

ANAMMOX prosesi ile amonyum giderimi ve Anammox popülasyonunun karakterizasyonu

Didem GÜVEN*, Seval SÖZEN

İTÜ İnşaat Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 34469, Ayazağa, İstanbul

Özet

Atıksuların alıcı ortama deşarjında özellikle azot bileşenleri için getirilen sıkı standartlar mevcut sistemlerin yerine alternatif yöntemlerin geliştirilmesini gerektirmektedir. Anaerobik amonyum oksidasyonu (Anammox), özellikle yüksek azot yüküne sahip atıksuların arıtılmasında yeni ve güçlü bir sistem olarak ortaya konmuştur. Bu çalışmada tam karışimli sürekli bir anammox reaktöründe yüksek konsantrasyonda amonyum içeren sentetik atıksu kullanılarak, 262 gün boyunca amonyum giderim verimi incelenmiştir. 1. ve 262. günler arasında sisteme verilen amonyumun %90'ının ve nitritin %99'unun giderildiği görülmüştür. Reaktörden biyokütle atılmadığından, sistem kademeli olarak artırılan azot ile yüklenmiştir. Yüklemedeki bu artış sonunda hacimsel nitrit ve amonyum dönüşüm hızı ve nitrat üretim hızı artmıştır. Çalışmada anammox prosesini yürüten mikroorganizma topluluğunun FISH analizi ile karakterizasyonu yapılmıştır. Prosesi oluşturan biyokütle topluluğunun Planktomaysit türünde Anammox bakterilerinin Dokhaven-2 alt türünden oluştuğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Anammox, amonyum, Flüoresan in situ hibridizasyon (FISH).

Ammonium removal using ANAMMOX process and characterization of the population

Abstract

Stringent standards for nitrogen discharge necessitate the implementation of new systems for the sustainable removal of ammonium from wastewater. One of such systems is based on the process of anaerobic ammonia oxidation called as Anammox, which is a new powerful tool especially for strong nitrogenous wastewaters. In this study, continuous flow experiments were conducted in an anammox reactor with synthetic wastewater for 262 days. Between days 1 and 262, 90% ammonium and 99% nitrite removal was obtained. In this period, the average ammonium and nitrite degradation and nitrate production yielded a ratio of 1:1.31:0.18. Since almost complete biomass retention was achieved in the reactor, the nitrogen load of the reactor could be increased gradually. In this sense, increased volumetric ammonium and nitrite conversion rates were obtained. Volumetric ammonium conversion rate was increased from 0.002 to 0.28 kg NH₄⁺-N m⁻³ reactor day⁻¹ and volumetric nitrite conversion rate was increased from 0.002 to 0.363 kg NO₂⁻-N m⁻³ reactor day⁻¹. The microbial community in the reactor was characterized with Fluorescence in situ Hybridization. Results obtained from the continuous flow experiments made possible to evaluate the process performance and dynamics of the anammox population. FISH analysis showed that the biocommunity in the reactor was dominated by Dokhaven strain of Planctomycete-like Anammox bacteria.

Keywords: Anammox, ammonium, Fluorescence in situ hybridization (FISH).

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Didem GÜVEN, didemnl@yahoo.com; Tel: (212) 285 65 40.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ İnşaat Fakültesi'nde tamamlanmış olan "Experimental assessment of anammox process response to different carbon compounds" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 25.07.2003 tarihinde dergiye ulaşmış, 17.09.2003 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 29.02.2004 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

Giriş

Amonyum, evsel ve endüstriyel atıksuların arıtımında giderilmesi gereken en önemli parametrelerden biridir. Atıksulardan amonyum giderimi genellikle biyolojik sistemlerde amonyağın aerobik koşullar altında nitrata oksidasyonu (nitrifikasyon) ve nitratın anoksik koşullar altında bir organik karbon kaynağının varlığında azot gazına indirgenmesi (denitrifikasyon) ile sağlanmaktadır. Nitrifikasyon prosesi iki ayrı adımda gerçekleşir. İlk adımda amonyum nitrite oksitlenir ve bu adımı *Nitrosomonas* ya da *Nitrosospira* gibi ototrofik amonyum oksitleyici bakteriler yürütür. İkinci adımda nitrit, Nitrobakter gibi nitrit oksitleyici bakteriler tarafından nitrata oksitlenir. Nitrifikasyonu takip eden denitrifikasyon prosesinde nitrat ya da nitrit denitrifikasyon bakterileri tarafından azot gazına indirgenir. Denitrifikasyon, çeşitli tür ve fizyolojik tipte geniş bir spektrumdaki bakteriler tarafından gerçekleştirilir (Kuenen ve Robertson, 1987).

Yakın geçmişte amonyumun anaerobik koşullar altında doğrudan azot gazına indirgendiği yeni bir biyolojik proses (Anammox) tanımlanmıştır (Van De Graaf vd., 1996). Nitritin elektron alıcısı olarak kullanıldığı anaerobik amonyum oksidasyonunda (Anammox) ana ürün azot gazı olmakla birlikte, bir miktar nitrat da oluşmaktadır. Ardışık kesikli reaktörlerde yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre NH_4^+ (giderilen): NO_2^- (giderilen): NO_3^- (üretilen) oranları 1:1.32:0.26 ve maksimum çoğalma hızı 0.0027 h^{-1} olarak belirlenmiştir (Strous vd., 1998). Bu prosesi oluşturan mikroorganizma topluluğu Planktomaysit türünün ototrofik grubunun üyesi olarak tanımlanmıştır (Strous vd., 1999). Bu organizmaya ait 16S rRNA bilgileri kullanılarak geliştirilen oligonükleotit problemleri ile flüoresan in situ hibridizasyon analizi ile anammox bakterisinin ve bu gruba dahil diğer türlerin varlığının tespiti için çeşitli atıksu arıtma tesislerinde araştırmalar yapılmıştır ve bu sistemlerin pek çoğunda bu organizmalar tespit edilebilmiştir (Schmid, 2000). Bu çalışmada tam karışimli sürekli bir anammox reaktörü ile yüksek konsantrasyonda amonyum içeren sentetik atıksu kullanılarak prosesin azot giderim performansı incelenmiştir. Çalışmada ayrıca, son yıllarda geliştirilen Flüoresan in situ hibridizasyon

(FISH) analizi ile anammox prosesini yürüten mikroorganizma topluluğunun karakterizasyonu yapılmıştır.

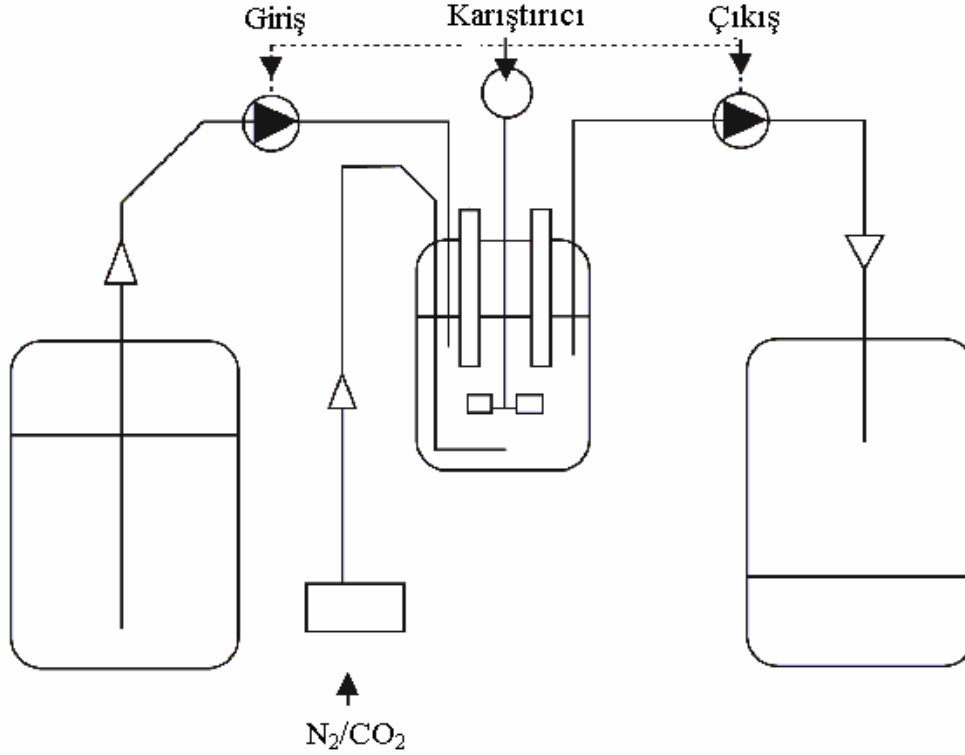
Deneysel çalışmalar

Reaktörün aşılınması için %74 oranında zenginleştirilmiş anammox biyokütlesi kullanılmıştır. Bu biyokütle planktomaysit türünde anaerobik amonyum oksitleyici (anammox) bakterilerden oluşmaktadır. Deney 15 l'lik bir tam karışimli sürekli akımlı reaktörde gerçekleştirilmiştir (Şekil 1). Reaktöre N_2/CO_2 gaz karışımı sürekli olarak verilmek suretiyle reaktör içinde anaerobik koşulların sürekliliği sağlanmıştır. Reaktör, hidrolik bekleme süresi 5 gün olacak şekilde çalıştırılmış, tam karışım $100 \pm 10 \text{ rpm}$ hızında çalışan otomatik karıştırıcı ile sağlanmıştır. Deney boyunca reaktörden biyokütle atılmamış, çoğalan biyokütle reaktörde tutulmuştur. Reaktörde ısıtma yapılmak suretiyle sıcaklık $30 \pm 1^\circ\text{C}$ olarak sabit tutulmuştur. Reaktör, artan konsantrasyonlarda nitrit ve amonyum içeren sentetik atıksu ile beslenmiştir. Sentetik atıksu, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ formunda amonyum ve NaNO_2 formunda nitrit ve mineraller ile oluşturulmuştur (Tablo 1).

Nitrat, nitrit ve amonyum Strous (1998) tarafından tanımlanan kolorimetrik yöntemler esas alınarak ölçülmüştür. Reaktörün işletilmesi sırasında biyokütle örnekleri alınarak biyokütle kompozisyonu Flüoresan in situ hibridizasyon analizi ile incelenmiştir. Flüoresan in situ Hibridizasyonu, Neef vd., (1998) tarafından verilen protokol uyarınca gerçekleştirilmiştir.

Deneysel bulgular

Laboratuvar ölçekli 15 l'lik reaktör, yüksek derecede zenginleştirilmiş Anammox biyokütlesi (*Candidatus Brocadia Anammoxidans*) ile aşılınmıştır. Tam karışimli ve sürekli olarak çalıştırılan reaktör, artan konsantrasyonlarda amonyum ve nitrit içeren sentetik atıksu ile beslenmiştir. İlk 147 gün boyunca sistemin azot yükü kademeli olarak $0.002 \text{ kg NH}_4^+-\text{N m}^{-3}_{\text{reaktör}} \text{ gün}^{-1}$ değerinden, $0.183 \text{ kg NH}_4^+-\text{N m}^{-3}_{\text{reaktör}} \text{ gün}^{-1}$ değerine ve $0.002 \text{ kg NO}_2^--\text{N m}^{-3}_{\text{reaktör}} \text{ gün}^{-1}$ değerinden $0.204 \text{ kg NO}_2^--\text{N m}^{-3}_{\text{reaktör}} \text{ gün}^{-1}$ değerine yükseltilmiştir.



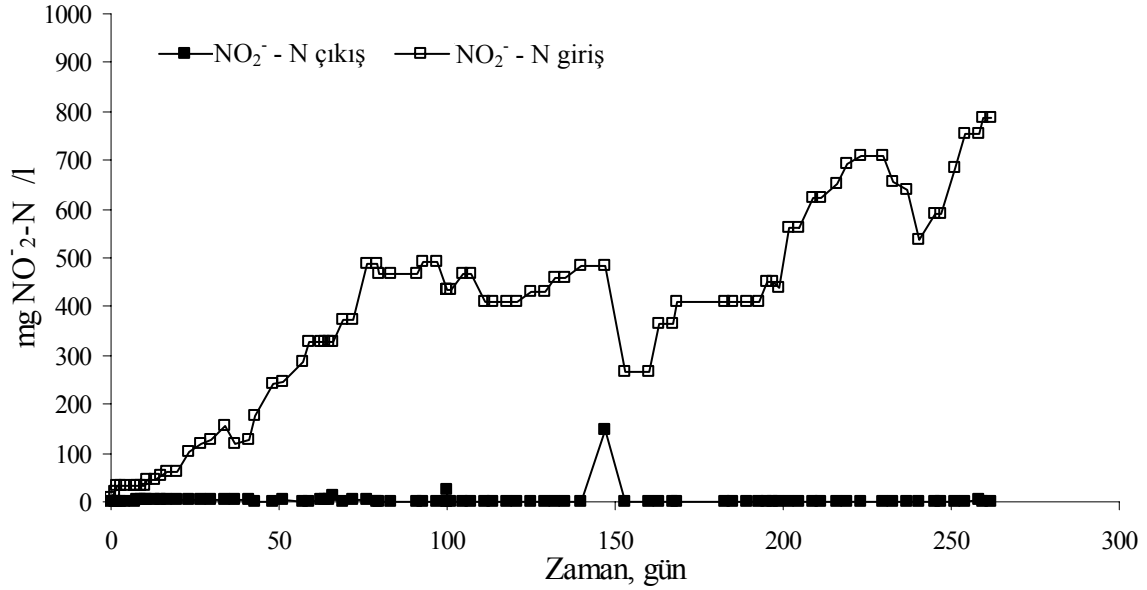
Şekil 1. Deney düzeneğinin şematik gösterimi

Tablo 1. Sentetik atıksu için kullanılan mineral ortamın bileşimi

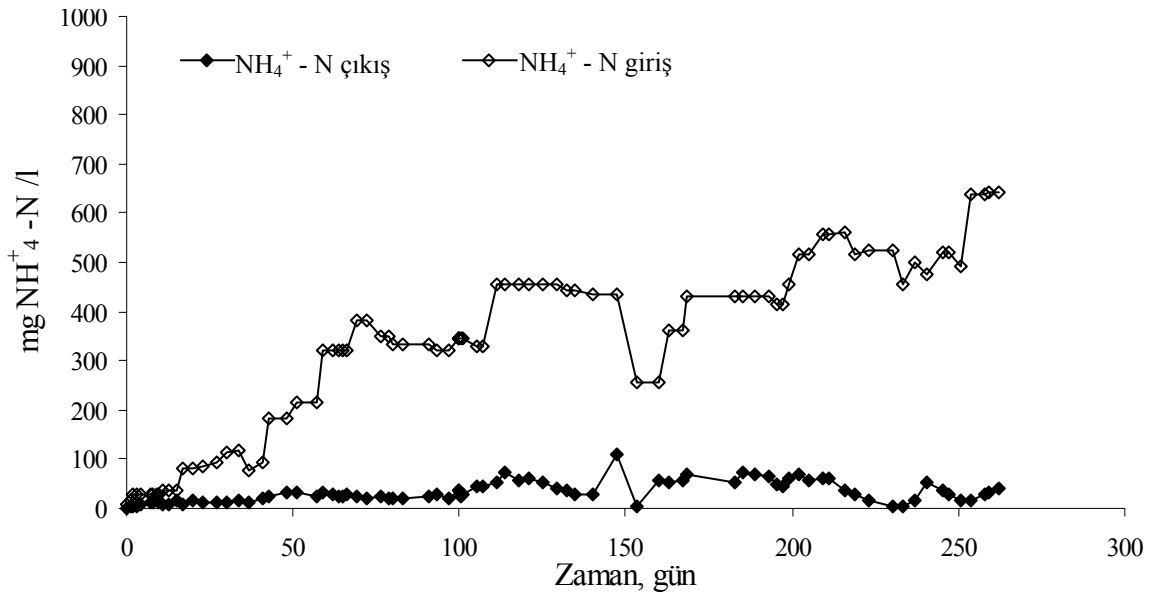
Bileşen	Konsantrasyon(g/l)
KHCO ₃	1.25
KH ₂ PO ₄	0.025
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.3
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
FeSO ₄	0.00625
EDTA	0.00625
1M HCL	1.25 ml/l
İz element çözeltisi:	1.25 ml/l
EDTA	15
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.43
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.24
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.99
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.25
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.22
NiCl ₂ .6H ₂ O	0.19
NaSeO ₄ .10H ₂ O	0.21
H ₃ BO ₄	0.014
NaWO ₄ .2H ₂ O	0.050

Şekil 2’de 262 günlük periyoda ait nitrit profilleri görülmektedir. 147. günde çıkış akımında nitrit

konsantrasyonunun 148 mg NO₂⁻-N l⁻¹ değerine ulaştığı görülmektedir. Bu zamanda oluşan bir pompa arızası, sistem giriş akımının yükselmesine sebep olmuştur. Bu şekilde artan nitrit yükü sistemdeki biyokütlenin nitrit tüketim aktivitesi ile karşılanamadığından, çıkış akımında nitrit konsantrasyonunun arttığı görülmüştür. Aynı şekilde reaktördeki amonyum konsantrasyonu da 100 mg NH₄⁺-N l⁻¹ değerine ulaşmıştır (Şekil 3). Sistemde biriken bu fazla amonyum ve nitritin ortamdan uzaklaştırılması için reaktör 24 saat süreyle nitrit ve amonyum içermeyen sentetik atıksu ile beslenmiştir. Daha sonra anammox aktivitesinin geri kazanılabilmesi için azot yükü 0.114 kg NH₄⁺-N m⁻³_{reaktör} gün⁻¹ ve 0.118 kg NO₂⁻-N m⁻³_{reaktör} gün⁻¹ değerlerine düşürülerek takip eden 5 gün boyunca bu değerde tutulmuştur. Şekil 4, reaktörde üretilen nitrat profilini göstermektedir. Nitrat, anammox aktivitesi sonucu oluşmakta ve reaktör içinde zamanla birikmektedir. Şekil 4’te görüldüğü gibi 147. günde meydana gelen arıza ile kaybedilen anammox aktivitesi çıkış nitrat konsantrasyonunun düşmesine sebep olmuştur. 153. günden 262. güne kadar azot yükü tekrar 0.3 kg NH₄⁺-N m⁻³_{reaktör} gün⁻¹ ve



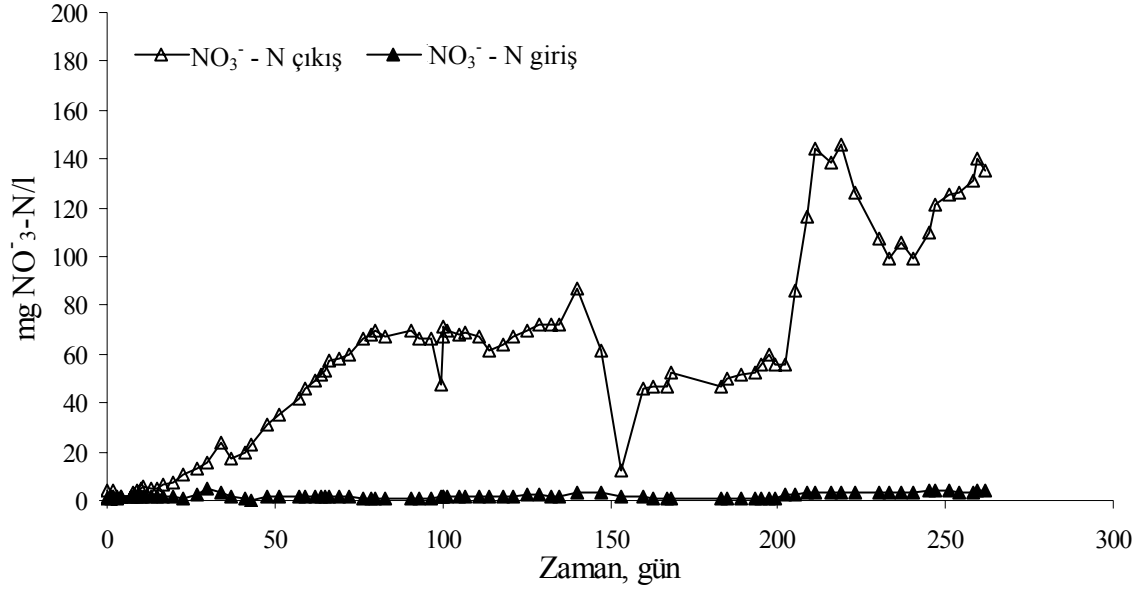
Şekil 2. Reaktördeki giriş ve çıkış nitrit profilleri



Şekil 3. Reaktördeki giriş ve çıkış amonyum profilleri

0.36 kg $\text{NO}_2^- - \text{N m}^{-3}_{\text{reaktör}} \text{gün}^{-1}$ değerine kademeli olarak artırılmıştır. 211. ve 250. günler arasında sisteme amonyum ve nitritin stokiyometrik orandan farklı değerlerde dengesiz olarak beslenmesi, amonyum ve nitrat çıkış konsantrasyonlarında salınımlara sebep olmuştur. 1. ve 262. günler arasında sisteme verilen amonyumun %90'unun ve nitritin %99'unun giderildiği görülmüştür (Tablo 2). Reaktörde üretilen biyokütlelerin hemen tamamı reaktörde tutulabildiğinden sistemin azot yükü kademeli olarak artırılabilmiştir. Bu da

hacimsel amonyum ve nitrit giderim hızları ile nitrat üretim hızının artması ile sonuçlanmıştır. 1-262. günler arasında amonyum giderim hızı $0.002 \text{ kg NH}_4^+ - \text{N m}^{-3}_{\text{reaktör}} \text{gün}^{-1}$ 'den $0.28 \text{ kg NH}_4^+ - \text{N m}^{-3}_{\text{reaktör}} \text{gün}^{-1}$ değerine ulaştığı görülmüştür (Şekil 5). Bu periyot içinde amonyum (giderilen)/nitrit (giderilen)/nitrat (üretilen) oranının ortalama değeri 1:1.31:0.18 olarak hesaplanmıştır. Bu değer Strous ve diğerleri (1998) tarafından ortaya konan stokiyometrik ilişkiler ile uyumludur.



Şekil 4. Reaktördeki giriş ve çıkış nitrat profilleri

Tablo 2. Anammox reaktörü sonuçları

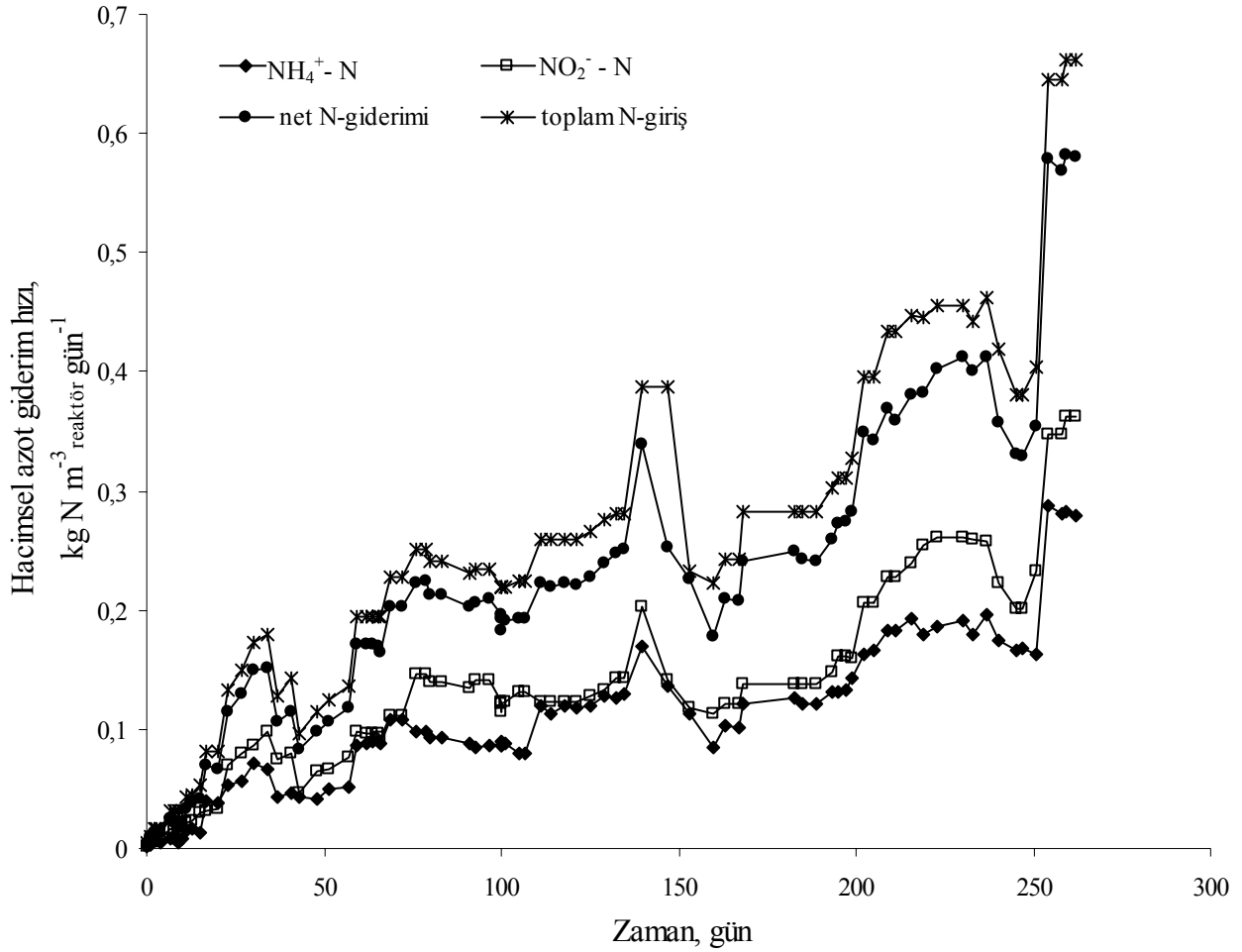
Parametre	
Test periyodu (gün)	1-262
Giriş amonyum konsantrasyonu (mg NH ₄ ⁺ -N l ⁻¹)	7-644
Çıkış amonyum konsantrasyonu (mg NH ₄ ⁺ -N l ⁻¹)	1-40
Giriş nitrit konsantrasyonu (mg NO ₂ ⁻ -N l ⁻¹)	8.4-784
Çıkış nitrit konsantrasyonu (mg NO ₂ ⁻ -N l ⁻¹)	0
Azot yükü (kg N _{toplam} m ⁻³ reaktör gün ⁻¹)	0.004-0.662
Amonyum dönüşümü (kg NH ₄ ⁺ -N m ⁻³ reaktör gün ⁻¹)	0.002-0.28
Nitrit dönüşümü (kg NO ₂ ⁻ -N m ⁻³ reaktör gün ⁻¹)	0.002-0.363
Nitrat üretimi (kg NO ₃ ⁻ -N m ⁻³ reaktör gün ⁻¹)	0-0.061
Azot giderimi (kg N _{toplam} m ⁻³ reaktör gün ⁻¹)	0.003-0.581
Amonyum giderimi (%)	90
Nitrit giderimi (%)	>99
Net azot giderimi (%)	87
NO ₂ ⁻ /NH ₄ ⁺	1.3 ± 0.1

Reaktördeki biyokütleyi oluşturan mikrobiyal popülasyonunun karakterizasyonu FISH analizi

ile yapılmıştır ve kullanılan 16 S rRNA problemleri Tablo 3'te verilmiştir. Reaktörden alınan biyokütle örneğine ait FISH mikrografı Şekil 6'da sunulmuştur. Şekildeki a, b ve c resimleri aynı mikroskopik alanı göstermektedir. Resimlerden görüldüğü gibi her üç mikroskopik bölge de her üç problemleri aynı sinyali vermektedir. Bu da reaktördeki organizma topluluğunun önemli bir bölümünün planktomaysit türüne ait olduğunu ve bu türün hemen hepsinin Dokhaven-2 alt türünden oluştuğunu göstermektedir.

Sonuçlar

Bu çalışmada yüksek amonyum, içeren atıksuların arıtılmasında yeni bir biyolojik proses olan Anammox prosesinin verimliliği ve prosesi oluşturan anammox bakterilerinin belirlenmesi üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışmada uygulanan Anammox prosesi ile %90 amonyum, %99 nitrit giderimi sağlanmıştır. 262 günlük işletme döneminde amonyum ve nitrit giderim hızlarının zamanla önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Amonyum giderim hızı 0.002 kg NH₄⁺-N m⁻³ reaktör gün⁻¹ değerinden 262. gün sonunda 0.28 kg NH₄⁺-N m⁻³ reaktör gün⁻¹ hızına ulaşmıştır. Amonyum giderim hızındaki bu artış oluşan biyokütlenin hemen tamamının reaktörde tutulması ve biyokütle konsantrasyonunun zaman içinde artmasının bir sonucudur.



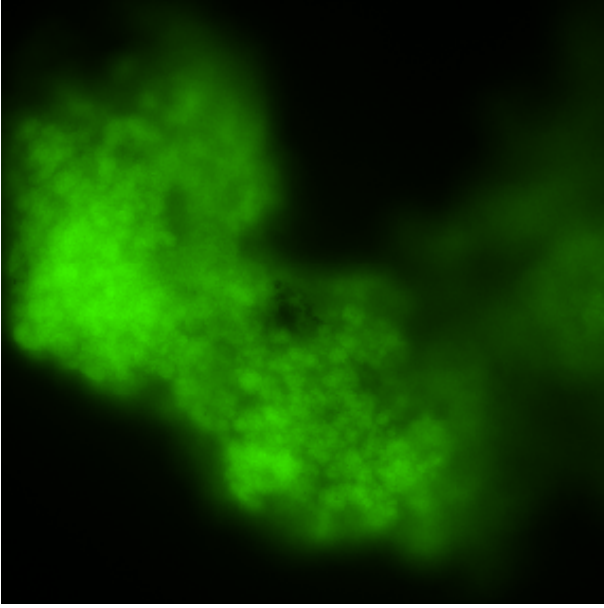
Şekil 5. Amonyum ve nitrit giderim hızları ve nitrat üretim hızı

Tablo 3. FISH analizinde kullanılan probalar ve uygulanan formamid konsantrasyonlar

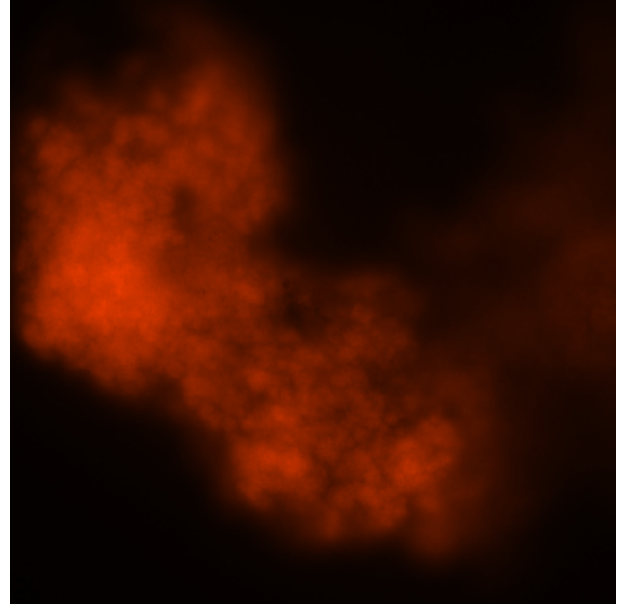
Prob ismi	Prob dizisi	Hedef organizmalar	Formamid %
EUB338 [S-D-Bact-0338-a-A-18]	5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'	Tüm öbakteriler	20
PLA46 [S-P-Planc-0046-a-A-18]	5'-GAC TTG CAT GCC TAA TCC-3'	Planktomaysitler	20
DH2-432	5'-CCT AAC TCC CGA CAG CGG-3'	Dokhaven-2	20

Yapılan FISH analizleri ile reaktörü oluşturan organizma topluluğunun önemli bölümünü Planktomaysit türünün oluşturduğunu ve bu topluluk içindeki dominant türün Dokhaven-2 olduğunu göstermiştir. İncelenen bakteri kümesinde EUB-338 probuyla sinyal veren organizmaların önemli bir bölümünü yine Planktomaysit türünün oluşturması, reaktördeki biyokütleinin yüksek derecede zenginleştirilmiş

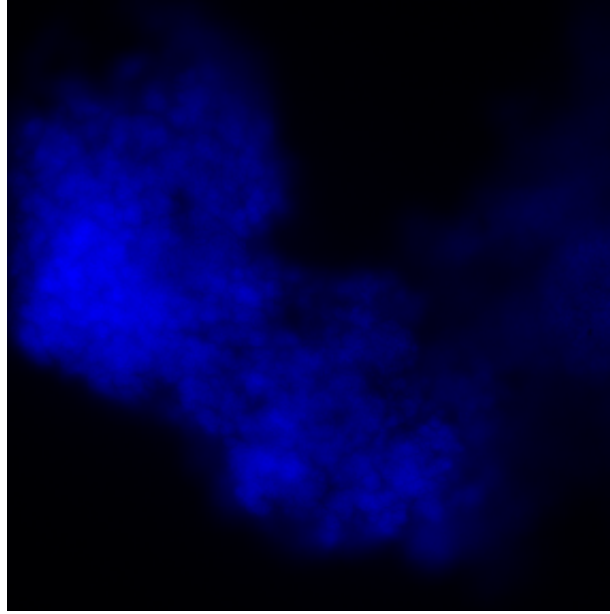
Planktomaysit türü Anammox bakterisi olduğunu göstermektedir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 6. Reaktördeki Anammox bakterilerinin flüoresan işaretli 16S rRNA probları ile belirlenmesi.(a): cy-3 işaretli DH2-432 probu ile hibridizasyon,(b): Fluos işaretli EUB338 probu ile hibridizasyon,(c): cy-5 işaretli PLA46 probu ile hibridizasyon

Kaynaklar

Kunen, J. G. ve Robertson, L. A. (1987). Ecology of Nitrification and Denitrification, p.161-218. In Cole, J. A. ve Ferguson, S. J. (ed.), The Nitrogen and Sulphur Cycles, Cambridge University Press, Cambridge.

Neef, A., Amann, R. I., Schlesner, H. ve Schleifer, K. H. (1998). Monitoring a Widespread Bacterial Group: In Situ Detection of Planctomycetes with 16S Rrna-Targeted Probes. *Microbiology*, **144**, 3257-3266.

Strous, M., Heijnen, J. J., Kuenen, J. G. ve Jetten, M. S. M. (1998). The Sequencing Batch Reactor as a Powerful Tool to Study Very Slowly Growing

- Micro-Organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **50**, 589-596.
- Strous, M., Kuenen, J. G. ve Jetten, M. S. M. (1999). Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65**, 3248-3250.
- Schmid, M. (2000). Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Systematic Applied Microbiology*, **23**, 93-106.
- Van de Graaf, A. A., De Bruijn, P., Jetten, M. S. M. ve Robertson L. A., Kuenen J. G. (1996). Autotrophic Growth of Anaerobic Ammonium Oxidizing Microorganisms in Fluidized Bed Reactor, *Microbiology*, **142**, 2187-2196.