



Denitrifikasyon ve Mikroorganizmalar

Gülten KURUCUOĞLU ÖKMEN¹

Ömer Faruk ALGUR²

¹Muğla Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, MUĞLA

²Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ERZURUM

*Sorumlu Yazar

e-posta: gultenokmen@gmail.com

Geliş Tarihi : 13 Nisan 2011

Kabul Tarihi : 07 Temmuz 2011

Özet

Azot, bitki ve hayvan gelişimi için gerekli bir besindir. Ayrıca tüm mikroorganizmalar protein sentezi ve gelişim için azota ihtiyaç duymaktadırlar. Fakat akıntı ve potansiyel içme suyu kaynaklarının nitrat kontaminasyonu ciddi ve hala artan bir problemdir. İnsanlar için nitratların toksisitesi yeterince anlaşılammıştır. Bununla birlikte, bunların tüketimi bebekte mavi bebek sendromuna neden olabilmektedir (methemoglobinemia). Nitratların nitritlere indirgenmesi kanserojen olarak bilinen nitrozaminlerin oluşmasını sağlayabilmektedir. Bundan dolayı, içme suyu ve atık sudan nitratın uzaklaştırılması için farklı prosesler kullanılmaktadır. Biyolojik denitrifikasyon nitrat uzaklaştırması için oldukça seçicidir. Hatta biyolojik denitrifikasyon atıksu uygulamalarında yıllardır kullanılmaktadır. Biyolojik denitrifikasyonda heterotrofik veya ototrofik mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Biyolojik denitrifikasyon diğer metotlardan daha ucuz olduğundan dolayı tercih edilmektedir. Bu derleme bu nedenle hazırlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Denitrifikasyon, mikroorganizma

Denitrification and Microorganisms

Abstract

Nitrogen is an essential nutrient for plant and animal growth. In addition, all microorganisms require nitrogen for protein synthesis and growth. But, nitrate contamination of current and potential drinking water sources is a serious and ever-increasing problem. The toxicity of nitrates for humans is not clearly understood. However, their consumption can cause infant methemoglobinemia. Reduction of nitrates into nitrites may contribute to the formation of nitrosoamines, which are known carcinogens. Therefore, various unit processes have been used for nitrate removal from drinking water and wastewater. Biological denitrification is highly selective for nitrate removal. Moreover, biological denitrification have been used for years in wastewater treatments. Heterotrophic or autotrophic microorganisms have been used in biological denitrification. Biological denitrification is cheaper than the other methods. Therefore, biological denitrification has been preferred. This review is prepared for this reason.

Key Words: Denitrification, microorganism

GİRİŞ

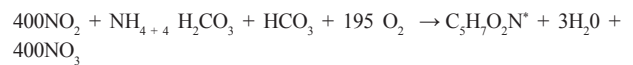
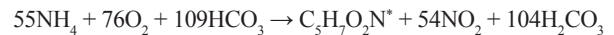
Nitrat ve nitrit bileşiklerinin, anaerobik koşullarda mikroorganizmalar tarafından redüksiyona uğratılarak elementer azota dönüştürülmesi olayı denitrifikasyon (nitrat solunumu) olarak tanımlanmaktadır [1,2, 3].

Atmosferin %78' ini oluşturan azot, canlılardaki temel besin maddelerinden biridir. Gerek canlı bünyesinde ve gerekse ölü organizmalarda bulunan azot, doğada "azot çevrimi" denilen bir döngü içinde sürekli dolanım halindedir. Yukarıda kısaca tanımlanan biyolojik denitrifikasyon, bu çevrimin önemli aşamalarından biridir [4]. Denitrifikasyonun önemini anlamak için, kısaca azot çevrimini özetlemek yararlı olacaktır.

Toprakta bulunan organik azotlu maddeler, proteinler, çekirdek asitleri, pürin ve pirimidin bazları, glikozamin ve galaktozamin gibi amino şekerlerdir. Topraktaki proteinler, mikroorganizmaların hücre dışına saldırdığı "proteinaz" enzimleriyle amino asitlere parçalanırlar. Bu faaliyetler sonunda meydana gelen amino asitler, ya yine mikroorganizmalar tarafından besin olarak kullanılır veya daha küçük bileşenlerine ayrıştırılırlar [5].

Bitkiler, azotu genellikle nitrat şeklinde alırlar. Topraktaki nitrat birikimi ise proteinlerin parçalanma ürünü olan amonyağın mikrobiyal oksidasyonu ile oluşur. Bu olay, iki basamakta gerçekleştirilir. Birinci basamakta amonyak nitrite çevrilir ve "nitrosifikasyon" denen bu olayda başlıca *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus* ve *Nitrosolobus* cinslerine ait bakteri türleri etkin rol oynarlar.

İkinci basamakta ise nitrit, *Nitrobacter* cinsine ait bakteri türleri tarafından nitratlara çevrilir (nitrikasyon) [6]. Bu olaylarla ilgili denklemler aşağıda verilmiştir [4,5,7,8].



Yukarıda özetlenmeye çalışılan mikrobiyal faaliyetler sonucunda meydana gelen nitratlar, eğer hemen bitkiler tarafından alınmazsa yine topraktaki bazı bakteriler tarafından redüksiyona

uğrattır ve bu şekilde nitritler, amonyak ve elementer azot oluşur (denitrifikasyon) ve toprak nitrat bakımından fakirleşir [1,5]. Karbon kaynağı olarak metanolün kullanıldığı denitrifikasyona ait sitokiyometrik bağıntı aşağıda verilmiştir [9-11].



(*) Bu denklemlerde bakteri hücre formülü olarak $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ alınmıştır.

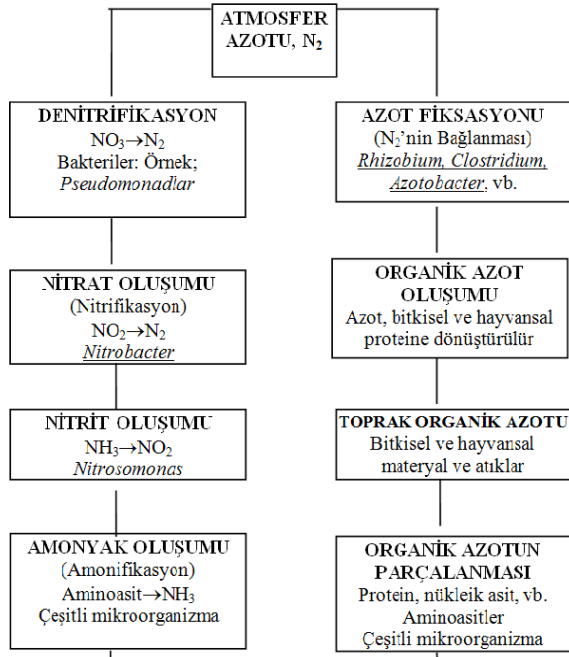
Nitratlar bitkiler tarafından alınınca, bunların önemli bir bölümü protein moleküllerinin yapımında kullanılır. Bitkisel proteinleri yiyen hayvanlar, onları hayvansal proteine çevirirler.

Hayvanların protein metabolizması sonunda, artık madde olarak üre ve ürik asit gibi azotlu bileşikler dışarı atılır ve bunlardan amonyak oluşur. Diğer taraftan, ölü hayvanların ve bitkilerin proteinlerinin parçalanmasıyla peptonlar, peptidler, amino asitler ve sonunda amonyak ortaya çıkar (mineralizasyon ve amonifikasyon) [5].

Azot çevriminde önemli bir başka olay da, havanın 4/5'ünü oluşturan serbest azotun bağlanmasıdır. Bu olay, biri simbiyotik diğeri simbiyotik olmayan iki farklı yolla gerçekleşir. Simbiyotik azot bağlanmasında, baklagil bitkilerinin köklerine yerleşen ve burada yumrular oluşturan *Rhizobium meliloti* ve *Rhizobium leguminosarum* gibi bakteriler rol almaktadır. Ayrıca bazı küf mantarları ve aktinomisetlerinde bitkiler ile simbiyotik yaşayarak azot bağladıkları ifade edilmektedir. Simbiyotik olmayan azot bağlanması olayında ise nötral reaksiyonlu toprakta *Azotobacter* gibi, asit reaksiyonlu toprakta ise *Clostridium pasteurianum* gibi, alkali topraklarda ise siyanobakteriler gibi bakteriler görev alırlar. Bu özelliğe sahip bakteriler, sentezledikleri "nitrogenaz" enzimleri sayesinde serbest azot bağlama yeteneğindedirler [5]. Şekil 1.'de azot çevrimi ve etkili mikroorganizmalar özetlenmiştir [12].

Denitrifikasyonun Mekanizması ve Denitrifikasyon Üzerinde Etkili Faktörler

Denitrifikasyon olayında, nitratın elementer azota indirgenmesi dört basamakta gerçekleşmekte (NO_3^- - NO_2^- - NO



Şekil 1. Azot çevrimi ve etkili mikroorganizmalar [12]

- N_2O - N_2) ve bu basamakların her biri ayrı bir enzim sistemi tarafından katalizlenmektedir. Denitrifikasyon bakterilerinde membrana bağlı olan bu enzimlerin sentezi anaerobik şartlarda gerçekleştirilir.

İlk basamağı oluşturan nitratların nitritlere indirgenmesinde, molibden içeren membrana bağlı "nitrat redüktaz" enzimi rol almakta, nitritlerin indirgenmesini ise, birinin merkezinde bakır, diğeri merkezinde ise iki tane hem grubu olan iki farklı "nitrit redüktaz" enzimi tarafından yürütülmektedir. Diğer taraftan azot oksitlerin (NO) indirgenmesindeki enzimatik olaylar aydınlığa kavuşturulamamakla beraber, denitrifikasyonun son safhasını oluşturan N_2O 'in elementer azota indirgenmesinde " N_2O redüktaz" denen enzimin görev aldığı ve bu enzimin bakır içeren bir sitoplazmik enzim olduğu belirtilmektedir [11,13-16].

Denitrifikasyon enzimleriyle ilgili çalışmalar daha çok *Paracoccus denitrificans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas stutzeri* türleri üzerinde yapılmıştır. Bu ayrıntılı çalışmalar sonucunda "nitrat redüktaz" enziminin a, b, ve d olmak üzere üç alt üniteden meydana geldiği, bunlardan a-alt ünitesinin molibden kofaktörünü taşıdığı, b-alt ünitesinin FeS gruplarını içerdiği ve d-alt ünitesinin ise sitokrom-b taşıdığı saptanmıştır [13]. Oldukça yüksek çözünürlükte olan enzim membrana bağlı, molibdo-proteindir, sadece anaerobik şartlar altında sentezlenmektedir [17]. Nitrit redüktaz, bakır içeren hem-grubu bulunmayan bir enzimdir [18]. Bundan başka nitrik oksit redüktaz henüz saflaştırılmamıştır [17]. Nitroz oksit redüktaz ise hem-grubu içermeyen, bakır içeren bir enzimdir [17].

Denitrifikasyonun genetik temeli de araştırılmış ve en az 40 genin bu olay üzerinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır [13].

Bazı bakteri türlerinin enzim sistemleri üzerinde yapılan ayrıntılı araştırmalar sonucunda, enzimlerin sentezlenmesi ve baskılanmasını etkileyen faktörlerin genel olmadığı, bu durumun ise denitrifikasyonda rol alan bakterilerin genetik çeşitliliğinden ve dolayısıyla metabolik farklılıklarından kaynaklandığı belirlenmiştir. Örneğin *Paracoccus denitrificans* türü ile yapılan çalışmalarda "nitrat redüktaz" ve "nitrit redüktaz" üretiminin ayrı substratlarla başlatıldığı bildirilmektedir. Nitrat redüktaz enzimi, oksijen ya da nitrit tarafından (0,1mM) inhibe edilmezken, nitrit redüktazın aktivitesi, oksijen varlığında önemli ölçüde inhibe edilmiştir. Ortamda her iki enzimin bulunması durumunda ise, nitratın nitrite tercih edildiği kaydedilmiştir [11,14,19].

Denitrifikasyon yapma yeteneğine sahip mikroorganizmalar, nitratlardan üç şekilde yararlanmaktadır:

1. Azot kaynağı olarak,
2. Nitratı nitrite, nitriti de amonyağa indirmek suretiyle nitrat asimilasyonunda,
3. Nitratı, oksijen yerine son elektron alıcısı olarak [1, 20].

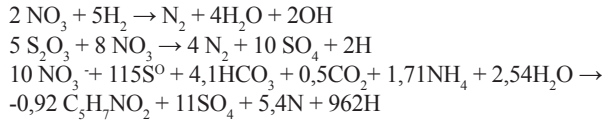
Denitrifikasyon, bir solunum olayı olduğundan, enerji kaynağı olarak oksitlenebilir bir substrat ya da elektron vericisine ihtiyaç vardır. Denitrifiye edici bakteriler çoğunlukla heterotrof olup, kompleks organik maddeleri oksitlenebilir substrat olarak kullanırlar. Ancak bazı denitrifikasyon bakterileri ise ototroflar ve H_2 , CO_2 ya da kükürt bileşiklerini enerji kaynağı olarak kullanırlar [11,21].

Heterotrofik denitrifikasyonda metanol, etanol, glikoz, asetik asit ve formik asit gibi birçok organik madde karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır [22-27]. Ayrıca metan ve karbonmonoksit gibi gaz halindeki organik maddeler de substrat olarak kullanılabilir. Metan gazının elektron vericisi olarak kullanıldığı denitrifikasyonun mekanizması hakkındaki bilgiler birtakım çelişkiler içermekle beraber, gaz halindeki karbon kaynakları içerisinde en kapsamlı çalışılan substrat, metandır.

Araştırmacılar, metan oksidasyonunun aerobik ya da mikroaerofilik şartlara ihtiyaç duyduğunu ileri sürmüşler ve bu denitrifikasyonun farklı iki mikroorganizmanın simbiyotik ilişkisi sonucu gerçekleştiğini belirtmişlerdir [28]. Karbonmonoksitin kullanıldığı çalışmalar ise çok daha az sayıdadır.

Yukarıda da belirtildiği gibi denitrifikasyon olayı, hidrojen ve çeşitli indirgenmiş kükürt bileşiklerini enerji kaynağı olarak kullanabilen ototrofik bakteri türleri tarafından da gerçekleştirilmektedir (ototrofik denitrifikasyon). Ototrofik üreme koşullarında herhangi bir dış organik karbon kaynağına ihtiyaç duyulmamakta, daha çok karbondioksit ve bikarbonat, hücre sentezi için karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Diğer taraftan *Paracoccus denitrificans* ve *Thiobacillus denitrificans* gibi bazı bakteri türleri hem ototrofik hem de heterotrofik denitrifikasyon yapabilmektedir [14]. Ayrıca *Ferrobacillus*, *Gallionella*, *Leptothrix* ve *Sphaerotilus* cinslerine ait bakteriler Fe^{+3} ü enerji kaynağı olarak kullanmak suretiyle denitrifikasyon yapmaktadırlar. Aşağıda sırasıyla hidrojen, tiyosülfat ve elementer kükürt kullanımına ilişkin sitokiyometrik bağıntılar verilmiştir [10,11,29,30].



Biyolojik denitrifikasyonun azot çevrimindeki rolüne ilâveten içme sularında biyolojik NO_3^- artımı için de kullanılabileceğinin anlaşılması, işlemi daha verimli hale getirmek için optimum parametrelerin belirlenmesi çalışmalarını da hızlandırmıştır. Yapılan araştırmalar, denitrifikasyon bakterilerinin metabolizmasında elektron alıcısı olarak nitratla rekabet eden oksijenin önemli bir inhibitör olduğunu ve $0,2\text{mg/L}$ 'nin üzerindeki oksijen konsantrasyonlarında nitrat indirgenmesinin gerçekleşmediğini göstermiştir [31,32]. Ancak *Pseudomonas* ve *Bacillus* cinslerine ait birkaç mikroorganizmanın aerobik şartlarda da NO_3^- 'i elektron alıcısı olarak kullanmak suretiyle denitrifiye edebileceği belirtilmektedir [33]. Diğer taraftan, denitrifikasyon sırasında hücrelerde ki NADH dehidrogenaz, suksinat dehidrogenaz ve metanol dehidrogenaz gibi H_2 koparılmasını katalizleyen enzimlerin de rol oynadıkları belirlenmiştir [16].

Araştırmacılar, denitrifikasyon için optimum pH aralığının pH5-8, sıcaklık sınırlarının ise $4-60^\circ\text{C}$ olduğunu, bu sınırlar dışındaki değerlerde ise denitrifikasyonun gerçekleşmediğini kaydetmişlerdir [34]. Bunların dışında oksijen seviyesi, C/N oranları, nitrat konsantrasyonu, tuz, iz elementler gibi çoğu çevresel faktöründe denitrifikasyon üzerinde etkili olduğu rapor edilmiştir [35-39].

Denitrifikasyon üzerinde inhibitör etkisi olan bileşiklerin başında kükürt bileşikleri gelmektedir. Aynı zamanda, çok az miktarlar da bulunsun bile nitratın $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ dönüşümünü, enzim aktivitesini baskılamak suretiyle engellediği belirtilmektedir [7,10].

Denitrifikasyonun Biyoteknolojik Amaçla Kullanımı (içme sularındaki nitratın biyolojik giderimi)

Azotlu bileşikler, doğal yollarla veya insan faaliyetleri sonucu akuatik sistemlere de geçmektedir. Ancak, bu ortamlara insan faaliyetiyle geçen azot yükü, doğal yolla geçene oranla çok daha fazladır.

Bu sistemlerdeki doğal azotlu bileşikler, yağışlar ve toprakla temas halindeki yüzey sularının getirdiği maddeler ile,

mikroorganizmalar tarafından bağlanan azottan ibarettir. İnsan faaliyetleri sonucu sulara meydana gelen azot yükü ise, başlıca kentsel atık su arıtma tesislerinin çıkış suyu ile koklaştırma tesisleri, sun-î gübre fabrikaları ve nitroselüloz fabrikaları gibi sanayilerin drenaj sularından kaynaklanmaktadır. Özellikle kentsel atık su arıtma tesislerinin çıkış suları, yağışsız havada $40-80 \text{g/cm}^3$ azot içermektedir. Diğer taraftan, akuatik sistemlerdeki insan faaliyeti orijinli azotlu bileşiklerin önemli bir kaynağını da doğal veya sun-î gübreleme işlemleri oluşturmaktadır. Çünkü toprak, gübrede bulunan fosfat ve amonyum iyonlarına kıyasla, nitrat iyonlarını daha güç bağlayabilmekte ve bu iyonlar sonuçta drenaj sularıyla yıkanarak akuatik sistemlere karışmaktadır. Bu iş için doğal gübrelerin kullanılması halinde de, toprak bakterilerinin metabolik faaliyetleri sonucunda nitrat iyonları oluşacaktır [4,7,9,40].

Yapılan araştırmalar, içme suyu kaynaklarına karışan azotlu bileşikler içerisinde, insan sağlığına en olumsuz etkilere sahip bileşiğin nitrat olduğunu [41], nitrat konsantrasyonu 500mg/L 'i geçen içme sularının, yetişkinlerde sindirim sistemi ve ürogenital sistem iltihaplanmalarına yol açtığını ve ayrıca 6 aylıktan küçük bebeklerde mide asitlerinin tam oluşmaması nedeniyle, nitratların sindirim sisteminde nitritlere indirgendiği ve oluşan nitritin kandaki hemoglobin ile birleşerek "methemoglobin" maddesini oluşturması sonucu "mavi bebek sendromu" veya "methemoglobinemia" denen hastalığın ortaya çıktığını göstermiştir [42,43].

Diğer taraftan içme sularındaki nitritlerin asitli ortamda sekonder ve tersiyer aminler, alkil amonyum bazlar ve amidlerle reaksiyona girmek suretiyle nitrosaminleri ve nitrosamidleri oluşturdukları, bu bileşiklerin ise kanserojen etkilerinin olduğu kaydedilmektedir [4,9,40]. Akuatik sistemde nitrit birikimine neden olan faktörlerden biri ortamdaki ortak elektron vericisi için nitrat ve nitrit redüktazın rekabete girmesi ve bazı denitrifiye organizmalar vasıtasıyla nitrit birikiminin artmasıdır [44-46]. Ayrıca bazı araştırmacılar tarafından da karbon kaynağının seçiminin ortamdaki nitrit birikim seviyesini etkilediği gösterilmiştir [47-49]. Karbon kaynağı olarak sukroz kullanıldığında nitrit birikimi $5\text{mgNO}_2/\text{L}$ iken [49], etanol ile metanol kullanıldığında ise bu oran değişmektedir [50]. Ortamda biriken nitritin de balıklar ve akuatik canlılar için son derece toksik olduğu bildirilmektedir [51-55].

Yukarıda özetlenmeye çalışılan sakıncaları nedeniyle Çevre Koruma Ajansı (EPA) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gibi kurumlar, içme sularında sırasıyla 10 ve $11,3 \text{mg NO}_3\text{-N/L}$ sınır değerlerini belirlemişlerdir [7,9,10,56]. Türk içme suyu standardı TS-226'ya göre içme suyunda müade edilen maksimum nitrat konsantrasyonu 45mg/L 'dir.

Denitrifikasyon yapan bakteriler

Denitrifikasyon olayı, Proteobacter'lerden ve Archaea'lere kadar olan prokaryotlar arasında geniş bir dağılım göstermektedir [57,58]. Denitrifikasyon üzerinde yapılan çok sayıda araştırma sonucunda, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Aquaspirillum*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beggiatoa*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Erythrobacter*, *Gallionella*, *Halobacterium*, *Halomonas*, *Hyphomicrobium*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodospseudomonas*, *Thiobacillus*, *Vibrio* ve *Xanthomonas* cinslerine ait çok sayıda bakterinin denitrifikasyon aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır [11].

Her ne kadar denitrifikasyon yapan bakteri sayısı fazla ise de, NO_3^- giderimi amacıyla üzerinde araştırma yapılan türlerin

başlıcaları *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Paracoccus denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans* ve *Bacillus licheniformis*' tir [2,11,22].

SONUÇ

Nitrat kirliliğini gidermek için kimyasal çöktürme, iyon değişimi, ters ozmoz, elektrodiyaliz ve distilasyon gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin seçiciliklerinin az olması, yüksek enerji maliyetine sahip olmaları ve artırılmış suya başka maddelerin karışmasına yol açmaları gibi, kullanılmalarını güçleştiren dezavantajları vardır. İşte bu nedenlerle, tamamen doğal bir proses olan biyolojik denitrifikasyonla nitrat giderme çalışmaları, günümüzde daha da önem kazanmaktadır. Bu işlemde, mikroorganizmalar anaerobik ortamda elektron verici madde yardımıyla (karbon kaynağı), nitratları oksijenin yerine son elektron alıcısı olarak kullanmak suretiyle, havanın tabii bir bileşeni olan azot gazına indirgemektedirler [9]. Tüm bunlara ilaveten maliyetinin düşük olması da ayrı bir avantaj olarak gözükmektedir.

Günümüzde denitrifikasyon kapasitesi yüksek olan yeni tür arayışlarına ve bunların optimizasyon çalışmalarının detaylı bir şekilde bilim insanları tarafından ele alınmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Çelebioğlu İ, et al. 1980. Toprak Mikrobiyolojisi Ders Notları. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, Erzurum.
- [2] Schlegel HG. 1986. General microbiology, 6th edition. Cambridge University Press, London.
- [3] Crab R, Avnimelech Y, Defoirdt T, Bossier P, and Verstraete W. 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*. 270(1-4):1-14.
- [4] Uslu O, Türkman A. 1987. Su Kirliliği ve Kontrolü. T.C. Başbakanlık Çevre Genel Müdürlüğü Yayınları Eğitim Dizisi, Ankara.
- [5] Unat EK. 1985. Temel Mikrobiyoloji. Beta Basım Yayın Dağıtım A.Ş. No:52. İstanbul.
- [6] Colliver BB, and Stephenson T. 2000. Production of nitrogen oxide and dinitrogen oxide by autotrophic nitrifiers. *Biotechnol Adv*. 18:219-232.
- [7] Hiscock KM et al. 1991. Review of natural and artificial denitrification of groundwater. *Water Res*. 25:1099-1111.
- [8] Sawyer C, McCarty PL, Parkin GF. 1994. Chemistry for Environmental Engineering. International Editions, McGraw-Hill Co., 439-453. United States.
- [9] Dahab MF and Lee YW. 1988. Nitrat removal from water supplies using biological denitrification. *Journal of W.P.C.F*. 90:1670-1676.
- [10] Gayle BP, et al. 1989. Biological denitrification of water. *J Environ Eng*. 111:930-943.
- [11] Mateju V. 1992. Biological denitrification. A review. *Enzym Microb Tech*. 14:170-183.
- [12] Özçelik S. 1985. Genel Mikrobiyoloji. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Yayın No:1. Konya.
- [13] Verseveld HW et al. 1983. Energetic aspect of growth of *Paracoccus denitrificans*. *Arch Microbiol*. 135:229-236.
- [14] Gottschalk G. 1985. Bacterial Metabolism, 2nd edition. Springer-Verlag, 122-126. New York.
- [15] Verstraete W and van Vaerenbergh E. 1986. Aerobic activated sludge. In: *Biotechnology*. (ed. Schönborn W), Vol. 8, Microbial degradations. Weinheim, Germany, VCH; 8:3.
- [16] Stouthamer AH. 1991. Metabolic regulation including anaerobic metabolism in *Paracoccus denitrificans*. *J of Bioenerg and Biomembr*. 23:163-185.
- [17] Payne WJ. 1985. Diversity of denitrifiers and their enzymes. In: *Denitrification in the nitrogen cycle*. (ed. Golterman HL) Plenum Press, 47-65. New York, NY.
- [18] Bryan BA. 1981. Physiology and biochemistry of denitrification. In: *Denitrification, nitrification, and atmospheric nitrous oxide*. (ed. Delwiche CC), John Wiley & Sons, New York, NY.
- [19] Rick WY, Averill BA and Tiedje JM. 1994. Denitrification: Production and consumption of nitric oxide. *Appl Environ Microbiol*. 60:1053-1058.
- [20] Okada N, Nomura N, Nakajima-Kambe T, and Uchiyama H. 2005. Characterization of the aerobic denitrification in *Mesorhizobium* sp. strain NH-14 in comparison with that in related rhizobia. *Microbes Environ*. 20:208-215.
- [21] Hall T. 1991. Biological denitrification for potable water treatment. Extended Summaries, Environ Biotech Group Meeting: London. 185-187.
- [22] Smith J, et al. 1972. Nitrogen removal from municipal waste water by columnar denitrification. *Environ Science and Tech*. 6:260-267.
- [23] Timmerman P, et al. 1983. Denitrification with methanol. *Water Res*. 17:1267-1274.
- [24] Evans PJ, et al. 1991. Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Appl Environ Microb*. 57:1139-1145.
- [25] Akunna JC, et al. 1993. Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources. *Water Res*. 27:1303-1312.
- [26] Delanghe B, et al. 1994. Drinking water denitrification of in a membran bioreactor. *Wat Sci Tech*. 6:157-160.
- [27] Fass S, et al. 1994. Volatile fatty acids as organic carbon sources in denitrification. *Environ Tech*. 15:459-467.
- [28] Rhee G, Fuhs G. 1978. Wastewater denitrification with one carbon compounds as energy source. *Journal of W.P.C.F*. 50:2111-2119.
- [29] Kurt M, et al. 1987. Biological denitrification of drinking water using autotrophic organism with hydrogen in a fluidized bed biofilm reactor. *Biotech and Bioeng*. 29:493-501.
- [30] Nuhoglu A. 1996. Çapraz akışlı membran bioreaktörde denitrifikasyon prosesi [Yüksek Lisans]. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- [31] Cox JC, Ingledew WJ, Haddock BA and Lawford HG. 1978. The variable cytochrome content of *Paracoccus denitrificans* grown aerobically under different conditions. *FEBS Lett*. 93:261-265.
- [32] Bosma G, et al. 1987. The respiratory chain and energy conservation in the mitochondrion-like bacterium *Paracoccus denitrificans*. *Microbiol Sci*. 4:329-333.
- [33] Stanier RY, Doudouff M. and Adelberg EA. 1970. *Microbial World*, 3rd edition. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

- [34] Usha S, et al. 1982. Denitrification potential of a salt marsh soil: Effect of temperature, pH and substrate concentration. *Soil Biol Biochem.* 14:117-125.
- [35] Cervantes F, Monroy O, and Gomez J. 1998. Accumulation of intermediates in a denitrifying process at different copper and high nitrate concentrations. *Biotechnology Letters*, 20(10):959-961.
- [36] Carrera J, Vicent T, and Lafuente FJ. 2003. Influence of temperature on denitrification of an industrial high-strength nitrogen wastewater in a two-sludge system. *Water SA.* 29(1):11-16.
- [37] Estuardo C, Martí MC, Huiliñir C, Áspe Lillo E, and Roeckel Von Bennewitz M. 2008. Improvement of nitrate and nitrite reduction rates prediction. *Electronic Journal of Biotechnology.* 11(3):1-10.
- [38] Glass C, and Silverstein J. 1998. Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Research.* 32(3):831-839.
- [39] Glass C, and Silverstein J. 1999. Denitrification of high-nitrate, high-salinity wastewater. *Water Research,* 33(1):223-229.
- [40] Samsunlu A. 1992. Control of nitrogen sources and principles of treatment. NATO ASI Series G 30, pp. 435-444.
- [41] Sáez F, Pozo C, Gómez MA, Rodelas B, González-López J. 2003. Growth and nitrite and nitrous oxide accumulation of *Paracoccus denitrificans* ATCC 19367 in the presence of selected pesticides. *Environ Toxicol Chem.* 22:1993-1997.
- [42] Hallberg GR. 1989. Nitrate in ground water in the United States. In: *Nitrogen Management and Ground Water Protection*, (ed. Follet RF), 35-74. Elsevier, Amsterdam.
- [43] Hile R. 1996. The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem Rev.* 96:2757-816.
- [44] Betlach MR and Tiedje JM. 1981. Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Appl Environ Microbiol.* 42:1074-1084.
- [45] Kucera I, Dadak V and Dorby R. 1983. The distribution of redox equivalents in the anaerobic respiratory chain of *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem.* 130:359-364.
- [46] Thomsen JK, Geest T and Cox RP. 1994. Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol.* 60:536-541.
- [47] McCarthy PL, Beck L and Amant St. P. 1969. Biological denitrification of wastewaters by additions of organic materials. 24th Annual Purdue Industrial Waste Conf. Purdue University, 1271. Lafayette.
- [48] Okmen G, Algur OF. 2000. Farklı Karbon Kaynaklarının ve C/N Oranlarının Mikrobiyal Denitrifikasyon Üzerine Etkileri. *Turk J Biol.* 24:533-542.
- [49] Gómez MA, González-López J, and Hontoria-García E. 2000. Influence of carbon source on nitrate removal of contaminated groundwater in a denitrifying submerged filter. *Journal of Hazardous Materials.* 80(1-3):69-80.
- [50] Lorrain MJ, Tartakovsky B, Peisajovichgilkstein A, and Guiot SR. 2004. Comparison of different carbon sources for ground water denitrification. *Environmental Technology.* 25(9):1041-1049.
- [51] Svobodova Z, Machova J, Poleszczuk G, Huda J, Hamackova J, Kroupova H. 2005. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems. *Acta Vet Brno.* 74:129-137.
- [52] Cheng SY, and Chen JC. 2001. The time-course change of nitrogenous excretion in the Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* following nitrite exposure. *Aquatic Toxicology.* 51(4):443-454.
- [53] Jensen FB. 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 135(1):9-24.
- [54] Kır M, Kumlu M, and Eroldoğan OT. 2004. Effect of temperature on acute toxicity of ammonia to *Penaeus semisulcatus* Juveniles. *Aquaculture.* 241(1-4):479-489.
- [55] Yıldız HY and Benli ACK. 2004. Nitrite toxicity to crayfish, *Astacus leptodactylus*, the effects of sublethal nitrite exposure on hemolymph nitrite, total hemocyte counts, and hemolymph glucose. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 59(3):370-375.
- [56] Pontius F. 1993. Nitrate and cancer: is there a link. *Am Water Works Assoc.* 85:12-14.
- [57] Yamamoto M, Murai H, Takeda A, Okunishi S and Morisaki H. 2005. Bacterial flora of the biofilm formed on the submerged surface of the reed *Phragmites australis*. *Microbes Environ.* 20:14-24.
- [58] Zumft WG. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61:533-616.