruginosa*, toprak, su, insanlar, hayvanlar, bitkiler, kanalizasyon ve hastaneler gibi ortamlarda bulunduğu için çok yaygın bir mikroorganizma olmasını sağlar [36]-[37].

Çalışma pilot ölçekte nitritle beslenen bir biyoreaktörden aşılanarak gerçekteştirilmiş olduğundan çok geniş bir tür çeşitliliği görùlmemiřtir. Sistemde doğrudan biyokùtle miktarları çok düşük kaldığından standart askıda katı madde belirleme metodu kullanılamamıştır. Sonrasında yapılan çalışmalarda doğrudan denitrifikasyon çamurundan daha yoğun bir biyokùtle ile aşılanarak yapılması çok daha çeşitli mikroorganizma varlığını ve denitrifikasyon kinetiğini net bir şekilde ortaya koyabilir.

Denitrifikasyon ürünlerinden N_2 gazının ölçümü analiz sistemin tam olarak havasız bir hale getirememesinden ötürü tüm ölçümlerde N_2 ve O_2 gazına sırasıyla 41000 ve 9000 ppm seviyesinde rastlanmıştır. Daha sonraki çalışmalarda hem biyoreaktör denemeleri hem de ölçümlerin havasız ortam sağlanarak yapılması sonuçların güvenilirliğini artıracaktır.

Bu çalışmada azot kaynağı olarak başlıca nitrat ve nitrit kullanılmış olup, sistemin kirletici gazlardan NO_x için çalıştırılması ile atık gazın enerji eldesi amaçlı N_2O olarak kullanılmasına imkân sağlayacaktır. Sürekli biyoreaktörlerde, NO_x 'ların düşük C: N oranı ve yüksek fosfat konsantrasyonları veya uygun içerikli atık suyun karbon ve besi kaynağı olarak kullanılarak enerji eldesi amaçlı N_2O 'ya çevrilmesi fazladan etkili bir sera gazı salınımına neden olmadan hem atık gazın bertarafını hem de enerji üretiminin gerçekleşmesini mümkün kılacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Maeda M., Kayano E., Fujiwara T., Nagare H., Akao S., (2016), "Nitrous oxide emissions during biological soil disinfestation with different organic matter and plastic mulch films in laboratory-scale tests", *Environmental Technology*, 37 (4), 432-438.
- [2] Web 1, (2017), <http://www.iklim.cevreorman.gov.tr/>, (Erişim Tarihi: 04.04.2017).
- [3] Web 2, (2017), <http://www.meteoroloji.org.tr>, (Erişim Tarihi: 02.02.2017).
- [4] Web 3, (2017), <https://www.epa.gov/ghgemissions/overview-greenhouse-gases>, (Erişim Tarihi: 01.03.2017).
- [5] Shoun H., Fushinobu S., Jiang L., Kim S. W., Wakagi T., (2012), "Fungal denitrification and nitric oxide reductase cytochrome P450nor", *Philos Trans Soc Lond Biology Science*, 367 (1593), 1186-1194.
- [6] Yang Q., Liu X., Peng C., Wang S., Sun H., Peng Y., (2009), "N₂O Production during Nitrogen Removal via Nitrite from Domestic Wastewater: Main Sources and Control Method", *Environmental Science Technology*, 43 (24), 9400-9406.
- [7] Web 4, (2013), <http://www.iklim.gov.tr>, (Erişim Tarihi: 03.04.2017)
- [8] Tiedje J. M., (1988), "Ecology of Denitrification and dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium", . *Environmental Microbiology of Anaerobes*, 54, 179-244.
- [9] Shoun H. T., Uchimura N. ,Enjoji H., Seki T., Taguchi A., (2002), "Nitrate Reductase-Formate Dehydrogenase Couple Involved in the Fungal Denitrification by *Fusarium oxysporum*", *Biochemical*, 131, (4), 579-586.
- [10] Kampschreur M. J. T., Hardy K., Jetten R., Mike S. M., Van L., Mark C. M., (2009), "Nitrous oxide emission during wastewater treatment", *Water Research*, 4093-4103.
- [11] Qasaimeh A., AlSharie H., Masoud T., (2015), "A Review on Constructed Wetlands Components and Heavy Metal Removal from Wastewater", *Journal of Environmental Protection*, 06 (07), 710-718.
- [12] Metcalf E., (2003), "Wastewater engineering: treatment and reuse", Fourth edition, George Tchobanoglous.

- [13] Asma Alinsafi N. A., Fabrice Be'line B., Lendormi T., Limousy L., Sire O., (2008), "Nitrite effect on nitrous oxide emission from denitrifying activated sludge", *Process Biochemistry*, 43, 683–689
- [14] Scherson Y. D., Wells G. F., Woo S. G., Lee J., Park J., Cantwell B. J., Criddle C. S., (2013), "Nitrogen removal with energy recovery through N₂O decomposition", *Energy Environmental Science*, 6 (1), 241-248.
- [15] Stouthamer A. H., (1991), "Metabolic Regulation including Anaerobic Metabolism in *Paracoccus Denitrificans*", *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 23, (2), 163-185.
- [16] Gottschalk G., (1985), "Bacterial Metabolism", Springer Verlag, 122-126.
- [17] Dahab M. F., (1988), "Nitrate Removal from Water Supplies Using Biological Denitrification", *Jornal of Water Polution Control Federation*, 1670-1676.
- [18] Van Verseveld H. W., (1987), "The Respiratory Chain and Energy Conservation in the Mitochonrion-Like Bacterium *Paracoccus Denitrificans*", *Microbiological Siciences*, 329-333.
- [19] Vestrate W., Vaerenbergh E., (1986), "Aerobic activated Sludge", *Biotechnology*, 43-112
- [20] Adouani N., Lendormi, T., Limousy, L., Sire, O., (2010), "Effect of the Carbon Source on N₂O emissions during Biological Denitrification", *Resources, Conservation and Recycling*, 54, (5), 299-302.
- [21] Reiko Sameshima-Saito K. C., Minamisawa K., (2003), "New Method of Denitrification Analysis of *Bradyrhizobium*", *American Society for Microbiology*, 72, (4), 2526-2532.
- [22] Gayle B. P., Boardman G.D., Sherrand J.H., Bendit R.E., (1989), "Biological Denitirification of Water", *Journal of Environmental Engineering*, 930-943.
- [23] Mateju V., (1992), "Biological Denitrification," *Enzym Microbiology Technology*, 170-183.
- [24] Delanghe B., Nakamura F., Myoga Y., Guibal E., (1994), "Drinking Water Denitrification of in a Membrane Bioreactor", *Water Science Technology*, 30, (6), 157-160.

- [25] Guyot J. P., Ramirez F., Ollivier B., (1994), "Synergistic degradation of acetamide by methanogens and an aerobic Gram-positive rod.", *Microbiol Biotechnology*, 42, 452–456.
- [26] Noeth C., Britz T. J., Joubert W. A., (1988), "The isolation and characterization of the aerobic endospore-forming bacteria present in the liquid phase of an anaerobic fixed-bed digester, while treating a petrochemical effluent. ", *Microbiologic Ecology*, 233–240.
- [27] Toerien D.F., Hattingh W.H., (1969), "Anaerobic digestion and The microbiology of anaerobic digestion.", *Water Research*, 3, (6), 385–416.
- [28] Britz T. J., Spangenberg G., Venter C. A., (1994), "Acidogenic microbial species diversity in anaerobic digesters treating different substrates.", *Water Science Technology*, 55–61.
- [29] Hakulinen R., Woods S., Ferguson J., (1985), "The role of facultative anaerobic micro-organisms in anaerobic biodegradation of chlorophenols", *Water Science Technology*, 289–301.
- [30] Ng A., Melvin W. T., Hobson P. N., (1994), "Identification of anaerobic digester bacteria using a polymerase chain reaction method", *Bioresource Technology*, 73–80.
- [31] Aznar R., Alcaide E., Garay, (1992), "Numerical taxonomy of pseudomonads isolated from water, sediments and eels.", *Enzym Sysem Application Microbiology*, 235–246.
- [32] Boonchan S., Britz M. L., Stanley G. A. , (1998), "Surfactant enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*", *Biotechnol Bioengineering*, 482–494.
- [33] Finkmann W., Altendorf K., Stackebrandt E., Lipski A., (2000), "Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen.", *International System Evolution Microbiology*, 273–282.
- [34] Wilkinson K. G., Dixon K. W., Sivasithamparam K., (1994), "Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid associated bacteria.", *Plant Soil*, 291–295.
- [35] Wallace W. H., Rice J. F., White D. C., Sayler G. S., (1994), "Distribution of alginate genes in bacterial isolates from corroded metal surfaces. ", *Microbiological Ecology*, 213–223.

- [36] Lederberg J., (2000), "Encyclopedia of Microbiology.", Second Edition., San Diego, 876-891.
- [37] Essokazi A., Sebastien T., Jean Luc C., Marc L., Hovel M., (2002), "Stenotrophomonas acidaminiphila sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 559–568.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Aydın’da doğdu. 2008 yılında İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fizik bölümünden mezun oldu. 2015 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans öğrenimi boyunca TÜBİTAK tarafından desteklenen 114Y125 numaralı araştırma projesinde burslu öğrenci olarak görev aldı.