

**Atf İçin:** Kuru-Kaçmazoğlu E, 2021. Kalsiyum Aljinatta Tutuklanmış *Paracoccus denitrificans* ile Sabit Yatak Biyoreaktörde İçme Sularından Nitrat Giderimi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(4): 2632-2644.

**To Cite:** Kuru-Kaçmazoğlu E, 2021. Nitrate Removal from Drinking Water by Calcium Alginate Immobilized *Paracoccus denitrificans* in a Packed Bed Bioreactor. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(4): 2632-2644.

## Kalsiyum Aljinatta Tutuklanmış *Paracoccus denitrificans* ile Sabit Yatak Biyoreaktörde İçme Sularından Nitrat Giderimi

Emine KURU KAÇMAZOĞLU<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada, kalsiyum aljinatta tutuklanmış *Paracoccus denitrificans* hücreleri ile sabit yataklı biyofilm reaktörde nitrat giderimi incelenmiştir. Bu amaçla, besleme çözeltisinin nitrat içeriği ve akış hızının biyolojik denitrifikasyon üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu inceleme sonucunda, reaktör çıkışındaki ürün suyun nitrat derişimi, 150 mL h<sup>-1</sup>'lik akış hızına kadar Dünya Sağlık Örgütü ve TS-266 tarafından izin verilen standartların altında bulunmuştur. Maksimum reaktör verimliliği ve 31.53 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> olarak 150 mL h<sup>-1</sup>'lik besleme çözeltisi akış hızında elde edilmiştir. Bu değer için hidrolik alıkonma süresi 30 dakikadır. Besleme çözeltisi nitrat içeriği 250 mg L<sup>-1</sup>'ye kadar, çıkış suyundaki nitrat derişimi standartların altında bulunmuştur. Maksimum nitrat giderme hızı ve reaktör verimliliği 397.50 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>'lik yükleme hızında sırasıyla 342.06 ve 30.70 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> olarak elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyolojik nitrat giderimi, dolgu yataklı biyoreaktör, immobilizasyon, kalsiyum aljinat.

### Nitrate Removal from Drinking Water by Calcium Alginate Immobilized *Paracoccus denitrificans* in a Packed Bed Bioreactor

**ABSTRACT:** In this study, nitrate removal was investigated in a packed bed bioreactor with *Paracoccus denitrificans* cells immobilized in calcium alginate. For this purpose, the effects of nitrate content and flow rate of the feed solution on biological denitrification were investigated. As a result of this examination, the nitrate concentration of the product water at the reactor outlet was found below the standards allowed by the World Health Organization and TS-266 up to a flow rate of 150 mL h<sup>-1</sup>. Maximum reactor efficiency was obtained as 31.53 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> at a feed solution flow rate of 150 mL h<sup>-1</sup>. The hydraulic retention time for this value is 30 minutes. The nitrate content of the feed solution was up to 250 mg L<sup>-1</sup>, and the nitrate concentration in the effluent was below the standards. Maximum nitrate removal rate and reactor efficiency were found as 342.06 and 30.70 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> at a loading rate of 397.50 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectively.

**Keywords:** Biological nitrate removal, packed bed bioreactor, immobilization, calcium alginate.

<sup>1</sup> Emine KURU KAÇMAZOĞLU (Orcid ID: 0000-0002-9718-6790), İnönü Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Malatya, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Emine KURU KAÇMAZOĞLU, e-mail: emine.kacmazoglu@inonu.edu.tr

Bu çalışma yazarın Doktora tezinden üretilmiştir.

## GİRİŞ

Organizmaların yapısında yer alan azot, hayati öneme sahip temel elementlerden biri olup, artan insan nüfusunun beslenme gereksinimini karşılamak için başta tarımsal üretim olmak üzere çeşitli etkinliklerde azot ve azotlu bileşikler sıkça kullanılmaktadır. Evsel atıksuların yanısıra mezbaha, alkol, şeker, tekstil gibi çeşitli endüstriyel atıksuların alıcı ortamlara deşarj edilmesi, tarım arazilerinde bilinçsiz gübre kullanımı, meraların işlenebilir arazilere dönüştürülmesi gibi etkenler su kütlelerindeki azotlu bileşiklerin miktarını artıran başlıca etkinliklerdir. Su kütlelerinde bu bileşiklerin artması ise ötrofikasyon ve alg patlaması, sağlık sorunları gibi birçok önemli çevresel sorunun ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Chen ve Lin, 1993; Kapoor ve Viraraghavan, 1997; Conley ve ark., 2009; Wang ve Chu, 2016).

İçme sularında özellikle de yeraltı sularında kirliliğe yol açan azotlu bileşiklerin en önemlisi nitrat azotudur. Yüksek oranda nitrat içeren suların tüketilmesi, methemoglobinemia (mavi bebek sendromu), nitrozamin ve benzeri kanserojen bileşiklerin oluşması gibi bir dizi ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır (Uslu ve Türkmen, 1987; Crespi ve Ramazzoth, 1991; Dourson ve ark., 1991; Shrimali ve Singh, 2001; Erkekoğlu ve Baydar, 2010; Sadler ve ark., 2016; Wang ve Chu, 2016). Bu nedenle su arıtımında azot giderimi büyük önem taşımakta olup, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (USEPA) ve Türk Standartları Enstitüsü (TSE) tarafından çıkarılan yönetmeliklerde, içme sularındaki nitrat içeriğinin sınır değerini 50 mg NO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> olarak tanımlanmıştır (Mateju ve ark., 1992; Anonim, 2016; Anonymous, 2016; Anonymous, 2017a; Anonymous, 2018).

Nitratın içme sularından uzaklaştırılması için farklı performans ve maliyet seviyelerine sahip çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler mevcuttur (Gayle ve ark., 1989; Dahab, 1991; Demircioğlu, 1996; Nuhuğlu, 1996; Kapoor ve Viraraghavan, 1997; Bucco ve ark., 2014). Diğer yöntemlere göre biyolojik denitrifikasyonun, daha ekonomik, uygulaması kolay, çevreye duyarlı ve çok yönlü bir yaklaşım olması nedeniyle, su ve atıksuların arıtımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Üstelik denitrifikasyon prosesi, atıksu arıtımında bir ileri atıksu arıtım yöntemi olarak hem nitratın giderilmesini sağlamakta hem de havalandırmanın güç olduğu durumlarda karbon giderimine yardımcı olmaktadır (van Der Hoek ve ark., 1988; Hiscock ve ark., 1991; Rogalla ve ark., 1991; van Der Hoek ve ark., 1992; Dorias ve Bauman, 1994; Orhon ve ark., 1994; McCleaf ve Schroeder, 1995; Ovez ve ark., 2006; Rahimi ve ark., 2020).

Biyolojik denitrifikasyon, bir dizi enzimatik reaksiyon yoluyla nitratın azot gazına indirgenmesi sürecine denir. Birçok bakteri iyonik azot oksitleri (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) gaz halindeki ürünlere (NO, N<sub>2</sub>O ve N<sub>2</sub>) indirgeyerek çoğalma eğilimindedirler. Azot oksitler (NO<sub>x</sub>) oksijen (O<sub>2</sub>) yokluğunda son elektron alıcısı olarak işlev görürler (Knowles, 1982; Kocataş, 1996). Enerji kaynağı olarak inorganik veya organik bileşiklerin kullanılmasına göre denitrifikasyon, ototrofik ve heterotrofik olmak üzere iki yolla gerçekleştirilir. Ototrofik denitrifikasyon bakterileri enerji kaynağı olarak, hidrojen, demir veya kükürt bileşiklerini ve karbon kaynağı olarak karbon dioksit ve bikarbonat gibi inorganik karbon bileşiklerini kullanırlar. Heterotrofik denitrifikasyonda ise, elektron vericisi olarak oksitlenebilen organik bir karbon kaynağına gereksinim vardır. Etanol, metanol, asetik asit, yağ asitleri, şeker ve şeker kamışı, suda çözünmeyen ama biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, sentetik polyester granüller, gazete ve saman, işlenmemiş pamuk lifi, ağaç kabuğu ve benzeri doğal organik substratlar gibi çeşitli katı, sıvı ve gaz halinde karbon kaynakları kullanılmaktadır. Heterotrofik denitrifikasyon, karbon kaynaklarının kolay bulunması, daha ekonomik olması, büyük ölçeklerde uygulanması gibi avantajları nedeniyle son yıllarda su arıtım uygulamalarında daha çok tercih edilmektedir (Van Rijn ve ark., 2006; Karanasios ve

ark., 2010; Xu ve ark., 2011; Burghate ve Ingole, 2014; Zhu ve ark., 2015; Wang ve Chu, 2016; Zhang ve ark., 2018).

Mikroorganizmaların suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel ve kimyasal olarak tutunarak üredikleri biyofilm sistemleri askıdaki biyokütle reaktörlerine kıyasla daha düşük alan gerektirmesi ve özellikle daha düşük sermaye ve işletme maliyetlerine sahip olmasından dolayı, başta besin endüstrisi olmak üzere biyolojik dönüşüm proseslerinde ve biyolojik su/atıksu tasfiyesinde sıkça kullanılmaktadırlar (Chibata ve ark., 1986; Muslu, 1990; Yang ve ark., 1994; Van Rijn ve ark., 2006; Xu ve ark., 2011; Zhu ve ark., 2015).

Biyofilm sistemler ya hücreler çeşitli taşıyıcılara fiziksel adsorbsiyon, iyonik veya kovalent bağlarla doğrudan bağlanarak ya da organizmanın hareketini (göçünü) sınırlayan poröz veya fibröz materyallerin içerisinde tutuklanarak elde edilirler. Bu amaçla, kollajen, jelatin, agar, aljinat, karrajen, selüloz triasetat, poliakrilamid, epoksi reçineleri, ve benzeri jel polimerler taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (Chibata ve ark., 1986; Lewandowski ve ark., 1987; Wakao ve ark., 1994; Bülbül ve Aksu, 1997; Lee ve ark., 2001; Liu ve ark., 2003; Shams ve ark., 2016; Schroeder ve ark., 2020).

Alginat jel, deniz yosunundan elde edilen bir polisakkarittir ve kalsiyum, alüminyum gibi multivalent iyonlarla jelleşerek poröz yapıda üç boyutlu bir matriks oluşturur (Chen ve Huang, 1988; Kitamikado, 1992; Hu ve ark., 2020). Aljinat jelde tutuklama güvenli, toksik olmayan, hızlı, hafif, basit, ucuz ve çok yönlü kullanıma uygun bir yöntem olduğu için tercih edilmektedir.

Bu çalışmada, dolgu malzemesi olarak kalsiyum aljinat (Ca-aljinat) jelde tutuklanmış *P.denitrificans* hücreleri ile bir kolon reaktörde nitrat gideriminin uygulanabilirliği ve işlem üzerine besleme çözeltisi akış hızı ve nitrat derişiminin etkileri araştırılmış ve sistemin biyofilm ve denitrifikasyon kinetiği incelenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

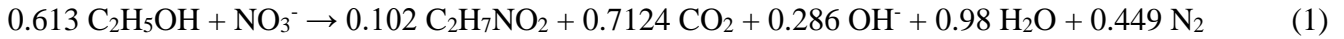
### Deney Sistemi

Araştırmada kullanılan deney düzeneği Şekil 1'de gösterilmektedir. Sistem, Ca-aljinat dolgulu biyoreaktör, peristaltik pompa, termostat, besleme solüsyonu tankı ve sıvı akışları için lateks bazlı tüplerden oluşmaktadır. Reaktör 100 cm yüksekliğinde ve iç çapı 2.5 cm olan silindirik bir kaptır. Yatak boyunca eşit aralıklarla 8 adet ve giriş-çıkışta iki adet ilave numune alma noktası vardır. Reaktörün sadece 70 cm'lik kısmı 275 g Ca-aljinat boncukları ile doldurulmuştur. Reaktörün sıcaklığı, bir su ceketi ile 30°C'de sabit tutulmuştur. Besleme çözeltisi, kolona peristaltik pompa yardımıyla alttan verilmiştir. Reaktörün Ca-aljinat ile doldurulan kısmının toplam boş hacmi ( $V_T$ ) 375 mL'dir. Reaktörün aktif olan kısmının boşluk hacmi ( $V_R$ ) ise 75 mL olarak belirlenmiştir.

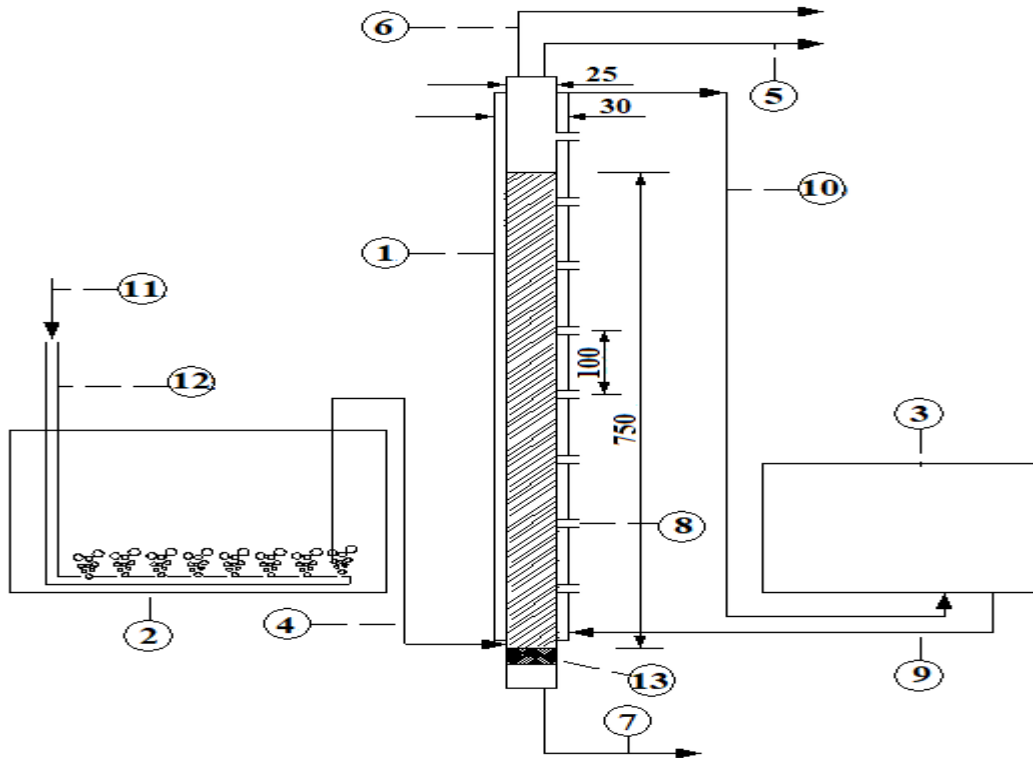
### Mikroorganizmanın Üretilmesi

Araştırmada denitrifikasyon bakterisi olarak kullanılan *Paracoccus denitrificans* NRRL B-3784, Dr. Lk. Nakamura'dan (Department of Agriculture, Agricultural Resource Service, Midweek Area, National Centre for Agriculture Utilisation Resource, 1815 North University street, Peoria, Illinois, USA) liyofilize kültür olarak temin edilmiştir. Mikroorganizmanın üretilmesinde, van Spanning ve çalışma arkadaşları tarafından önerilen ve litresinde 57 mM  $C_2H_5OH$ , 50 mM  $KNO_3$ , 9.6 mM  $K_2HPO_4$ , 6.3 mM  $KH_2PO_4$ , 30 mM  $NH_4Cl$ , 0.6 mM  $Na_2MoO_4$ , 0.26 mM Titriplex I, 0.8 mM  $MgSO_4$ , %0.01 maya özütü ve 1.0 mL eser elementler çözeltisi içeren besiyeri kullanılmıştır. Ancak yukarıda verilen besiyerinin orijinalinde karbon kaynağı olarak, metilamin yer almaktadır (van Spanning ve ark., 1990). Mikroorganizma bu besiyerinde üç gün süreyle yetiştirildikten sonra Ca-aljinatta tutuklanmıştır.

Heterotrofik denitrifikasyonun etanol ile sitokiyometrik eşitliği Eşitlik 1’de verilmiştir.



Buradaki  $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$  hücre kütesini göstermektedir. Eşitlik 1’de verilen reaksiyon için substratın ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) ürüne ( $\text{N}_2$ ) dönüşüm katsayısı ( $Y_{P/S} = \text{g N/g C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) 0.466’dır (Gayle ve ark., 1989; Mateju ve ark., 1992; Burghate ve Ingole, 2014). Besleme çözeltisinin bulunduğu tanktaki karıştırma, tankın altında sabitlenmiş Z şeklinde azot gazı dağıtıcısı ile sağlanmıştır. Besleme çözeltisi reaktöre hızı ayarlanabilen bir pompa yardımıyla gönderilmiştir.



**Şekil 1.** Deney düzeneğinin şematik görünüşü (1: Ca-aljinat dolgulı biyoreaktör, 2: Besleme çözeltisi tankı, 3: Sabit sıcaklıktaki su sirkülatörü, 4: Besleme çözeltisinin reaktör girişi, 5 ve 6: Ürün su çıkışı, 7: Drenaj, 8: Örnek alma vanaları, 9 ve 10: Termostat suyunun reaktöre giriş ve çıkış noktaları, 11: Azot gazı girişi, 12: Gaz dağıtıcısı, 13: Reaktör tabanı).

### Mikroorganizmanın Ca-Aljinat Jelde Tutuklanması

Deiyonize suda çözülmüş *Microcystis pyrifera*’dan elde edilmiş %4 (w/v)’lük Ca-aljinat çözeltisi *Paracoccus denitrificans* kültürüyle 1/1 (v/v) oranında karıştırılmıştır. Bu aljinik asit-kültür karışımı, peristaltik pompa yardımıyla karışmakta olan  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$ ’lik  $\text{CaCl}_2$  çözeltisine damlatılmıştır. Böylece yaklaşık 3 mm çapında mikroorganizmaların tutuklandığı Ca-aljinat boncukları elde edilmiştir. Boncuklar 20 dakika süreyle  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içerisinde tutularak katılaşmaları sağlanmıştır. Daha sonra  $5 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  içeren deiyonize su ile yıkanmıştır (Hulst ve ark., 1985; Robinson ve ark., 1985; De Boer ve ark., 1995).

Reaktöre, toplamda 275 g Ca-aljinat boncuğu doldurulmuştur. Boncuklar reaktöre doldurulduktan sonra, 57 mM  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , 25 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 9.6 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 6.1 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0.6 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0.26 mM Titriplex I, 0.8 mM  $\text{MgSO}_4$ , %0.01 maya özütü ve 1.0 mL eser elementler çözeltisi içeren besiyeri ile reaktör beslenmiştir. Nitrat dönüşüm verimi %95-98’e ulaşınca kadar reaktör kesikli modda çalıştırılmış, bu değere ulaşıldıktan sonra sürekli çalışma moduna geçilmiştir. Denemeler 55 gün boyunca stabil olarak sürdürülmüştür.

Her bir örnek alma musluğundan örnekler, tek bir deneme için 48 sa’lik çalışma süresi içerisinde belirli zaman aralıklarında toplanmıştır. Çalışma süresi boyunca, her bir örnek alma musluğundan en az

10 örnek alınmıştır. Farklı zaman aralıklarında toplanan bu örneklerin nitrat derişimleri deneysel hata aralığında ( $\pm\%10$ ) değişmektedir. Dolayısıyla burada sunulan veriler, farklı zaman aralıklarında elde edilen verilerin ortalamasıdır.

### Analiz Yöntemleri

Her bir örnek alma musluğundan alınan örnekler, nitrat ve nitrit içerikleri açısından analiz edilmiştir. Nitrat ve nitrit analizleri, Shimadzu UV 160A tipi spektrometre kullanılarak yapılmıştır (Anonymous, 1985; Anonymous, 2017b).

Nitrat derişimi, standart yonteme göre, 220 nm dalga boyunda 1 M HCl ayırıcı kullanılarak ölçülmüştür. Nitrit derişimi, sülfanilamitin nitrit iyonları ile diazonyum tuzu oluşturması ve ortama 1-Naftil-etilen diamin dihidrokloritin ilavesi ile bağlanmasından sonra 543 nm'de fotometrik olarak ölçülmüştür (Anonymous, 1985; Anonymous, 2017b).

Çalışmanın amacı sadece mevcut deney düzeneğinin nitrat giderme performansını araştırmak olduğundan, toplanan örneklerde mikroorganizma ve organik madde analizi yapılmamıştır.

Toplam azot derişimi ( $\Sigma\text{NO}_x$ ) Eşitlik 2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\Sigma\text{NO}_x = (\text{N-NO}_2^-) + (\text{N-NO}_3^-) \quad (2)$$

Denitrifikasyon verimliliği (E) Eşitlik 3 kullanılarak belirlenmiştir.

$$E = [1 - (\Sigma\text{NO}_x)_{\text{ıkış}} / (\Sigma\text{NO}_x)_{\text{Giriş}}] \times 100 \quad (3)$$

Buradaki  $(\Sigma\text{NO}_x)_{\text{Giriş}}$  ve  $(\Sigma\text{NO}_x)_{\text{çıkış}}$  değerleri denitrifikasyon reaktörünün giriş ve çıkışındaki toplam oksitlenmiş azot bileşiklerini göstermektedir.

Kinetik verilerin hesaplanmasında Eşitlik 4-10 kullanılmıştır (Keskinler ve ark., 1995; La Motta ve Cascante, 1996):

$$X = [(C_{\text{Giriş}} - C_{\text{ıkış}}) / C_{\text{Giriş}}] \times 100 \quad (4)$$

$$D = F / V_T \quad (5)$$

$$D_R = F / V_R \quad (6)$$

$$L = C_{\text{Giriş}} D_t \quad (7)$$

$$P_r = D(C_{\text{Giriş}} - C_{\text{ıkış}}) Y_{P/S} \quad (8)$$

$$R = D_R (C_{\text{Giriş}} - C_{\text{çıkış}}) \quad (9)$$

$$\tau = 1 / D_t \quad (10)$$

Burada; X, dönüşüm verimini (%),  $C_{\text{Giriş}}$ , reaktör girişindeki nitrat derişimini ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $C_{\text{çıkış}}$ , reaktör çıkışındaki nitrat derişimini ( $\text{mg L}^{-1}$ ), D, dilüsyon hızını ( $\text{h}^{-1}$ ), F, besleme çözeltisi akış hızını ( $\text{mL h}^{-1}$ ),  $V_T$ , toplam hacmi (mL),  $D_R$ , gerçek dilüsyon hızını ( $\text{h}^{-1}$ ), L, nitrat yükleme hızını ( $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ),  $P_r$ , reaktör verimliliğini ( $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ),  $Y_{P/S}$ , substratın ürüne dönüşme katsayısını, R, nitrat giderme hızını ( $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) ve  $\tau$  ise reaktördeki alıkonma süresini ( $\text{h}^{-1}$ ) göstermektedir.

### Çalışma Koşulları

Karbon kaynağı olarak etil alkol, azot kaynağı olarak  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  kullanılan denemelerde sıcaklık  $30^\circ\text{C}$ ; başlangıç pH'sı 7.5 ve C/N 2.0 olarak ayarlanmış ve farklı akış hızı (85.23, 98.63, 119.52, 150.00 ve  $183.86 \text{ mL h}^{-1}$ ) ile nitrat derişimlerinin (100, 150, 200, 250 ve  $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) etkileri incelenmiştir.

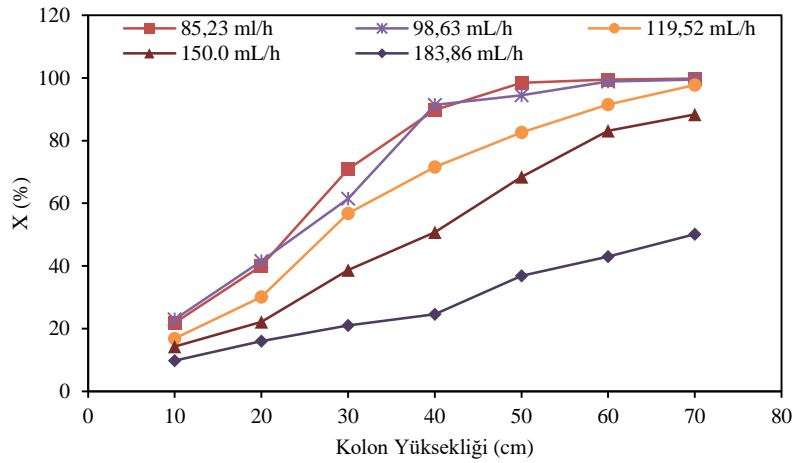
### BULGULAR VE TARTIşMA

Bu çalışmada, sabit yataklı kolon reaktörde, Ca-aljinatta tutuklanmış *Paracoccus denitrificans* hücreleri ile içme sularından nitrat giderimi üzerine, 85.23 ila  $183.86 \text{ mL h}^{-1}$  arasında değişen besleme çözeltisinin akış hızı ve  $100$  ilâ  $300 \text{ mg L}^{-1}$  arasında değişen nitrat derişiminin etkisi araştırılmıştır.

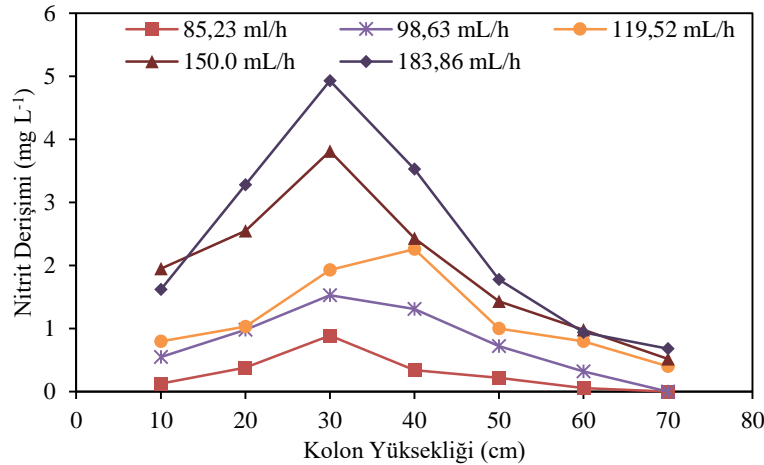
Denemeler tıpa akışlı kolon reaktörde yürütüldüğünden, nitrat ve nitrit derişimi, reaktör verimliliği, nitrat giderme hızı gibi parametreler reaktör (kolon) yüksekliğinden önemli ölçüde etkilenmektedir. Bu nedenle veriler, kolon yüksekliğine göre değerlendirilmiştir.

### Nitrat Giderimi Üzerine Besleme Çözeltisi Akış Hızının Etkisi

Şekil 2’de besleme çözeltisi akış hızının nitrat giderim verimine etkisi ve Şekil 3’te ise denitrifikasyon esnasında oluşan nitrit derişimi verilmiştir. Şekil 2 ve Şekil 3’te de görüldüğü gibi artan besleme çözeltisi akış hızına bağlı olarak denitrifikasyon verimliliği azalmaktadır. Çalışılan akış hızlarında çıkış suyu nitrat ve nitrit içerikleri, en yüksek akış hızı (183.86 mL h<sup>-1</sup>) hariç diğerlerinde, içme suları için önerilen sınır değerlerin altındadır (Anonim, 2016).



Şekil 2. Besleme çözeltisi akış hızının nitrat giderim verimine etkisi (C/N: 2.0, besleme çözeltisi nitrat içeriği: 200 mg L<sup>-1</sup>, karbon kaynağı: etanol)



Şekil 3. Besleme çözeltisi akış hızının nitrit birikimine etkisi (Besleme çözeltisi nitrat içeriği: 200 mg L<sup>-1</sup>, C/N: 2.0, karbon kaynağı: etanol)

Çizelge 1’de 70 cm’lik kolon yüksekliğinde, farklı besleme çözeltisi akış hızının etkisine ait kinetik veriler yer almaktadır. Çizelgeden de görüldüğü gibi, en yüksek nitrat giderim hızı, 150.0 mL h<sup>-1</sup>’lik akış hızında, 353.52 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> ve reaktör verimliliği ise, 31.53 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> olarak ölçülmüştür. Bu değer için hidrolik alıkonma süresi 30 dk ve D<sub>r</sub> değeri 2.0 h<sup>-1</sup>’dir.

Biyofilm sistemlerinin verimini etkileyen parametreler; partikül büyüklüğü, destek materyalinin porozitesi, biyofilm kalınlığı ve substratın biyofilm içerisine difüzyonu olarak bilinmektedir (Wilderer, 1995; Zhang ve Bishop, 1994; Stewart, 2003). Besleme çözeltisi akış hızı, substratın biyofilm içerisine difüzyonunu dolayısıyla organizmanın metabolizma hızını etkilediğinden nitrat giderme verimi ile doğrudan ilişkilidir. Farklı türler ve farklı reaktör tipleri ile yapılan çalışmalar sonucunda da yüksek akış

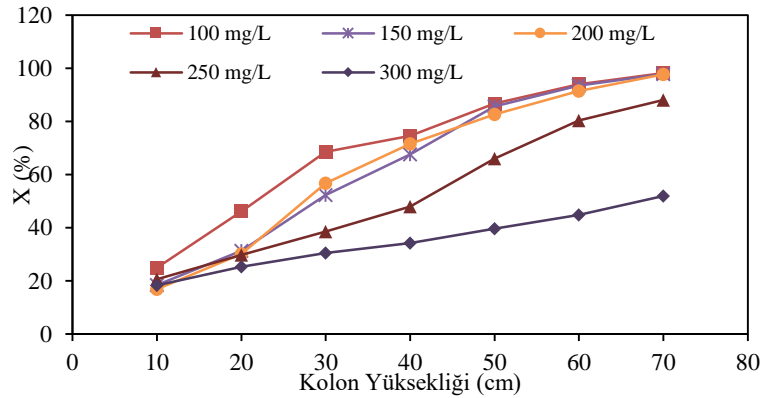
hızı uygulamalarının nitrat giderim veriminde düşümlere yol açtığı bulunmuştur. Daha yüksek akış hızlarında nitrat giderim veriminin azalmasının nedenleri arasında bakterilerin, hücre dışı enzimlerin ve çözümlü substratın yıkanması sayılabilir (Claus ve Kutzner, 1985a; Claus ve Kutzner, 1985b; Kargı, 1993; Wijffels ve ark., 1995; Xu ve ark., 2009; Ashok ve Hait, 2015; Wang ve Chu, 2016). Bunun sonucu olarak çıkış suyundaki organik madde derişimi artmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar alan-yazın ile uyumludur.

**Çizelge 1.** Farklı besleme çözültisi akış hızlarına ait (70 cm kolon yüksekliğinde) kinetik veriler

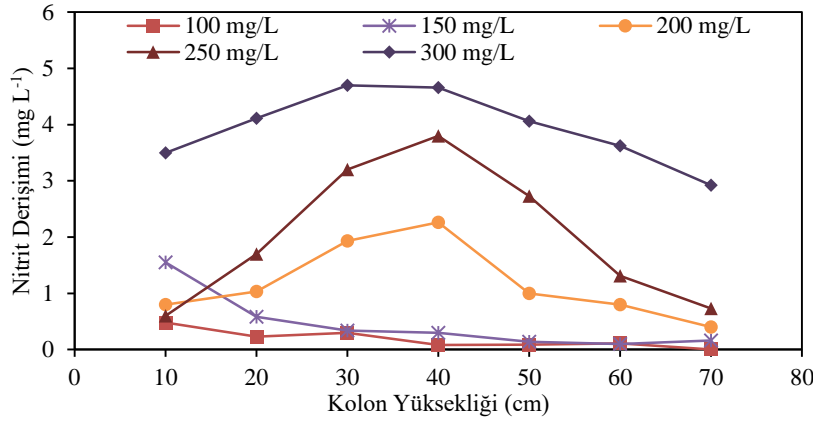
F (mL h <sup>-1</sup> )	85.23	98.63	119.52	150.00	183.86
C <sub>Giriş</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	200	200	200	200	200
X (%)	99.82	99.51	97.75	88.38	50.17
D (h <sup>-1</sup> )	0.23	0.26	0.32	0.40	0.49
D <sub>R</sub> (h <sup>-1</sup> )	1.14	1.31	1.59	2.0	2.45
R (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	227.59	260.71	310.85	353.52	245.83
P <sub>r</sub> (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	20.48	23.08	27.9	31.53	21.93
L (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	228	262	318	400	490
τ (dk)	52.8	45.62	37.65	30	24.47
NO <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	0	0	0.4	0.52	0.68

#### Nitrat Giderimi Üzerine Besleme Çözültisi Nitrat Derişiminin Etkisi

Farklı başlangıç nitrat derişim oranlarının nitrat giderimi üzerine etkisi incelenirken besleme çözültisinin başlangıç nitrat derişimi 100, 150, 200, 250 ve 300 mg L<sup>-1</sup> olarak değiştirilmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4 ve Şekil 5'te verilmiştir. Şekil 4'te de görüldüğü gibi başlangıç nitrat derişimi 200 mg L<sup>-1</sup>'ye kadarki derişimlerde %95'in üzerinde verim elde edilmiştir. Çalışılan en yüksek nitrat derişiminde nitrat giderim verimi %51'e düşmüştür. Denitrifikasyon esnasında oluşan nitrit oluşum hızı, başlangıç nitrat derişimi artıka artmaktadır (Şekil 5). Dolayısıyla yüksek başlangıç nitrat derişimi hem nitratın, hem de nitritin eksik redüksiyonuna neden olmaktadır.



**Şekil 4.** Besleme çözültisi nitrat içeriğinin, nitrat giderme verimine etkisi (C/N= 2.0, akış hızı: 119.52 mL h<sup>-1</sup>, karbon kaynağı: etanol)



Şekil 5. Besleme çözeltisi nitrat içeriğinin nitrit derişimine etkisi (C/N: 2.0, akış hızı: 119.52 mL h<sup>-1</sup>, karbon kaynağı: etanol)

Çizelge 2’de 70 cm’lik kolon yüksekliğinde farklı başlangıç nitrat derişiminin etkilerine ait kinetik veriler yer almaktadır. Çizelgeden görülebileceği üzere 397.5 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>’lik yükleme hızına kadar, yükleme hızı artııkça reaktör verimliliğinin arttığı ancak bu değerden sonra reaktör verimliliğinde önemli bir azalma görülmüştür. Çalışmada en yüksek nitrat giderim hızı değeri 397.5 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>’lik yükleme hızında, 342.06 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> ve reaktör verimliliği ise 30.7 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> olarak ölçülmüştür. Bu değer için hidrolik alıkonma süresi 37.8 dk ve D<sub>r</sub> değeri ise 1.59 h<sup>-1</sup>’dir.

Çizelge 2. Çıkış suyundaki farklı besleme çözeltisi nitrat derişimine ait kinetik veriler

C <sub>Giriş</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	100	150	200	250	300
F (mL h <sup>-1</sup> )	119.52	119.52	119.52	119.52	119.52
X (%)	98.21	97.91	97.75	88.05	51.89
D (h <sup>-1</sup> )	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
D <sub>R</sub> (h <sup>-1</sup> )	1.59	1.59	1.59	1.59	1.59
R (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	156.17	230.39	310.85	342.06	247.52
P <sub>r</sub> (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	14.02	20.68	27.9	30.7	22.22
L (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	159	238.5	318	397.5	477
τ (dk)	37.8	37.8	37.8	37.8	37.8
NO <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	0.0	0.16	0.4	0.73	2.92

Yüksek nitrat derişimlerinde, denitrifikasyon veriminde azalmalar sabit yataklı reaktörlerin kullanıldığı benzer araştırma sonuçlarında da görülmektedir (Claus ve Kutzner, 1985a; Claus ve Kutzner, 1985b; Chang ve ark., 1999; Karanasios ve ark., 2010;). Biyofilm reaktörlerinin en önemli avantajları şok yüklemelere karşı dayanıklı oluşlarıdır (Mol ve ark., 1993; Yang ve ark., 1994; Nuhoglu ve ark., 2002; Wang ve ark., 2013). Ancak yine de yüksek NO<sub>3</sub> yüklemelerinde redüksiyonun son basamaklara kadar yürütülemediği ve nitrit birikimine yol açtığı belirtilmektedir (Claus ve Kutzner, 1985a; Claus ve Kutzner, 1985b; Almeida ve ark., 1995; Glass ve Silverstein, 1998). Aynı durum bizim çalışmamız için de geçerlidir.

Metabolize edilecek bir substratın kullanımı ya difüzyon ya da metabolizma ile sınırlıdır. İkinci durumda metabolizma için gerekenden daha fazla substrat mevcuttur ve bu substratın çok az bir kısmı kullanılabilir. Sonuçta yüksek substrat içeriği, ozmotik basınç veya benzeri fizyolojik mekanizmalar yoluyla inhibisyona neden olur. Araştırmamızda yüksek derişimdeki nitrat yüklemelerinde görülen verimdeki azalma böyle bir nedene bağlı olabilir (Claus ve Kutzner, 1985a; Claus ve Kutzner, 1985b; Wilderer, 1995; Pekdemir ve ark., 1998).

Biyofilm sistemlerin dezavantajlarından biri çıkış suyuna hücre kaçağı olabilmektedir (Bülbül ve Aksu, 1997). Yapılan çalışmada çıkış suyunda 3.2x10<sup>2</sup> CFU/mL hücre bulunduğu belirlenmiştir.



## SONUÇ

Bu araştırmada, sabit yataklı kolon reaktörde, Ca-aljinatta tutuklanmış *Paracoccus denitrificans* hücreleri ile içme sularından nitrat giderimi üzerine, besleme çözeltisi akış hızı ve nitrat derişiminin etkisi araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen temel sonuçlar aşağıdaki gibidir:

- Artan besleme çözeltisi akış hızına bağlı olarak denitrifikasyon verimliliği azalmaktadır. 150 mL h<sup>-1</sup>'lik akış hızına kadar çıkış suyundaki nitrat derişiminin izin verilen standartların altında olduğu belirlenmiştir.
- Maksimum reaktör verimliliği, yine aynı akış hızında 353.52 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> ve reaktör verimliliği ise 31.53 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir.
- Başlangıç nitrat derişimi 200 mg L<sup>-1</sup>'ye kadar ki derişimlerde %95'in üzerinde nitrat giderimi sağlanmıştır.
- Başlangıç nitrat derişimi artıkça denitrifikasyon ara ürünü olan nitrit birikimide artmaktadır. Yüksek başlangıç nitrat derişimi hem nitratın hem de nitritin tam olarak indirgenememesine yol açmaktadır.
- 397.5 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>'lik yükleme hızına kadar, çıkış suyundaki nitrat derişimi standartların altında bulunmuştur. Bu değer için maksimum nitrat giderme hızı ve reaktör verimliliği sırasıyla 342.06 ve 30.70 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> olarak elde edilmiştir.
- Hücre kaçaklarının giderilmesi için tasfiye sonrası herhangi bir dezenfeksiyon işleminin uygulanması gereklidir.
- İçme suyundan nitrat giderimi çalışmalarında, Ca-aljinatın tutuklama malzemesi olarak kullanılmasının uygun olduğu görülmüştür.

## TEŞEKKÜR

Burada sunulan veriler, yazarın "Sabit Yataklı Reaktörlerde Mikrobiyal Nitrat Giderimi ve Kinetiği" başlıklı doktora tezinden üretilmiştir.

Doktora çalışmasının planlanması ve yürütülmesinde büyük desteklerini gördüğüm Danışmanım Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR'u rahmetle anar, Eş Danışmanım Prof. Dr. Bülent KESKİNLER'e yardımlarından dolayı içtenlikle teşekkür ederim.

## Çıkar Çatışması

Makalenin planlanması, yürütülmesi ve yazılması sırasında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederim.

## Yazar Katkısı

Makalenin planlanmasının, yürütülmesinin ve yazılmasının makalenin tek yazarı olarak tarafımdan yapıldığını beyan ederim.

## KAYNAKLAR

- Almeida JS, Reis MA, Carrondo MJ, 1995. Competition Between Nitrate and Nitrite Reduction in Denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnology and Bioengineering*, 46 (5): 476-484.
- Anonim, 2016, TSE, Türk İçme Suyu Standartları, TS-266. Ankara.
- Anonymous, 1985, Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. (16th ed.) Washington, DC, pp. 391-406.
- Anonymous, 2016. Nitrate And Nitrite In Drinking-Water., World Health Organization, Geneva-Switzerland.

- Anonymous, 2017a. Guidelines For Drinking-Water Quality: Fourth Edition Incorporating The First Addendum, World Health Organization, Geneva.
- Anonymous, 2017b. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, (23rd ed.), Method 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> B. American Public Health Association, Washington, DC.
- Anonymous, 2018. 2018 Edition Of The Drinking Water Standards And Health Advisories Tables. Office of Water United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Ashok V, Hait S, 2015. Remediation of Nitrate-Contaminated Water by Solid-Phase Denitrification Process-A Review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22:8075-8093.
- Bucco S, Padoin N, Netto WS, Soares HM, 2014. Drinking Water Decontamination by Biological Denitrification Using Fresh Bamboo as İnoculum Source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37:2009-2017.
- Burghate SP, Ingole NW, 2014. Biological Denitrification-A Review. *Journal of Environmental Science, Computer Science and Engineering & Technology*. 3 (1): 009-028.
- Bülbül G, Aksu Z, 1997. Atıksulardaki Fenol Kirliliğinin Serbest ve Ca-Alginat'a Tutuklanmış P. Putida İle Giderilmesinin Kesikli ve Karıştırmalı Tepkime Kabında Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 21 (3): 175-181.
- Chang CC, Tseng SK, Huang HK, 1999. Hydrogenotrophic Denitrification with İmmobilized *Alcaligenes eutrophus* for Drinking Water Treatment. *Bioresource Technology*, 69: 53-58.
- Chen KC, Huang CT, 1988. Effects of The Growth of *Trichosporon cutaneum* in Calcium Alginate Gel Beads Upon Bead Structure and Oxygen Transfer Characteristics. *Enzyme and Microbial Technology*, 10 (5): 284-292.
- Chen KC, Lin YF, 1993. The Relationship Between Denitrifying Bacteria and Methanogenic Bacteria in A Mixed Culture System of Acclimated Sludge. *Water Research*, 27 (12): 1749-1759.
- Chibata I, Tosa T, Sato T, 1986. Methods of Cell Immobilization. In: Demain AL, Solomon NA Editors, *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, pp. 217-229, Washington DC-USA
- Claus G, Kutzner HJ, 1985a. Physiology and Kinetics of Autotrophic Denitrification by *Thiobacillus denitrificans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22: 283-288.
- Claus G, Kutzner HJ, 1985b. Autotrophic Denitrification by *Thiobacillus denitrificans* in a Packed Bed Reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22: 289-296.
- Conley DJ, Paerl HW, Howarth RW, Boesch DF, Seitzinger SP, Havens KE, Lancelot C, Likens GE, 2009. Controlling Eutrophication: Nitrogen and Phosphorus, *Science* 323 (5917): 1014-1015.
- Crespi M, Ramazzoth V, 1991. Evidence That N-Nitroso Compounds Contribute to The Causation of Certain Human Cancers. In: Bogardi I, Kuzelka RD Editors. *Nitrat Contamination: Exposure, Consequence and Control*, North Atlantic Treaty Organization ASI Series, Vol. G:30, pp. 233-252. Berlin-Germany.
- Dahab MF, 1991. Nitrate Treatment Methods: An Overwiev. In: Bogardi I, Kuzelka RD Editors. *Nitrat Contamination: Exposure, Consequence and Control*, North Atlantic Treaty Organization ASI Series, G:30, pp. 449-468, Berlin-Germany.
- De Boer W, Klein Gunnewiek PA, Laanbroek HJ, 1995. Ammonium Oxidation at Low pH By A Chemolithotrophic Bacterium Belonging to The Genus *Nitrosospira*. *Soil Biology and Biochemistry*, 27 (2): 127-132.
- Demircioğlu N, 1996. Sulu Ortamlarda Sıvı Membran Teknolojisiyle Nitrat ve Nitrit İyonlarının Çift Yönlü Taşınım Kinetiği. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi (Basılmış).
- Dorias B, Bauman P, 1994. Denitrification in Trickling Filters. *Water Science and Technology*, 30 (6): 181-184.

- Dourson M, Stern B, Griffin S, Bailey K, 1991. Impact of Risk-Related Concerns on U.S. Environmental Protection Agency Programs. Nitrat Contamination Exposure, Consequence and Control. In: Bogardi I, Kuzelka RD Editors. Nitrat Contamination: Exposure, Consequence and Control, North Atlantic Treaty Organization ASI Series, G:30, pp. 477-487, Berlin-Germany.
- Erkekoğlu P, Baydar T, 2010. Nitrite, a Hidden Foe in Food: Evaluation of Nitrite in Toxicological Perspective. Gazi University Journal of Science, 23 (3): 261-270.
- Gayle BP, Boardman GD, Sherrard JH, Benoit RE, 1989. Biological Denitrification of Water. Journal of Environmental Engineering, 115 (5): 930-943.
- Glass C, Silverstein J, 1998. Denitrification Kinetics of High Nitrate Concentration Water: pH Effect on Inhibition and Nitrite Accumulation. Water Research, 32 (3): 831-839.
- Hiscock KM, Lloyd JM, Lerner DN, 1991. Review of Natural and Artificial Denitrification of Groundwater. Water Research, 25 (9): 1099-1111.
- Hu M, Zheng G, Zhao D, Yu W, 2020. Characterization of The Structure and Diffusion Behavior of Calcium Alginate Gel Beads. Journal of Applied Polymer Science, 137 (31):1-9.
- Hulst AC, Tramper J, Van't Riet K, Westerbeek JMM, 1985, A New Technique for Immobilized Biocatalyst in Large Quantities. Biotechnology and Bioengineering, 27 (6): 870-876
- Kapoor A, Viraraghavan T, 1997. Nitrate Removal From Drinking Water-Review. Journal of Environmental Engineering, 123 (4): 371-380.
- Karanasios KA, Vasiliadou IA, Pavlou S, Vayenas DV, 2010. Hydrogenotrophic Denitrification of Potable Water: A Review. Journal of Hazardous Materials 180 (1):20-37.
- Kargı F, 1993. Çevre Mühendisliğinde Biyoprosesler. Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Basım Ünitesi, s.217-223, İzmir-Türkiye.
- Keskinler B, Çakıcı A, Algur ÖF, 1995. Endüstriyel Atıksulardan Fe<sup>2+</sup>'nin Biyoteknolojik Arıtımı. Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences, 19 (4): 311-317.
- Kitamikado M, Tseng CH, Yamaguchi K, Nakamura T, 1992. Two Types of Bacterial Alginate Lyases. Applied and Environmental Microbiology, 58 (8): 2474-2478.
- Knowles R, 1982. Denitrification. Microbial Review, 46 (1): 43-70.
- Kocataş A, 1996. Ekoloji- Çevre Biyolojisi. Ege Üniversitesi Basımevi (3. Baskı), s.322-330, İzmir-Türkiye.
- La Motta EJ, Cascante P, 1996. Substrate Consumption Kinetics in Anaerobic Biofilm Fluidized Reactor. Journal of Environmental Engineering, 122 (3): 198-203.
- Lee HG, Choi MW, Wang SH, Park TJ, Kim CW, 2001. Applicability of Fixed Bed Biofilm Reactor for Nitrogen Removal From Sewage With High Nitrogen Contents. Environmental Engineering Research, 6 (2): 55-61.
- Lewandowski Z, Bakke R, Characklis WG, 1987. Nitrification and Autotrophic Denitrification in Calcium Alginate Beads. Water Science and Technology, 19 (1-2): 175-182.
- Liu SX, Hermanowicz SW, Peng M, 2003. Nitrate Removal From Drinking Water Through The Use of Encapsulated Microorganisms in Alginate Beads. Environmental Technology, 24 (9): 1129-1134.
- Mateju V, Cizinska S, Krejci J, Jonach T, 1992. Biological Water Denitrification: A Review. Enzyme and Microbial Technology, 14 (3): 170-183.
- McCleaf PR, Schroeder ED, 1995. Denitrification Using a Membrane Immobilized Biofilm. Journal of American Water Works Association, 87 (3): 77-86.
- Mol N, Kut OM, Dunn IJ, 1993. Adsorption of Toxic Shocks on Carriers in Anaerobic Biofilm Fluidized Bed Reactors. Water Science and Technology, 28 (2): 55-65.

- Muslu Y, 1990. Kullanılmış Suların Tasfiyesi. Cilt 1, İstanbul Teknik Üniversitesi İnşaat Fakültesi Matbaası (2. Baskı), s.318-337, İstanbul-Türkiye.
- Nuhoğlu A, 1996. Çapraz Akışlı Membran Biyoreaktörde Denitrifikasyon Prosesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (Basılmış).
- Nuhoğlu A, Pekdemir T, Yıldız E, Keskinler B, Akay G, 2002. Drinking Water Denitrification by Membrane Bioreactor. *Water Research*, 36: 1155-1166.
- Orhon D, Sözen S, Ubayo E, 1994. Assessment of Nitrification - Denitrification Potential of Istanbul Domestic Waste Water. *Water Science and Technology*, 30 (6): 21-30.
- Ovez B, Mergaert J, Sağlam M, 2006. Biological Denitrification in Drinking Water Treatment Using The Seaweed *Gracilaria verrucosa* as Carbon Source And Biofilm Carrier. *Water Environment Research*, 78 (4): 430-434.
- Pekdemir T, Kuru-Kaçmazoğlu E, Keskinler B, Algur ÖF, 1998. Drinking Water Denitrification in a Fixed Bed Packed Biofilm Reactor. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 22 (1): 39-45
- Rahimi S, Modin O, Mijakovic I, 2020. Technologies For Biological Removal and Recovery of Nitrogen From Wastewater. *Biotechnology Advances*, 43 (2020) 107570: 1-25.
- Robinson PK, Dainty AL, Goulding KH, Simpkins I, Trevan MD, 1985. Physiology of Alginate-Immobilized *Chlorella*. *Enzyme and Microbial Technology*, 7: 212-216.
- Rogalla F, De Larminat G, Couttelle J, Godart H, 1991. Experience with Nitrate-Removal Methods From Drinking Water. In: Bogardi I, Kuzelka RD Editors. Nitrat Contamination: Exposure, Consequence and Control, North Atlantic Treaty Organization ASI Series, Vol. G:30, pp. 367-383. Berlin-Germany.
- Sadler R, Maetam B, Edokpolo B, Connell D, Yu J, Stewart D, Park MJ, Gray D, Laksono B, 2016. Health Risk Assessment for Exposure to Nitrate in Drinking Water From Village Wells in Semarang, Indonesia. *Environment Pollution*, 216 (2016):738-745.
- Schroeder A, Souza DH, Fernandes M, Rodrigues EB, Trevisan V, Skoronski E, 2020. Application of Glycerol as Carbon Source for Continuous Drinking Water Denitrification Using Microorganism From Natural Biomass. *Journal of Environmental Management*, 256 (2020): 1-8.
- Shams DF, Rubio A, Elefsiniotis P, Singhal N, 2016. Post-Denitrification Using Alginate Beads Containing Organic Carbon and Activated Sludge Microorganisms. *Water Science and Technology*, 74 (7): 1626-1635.
- Shrimali M, Singh KP, 2001. New Methods of Nitrate Removal From Water. *Environmental Pollution* 112 (2001):351-359.
- Stewart PS, 2003. Diffusion in Biofilm. *Journal of Bacteriology*, 185 (5): 1485-1491. DOI: 10.1128/JB.185.5.1485-1491.
- Uslu O ve Türkmen A, 1987. Su Kirliliği ve Kontrolü. T. C. Başbakanlık Çevre Genel Müdürlüğü Yayınları Eğitim Dizisi, s. 151, Ankara-Türkiye.
- Van Der Hoek JP, Kappelhof JWNM, Hijnen WAM, 1992. Biological Nitrate Removal From Groundwater by Sulphur/Limestone Denitrification. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 54 (2): 197-200.
- Van Der Hoek JP, Van Der Ven PJM, Klapwijk A, 1988. Combined Ion Exchange/Biological Denitrification for Nitrate Removal From Ground Water Under Different Process Conditions. *Water Research*, 22 (6): 679-684.
- Van Rijn J, Tal Y, Schreier HJ, 2006. Denitrification in Recirculating Systems: Theory and applications. *Aquacultural Engineering*, 34 (3): 364-376.

- Van Spanning RJM, Wansel C, Harms N, Oltmann LF, Stouthamer AH, 1990. Mutagenesis of Gene Encoding Cytochrome c550 of *Paracoccus denitrificans* and Analysis of The Resultant Physiological Effects. *Journal of Bacteriology*, 172 (2): 987-996.
- Wakao N, Endo K, Mino K, Sakurai Y, Shiota H, 1994. Immobilization of *Thiobacillus ferrooxidans* Using Various Polymers as Matrix. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 40: 349-358
- Wang J, Chu L, 2016. Biological Nitrate Removal From Water and Wastewater by Solid-Phase Denitrification Process. *Biotechnology Advances*, 34: 1103-1112.
- Wang R, Feng Q, Liao T, Zheng X, Butterbach-Bahl K, Zhang W, Jin C, 2013. Effects of Nitrate Concentration on The Denitrification Potential of a Calcic Cambisol and Its Fractions of N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O and NO. *Plant Soil*, 363: 175-189.
- Wijffels RH, Hunik JH, Leenen EJTM, Günther A, Obon de Castro JM, Tramper J, Englund G, Bakketun A, 1995. Effects of Diffusion Limitation on Immobilized Nitrifying Microorganisms at Low Temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, 45:1-5
- Wilderer PA, 1995. Technology of Membrane Biofilm Reactors Operated Under Periodically Changing Process Conditions. *Water Science and Technology*, 31 (1): 173-183.
- Xu Y, Qiu TL, Han ML, Li J, Wang XM, 2011. Heterotrophic Denitrification of Nitrate-Contaminated Water Using Different Solid Carbon Sources. *Procedia Environmental Sciences*, 10 (1): 72-77.
- Xu ZX, Shao L, Yin HL, Chu HQ, Yao YJ, 2009. Biological Denitrification Using Cornobs as a Carbon Source and Biofilm Carrier. *Water Environment Research*, 81 (3): 242-247.
- Yang PY, Ma T, See TS, Nitisaravut N, 1994. Applying Entrapped Mixed Microbial Cell Techniques for Biological Wastewater Treatment. *Water Science and Technology*, 29 (10-11): 487-495.
- Zhang H, Zhao Z, Chen S, Kang P, Wang Y, Feng J, Jia J, Yan M, Wang Y, Xu L, 2018. *Paracoccus versutus* KS293 Adaptation to Aerobic and Anaerobic Denitrification: Insights From Nitrogen Removal, Functional Gene Abundance, and Proteomic Profiling Analysis. *Bioresource Technology*, 260:321-328.
- Zhang TC, Bishop PL, 1994. Experimental Determination of The Dissolved Oxygen Boundary Layer And Mass Transfer Resistance Near The Fluid-Biofilm Interface. *Water Science and Technology*, 30 (11): 47-58.
- Zhu, SM, Deng YL, Ruan YJ, Guo XS, Shi MM, Shen JZ, 2015. Biological Denitrification Using Poly(Butylene Succinate) as Carbon Source and Biofilm Carrier for Recirculating Aquaculture System Effluent Treatment. *Bioresource Technology*, 192: 603-610.