

Biyolojik aşırı fosfor gideren aerobik granüler biyokütlenin mikrobiyolojik özellikleri

Ebru DÜLEKGÜRGEN*, Nazik ARTAN

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

Özet

Tam-ölçekli konvansiyonel bir biyolojik arıtma tesisinden alınan floküler biyokütle ile başlatılan laboratuvar-ölçekli ardışık kesikli reaktörde, anaerobik/aerobik işletme ve fosfor ile besleme sonucu biyolojik aşırı fosfor giderimi (BAFG) elde edilmiştir. Çökeltme süresinin kısaltılması (15 dak), ilk hacmin düşürülmesi (V_0 1.8 L), hacimsel karbon yüklemesinin yükseltilmesi (1.41 kg KOI/m³.gün) ve havalandırma kaynaklı kesme kuvvetinin artırılması (0.19 cm/s) ile, fosfor depolayan organizmalar (PAO) gibi yavaş-büyüyen organizmaların varlığı ile iyileşeceği öngörülen aerobik granülasyon süreci desteklenmiştir. Üstün çökeltme özelliklerine (ÇHI < 40-50 mL/g) sahip aerobik granüler BAFG biyokütlesi ile kararlı halde %92 karbon, %99 fosfor ve %78 azot giderimi elde edilmiştir. Sistemin biyokimyasal performansının izlenmesine paralel olarak, aerobik granüler BAFG biyokütlesinin mikrobiyolojik değerlendirmesi için morfolojik ve ekofizyolojik incelemeler gerçekleştirilmiştir. Hücre-içi poli-P (poli-fosfor) ve PHB (poli-hidroksi-bütirat) depolarının görsel tespiti için uygulanan Neisser ve Sudan Black B boyamaları sonucu, biyokütlenin morfolojik ve ekofizyolojik açılardan çeşitlilik gösterdiği saptanmıştır. Sistemde baskın tür, tanımlanmış morfolojileri ve ekofizyolojileri ile çubuksu PAO'lardır. Bunların yanı sıra, morfolojik olarak glikojen depolayan organizmalara (GAO) benzeyen ancak ekofizyolojik özellikler açısından GAO-fenotipine uymayan tetrad/sarcina-benzeri hücreler (TFO) belirlenmiştir. Ayrıca, diplo-kokkoidlere, yoğun kokoid topluluklara, az miktarda filamentlere ve çeşitli protozoalara rastlanmıştır. Mikroskopik gözlemler niteliksel olmakla birlikte, sistemin biyokimyasal dönüşüm süreçleri bağlamındaki niceliksel performansı ile örtüşmektedir. Burada mikrobiyolojik özellikleri özetlenen aerobik granüler BAFG biyokütlesinin, mühendislik uygulamaları bağlamındaki üstün özellikleri nedeniyle, bu uygulamanın biyolojik atıksu arıtımında yeni ve gelecek vaadeden bir seçenek olacağı öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Biyolojik aşırı fosfor giderimi, aerobik granüler biyokütle, morfoloji, ekofizyoloji.*

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Ebru DÜLEKGÜRGEN. edulekgurgen@ins.itu.edu.tr; Tel: (212) 285 65 40.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Programı kapsamında tamamlanmış olan "Hydraulic- and/or metabolic-selection pressures influenced aerobic granulation and its application in Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR)" başlıklı doktora tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 06.09.2006 tarihinde dergiye ulaşılmış, 19.10.2006 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 31.03.2007 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

Microbiological features of aerobic granular EBPR biomass

Extended abstract

A lab-scale sequencing batch reactor (SBR) was inoculated with a floccular biomass obtained from a conventional full-scale biological wastewater treatment plant. Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR) was obtained through application of a sequential anaerobic/aerobic operational mode together with the metabolic selection strategies of anaerobic feeding (with acetate as sole C-source) and supply of phosphate. The first strategy was applied to maintain absolute elimination of the feast period, where direct and fast growth on acetate was possible together with simultaneous C-storage; the former promoting growth and dominance of fast-growers having a negative impact on aerobic granulation. The merit of the anaerobic-feeding strategy was the possibility of directing the entire flux of externally available C-source to anaerobic C-storage mechanism, thus selecting the micro-organisms with the metabolic capability of taking up the acetate under anaerobic conditions, converting it to intracellular C-storage products (i.e., PHB: poly-hydroxybutyrate), and then growing slowly on these storage materials at the aerobic phase; the metabolic processes described for the PAO (Phosphate Accumulating Organisms) and GAO (Glycogen Accumulating Organisms) phenotypes. The second strategy was applied to promote dominance of the PAOs in the system.

Aerobic granulation process, suggested to be enhanced by the presence and dominance of slowly-growing microorganisms (like PAOs), was supported via lowering operationally determined settling time and initial reactor volume (T_S decreased from 30 to 15 min and V_0 decreased from 2.9 to 1.8 L), increasing volumetric COD load (from 0.24 to 1.41 kg/m³.d), and slightly increasing the shear rate due to aeration ($v_{S,air}$ increased from 0.14 to 0.19 cm/s). Monitoring the long-term steady state system performance in terms of biochemical conversion processes indicated that it was possible to secure high carbon, nitrogen and phosphorus removal efficiencies (92% COD removal, 99% EBPR, 78% overall N-removal) with the aerobic granular biomass upholding superior settling properties (SVI < 40-50 mL/g).

Parallel to the evaluations with regard to biochemical system performance, morphological and eco-

physiological examinations via conventional microscopy and chemical staining techniques were also executed to determine the microbiological features of the aerobic granular EBPR biomass, and to help confirm and interpret system performance with respect to presence of different microbial groups. Application of Neisser's and Sudan Black B stains to the biomass samples for visualization of intracellular volutin poly-P (poly-phosphate) granules and lipophilic PHB inclusions, respectively, revealed a microbial community rich in terms of morphological and eco-physiological traits. The dominant phenotype in the system was the PAOs with their conventional rod-shaped morphology and typical EBPR-physiology of being strongly poly-P(-) and strongly PHB(+) at the end of anaerobic phase, whereas being mostly poly-P(+) and partly PHB(-) at the end of the aerobic-period. In addition to the PAOs, tetrad/sarcina-like cells resembling the GAOs in terms of morphological features were also of significance. However, phenotypic properties of these microorganisms were not in line with those of the GAO-phenotype. Thus, the tetrad/sarcina-like cells, which were PHB(-) both at the end of the anaerobic- and aerobic-phases, were named as "TFOs" (Tetrad Forming organisms), a term for morphological differentiation, rather than "GAOs", a term related with functional properties. The PAOs and the TFOs co-existed with some other morphotypes like diplococci-shaped cells, staphylococci-like clustered populations, and a few filaments with an abundance of 0-1 in accordance with subjective-scoring. Presence of some fixed protozoa like *Vorticella campanula* and *Carchesium* spp., typical for activated sludge systems, was also recorded. Despite the microscopic observations were qualitative, they correlated well with the quantitative biochemical performance data.

Finally and from an engineering stand-point, operational flexibility of the SBR configuration, superior settling properties of granular biomass thus possibility of working with smaller reaction volumes or with shorter reaction times, and possibility of decreasing aeration related costs due to presence of an anaerobic phase, together demarcate the Aerobic Granular EBPR Technology as a promising biological wastewater treatment alternative enabling to decrease capital and operational costs while securing desired removal efficiencies.

Keywords: Enhanced Biological Phosphorus Removal, aerobic granular biomass, morphology, eco-physiology.

Giriş

Gerçekleştirilen pek çok çalışma sayesinde Biyolojik Aşırı Fosfor Giderimi (BAFG)'nin mikrobiyolojik ve biyokimyasal temellerinin çoğu belirlenmiştir. Ancak BAFG'ı tanımlayan biyokimyasal dönüşüm süreçlerinin hücre-içi depo maddelerinin mikrobiyal çevrimlerine dayalı olması, değerlendirmeleri zorlaştırmaktadır. Bu karmaşık yapı, BAFG sistemlerinde bulunan farklı mikrobiyal topluluklar arasındaki ilişkilerin (örneğin karbon kaynağı ya da elektron alıcısı için yarışma) ve bu ilişkilerin BAFG performansı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi konusunda da öne çıkmakta, dolayısıyla mikrobiyolojik ve biyokimyasal çalışmaların sürdürülmesini zorunlu kılmaktadır (Mino vd., 1998; Crocetti vd., 2000).

İleri moleküler teknikler, BAFG sistemlerindeki mikroorganizmaların filogenetik kimliklerinin kesin olarak belirlenmesini olanaklı kılmakta ve BAFG performansına katkıda bulunan mikroorganizmaların saptanmasına yardımcı olmaktadır. Örneğin, Crocetti ve arkadaşları (2000) tarafından gerçekleştirilen ve ileri moleküler tekniklerin uygulandığı çalışma ile fosfor-depolayan organizma (PAO) adayları olarak, filogenetik açıdan birbirine ve *Rhodocyclus spp.*'ye yakın üç bakteriyel grup, "*Candidatus Accumulibacter phosphatis*" filogenetik kimliği altında toplanmış ve bunlara yönelik geliştirilen oligonükleotid problemler sayesinde, BAFG sistemlerindeki bazı PAO adaylarının varlıklarının ve miktarlarının belirlenmesi olanaklı hale gelmiştir.

Ancak mikroorganizmaların fosfor ya da glikojen-depolayan organizmalar (sırasıyla PAO ve GAO) olarak sınıflandırılması, filogenetik kategorizasyondan çok fonksiyonel bir sınıflandırmadır. Bu bağlamda, fenotipik kimlik büyük önem taşımaktadır. Dolayısıyla, BAFG sistemlerinin doğru ve tam olarak değerlendirilebilmesi için mikrobiyal kimlik ve çeşitliliğin saptanması amacıyla ileri moleküler tekniklerin kullanılacağı çalışmaların yanısıra, morfolojik ve ekofizyolojik özelliklerin belirlenmesine yönelik konvansiyonel mikrobiyolojik çalışmalar ve sistem performansının saptanmasına yönelik

biyokimyasal çalışmalar eş zamanlı olarak yürütülmeli, elde edilen bulgular birbiriyle ilişkilendirilebilmelidir.

Yüksek arıtma performansının yanısıra, sistemdeki biyokütlenin çökeltme özelliğinin iyi olması, böylece biyokütlenin arıtılmış sudan kabul edilebilir bir süre içerisinde ayrılarak sistemden uzaklaştırılabilmesi, genel sistem performansı açısından son derece önemlidir. Çökeltme kapasitesi, mühendislik uygulamaları açısından biyokütlenin bekletildiği hacimleri ya da bekletme sürelerini belirlemede, başka bir deyişle arıtma tesislerinin ilk yatırım ve işletme giderlerini doğrudan etkilemektedir. Bu bağlamda, üstün çökeltme özelliklerine sahip olan ve sistemde yoğun halde ve yüksek miktarda biyokütle tutulmasını sağlayarak yüksek kirletici yüklerinde çalışabilmeyi olanaklı kılan anaerobik granüler biyokütle ile arıtma, 1970'lerin sonlarından itibaren tüm dünyada pek çok tam ölçekli arıtma tesisinde uygulanmaktadır. (Tay vd., 2004). Son on yıl içerisinde de aerobik ya da anoksik/aerobik işletilen ve karbon ve/veya azot gideren laboratuvar ölçekli ardışık kesikli reaktörlerde (AKR) aerobik granüler çamur elde edilmiştir (Liu ve Tay, 2002; Liu vd., 2005). Ancak, biyolojik aşırı fosfor gideren AKR'lerde aerobik granüler çamur eldesi ile ilgili çalışmalar son derece sınırlı sayıdadır (Dulekgurgen vd., 2003; de Kreuk ve van Loosdrecht, 2004).

Bu bağlamda, aerobik granüler BAFG biyokütle sistemleri ile ilgili literatürdeki ilk çalışmalardan biri olan çalışmanın (Dulekgurgen vd., 2003) devamı niteliğinde gerçekleştirilen ve aerobik granüler BAFG biyokütlesinin mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesine yönelik yürütülen çalışmanın sonuçları bu makalede özetlenmiştir. Ardışık anaerobik/aerobik modda işletilen laboratuvar ölçekli AKR'de elde edilen ve PAO'larca zenginleştirilmiş aerobik granüler BAFG biyokütlesinin morfolojik ve ekofizyolojik özellikleri konvansiyonel mikroskopi ve kimyasal boyama teknikleriyle belirlenmiş ve bu sonuçlar sistemin biyokimyasal performansı ile ilişkilendirilmiştir.

Materyal ve yöntemler

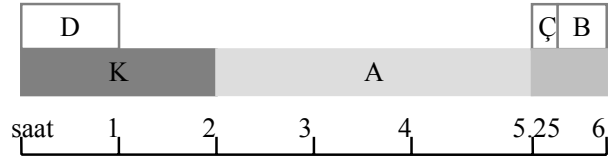
Reaktör işletimi

AKR-tipi laboratuvar ölçekli biyolojik reaktör, İstanbul-Ayazağa'da bulunan, karbon gideren, konvansiyonel havalandırmalı biyolojik bir atıksu arıtma tesisinin havalandırma havuzundan alınan floklüler yapılı ve karışık kültür biyokütle ile çalıştırılmaya başlatılmıştır. İnokülasyon biyokütlesi, tekil karbon kaynağı olarak asetata ve göreceli olarak yüksek fosfor yüküne alıştırmış ve elde edilen karışık kültür biyokütle, yüksek fosfor yükü sayesinde PAO'larca zenginleştirilmiştir. Sistemde oluşmaya başlayan üstün çökme özellikli aerobik granüler biyokütlenin oluşumunu hızlandırmak ve artırmak amacıyla, çökme süresi (T_S) ve ilk hacim (V_0) düşürülmüş (sırasıyla 30'dan 15 dak.'ya ve 2.9'dan 1.8 L'ye), hacimsel karbon yüklemesi ($KOİ_{yük}$) ve havalandırma kaynaklı kesme kuvveti (V_{KHava}) artırılmıştır (sırasıyla 0.24'ten 1.41 kg $KOİ/m^3 \cdot g$ 'a ve 0.14'ten 0.19 cm/s'ye).

Reaktörün iç çapı 14 cm'dir ve bu çalışmada sunulan bulguların elde edildiği çalışma periyodunda, çalışma yüksekliği 26 cm (yükseklik/çap=1.9) ve çalışma hacmi (V_W) 4 L'dir. Reaktör, günde 6 saatlik 4 çevrim planı ile işletilmiştir. AKR'nin bir çevrimindeki ardışık fazlarının şematik gösterimi Şekil 1'de görülmektedir. Tüm mekanik teçhizat (peristaltik pompa, karıştırıcı, solenoid vana, hava kompresörü, vb.) mekanik ya da dijital zamanlayıcılarla kontrol edilmiş, çalışma boyunca pH 7 ± 0.5 değerinde sabit tutulmuştur.

Reaktörün ilk hacmi (V_0) 1.8 L, doldurma hacmi (V_F) 2.2 L, değişim oranı (V_F/V_T) %55, ve hidrolik bekletme süresi (HRT) 10.9 saattir. Reaktörden günlük olarak çamur atılması ile çamur yaşı (SRT) 11.4 gün'de, etkin çamur yaşı (SRT_e) 10 gün'de tutulmuştur. Sentetik atıksu, 642 mg $KOİ/L$ eşdeğeri sodyum asetat, 20 mg PO_4-P/L eşdeğeri KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 ile 40 mg NH_4-N/L eşdeğeri NH_4Cl içecek şekilde hazırlanmış ve eser elementler çözeltisi ile (K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , vb.) desteklenmiştir. Sisteme uygulanan karbon:fosfor (C:P) oranı 32.1 mg $KOİ/mg PO_4-P$ 'dir.

Fazlar: ■ Anaerobik ■ Aerobik ■ Durgun



Şekil 1. AKR'nin çevrimsel işletim şeması: D; doldurma, K; mekanik karıştırma (anaerobik); A; havalandırma; Ç; çökme, B; boşaltma

Örnekleme ve ölçümler

AKR'nin BAFG performansını belirlemek amacıyla yapılan çevrim-içi deneyleri için, bir çevrim süresince reaktörden alınan tam karışım örnekleri, 1.2-1.6 μm ortalama gözenek çaplı konvansiyonel filtrelerden (Millipore AP40, cam elyaf filtre) süzöldükten sonra $KOİ$, NH_4-N , $Nox-N$ ($NO_2^-+NO_3^-$), PO_4-P ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Biyokütle ile ilişkili parametreler olan AKM, UAKM, ve χHI 'nin (çamur hacim indeksi; mL/g) belirlenmesi için havalandırma fazının sonunda tam karışımdan örnekleme gerçekleştirilmiştir. Bunlara ek olarak, biyokütlenin toplam fosfor içeriği sülfirik asit-nitrik asit parçalamasını takiben kalay klorür yöntemi ile belirlenmiştir. $KOİ$ parametresi hariç, tüm parametrelerin ölçümü APHA'nın *Standard Methods* (APHA vd., 1998) protokollerine göre yapılmıştır. $KOİ$ ölçümleri ise kapalı reflüks, ISO 6060'a (International Organization for Standardization, 1986) protokolleri uyarınca gerçekleştirilmiştir.

Mikrobiyolojik analizler

Biyokütlenin makro-yapısı- Genel biyokütle dokusunun ve mikrobiyal topluluktaki morfolojik çeşitliliğin değerlendirilmesi amacıyla reaktörden alınan örnekler konvansiyonel ışık mikroskopisi ile incelenmiştir. Bu amaçla kullanılan ve SPOT RX diagnostik kamera (CCD camera, ICD-803P, Ikegami, Japan) ile donatılı ve bilgisayar bağlantılı Olympus BX60 model ışık mikroskopu (Olympus Optical Co. Ltd., Japan) ile elde edilen görüntüler önce SPOT Advanced Software, daha sonra da Adobe Photoshop yazılımları ile işlenmiştir. Sistemde elde edilen aerobik granüler BAFG biyokütlesinin boyut dağı-

lim analizi, elde edilen mikrografların ImagePro Plus V4.0 (Media Cybernetics) görüntü analiz yazılım programı ile işlenmesi sonucu gerçekleştirilmiştir.

Poli-P ve PHB tespiti için Neisser ve Sudan Black B boyaması- Zenginleştirilmiş biyokütle, BAFG mekanizmasını karakterize eden fenotipik parametreler açısından incelenmiştir. Bu amaçla, çevrimin belirli noktalarından alınan biyokütle numunelerine poli-P ve PHB boyaması uygulanmıştır. Poli-P granüllerine tam spesifik olmamakla birlikte, hücre-içi metakromatik volütün fosfor granüllerinin boyanması için yaygın olarak kullanılan Neisser boyaması uygulanmıştır. Bu yöntemde, metilen mavisi ve kristal viyole çözeltileri pozitif-boyama, bismark brown çözeltileri ise negatif-boyama için kullanılmıştır. Lipofilik hücre-içi depo maddelerinin (örn. PHB) izlenmesi için ise örnekler önce Sudan Black B ile (pozitif boyama), ardından da Safranin O ile (negatif boyama) boyanmıştır (Jenkins vd., 1993).

Deneysel bulgular ve tartışma

Sistem performansı

Kararlı halde çalışan aerobik granüler biyokütlenin BAFG açısından davranışlarını karakterize etmek amacıyla gerçekleştirilen çevrim içi deneyleri sonucunda sistemin karbon ve fosfor giderim verimlerinin sırasıyla %92 ve %99 olduğu saptanmıştır. Sistemin çevrim içi KOİ ve PO₄-P profilleri tipik BAFG profilleridir ve PAO-fenotipini yansıtmaktadır (Şekil 2). Anaerobik karıştırma sonunda sıvı fazdaki PO₄-P değerinin 136 mg/L'ye kadar çıktığı ve bu devreyi izleyen aerobik fazın ilk 90 dakikasında salınan fosforun hemen hemen tamamının biyokütle tarafından depolandığı gözlenmiştir (Şekil 2). Biyokütlenin toplam fosfor içeriği 131 mg PO₄-P/g AKM olarak kaydedilmiştir (Tablo 1). Şekil 2'deki KOİ profilinden de görüldüğü gibi, 1 saatlik anaerobik besleme devresinin bitmesini takiben, sıvı fazdaki asetat anaerobik koşullar altında hızla tüketilmiş ve izleyen aerobik faz boyunca KOİ profili 20-30 mg/L civarında sabit kalmıştır. Sistemde saptanan nitrifikasyon ve denitrifikasyon verimleri sırasıyla %75 ve %100, toplam azot giderim verimi %78 olarak belirlenmiştir. Nitrifikasyon sonucu aerobik

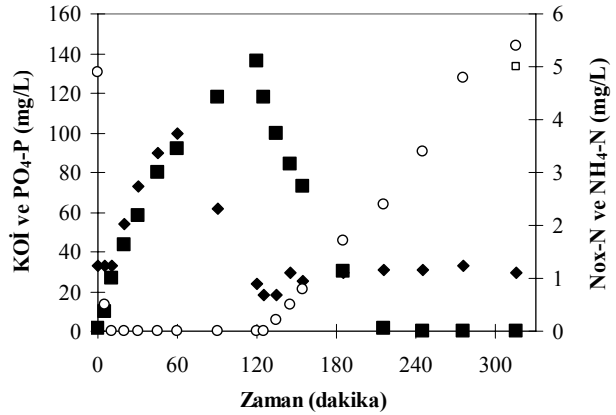
fazda üretilen Nox-N'nun tamamı, takibeden çevrimin ilk dakikalarında ve bir miktar asetatın da kullanımı sonucu denitrifikasyon ile tüketilmektedir. Bunlara ek olarak, 45 mL/g olarak belirlenen ÇHİ değeri, aerobik granüler BAFG biyokütlesinin üstün çökeltme özelliklerine sahip olduğunu göstermektedir.

Tablo 1. Kararlı-hal aerobik granüler BAFG biyokütlesi çevrim-içi deney koşulları

Giriş Atıksuyu ^a	İşletim	Biyokütle
KOİ(mg/L)	642 V ₀ (L)	1.8 AKM(mg/L) 4410
TP(mg/L)	20 V _F (L)	2.2 UAKM(mg/L) 3132
NH ₄ (mg/L)	40 V ₀ /V _F	0.82 UAKM/AKM 71%
	SRT(g)	11.4 ÇHİ(mL/g) 45
	Ts(d)	15 P içeriği ^b 113

^aÖlçülen: 544 mg KOİ/L, 20.8 mg PO₄-P/L, 40 mg NH₄-N/L.

^bBiyokütlenin toplam fosfor içeriği; mg PO₄-P/g AKM.



Şekil 2. Kararlı-hal aerobik granüler BAFG biyokütlesi çevrim-içi profilleri: PO₄-P (■), KOİ (◆), NH₄-N (□), ve Nox-N (○)

Biyokütlenin genel yapısı

15 dakika sonunda çökelen biyokütlenin, çökelmiş çamur yatağının büyük bir kısmına karşılık gelen ve gözle ayırt edilebilir büyüklükteki biyokütle agregaların yer aldığı yoğun alt tabaka ile çökeltme özelliği iyi olan floküler biyokütleden meydana gelen ince üst tabaka olmak üzere iki tabakadan oluştuğu gözlenmiştir. Literatürde, 400-500 mm'den büyük floklar "iri flok" olarak (Jenkins vd., 1993; Liss vd. 2002), 1-3.3 mm çaplı biyokütle agregaları ise

“granül” olarak tanımlanmaktadır (Beun vd., 1999). Aerobik sistemlerde yürütülen bazı çalışmalarda çapı 4.5-7 mm’ye kadar varan granüller rapor edilmektedir (Morgenroth vd., 1997; Etterer ve Wilderer, 2001). Bu çalışmada elde edilen ve mevcut biyokütlenin çoğunu oluşturan aerobik granüllerin ortalama çapı ise 2.5-3 mm olarak saptanmıştır.

Elde edilen granüller, çıplak gözle ayırt edilebilir, koyu renkli, yoğun, küresel ya da oval şekilli parçacıklardır. Daha küçük ve az yoğunlukta olan ve floklarla çevrelenmiş amorf şekilli agregalara da rastlanmıştır. Bu agregaların, 2.5-3 mm ortalama çaplı olgun granülleri oluşturan peletler ya da genç granül adayları olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda, aerobik granülasyonun dinamik bir süreç olduğu, granüllerin belirli bir fiziksel büyüme döngüsü izlediği, başlangıçta küçük olan granüllerin zamanla çaplarının büyüdüğü ve belirli bir değere (örn. 5-8 mm) ulaştıktan sonra iri granüllerin küçük granüllere parçalandıkları ve granül çapının yeniden artmaya başladığı saptanmıştır.

Granüllere ve floklara ek olarak aktif çamur sistemlerinde sıkça görülen tipik ökaryalara da rastlanmıştır. Granüllerin dış tabakalarında, *Vorticella campanula* ve *Carhesium spp.* gibi sabit protozoalar mevcuttur. Düşük miktardaki rotiferlerin yanısıra, yine az miktarda filamentli bakterilere rastlanmıştır. Filamentli bakterilerin subjektif puanlanma yöntemi (Jenkins vd., 1993) ile belirlenen miktarları 0-1 aralığındadır.

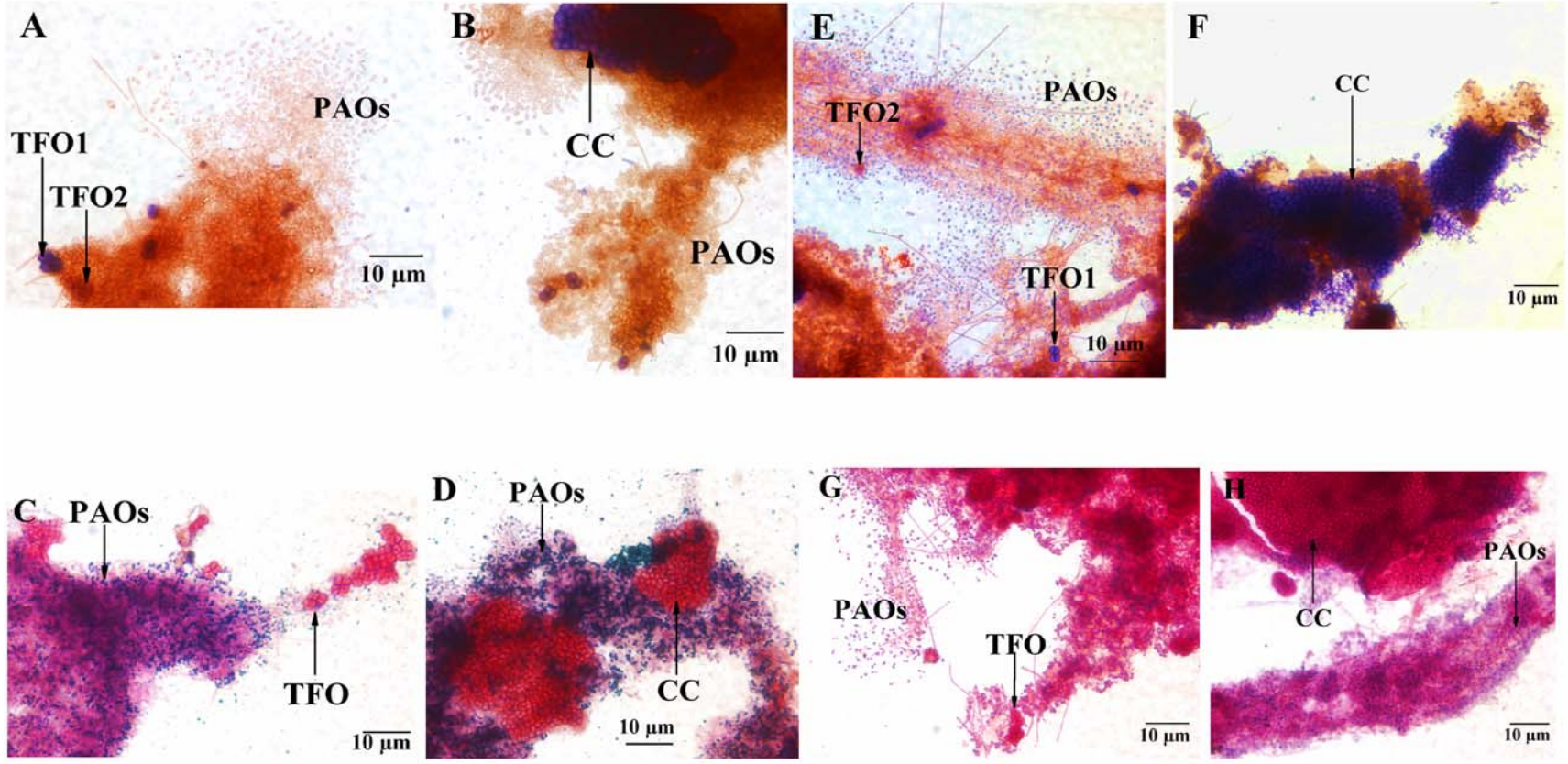
Morfolojik ve fenotipik çeşitlilik

Poli-P tesbiti için yapılan Neisser ve PHB’lerin gözlenmesi için uygulanan Sudan Black B boyamalarının sonuçları Şekil 3’te verilmiştir. Asetata alışmış olan ve uzun süredir tam-BAFG verimi sergileyen aerobik granüler biyokütle, morfolojik olarak oldukça zengin bir görünüm sergilemektedir. Literatürdeki bazı güncel çalışmalarda da PAO’larca zenginleştirilmiş BAFG biyokütlelerinde, konvansiyonel çubuksu ve kokoid PAO’ların yanısıra, özellikle dikkat çekici miktarda tetrad-benzeri bakterilerin gözleendiği belirtilmektedir (Liu, 1995; Mino vd., 1998; Bond vd., 1999; Crocetti vd., 2000;

Griffiths vd., 2002). Bu çalışmaların pek çoğunda tetrad-benzeri bakterilerin PAO’larla yarışan GAO’lar olduğu savunulmaktadır.

Şekil 3’te de görüldüğü gibi, bu çalışmada temel olarak 5 morfortip saptanmıştır. İncelenen örneklerde baskın morfortip, 1-2 µm çaplı çubuksu hücrelerdir. Bunların yanında az sayıda ve 20-40 µm uzunluğunda bazı düz filamentlere de rastlanmıştır. Tetra- ya da sarsina-benzeri hücrelerin/hücre topluluklarının varlığı da oldukça dikkat çekicidir. Sözkonusu tetradların ortalama çapları 3.5-4 µm olup; benzer hücreler için literatürde verilen ölçülere uymaktadır (Brock vd., 1994). Bir başka ilginç morfolojik grup ise yoğun ve oldukça büyük kokoid-topluluklardır. Bu topluluklar stafilokok morfolojisini andırmakta ve esasen 1.3-1.8 µm çaplı tekil kokların biraraya gelmesiyle oluşmaktadır (Şekil 3). Kokoid toplulukların oldukça yoğun olmaları nedeniyle bunların tekil kok hücre toplulukları mı, yoksa tetra/sarsina-benzeri hücre agregaları mı oldukları net olarak anlaşılmamaktadır. Buna rağmen, sözkonusu yoğun hücre topluluklarının poli-P ve PHB boyamalarına verdikleri reaksiyonlar genel olarak tetradla-rınkine benzer olduğundan (bazı tetradlar hariç), bu hücrelerin ekofizyolojik değerlendirilmelerinde belirsizlik yaşanmamıştır. Yukarıda sayılan morfolojik hücre tiplerine ek olarak bazı ender durumlarda diplo-kok hücrelere de rastlanmıştır.

Şekil 3; panel A ve B’de gözlenen çubuksu hücrelerin tümü anaerobik devre sonunda poli-P negatif [P(-)] reaksiyon vermişlerdir. Bunun anlamı, BAFG sistemlerinde baskın olan PAO-fenotipinden bekleneceği üzere anaerobik devre sonunda hücre-içi poli-P depolarının tükenmiş olmasıdır. Aynı örnekleme zamanında alınan ve PHB-boyası ile boyanan örneklerdeki çubuksu hücreler de tamamen pozitif bir cevap [PHB(+)] verdiğiinden hücre-içi PHB depolarının dolu olduğu yargısına varmak mümkündür (Şekil 3; panel C ve D). Takip eden aerobik devre sonunda alınan örneklerdeki çubuksu-hücreler tamamen olmasa da çoğunlukla Neisser(+)'dir ve bu da poli-P depolarının maksimum kapasitenin



Şekil 3. Aerobik granüler BAFG-biyokütlesinin mikrobiyolojik özellikleri: Panel [A] - [D]: Anaerobik devre sonu örnekleme. Panel [E] - [H]: Aerobik devre sonu örnekleme. Panel [A], [B], [E], ve [F]'deki numuneler poli-P granüllerinin belirlenmesi için Neisser boyası ile boyanmıştır (koyu lacivert-mor hücreler poli-P[+] ve kahverengi hücreler poli-P[-]). Panel [C], [D], [G], ve [H]'deki numuneler hücre-içi lipofilik PHB depolarının saptanabilmesi için Sudan Black B ile boyanmıştır (mavi-siyah hücreler PHB[+] ve pembe hücreler PHB[-]). Sonuçlar ve yorumları Tablo 2'de özetlenmiştir.

altında bir dolulukta olduğunu göstermektedir (Şekil 3; panel E). Buna bağlı olarak bu hücrelerin aerobik devre süresince PHB depolarının tamamını da kullanmadıkları gözlemlenmiştir (Şekil 3; panel G ve H). Bu çubuksuların gerek morfolojileri gerekse poli-P ve PHB boyamalarına verdikleri yanıtlar, literatürde PAO-fenotipi için önerilen özelliklerle örtüşmektedir (Mino vd., 1998; Bond vd., 1999; Mino, 2000; Levantesi vd., 2002). Sistemde %99'luk fosfor ve %92'lik karbon gideriminin sağlanmasına karşılık, çubuksu-PAO'larının hücre-içi poli-P depolarının kısmen dolu olması ve bu hücrelerin PHB havuzlarını tamamen kullanamamış olmaları, sistemin bu devrede fosfor kısıtlı olarak işletilmesine bağlanmıştır (KOİ:P oranı 32:1). Şekil 3'te mikrografları görülen boyama sonuçları Tablo 2'de özetlenmiştir. Sonuçların sunumunda, hücre-içi depoların göreceli miktarlarına işaret etmek üzere kesinlikle pozitif yanıtlar için (+++), ortalama yanıtlar için (++-), zayıf yanıtlar için (--+) ve kesinlikle negatif yanıtlar için (--) gibi basit bir derecelendirme sistemi kullanılmıştır (Tablo 2).

Gözlemlenen tetra/sarsina-benzeri hücrelerin şekilleri, literatürde tanımlanan/önerilen GAO-morfolojisini andırmaktadır. Çoğu tetrad, hem anaerobik hem de aerobik devre sonunda alınan numunelerde Neisser(+) çıkmıştır (Şekil 3; panel A, B, ve E). Ancak bu bulguların, sözkonusu hücrelerin BAFG ile ilgili olarak poli-P depolama yetenekleri olduğunun kanıtı olarak algılanmaması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bunun nedeni, bu tetradların hücre içlerinde değil, sadece hücre duvarlarında Neisser(+) reaksiyon vermiş olmalarıdır. Sitoplazma yerine hücre duvarında Neisser(+) reaksiyon veren ve bazı çalışmalarda "GAO" olarak tanımlanan tetrad yapıda hücrelerin varlığı literatürde de rapor edilmiştir (Liu, 1995; Liu vd., 1996; Mino vd., 1998; Bond vd., 1999; Crocetti vd., 2000; Griffiths vd., 2002).

Üzerinde en çok çalışılmış PAO türü olan *Acinetobacter* suşlarından bazılarının farklı yapılarında poli-P depolarının olduğu, ve bazı alt-suşların bi-fazik poli-P dağılımı gösterdikleri bilinmektedir (Florentz vd., 1984; Streichan vd., 1990). Bu suşların poli-P depolarının büyük bir

kısmı sitoplazmada ve poli-P granülü halinde iken, küçük ancak yadsınamayacak bir kısmı ise genelde Gram(-) olan bu bakterilerin dış membran ile ilişkili olarak, ya da dış ile iç membran arasındaki periplazmada bulunmakta ve hücrelerin boyanması durumunda oldukça koyu renkte bir zarf görünümü oluşturmaktadır (Florentz vd., 1984). Florentz ve diğerleri, ³¹P-NMR ve TEM teknikleriyle, sitoplazmik poli-P'nin (metakromatik volütün granül), anaerobik ortamda hücre içinden dış ortama salındığını ancak periplazmik poli-P'nin (yoğun hücre zarfı) hiçbir değişikliğe uğramadığını saptamıştır (Florentz vd., 1984). Sonuçlar, membran duvarı ilişkili poli-P tabakalarının, hücre içinde sitoplazmada bulunan ve BAFG mekanizmasında doğrudan enerji havuzu olarak kullanılan poli-P volütün granüllerinden farklı olduklarını göstermiştir. Bu bağlamda, membran ilişkili poli-P tabakalarının, BAFG'ı karakterize eden anaerobik fosfor salımı ve aerobik fosfor alımı süreçlerinde rol oynamadığı sonucuna varılmıştır.

Yukarıdaki açıklamalar doğrultusunda, bu çalışmada çoğu tetrad/sarsina-benzeri hücreden elde edilen ve hücre duvarı ilişkili Neisser(+) sonuçlar, söz konusu hücrelerin BAFG mekanizmasının fosfor bütçesine katılımlarının göstergesi olarak değil, hücre membranları ile ilişkili yoğun poli-P tabakalarına sahip olduklarının göstergesi olarak kabul edilmiştir.

Daha önce belirtildiği üzere tetra/sarsina benzeri hücreler morfolojik olarak GAO'lara benzerdir. Buna karşılık ve sistem yüksek KOİ yükü ile çalıştırıldığı halde, tüm tetradlar hem anaerobik hem de aerobik devreler sonunda kesinlikle PHB(-) yanıt vermiştir (Şekil 3; panel C ve G). Bu nedenle, sözkonusu tetradların GAO-morfolojisine uyduğu, ancak bu hücrelerin ekofizyolojik özelliklerinin, özellikle anaerobik PHB depolaması konusunda GAO-fenotipiyle örtüşmediği sonucuna varılmıştır.

Gerek bu çalışmada elde edilen sonuçlar, gerekse literatürde GAO morfolojisi ve fenotipi ile ilgili bazı çalışmalarda önerilen çıkarımların birbiriyle çelişiyor olması, BAFG sistemlerinde gözlenen tetrad/sarsina benzeri hücrelerin

Tablo 2. Aerobik granülerBAFG-biyokütlesinin morfolojik ve fenotipik özellikleri

Şekil 3	Morfoloji	Anaerobik Sonu		Aerobik Sonu		Fenotipik Özellikler	Kısa
Panel	Çubuksu hücreler	P(---)	PHB(+++)	P(++-)	PHB(--+)	<ul style="list-style-type: none"> •PAO-morfolojisi ile uyumlu •PAO-fenotipi ile uyumlu •Fosfor-kısıtlı işletme 	PAO
		A, B	C	E	G, H		
Panel	^a Tetrad/sarsina-benzeri hücreler (çoğunluk)	zP(+++)	PHB(---)	zP(++-)	PHB(---)	<ul style="list-style-type: none"> •GAO-morfolojisi ile uyumlu •Hücre duvarında Neisser(+) •Her koşulda PHB(-) •GAO-fenotipi ile uyumsuz 	TFO1
		A, B	C	E	G		
Panel	^b Tetrad/sarsina-benzeri hücreler (az)	zP(---)		zP(---)		<ul style="list-style-type: none"> •Diğer TFO'lardan farklı olarak tamamen Neisser(-) 	TFO2
		A		E			
Panel	^a Kokoid-topluluklar	zP(+++)	PHB(---)	zP(++-)	PHB(---)	<ul style="list-style-type: none"> •Hücre duvarında Neisser(+) •Her koşulda PHB(-) •GAO-fenotipi ile uyumsuz 	CC
		B	D	F	G, H		

^aTetra/sarsina-benzeri hücreler ve kokoid-yumaklar sadece hücre duvarları civarında kuvvetli olarak Neisser(+) yanıt vermiştir (hücreleri çevreleyen koyu renkli zarf benzeri yapılarlar). Bu morfolojilerin Neisser boyama sonuçları zP(++-) olarak kısaltılmıştır. ^bTFO2'yi TFO1'den ayırmak için benzer bir kısaltma, zP(---), kullanılmıştır.

ekofizyolojik açıdan GAO olarak davranıp davranmadıklarını belirleyebilmek için, sadece tek bir faz sonundan değil, hem anaerobik hem de aerobik fazlardan örnekleme yapılmasının ve gerçekleştirilecek geniş kapsamlı boyama ve morfolojik incelemelere ek olarak incelenen sistemlerin işletme koşullarıyla birlikte biyokimyasal dönüşüm süreçleri açısından performanslarının da göz önünde bulundurulmasının gerekliliğine işaret etmektedir. Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında gözlemlenen tetrad/sarsina-benzeri organizmaların “GAO” olarak adlandırılması uygun bulunmamış, buna karşılık bu morfolojik tip, Tsai ve Liu'nun ardından (Tsai ve Liu, 2001) TFO (Tetra Forming Organisms) olarak isimlendirilmiştir. Fonksiyonel bir sınıflandırmaya işaret “GAO” teriminden farklı olarak, “TFO” terimi morfolojik tanımlamaya/ayırt etmeye yöneliktir.

TFO morfolojisinin çoğunluğuna aykırı olarak kesinlikle Neisser(-) reaksiyon veren bazı

TFO'lara da rastlanmıştır (Şekil 3; panel A ve E). Bu iki grubu ayırdedebilmek amacıyla, hücre duvarlarında kuvvetle boyanan tetradlar TFO1 ve negatif reaksiyon verenler ise TFO2 olarak adlandırılmıştır (Tablo 2). Morfolojileri aynı olan bu iki grup organizmaların hücre duvarlarının kompozisyonunun farklı olduğu düşünülmektedir.

Kokoid-topakların boyama sonuçları TFO'larına (TFO1) benzerdir. Bunlar gerek anaerobik-gerekse aerobik-devre sonlarında sadece hücre duvarlarında Neisser(+)'dir (Şekil 3; panel B ve F). Benzer şekilde yoğun topakları oluşturan kokoidler her devrede kesinlikle PHB(-)'dir (Şekil 3, panel D ve H).

Sonuçlar

PAO'larca zenginleştirilmiş aerobik granüler biyokütlenin uzun süreli kararlı hal işletimi ardından incelenmesi sonucu hem morfolojik hem de ekofizyolojik açılarından çeşitlilik gösterdiği

saptanmıştır. Bu yargı, BAFG sistemleri bağlamında literatürde rapor edilen sonuçlarla uyumludur.

Sistemdeki baskın tür tanımlanmış morfolojileri ve ekofizyolojileri ile çubuksu PAO'lardır. Bu çalışmada gözlemlenen TFO'ların morfolojisi, GAO morfolojisi ile örtüşmekle birlikte, bunların anaerobik devre sonundaki PHB boyamasına verdikleri kesin olumsuz yanıtlar, bu morfolojinin fonksiyonel anlamda GAO oldukları savının sorgulanması gerektiğine işaret etmektedir.

Literatürde anaerobik granüler biyokütle ve karbon ya da azot gideren aerobik granüler biyokütle performansları ile ilgili çok sayıda çalışmalar bulunmakla birlikte, ardışık anaerobik-aerobik modda işletilen BAFG sistemlerinde aerobik granülasyon konusunda yayınlanan çalışmalar son derece sınırlı sayıdadır. Bu çalışmada sunulan sonuçlar, AKR tipi reaktörlerde hem tam BAFG performansı ile çalışmanın, hem de son derece üstün çökeltme özelliklerine sahip aerobik granüler biyokütle elde etmenin mümkün olduğunu göstermiştir.

Mühendislik uygulamaları açısından, AKR tipi reaktörlerin sunduğu işletme kolaylıkları (çökeltme süresinin, ilk hacim ya da doldurma hacminin değiştirilebilmesi, anaerobik ya da aerobik reaksiyon sürelerinin uzatılıp kısaltılabilemesi, BAFG prosesi için gereken ardışık anaerobik-aerobik fazların aynı hacimde farklı zamanlarda uygulanabilmesi, vb.), granüler biyokütlenin üstün çökeltme özellikleri (düşük çökeltme süresi, biyokütlenin kompakt yapısı nedeniyle V_0 hacminin düşürülebilmesi, yüksek biyokütle tutma kapasitesi sayesinde günlük yüklemelerin artırılabilmesi, vb.) ile BAFG mekanizmasının gereği olan anaerobik faz sayesinde sistemin toplam havalandırma ihtiyacının düşürülmesi gibi özellikler birleştirildiğinde "aerobik granüler BAFG teknolojisi", gerek istenilen sistem veriminin elde edilmesi gerekse ilk yatırım ve işletme giderlerinin düşürülmesi açısından gelecek vadede bir biyolojik atıksu arıtma alternatifi olarak öne çıkmaktadır.

Kaynaklar

- APHA, AWWA, WEF (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th Edn., Washington D.C., USA.
- Beun, J.J., Hendriks, A., van Loosdrecht, M.C.M., Morgenroth, E., Wilderer, P.A. ve Heijnen, J.J., (1999). Aerobic granulation in a sequencing batch reactor, *Water Research*, **33**, 10, 2283-2290.
- Bond, P.L., Erhart, R., Wagner, M., Keller, J. ve Blackall, L.L., (1999). Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems, *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 9, 4077-4084.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M., ve Parker, J., (1994). *Biology of Microorganisms*, 7th edn., Prentice-Hall Inc., NJ, USA.
- Crocetti, G.R., Hugenholtz, P., Bond, P.L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D. ve Blackall, L.L., (2000). Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation, *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 3, 1175-1182.
- de Kreuk, M.K. ve van Loosdrecht, M.C.M., (2004). Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability, *Water Science And Technology*, **49**, 11-12, 9-17.
- Dulekgürge, E., Ovez, S., Artan, N., Orhon, D. (2003). Enhanced biological phosphate removal by granular sludge in a sequencing batch reactor, *Biotechnology Letters*, **25**, 687-693.
- Etterer, T. and Wilderer, P.A., (2001). Generation and properties of aerobic granular sludge, *Water Science and Technology*, **43**, 3, 19-26.
- Florentz M., Granger P. ve Hartemann P., (1984). Use of ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy and electron microscopy to study phosphorus metabolism of microorganisms from wastewaters, *Applied and Environmental Microbiology*, **47**, 3, 519-525.
- Griffiths, P.C.; Stratton, H.M; Seviour, R.J. (2002). Environmental factors contributing to the "G Bacteria" population in full-scale EBPR plants, *Water Science and Technology*, **46**, 4-5, 185-192.
- International Organization for Standardization (1986). In: Technical Committee ISO/TC 147, eds. *International Standard ISO 6060: Water Quality – Determination of the chemical oxygen demand, Reference No. ISO 6060-1986(E)*, 1st edn. Switzerland: ISO.

- Jenkins, D., Richard, M.G., Daigger, G.T. (1993). *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*, 2nd edn., Lewis Publishers Inc., Michigan, USA.
- Levantesi, C., Serafim, L.S., Crocetti, G.R., Lemos, P.C., Rossetti, S., Blackall, L.L., Reis, M.A.M., ve Tandoi, V., (2002). Analysis of the microbial community structure and function of a laboratory scale enhanced biological phosphorus removal reactor, *Environmental Microbiology*, **4**, 559-569.
- Liu, W.T. (1995). *Function, Dynamics, and Diversity of Microbial Population in Anaerobic Aerobic Activated Sludge Processes for Biological Phosphate Removal*. Ph.D. dissertation, University of Tokyo, Japan.
- Liu, W.T., Mino, T., Matsuo, T., Nakamura, K., (1996). Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic-aerobic activated sludge without biological phosphorus removal, *Water Research*, **30**, 75-82.
- Liu, Y. ve Tay, J.-H., (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge, *Water Research*, **36**, 7, 1653-1665.
- Liu, Y., Wang, Z.-W. ve Tay, J.-H., (2005). A unified theory for upscaling aerobic granular sludge sequencing batch reactors, *Biotechnology Advances*, **23**, 5, 335-344.
- Liss, S.N.; Liao, B.Q.; Droppo, I.G.; Allen, D.G.; Leppard, G.G. (2002). Effect of solids retention time on floc structure, *Water Science and Technology*, **46**, 1-2, 431-438.
- 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.
- Mino, T. (2000). Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal, *Biochemistry (Moscow)*, **65**, 405-413.
- Morgenroth, E., Sherden, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., Wilderer, P.A., (1997). Rapid communication: Aerobic granulation in a sequencing batch reactor, *Water Research*, **31**: 3191-3194.
- Streichan, M., Golecki, J. R. ve Schon, G., (1990). Polyphosphate-accumulating bacteria from sewage plants with different processes for biological phosphorus removal, *FEMS Microbiology Ecology*, **73**, 113-124.
- Tay, J.H., Liu, Q.S. ve Liu, Y., (2004). The effect of upflow air velocity on the structure of aerobic granules cultivated in a sequencing batch reactor, *Water Science and Technology*, **49**, 11-12, 35-40.
- Tsai, C.S. ve Liu, W.T., (2002). Phylogenetic and physiological diversity of tetrad-forming organisms in deteriorated biological phosphorus removal systems, *Water Science Technology*, **46**: 179-184.