

Ardışık kesikli reaktörde glikozun biyolojik aşırı fosfor giderimine etkisi

Gülsüm Emel ZENGİN*, Nazik ARTAN, Takashi MINO

İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Programı, 34469, Ayazağa, İstanbul

Özet

Bu çalışmada evsel atıksularda yaygın olarak bulunan glikozun biyolojik fosfor giderimi üzerine etkisi incelenmiştir. Laboratuvar ortamında glikozla beslenen anaerobik-aerobik Ardışık Kesikli Reaktörler (AKR) işletilmiş; çalışma süresince proses performansında ve mikrobiyal türlerde meydana gelen değişimler izlenmiştir. AKR'nin ilk döneminde Biyolojik Aşırı Fosfor Giderimi (BAFG) aktif olarak görülmüştür. Ancak reaktörün ikinci döneminde BAFG aktivitesi bozulmaya başlamış, son döneminde ise kabarma problemi ile karşılaşmış ve koşullar iyileştirilemediği için işletilmesine son verilmiştir. AKR'nin başlangıç döneminde laktik asit oluşması ve oluşan laktik asitin anaerobik süreçte tüketilmesi sonucu fermentasyon bakterileri ile fosfor depolayan organizmaların (PAO) biyolojik fosfor giderimini birlikte gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Laktik asit bakterilerininin glikozu laktik asite fermente ettiği ve PAO'ların anaerobik fosfor salınımından enerji sağlayarak oluşan laktik asidi polihidroksialkonata (PHA) dönüştürdüğü düşünülmüştür. Bu dönemdeki mikroskopik gözlemlerde poli-P depolayan kokların yoğun olarak görülmesi ve filogenetik analiz sonucunda Firmicutes filumuna ait Lactococcus türlerinin mikrobiyal topluluğun önemli bir bölümü olarak tespit edilmesi bu varsayımı desteklemektedir. Ayrıca oluşan PHA'nın %77'sinin 3-hidroksivalerat (3HV) olması ve anaerobik süreçte laktik asitin tüketilmesi laktik asitin PAO'larca kullanılan esas karbon kaynağı olduğunu kanıtlamaktadır. AKR'nin 29'uncu gününde glikojen depolayan organizmalar (GAO) olarak tanımlanan Candidatus Competibacter Phosphatis türü filogenetik analizde yoğun olarak gözlemlenmiş ve BAFG aktivitesinin bozulmasının bu türün baskı hale gelmesinden kaynaklandığı belirlenmiştir. 29'uncu günle birlikte glikojen tüketiminin önemli miktarda artması, glikoz tüketimine karşı salınan fosfor değerinin (0.07 mol P/ mol C) düşmesi sistemde GAO'ların aktif olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Biyolojik aşırı fosfor giderimi, fosfat depolayan organizmalar, glikojen depolayan organizmalar, glikoz.*

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Gülsüm Emel ZENGİN. E-posta: zengingul@itu.edu.tr; Tel: (212) 285 65 40.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Programı'nda tamamlanmış olan "Microbial community and metabolism of enhanced biological phosphorus removal" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 13.01.2009 tarihinde dergiye ulaştırılmış, 23.02.2009 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 30.06.2010 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

The effect of glucose on the enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor

Extended abstract

Since short chain fatty acid (SCFA) is believed to be the favorable substrates for biological phosphorus removal, the majority of the studies on enhanced biological phosphorus removal (EBPR), focus on the metabolism of acetate. However EBPR process can also occur successfully with organic substrates other than acetate. A wide range of organic substances like carboxylic acids, sugars and amino acids can be taken up anaerobically by phosphate accumulating organisms (PAO) enriched sludges but the metabolism of these organic substrates is not clear yet. Hence, the effect of carbon sources other than acetate on EBPR has to be considered deeply. The composition of the organic substrates in domestic wastewater varies remarkably among countries and/or wastewater treatment plants and glucose is a significant simple sugar found widely in wastewaters with an important role in biochemical pathways. EBPR mechanism with glucose found wide interest but results of the reported studies in the related literature are not consistent with each other indicating many different mechanisms of anaerobic uptake and storage of glucose can act in favor of, or against EBPR.

The objective of this study was to investigate the effect of glucose feeding on the performance of the enhanced biological phosphorus removal process. The effect of glucose on process performance and microbial community was studied by operating laboratory-scale alternating anaerobic-aerobic sequencing batch reactors (SBRs).

The SBR fed with glucose as sole carbon source achieved biological phosphorus removal but deteriorated gradually along the operation of the reactor. During the good EBPR period (day 9), 63% of the glucose fed to the reactor was metabolized within 10 minutes of the anaerobic period and a rapid increase in glycogen concentration observed which showed the conversion of external glucose into glycogen. Lactate and acetate were detected in the supernatant and pH was dropped upon the glucose addition which indicated that part of the glucose was fermented to mainly lactate and to small amount of acetate. The results of the molecular analysis performed during this period showed the presence of many diverse fermentative bacteria proving clearly

the glucose fermentation. It is assumed that lactate was the major substrate converted to polyhydroxyalkanoates (PHA) by PAOs due to the significant amount of 3-hydroxyvalerate (3HV) formation and low level of glycogen consumption under anaerobic conditions. But if lactate was the only substrate uptaken by PAOs to be converted to PHA, lactate should be metabolized to acetyl-CoA and propionyl-CoA equally to maintain the redox balance which will result in formation of 3HV and 3-hydroxy-2-methylbutyrate (3H2MB) only. However 12% of the PHA was consisted of 3-hydroxy-2-methylvalerate (3H2MV) and small amount of glycogen was also consumed. Hence glycogen consumption together with lactate changed the ratios of acetyl-CoA and propionyl-CoA metabolized which could explain the formation of 3H2MV. Thus PHA was thought to be derived not only from the lactate but also from glycogen and from small amount of acetate fermented from glucose. The EBPR activity was remarkably deteriorated on the 29th day of the SBR operation. The occurrence and predominance of *Candidatus Competibacter Phosphatis* detected on day 29 sludge was significant. 17% of the γ -Proteobacteria were closely related to the *Candidatus Competibacter Phosphatis*. They were postulated as putative glycogen accumulating organisms (GAO) as they compete with PAOs. The dominance of GAOs detrimentally affects phosphorus removal by out-competing the PAOs since glycogen can be used as the energy source and reducing power for PHA accumulation reducing the dependency on polyphosphate degradation for energy supply. The significant increase in glycogen consumption was in accordance with the predominance of GAOs on day 29. The decrease in the total phosphorus content of the sludge (4.3% of the MLVSS) and phosphate release/carbon uptake ratio (0.07 mol P/mol C) indicated clearly the abundance of GAOs over PAOs. SBR was ended due to the bulking problem at the 54th day of operation. In the beginning of the operation of the SBR, the fermentation products were depleted at the end of the anaerobic period but in the latter phase of the operation significant amounts of fermentation products were detected at the end of the anaerobic period and these fermentation products probably stimulated the growth of filamentous bacteria. The lactate accumulation at the end of the anaerobic phase was related to the abundance of GAOs over PAOs.

Keywords: Enhanced biological phosphorus removal, phosphate accumulating organisms, glycogen accumulating organisms, glucose.

Giriş

Biyolojik Aşırı Fosfor Giderimi (BAFG) için en elverişli karbon kaynağı kısa zincirli uçucu yağ asitleri olduğundan BAFG ile ilgili çalışmaların önemli bir kısmı asetat metabolizması üzerinedir. Ancak biyolojik fosfor giderimi, asetat dışındaki birçok farklı organik karbon kaynağı ile de gerçekleştirilmektedir. Fosfor biriktiren organizmalarca zenginleştirilmiş biyokütle, anaerobik ortamda karboksilik asitler, şekerler ve aminoasitler gibi organik maddeleri hücre içine alabilmektedir. Ancak çoğunun anaerobik metabolizmaları henüz bilinmemektedir. Dolayısıyla asetat dışındaki karbon kaynaklarının BAFG üzerine etkisinin araştırılması önem kazanmaktadır.

Basit şekerlerden glikoz, atıksularda yaygın olarak bulunur ve biyokimyasal süreçlerdeki rolü önemlidir. Glikozun BAFG üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında sonuçların tutarlı olmadığı; glikozun karbon kaynağı olarak kullanılmasının biyolojik fosfor giderimine olumlu/olumsuz etki gösterebildiği gözlemlenmiştir. Literatürde yer alan çalışmaların çoğunda, tek karbon kaynağı olarak glikozun kullanılması durumunda fosforun atıksulardan giderilmesinde problemler gözlemlenmiştir. Cech ve diğerleri (1993) glikozla beslenen ve fosfor gideriminin zayıf olduğu BAFG sistemlerinde G-bakterilerinin baskın olduğunu tespit etmişlerdir. G-bakterilerin çoğalmasıyla birlikte biyolojik fosfor gideriminin kötüleştiğini çünkü G-bakterilerinin karbon kaynağını anaerobik ortamda hücre içine alabilmek için polifosfat yerine glikojeni enerji kaynağı olarak kullanabildiklerini öne sürmüşlerdir. G-bakterileri kok şeklinde dörtlü hücreler halinde gözlenen, filogenetik olarak çeşitli, Gram-pozitif veya Gram-negatif özellikte morfolojik bir tanımlamadır. Mino ve diğerleri (1998) glikojeni aerobik olarak depolayabilen ve anaerobik ortamda karbon kaynağını hücre içine alabilmek ve polihidroksialkonat (PHA) olarak depolayabilmek için gerekli enerjiyi glikojeni tüketerek sağlayan bu organizmalara fenotik bir tanımlama olan glikojen depolayan organizmalar (GAO) terimini önermiştir. GAO'ların tek tür olmadığı, mikrobiyal çeşitliliğe sahip olduğu

ve anaerobik ortamda asetat ve glikozu, glikojen ve PHA olarak depolayabildiği belirlenmiştir (Liu vd., 1996). Crocetti ve diğerleri (2002), fosfor giderimi zayıf olan bir BAFG sisteminden alınan çamurdan 16S rDNA gen klon kütüphanesi oluşturarak, *Gammaproteobacteria* grubunda yer alan hedef bakteriler için FISH probu dizayn etmiştir. *Candidatus Competibacter phosphatis* olarak isimlendirilen bu organizmalar, GAO fenotipine tamamen uyumamaktadır.

Randall ve diğerleri (1994), fosfor biriktiren organizmaların (PAO) anaerobik ortamda glikozu doğrudan hücre içine alamadığını ve anaerobik ortamda PAO'ların glikozu tüketebilmesi için öncelikle glikozun kısa zincirli yağ asitlerine dönüşmesi gerektiğini vurgulamıştır. BAFG veriminin glikoz fermentasyonu ile doğrudan ilişkili olması nedeniyle glikozun fosfor giderimini olumsuz etkileyebileceğini belirtmiştir. Yürüttükleri bu çalışmada, glikoz hızlıca fermentasyon bakterileri dışındaki organizmalarca hücre içine alındığı için biyolojik fosfor gideriminin gerçekleşmediği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte BAFG sistemlerinde glikozu karbon kaynağı olarak kullanarak kararlı bir biyolojik fosfor giderimi sağlayan çalışmalar da bulunmaktadır. Wang ve diğerleri (2002) uzun anaerobik reaksiyon süresi, yüksek konsantrasyonda glikoz beslenmesi ve kısa aerobik reaksiyon süreleri gibi spesifik işletme koşulları uygulandığında glikozun biyolojik fosfor giderimine olumsuz etkide bulunmadığını öne sürmüştür. Ancak asetatla beslenen sistemlerin aksine anaerobik fosfor salımının daha düşük olduğu ve 3-hidroksivalerat (3HV) monomerince zengin PHA oluştuğu görülmüştür. Liu (1998) glikozla beslenen BAFG sistemlerinde fosfor giderimi ile çamurun karbonhidrat içeriği arasında doğrudan bir bağlantı olduğunu bulmuştur; işlettikleri sistemde fosfor gideriminin iyi olduğu başlangıç döneminde çamurun karbonhidrat içeriğinin düşük değerlerde olduğunu gözlemlemiştir. İşletme koşulları değişmediği halde, biyolojik fosfor gideriminin zamanla kötüleştiği ve buna bağlı olarak biyokütlenin karbonhidrat içeriğinin de arttığı görülmüştür. Jeon ve diğerleri (2000) BAFG sistemlerine karbon kaynağı

olarak glikoz beslendiğ inde iki farklı mikrobiyal topluluk tarafından biyolojik fosfor gideriminin gerç ekleşt iğ ini ö ne sürmüştür. Önerdikleri modelde, laktik asit üreten organizmalar, glikozu hücre içinde glikojen olarak depolamakta ve bu reaksiyon için gerekli enerjiyi glikozun glikolizi sırasında laktik asit oluşmasıyla açığ a çıkan ATP ile karşılamaktadır. Laktik asit üreten organizmaların sentezledikleri 1 mol glikojene karşın 1 mol laktik asit üretilmiştir. Sentezlenen glikojenin çoğ u depo polimeri olarak depolanmakta, bir kısmı da PHA'ya dönüştürölmektedir. Laktik asit üreten organizmaların enerjiyi çoğ alma için kullanan diğ er asidojenik bakterilerden farklı olarak glikojen depolayabilmek için gerekli enerjiyi laktik asit üreterek sağ layan fakültatif bakteriler olduğ u belirtilmiştir. Modelde göre, ikinci aşamada PAO'lar üretilen laktik asidi daha yavaş bir prosesle PHA olarak depolamakta ve gerekli enerjiyi de polifosfatın hidrolizinden sağlamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, glikozun biyolojik aşırı fosfor gideriminin performansı ve mikrobiyal populasyon dinamiğ i üzerine etkisini incelemektir. Bu amaçla, laboratuvar ortamında, glikozla beslenen anaerobik-aerobik ardışık kesikli reaktörler iş letilerek sistem performansı ve mikrobiyal türlerdeki değ iş im izlenmiştir.

Materyal ve yöntem

Laboratuvar ölçekli ardışık kesikli reaktör (AKR), anaerobik-aerobik konfigürasyonda, 20°C sıcaklık değ erine ayarlanmış izotermal bir odada iş letilmiştir. Reaktörün hacmi 10 L'dir. Ardışık kesikli reaktörün ç amur yaşı 8 gün, hidrolitik bekletme süresi 10 saat olarak ayarlanmıştır. AKR günde 4 çevrimiçi çalışacak şekilde programlanmıştır. Bir çevrimiçi, 30 dakika doldurma, 90 dakika oksijensiz faz, 150 dakika oksijenli faz, 60 dakika ç ökelme ve 30 dakika boşaltma olmak üzere toplam 6 saattir. Ç ökelme fazı sonunda 6 L üst faz reaktörden boşaltılmakta ve konsantre edilmiş organik madde ve 4 L besleme ç özeltisi musluk suyu ile birlikte reaktöre pompalanmaktadır. Ç amur yaşı, aerobik faz sonunda alınan fazla ç amurla 8 güne ayarlanmaktadır. Reaktörün pH değ eri 6.8–7.2 değ erleri arasında pH kontrolör kullanılarak 0.1 N HCl

ve 0.1 N NaOH ile sağ lanmaktadır. Zorunlu oksijensiz ortam, azot gazı verilerek reaktördeki ç özünmüş oksijenin giderimi ile sağ lanmıştır. Oksijenli ortam için hava difüzörler aracılığ ıyla reaktöre beslenmiştir. AKR zamanlama cihazı ile kontrol edilmektedir. Organik ve inorganik besleme ç özeltilerini içeren sentetik atıksuyun içeriğ i Tablo 1'de verilmiştir. Fosforun ç ökelmesini engellemek için besleme ç özelteleri ayrı ayrı hazırlanmıştır. Nitrifikasyonu engellemek için AKR'ye Allylthiourea (ATU) eklenmiştir. Aktif ç amur, Tokyo kentinde bulunan bir BAFG mekanizmasıyla çalış an bir atıksu arıtma tesisinden alınmıştır. Organik madde kaynağ ı olarak glikoz kullanılmıştır. Reaktöre 160 mg C/L (425 mg KOİ/L) glikoz ve 12.5 mg P/L fosfor beslenerek KOİ/P oranı 34 olarak ayarlanmıştır.

AKR her hafta fosfat, nitrat, nitrit, asetat, propiyonat, laktik asit, glikojen, PHA, toplam fosfor (TP), ç özünmüş organik karbon (Ç OK), AKM ve UAKM ölçülerek ve detaylı çevrimiçi analizleri yapılarak takip edilmiştir. Fosfat, nitrit, nitrat ve laktik asit ölçümü iyon kromatografi (761 Compact IC, Metrohm Ltd.) ve kapiler elektroforez (CIA, Waters) ile gerç ekleştirilmiştir. Uçucu yağ asitleri (UYA), organik asit analizi kolonu SCR-101H (Shimadzu, Japan) ve dalgaboyu 210 nm'deki UV detektörü ile yüksek-performans sıvı kromatografi (HP 1100 Series, Agilent Technologies) cihazında ölçölmüştür. Ç OK analizi TOK ölçüm cihazı (TOC-500, Shimadzu, Japan) ile yapılmıştır. Glikojen ölçümü için modifiye fenol-sülfürik asit yöntemi uygulanmıştır (Dubois vd., 1956). AKM ve UAKM standart metotlara göre yapılmıştır (Japan Sewage Works Association, 1997). Toplam fosfor (TP) ölçümü için standart yöntemler uygulanmıştır (1995). PHA, Satoh ve diğ erleri, 1996 tarafından belirtildiğ i şekilde ç amurun metanolitik ayrışmasının ardından gaz kromatografi (GC-14A/FID, Shimadzu) cihazında ölçölmüştür.

Aktif ç amur, Gram boyama ve Metilen mavisi boyama ile rutin olarak gözlenmiş, detaylı mikrobiyal tür analizi için AKR'den aerobik fazın bitiminde aktif ç amur örnekleri alınarak analizi gerç ekleştirilmiştir. Ç amurdan DNA eks-

traksiyonu için FastDNA SPIN toprak kiti (BIO101, Carlsbad, USA) kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), GeneAmp PCR system model 9600 (Perkin-Elmer) ve T3 Thermocycler (Biometra, Germany) ile yürütülmüştür. PCR amplifikasyonu için universal 27f ve 1492r primerleri kullanılmıştır. 27f – 1492r primer seti için uygulanan termal program sırasıyla, 95°C’de 10 dakika süreyle ön-inkübasyon, 94°C’de 25 çevrimlik 30 saniye süren denatürasyon, 48°C’de 30 saniye bağlanma ve 72°C’de 3 dakika uzama şeklindedir. Son uzama için örnekler 72°C’de 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Çoğaltılan DNA, elektroforez ile doğrulanmıştır (i-Mupid Mini Agarose Gel Electrophoresis Apparatus System Advance Co. Ltd., Tokyo, Japan). PCR ürünleri QIAQuick PCR kiti (QIAGEN, Germany) ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PCR ürünleri QIAGEN PCR-Klonlama kiti (QIAGEN, Germany) ile üretici firmanın talimatnamesine göre klonlanmıştır. Klonların sekans analizleri MacroGen (Korea) tarafından gerçekleştirilmiştir. Sekans analizlerinin homoloji araştırması GenBank veri tabanında Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı ile yürütülmüştür. Dizileme çalışmaları için CLUSTAL W programı kullanılmıştır. Filogenetik ağaç, moleküler evrim genetik analizi (MEGA4) programı ile çizilmiştir.

Tablo 1. Sentetik atıksuyun içeriği

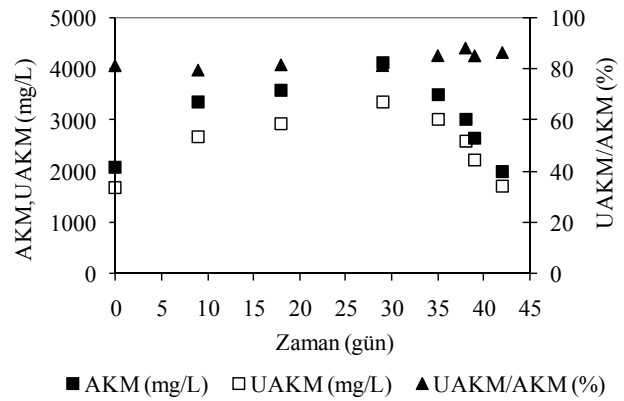
| I. Besleme Çözeltisi | Stok (g/5 L) | II. Besleme Çözeltisi | Stok (g/5 L) |
|--|--------------|---|--------------|
| C ₆ H ₁₂ NO ₆ | 100 | KCl | 21 |
| Yeast extract | 5 | NH ₄ Cl | 8.8 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 4.4 | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 10.8 |
| MgCl ₂ .2H ₂ O | 45.35 | K ₂ HPO ₄ | 9 |
| | | KH ₂ PO ₄ | 7 |
| | | ATU | 2 |

Deneysel çalışma sonuçları

Glikozla beslenen laboratuvar ölçekli AKR’nin BAFG aktivitesinde, 2 ay süresince belirgin değişimler gözlemlenmiştir. Reaktörün ilk döneminde fosforun, anaerobik fazda üst faza salınımı ve aerobik fazda hücre içine alınması artarak devam etmiş ve biyolojik fosfor giderimi

aktif olarak görülmüştür. Ancak reaktörün ikinci döneminde (10 ile 35’inci günler arası) populasyon dinamiğinde meydana gelen değişimlerle birlikte BAFG aktivitesi bozulmaya başlamıştır. 35’inci günden itibaren ise kabarma problemi ile karşılaşmıştır ve koşullar iyileştirilemediği için 54’üncü günde işletmeye son verilmiştir. Şekil 1’de reaktördeki AKM ve UAKM değerlerinin zamana göre değişimi verilmektedir. AKR’nin ikinci periyodunda AKM değerleri 3000 – 4000 mg/L aralığında iken, 29’uncu günden itibaren kademeli olarak 2000 mg/L değerine düştüğü gözlemlenmiştir.

Çamurdaki TP içeriği ve üst fazdaki fosfor konsantrasyonlarındaki değişim BAFG aktivitesini gösteren önemli parametrelerdir. Atıksu arıtma tesisinden alınan orijinal çamurda TP içeriği %3.3 iken, 9’uncu günde bu değer %6.5 değerine yükselmiş, 29’uncu günde ise %4.3 değerine düşmüş ve 42’inci günde %1.8 değerine inmiştir; 42’inci günde gözlenen çamurdaki TP değeri BAFG mekanizmasının tamamen sona erdiğini göstermektedir (Şekil 2). Verilen bu değerler, aerobik faz sonunda UAKM bazında TP sonuçlarıdır.



Şekil 1. AKM ve UAKM konsantrasyonlarının zamana göre değişimi

Reaktörün başlangıç döneminde anaerobik fazda üst faza 9.7 mg P/L fosfat salınmış, anaerobik fazı takip eden aerobik fazda ise 13.5 mg P/L fosfat hücre içine alınmıştır. En yüksek fosfat salınımı (39 mg P/L) ve hücre içine alınımı (40 mg P/L) 9’uncu günde gözlemlenmiştir. Reaktörün 29’uncu gününde fosfat salınımı ve hücre içine alımı sırasıyla 18.1 mg P/L ve 18.2 mg P

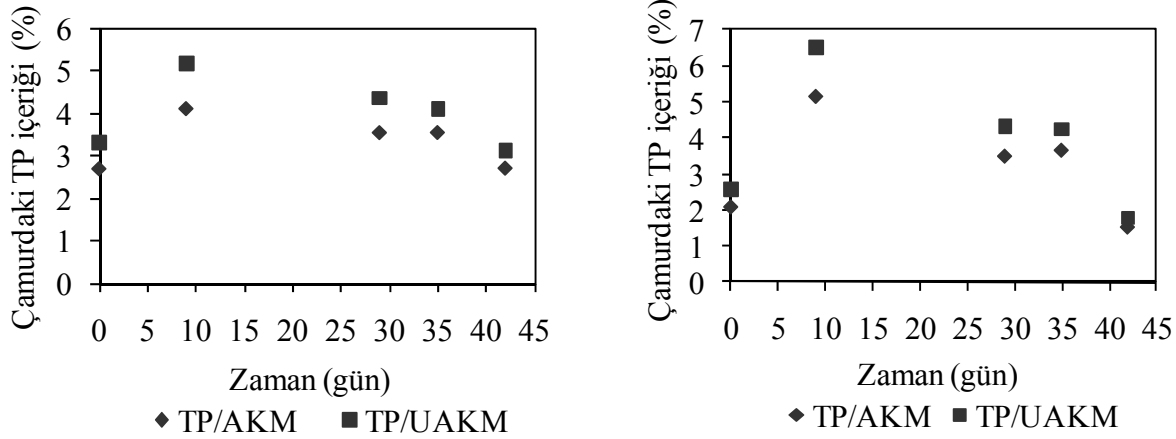
/L olarak ölçülürken, bu değerler 42'inci günde sırasıyla 11.6 mg P /L ve 4.5 mg P /L değerlerine düşmüştür (Şekil 3).

Anaerobik ve aerobik fazlarda üst fazda fermentasyon ürünleri ölçülmüştür. Laktik asidin AKR'nin işletildiği süre boyunca, BAFG aktivitesinden bağımsız olarak anaerobik fazda oluştuğu ancak aerobik fazda tüketim hızının BAFG aktivitesine bağılı olarak değiştiği belirlenmiştir. Asetat oluşumu ise sadece 9'uncu günde gözlemlenmiştir. AKR'nin işletilmesi sırasında aerobik ve anaerobik fazlarda zamana bağılı ölçülen laktik asit konsantrasyonları Şekil 4'te verilmektedir. Şekilden de görüldüğü üzere reaktörün 9'uncu gününde, glikoz hızlıca laktik aside fermente olmakta ve anaerobik faz sırasında tüketilmektedir. 29'uncu günde ise, anaerobik fazda oluşan laktik asitin tüketimi yavaşlamaktadır. 29'uncu günden sonra ise laktik

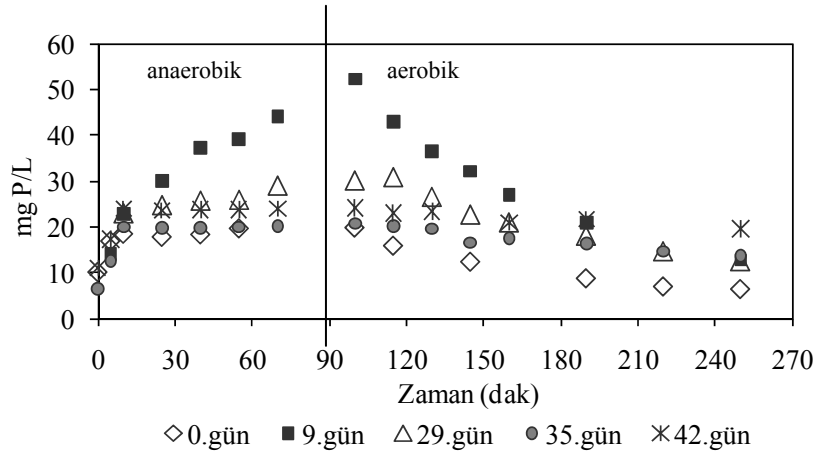
asitin anaerobik fazda tüketilmediği gözlemlenmiştir.

AKR'de sistem performansını izlemek için çamur yaşına bağılı olarak seçilen günlerde detaylı çevrimiçi analizler yürütülmüştür. Çevrim içi analizlerde anaerobik ve aerobik fazlardaki fosfor transformasyonu dışında karbon transformasyonunu belirleyen ÇOK, fermentasyon ürünleri, glikojen ve PHA gibi diğ er önemli parametreler de izlenmiştir. 9'uncu günde yapılan detaylı çevrimiçi analiz sonuçları Şekil 5'te görülmektedir.

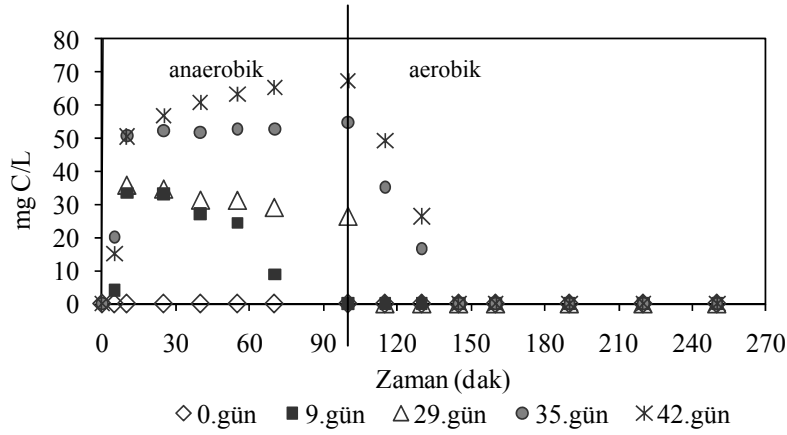
Anaerobik fazın ilk 10 dakikasında ÇOK konsantrasyonu hızlı bir şekilde 60 mg C/L değerine düşmektedir. Aynı anda fermentasyon ürünlerinden laktik asit ve asetat oluşumu gözlemlenmektedir. Laktik asit anaerobik süreçte hücre içine alınmakta ve anaerobik fazın sonunda



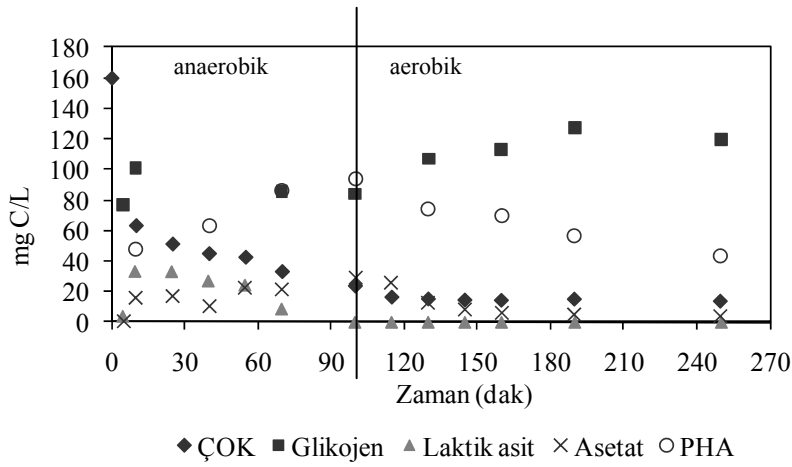
Şekil 2. Çamurdaki toplam fosfor içeriğinin zaman göre değişimi



Şekil 3. AKR'de çevrim içinde gözlenen fosfat profili



Şekil 4. AKR'de çevrim içinde gözlenen laktik asit profili



Şekil 5. 9'uncu gün detaylı çevrimiçi analiz sonuçları

tamamen tüketilmektedir. Anaerobik fazdaki glikojen tüketiminin oldukça düşük olduğu görülmüştür. Anaerobik süreçte 49.4 mg C/L PHA birikmiştir ve sonraki aerobik süreçte PHA'nın tamamı metabolize edilmiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda da rapor edildiği üzere, biriken PHA'nın önemli bir kısmı 3-hidroksivaleratdan (3HV) meydana gelmektedir. Anaerobik faz sonunda biriken PHA'nın %77'si 3HV iken 3-hidroksibütirat (3HB), 3-hidroksi-2-metilvalerat (3H2MV) ve 3-hidroksi-2-metilbütirat (3H2MB) oranları sırasıyla %8, %12 ve %3 olarak hesaplanmıştır. Wang ve diğerleri (2002)'nin çalışmalarında glikozla besledikleri reaktörde 3HV, PHA'nın %83'ünü kapsamaktadır. Hollender ve diğerleri (2002) glikozlu BAFG sistemlerinde PHA'nın %88'nin PHV olduğunu rapor etmiştir. Jeon ve Park (2000) ise

3HV/PHA oranını %60 olarak hesaplamıştır. Liu ve diğerleri (1996) glikoz ve laktik asit beslediği BAFG sistemlerinde 3HV/PHA oranını sırasıyla %87 ve %82.6 olarak gözlemlemiştir.

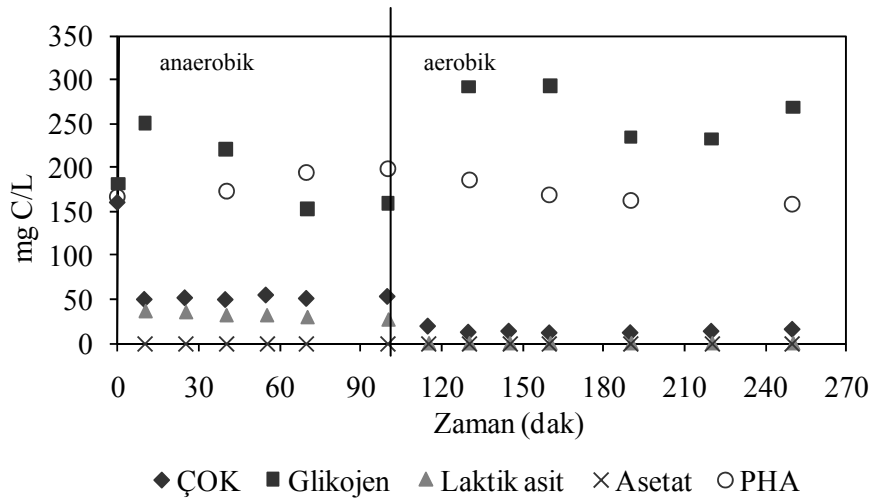
29'uncu günde gerçekleştirilen detaylı çevrimiçi analiz sonuçları Şekil 6'da verilmiştir. ÇOK konsantrasyonu anaerobik fazın hemen başında 160 mg C/L değerinden 50 mg C/L değerine düşmüş ve anaerobik süre boyunca çok değişmemiştir. Oluşan tek fermentasyon ürünün laktik asit olduğu gözlemlenmiş ancak anaerobik fazda tüketilmediği görülmüştür. Anaerobik fazı takip eden aerobik fazda ise laktik asit tamamen tüketilmiştir. Asetat oluşumu ise gözlemlenmemiştir. 9'uncu güne kıyasla glikojen tüketiminin 54 mg C/L değerine artması glikojen biriktiren organizmaların varlığını işaret etmektedir.

BAFG aktivitesindeki düş üş , PHA oluş umuna da yansımıştır, PHA birikimi 31.9 mg C/L olarak ölçülmüştür. 29. günde de PHA'nın yine ağı rlıklı olarak 3HV'den oluş tuğ u ancak 9'uncu güne kıyasla daha düşük bir oranda olduğ u tespit edilmiştir. Anaerobik faz sonunda biriken PHA'nın %68'i 3HV iken 3HB, 3H2MV ve 3H2MB oranları sırasıyla %6, %24 ve %2 olarak hesaplanmıştır. Reaktörün 9'uncu ve 29'uncu günlerinde ölçülen biyokütlenin PHA kompozisyonu Ş ekil 7'de gösterilmektedir. Biyolojik fosfor giderimindeki kötüleş me, anaerobik koş ullarda biriken PHA miktarını azaltırken, PHA kompozisyonunu etkilememiştir.

AKR'nin iş letildiğ i süre boyunca gerçekleştirilen mikroskobik gözlemler morfolojik olarak farklı bakterilerin varlığını göstermiştir. Mikroskobik gözlemlerde, bakterilerin morfolojilerini belirleyebilmek için Gram Boyama ve Metilen-mavisi Boyama yöntemleri uygulanmıştır. Başlangıçta Gram-negatif kok şeklinde hücreler ile birlikte çok az miktarda filamentli organizmalar görülmüştür. 9'uncu günde gözlemlenen metilen mavisi ile boyama sonucu menekşe rengine boyanan kümeler içindeki koklar Poli-P birikimini göstermektedir ki bu dönemde gözlenen iyi BAFG aktivitesi ile de tutarlıdır. 29'uncu günde dör t lü koklar belirgin şekilde baskın hale gelmiştir. Literatürde, glikozun GAO'ların çoğ almasına neden olduğ u vurgulanmıştır ve GAO'lar dör t lü koklar şeklinde görülen belirgin bir morfolojiye sahiptir. 35'inci

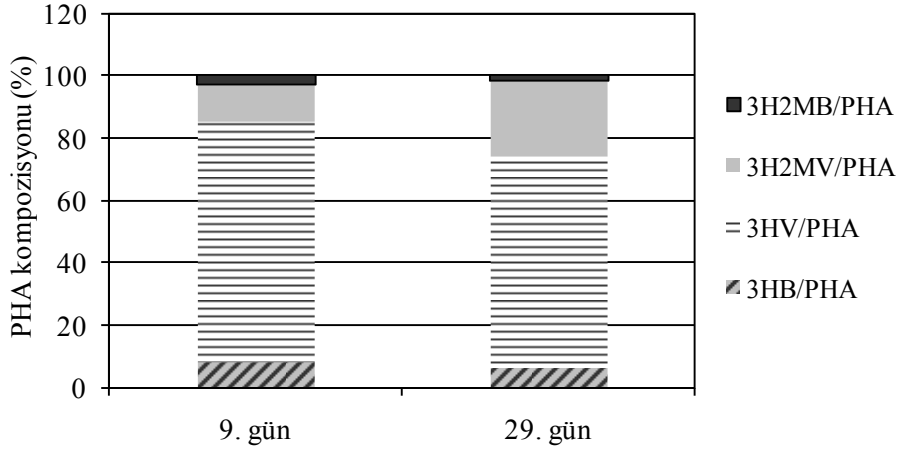
günde yapılan gözlemler açık bir şekilde filamentli organizmaların baskın hale geldiğ ini göstermektedir ve 29'uncu güne benzer şekilde dör t lü koklar belirgin şekilde gözlemlenmiştir. (Ş ekil 8). *Type 0803* ve *Nostocoida Limicola II* isimli iki ana filamentli organizma görülmüştür.

9'uncu ve 29'uncu gündeki mikrobiyal türlerdeki değ iş imi incelemek amacıyla PCR-klonlama yöntemi uygulanmıştır. 200 adet bakteriyel gen klonunun analiz sonuçlarının BLAST veri bankası ile karşılaştırılması sonucunda oluşturulan taksonomik sınıflandırma Ş ekil 9'da gösterilmiştir. 9'uncu günde mikrobiyal topluluğ un önemli bir bölümünün *Firmicutes* filumu olduğ u ve laktik asit bakterileri olarak da tanımlanan *Lactococcus sp.* türleri ile yakından ilgili olduğ u gözlemlenmiştir. 29'uncu günde ise bu filumun tamamen yokolduğ u belirlenmiştir. Filogenetik analizin en önemli sonuçlarından biri 29'uncu günde *γ-Proteobacteria* filumunun %17'sinin *Candidatus Competibacter phosphatis* türü ile yakından ilgili olmasıdır. Glikojen biriktiren organizmalar (GAO), BAFG sistemlerinde biyolojik fosfor gideriminin kötüleş mesinden sorumlu olarak düşünölmektedir ve *Candidatus Competibacter phosphatis*, GAO olarak tanımlanmıştır (Crocetti vd., 2002). GAO'ların baskın olduğ u durumlarda glikojen, enerji ve indirgeme gücü kaynağ ı olarak kullanılarak enerji kaynağ ı olarak kullanılan polifosfatın hidrolizine gereksinimi azaltmaktadır.

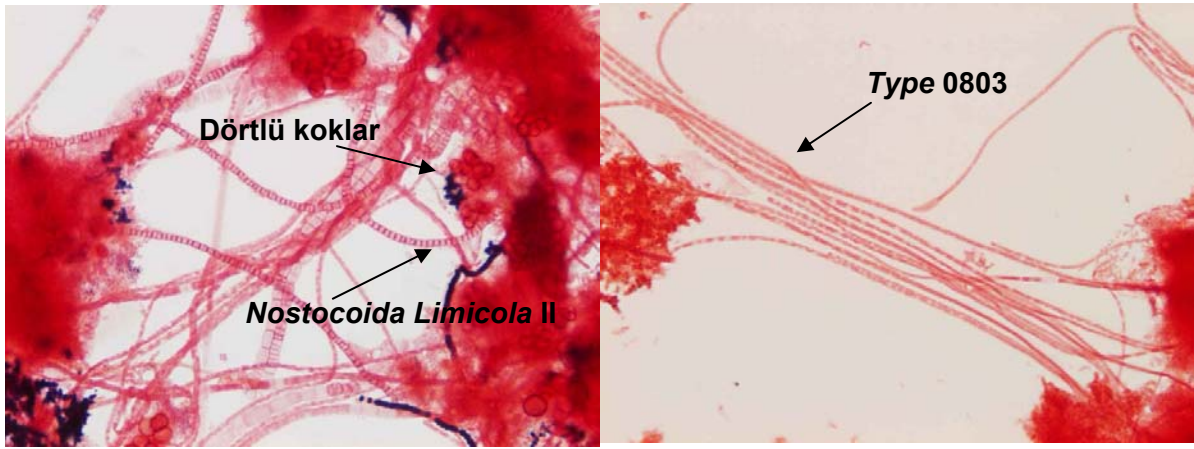


Ş ekil 6. 29'uncu gün detaylı çevrimiçi analiz sonuçları

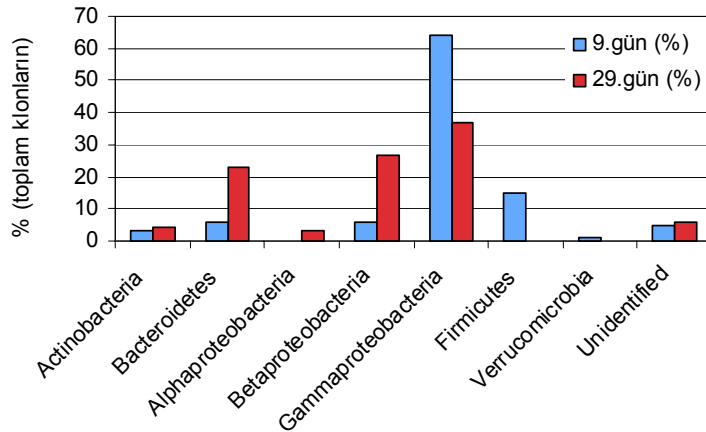
Ardışık kesikli reaktörde glikozun biyolojik aşırı fosfor giderimine etkisi



Şekil 7. 9'uncu ve 29'uncu günlerde biyokütlenin PHA kompozisyonu



Şekil 8. 29'uncu günde Gram boyama ile mikroskopik gözlem



Şekil 9. Aktif çamur örneklerinden oluşturulan 16S rDNA klon kütüphanesi

Genel olarak fosfor biriktiren organizmaların glikozu, anaerobik koşullarda doğrudan hücre içlerine alamadıkları ancak glikozun kısa zincirli yağ asitlerine dönüştürüldüğü zaman tüket-

bildikleri bilinmektedir. Moleküler analiz sonuçlarında gözlemlenen pek çok farklı fermentasyon bakterilerinin varlığı glikoz fermentasyonunu kanıtlamaktadır. Çalışma sonuçlarına ben-

zer şekilde Kong ve diğ erleri (2001) de glikozla beslenen BAFG sistemlerinde laktik asit bakterilerinin yoğun olarak görülmekte olduğunu rapor etmiştir. Jeon ve Park (2000), glikozun organik madde kaynağı olarak kullanıldığı durumda, BAFG'nin gerçekleşebilmesi için 2 farklı bakteri türünün ortamda olmasının gerekli olduğunu vurgulamıştır. Bunlardan laktik asit bakterileri, glikozu laktik aside fermente etmekte ve fosfat biriktiren organizmalar anaerobik fosfor salınımdan enerji sağlayarak oluşan laktik asidi PHA'ya dönüştürmektedir. Bu varsayım, BAFG mekanizmasının iyi olduğu dönemde laktik asidin anaerobik fazda tamamen tüketilirken, BAFG mekanizmasının kötüleştiği dönemde laktik asit tüketiminin azalmasını açıklamaktadır. AKR'nin başlangıç döneminde laktik asit oluşması ve oluşan laktik asitin anaerobik fazda tüketilmesi sonucu fermentasyon bakterileri ile Poli-P bakterilerinin biyolojik fosfor giderimini birlikte gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Fermentasyon bakterilerinin glikozu fermente etmesi sonucunda PAO'ların fermentasyon ürünlerini anaerobik fazda hücre içlerine aldığı ve PHA'ya dönüştürdüğü düşünülmüştür. Belirgin oranda 3HV oluşumu ve anaerobik fazda laktik asidin tüketilmesinden dolayı laktik asidin PAO'larca kullanılan esas karbon kaynağı olduğu sonucuna varılmıştır. Oluşan PHA'nın %77'sinin 3HV'den oluşması literatürde sunulan çalışmalarla örtüşmektedir.

Satoh ve diğ erleri (1992) tarafından laktik asit için önerilen metabolik modelde, laktik asit redoks dengesini sağlamak için asetil-CoA'ya ve propiyonil-CoA'ya eşit olarak parçalanarak 3HV ve 3H2MB bileşenlerinden oluşan PHA'ya dönüşmektedir. Ancak bu çalışmada, PHA'nın %12'sinin 3H2MV olduğu ve buna paralel olarak az miktarda glikojen tüketildiği belirlenmiştir. Bu sonuçlardan hareketle, laktik asitle birlikte tüketilen glikojenin asetil-CoA ve propiyonil-CoA oranlarını değiştirerek diğ er PHA bileşenlerine ek olarak 3H2MV oluşumuna neden olduğu düşünülmüştür.

AKR'nin 29'uncu gününde *Candidatus Competibacter phosphatis* baskın halde gözlemlenmiştir. BAFG sistemindeki kötüleşmenin bu türün baskın hale gelmesinden kaynaklandığı

düşünülmüştür çünkü GAO'lar fosfat biriktiren organizmalara karşı baskın olduğu durumlarda glikojen, enerji ve indirgeme gücü kaynağı olarak kullanılmakta ve enerji kaynağı olarak kullanılan polifosfata gereksinimi azaltmaktadır. Mikrobiyal analiz sonuçlarına paralel olarak 29'uncu günde önemli miktarda glikojen tüketiminin artması, karbon kaynağı tüketimine karşın salınan fosfor değerinin (0.07 mol P/ mol C) düşmesi sistemde GAO'ların aktif olduğunu göstermektedir.

Sonuçlar

Glikozla beslenen ardışık kesikli reaktörde başlangıçta biyolojik fosfor giderimi yüksek verimde gerçekleştirilmiştir. Ancak biyolojik aşırı fosfor giderim aktivitesi reaktörün işletimi süresince kademeli olarak kötüleşmiştir.

Glikozun karbon kaynağı olarak kullanılması durumunda; fermentasyon bakterilerinin varlığının biyolojik fosfor gideriminin gerçekleşebilmesi için önemli olduğu görülmüştür. Glikozun fermentasyonu sonucu oluşan laktik asitin fosfat depolayan organizmalarca esas karbon kaynağı olarak tüketildiği ve 3HV'ce zengin PHA olarak hücre içinde depolandığı belirlenmiştir. Dolayısıyla laktik asit bakterileri ile fosfat depolayan organizmaların biyolojik fosfor giderimini birlikte gerçekleştirdiği sonucuna varılmıştır.

Yüksek konsantrasyonda glikoz beslenmesinin literatürde yer alan çalışmaların aksine glikojen metabolizmasını ve dolayısıyla glikojen depolayan organizmaların çoğalmasını desteklediği ve biyolojik aşırı fosfor giderim aktivitesinin bozulmasına neden olduğu bu çalışma ile gösterilmiştir.

Kaynaklar

- Cech, J.S. ve Hartman, P., (1993). Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria in enhanced biological phosphate removal systems, *Water Research*, **27**, 7, 1219-1225.
- Crocetti, G.R., Banfield, J.F., Keller, J., Bond, P.L. ve Blackall, L.L., (2002). Glycogen accumulating organisms in laboratory scale and

- full-scale wastewater treatment processes, *Microbiology*, **148**, 3353-3364.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. ve Smith, F., (1956). Colometric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, **28**, 350-356.
- Hollender, J., van der Krol, D., Kornberger, L., Gierden, E. ve Dott, W., (2002). Effect of different carbon sources on the enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor, *World Journal of Microbiology and Technology*, **18**, 355-360.
- Jeon, C.J. ve Park, J.M., (2000). Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor supplied with glucose as a sole carbon source, *Water Research*, **34**, 7, 2160-2170.
- Kong, Y.H., Beer, M., Seviour, R.J., Lindrea, K.C. ve Rees, G.A., (2001). Structural and functional analysis of the microbial community in an aerobic: anaerobic sequencing batch reactor (SBR) with no phosphorus removal, *Systematic and Applied Microbiology*, **24**, 597-609.
- Liu, W.T., Mino, T., Nakamura, K. ve Matsuo, T., (1996). Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic-aerobic activated sludge without biological phosphorus removal, *Water Research*, **30**, 1, 75-82.
- Liu, Y.H., (1998). Relation between sludge carbohydrate content and biological phosphate removal, *Water Research*, **32**, 5, 1635-1641.
- Mino, T., van Loosdrecht, M.C.M. ve Heijnen, J.J., (1998). Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Research*, **32**, 11, 3193-3207.
- Randall, A.A., Benefield, L.D. ve Hill, W.E., (1994). The effect of fermentation products on enhanced biological phosphorus removal, polyphosphate storage, and microbial population dynamics, *Water Science and Technology*, **30**, 6, 213-219.
- Satoh, H., Mino, T. ve Matsuo, T., (1992). Uptake of organic substrates and accumulation of polyhydroxyalkanoates linked with glycolysis of intracellular carbohydrates under anaerobic conditions in the biological excess phosphate removal processes, *Water Science and Technology*, **26**, 5-6, 933-942.
- Satoh, H., Ramey, W.D., Koch, F.A., Oldham, W.K., Mino, T. ve Matsuo, T., (1996). Anaerobic substrate uptake by the enhanced biological phosphorus removal activated sludge treating real sewage, *Water Science and Technology*, **34**, 1-2, 9-16.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, (1995). 19th edn. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
- Wang, N., Peng, J. ve Hill, G., (2002). Biochemical model of glucose induced enhanced biological phosphorus removal under anaerobic condition, *Water Research*, **36**, 49-58.