

## Aktif Çamur Sistemlerinde Sorun Yaratan Filamentli Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Kontrol Stratejileri Üzerine Bir Araştırma

\*Alev Haliki, Güven Özdemir, Ataç Uzel

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye  
\*E mail: haliki@sci.ege.edu.tr

**Abstract:** Research on isolation and identification of filamentous microorganisms causing some problems in activated sludge. In this research, isolation and identification of filamentous microorganisms causing many problems in activated sludge were studied. It was determined growth properties of selected 4 isolates in different pH and temperature conditions. Regarding to pH and temperature, isolates best grown at pH 6-7 and 25-35°C, respectively.

**Key Words:** Filamentous microorganisms, Isolation, Identification, Activated sludge.

**Özet:** Bu araştırmada öncelikle aktif çamur sistemlerinde birçok soruna neden olan iplikli bakterilerin izolasyonu ve tanılanması yapılmıştır. İzole edilenler arasından seçilen 4 iplikli bakteri izolatu üzerinde farklı pH ve sıcaklık koşullarında büyüme özellikleri belirlenmiştir. pH 6-7, sıcaklık 25-35°C civarında en iyi büyüme gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** İplikli mikroorganizmalar, İzolasyon, Tanılama, Aktif Çamur.

### Giriş

Çevre sağlığını ilgilendiren birçok organik atık günümüzde çeşitli aerobik biyolojik arıtma prosesleri ile daha kararlı inorganik formlara dönüştürülebilir. Yararlanılan birçok yöntem içerisinde aktif çamur sistemi en popüler ve en kullanışlı olanlardan biridir. Bu proses, doğal olarak kabul edilebilir bir çıkış suyunun oluşumu için iki bağımsız karakteristiğe dayanmaktadır. Birinci özellik mikroorganizmalar tarafından süspende ve koloidal organik maddelerin tam asimilasyonu sonucu CO<sub>2</sub>, su ve daha birçok inert maddeler gibi son ürünlerin oluşumudur. Aktif çamur prosesinin bu ilk fazı genellikle substrat kullanımı olarak ifade edilir. İkinci faz, yüksek kalitede çıkış suyunun oluşturulması için düşük BOD<sub>5</sub> son ürün elde edilebilmek amacıyla mikroorganizmaların ve diğer süspende maddelerin veya koloidal bileşiklerin kolayca çökebilir kütleyle flokülasyonudur (Scruggs ve Randall, 1998). Aktif çamur sisteminin tüm operasyonel etkinliği direkt olarak bu çökeltim olayına bağlıdır. Aktif çamur prosesinde 50-2000 µm çapında flokların oluşumu birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörlerden biri Fe<sup>3+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> gibi polivalent katyonlar ile oluşturulan iyonik köprülerin bireysel hücreleri birbirine tutunmasını sağlamasıdır. Diğer bir etken de hücrelerin içinde bulunduğu bir matriksi oluşturan yapıştırıcı özellikteki genellikle glikokaliks olarak ifade edilen ve başlıca selüloz ve hemiselüloz tip polimerler olan polisakkaritler ile muhtemelen ölü hücrelerden açığa çıkan DNA ve RNA'dan ibaret hücreleri birbirine bağlayan maddelerdir. Flok oluşumuna katkıda bulunan üçüncü fenomen olarak, filamentöz bakterilerin bir matriks veya iskelet oluşturduğu ve bunlara bakterilerin, özellikle civik ve kapsül oluşturan bakterilerin bu yapıdaki ekzopolisakkaritler sayesinde tutunmalarıdır (Verstraete ve

Vaerenbergh, 1986). Ekzopolisakkaritler aktif çamurda polielektrolitler gibi davranırlar ve partiküllerle, mikroorganizmaların birbirine tutunmasını sağlarlar (Horan et al, 1988). Sürekli EPS üretimi, diğer mikroorganizmaların ve koloidal partiküllerin birbirine tutunmasına neden olur ve sonuçta flok çapı artar. Böylece, protozoanlar da floğa tutunarak kolonize olurlar. Protozoanların floğu desteklemesine katkıda bulunabilen yapışkan bir mukus salgıladığına dair bazı deliller vardır (Horan, 1990).

Filamentli mikroorganizmalar aktif çamur sistemlerinde çökme karakteristikleri üzerinde oldukça etkin olduklarından bu organizmaların yüksek yoğunlukta bulunması durumunda sistemi olumsuz yönde etkileyen şişkin çamur ortaya çıkmaktadır. Aktif çamur komunitasinde genellikle organotrofik bakteriler baskındır ve bunların büyük bir kısmı çamur floklarına dahil olmasına rağmen bazıları sıvı içerisinde serbest olarak bulunmaktadır. Bakteriler ve saprobik protozoanlar, holozoik protozoanlar ve rotiferler için besin kaynağıdır (Horan, 1990). Aktif çamurda bulunan başlıca bakteri genusları ve fonksiyonları tablo halinde verilmiştir (Tablo 1).

Filamentli bakteriler ise genellikle bir kılıf veya tüp içerisinde veya böyle bir yapıya gereksinim duymadan arka arkaya dizilmiş hücrelerin oluşturduğu iplikli bakterilerdir. Aktif çamurda ve şişkin çamurda oldukça sık rastlanan filamentli bakteriler Gram pozitif bakterilerden *Microthrix parvicella*, *Nocardia amarae* ve *Nocardia pinensis*; Gram negatif bakterilerden *Sphaerotilus natans*, *Leptothrix* sp., *Thiothrix* sp., *Beggiatoa* sp., *Haliscomenobacter* sp. ve *Herpetosiphon* sp. türleri olup, izolasyon, kültivasyon ve tanılama yöntemleri geliştirilmiş ve özellikleri belirlenmiştir. (Kampher, 1997).

**Tablo 1.** Aktif çamurda bulunan başlıca bakteri genusları ve fonksiyonları (Horan, 1990).

Genus	Görevi
<i>Zooglea</i>	Slime(cıvık madde) üretimi
<i>Pseudomonas</i>	Karbonhidrat parçalanması, slime üretimi, denitrifikasyon
<i>Bacillus</i>	Protein parçalanması
<i>Arthrobacter</i>	Karbonhidrat parçalanması
<i>Microtrix</i>	Yağların parçalanması, filamentöz büyüme
<i>Nocardia</i>	Filamentöz büyüme , köpük oluşumu
<i>Sphaerotilus</i>	Filamentöz büyüme
<i>Acinetobacter</i>	Fosfor uzaklaştırılması
<i>Nitrosomonas</i>	Nitrifikasyon
<i>Nitrobacter</i>	Nitrifikasyon
<i>Achromobacter</i>	Denitrifikasyon
<i>Cytophaga</i>	Polimerik substratların parçalanması

Funguslar ve mayalar genellikle aktif çamurda bulunurlar, fakat bazı biyokimyasalların devamlı girişi veya çeşitli şekerlerin bulunmaması gibi durumlarda dominant değildirler. Protozoonlar ise toplam çamur ağırlığının %5-10'nu oluşturmaktadırlar; flagellatlar ve serbest hareket eden siliyatlar ise genellikle 10<sup>8</sup>/ml'den daha yüksek bakteri konsantrasyonlarında bulunurlar. 10<sup>6</sup>/ml'den daha düşük bakteri konsantrasyonlarında ise saplı siliyatlar dominanttır ve askıda katı maddenin uzaklaştırılmasına katkıda bulunurlar (Verstraete ve Vaerenbergh, 1986).

Araştırmamızda, İzmir yöresindeki çeşitli sanayi tesislerinin aktif çamur tipi arıtma tesislerinden aldığımız aktif çamur örneklerinden filamentli bakteri izolasyonu ve identifikasyonu yapılmış, ayrıca sıcaklık ve pH gibi çeşitli faktörlerin bu organizmalar üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

## Materyal ve Yöntem

Aktif çamur örnekler 1997-1998 yıllarında çeşitli zaman aralıklarında İzmir-Aliağa-Petkim-Petrokimya Holding A.Ş. ve Tüpraş İzmir Rafineri Atık Giderme Üniteleri Biyolojik Havuzundan ve Geri Dönüşten kahverengi steril şişeler ile alınmış ve iki saat içinde laboratuvara getirilmiştir. Tesisten alınan aktif çamur örneklerinin her biri 200 ml hacimde vorteks mikser' de 2 dk. homojenize edildikten sonra 5µm por çapına sahip glass fibre filtreden geçirilmiştir. Filtre 10 ml steril fizyolojik suda steril bir bisturi ile kazındıktan sonra iyice yıkanarak bu işlem 2 kez tekrarlanmış, filtrede kalan kısım bir öze ile filamentli bakterilerin izolasyonunda kullanılan TY agara ( Trypton 5 g, Yeast ekstrakt 1 g, Distile su 1000 ml), *Sphaerotilus natans* besiyeri CGY agara ( Casitone 0,5 g, Yeast ekstrakt 0.2 g, Gliserol 0,5 g, Agar 15 g, Distile su 1000 ml) ve *Leucothrix* besiyeri SCY agara ( Sukroz 1 g, Casitone 0.75 g, Yeast ekstrakt 0.25 g, Triptik soy broth 0,025 g, Vitamin B<sub>12</sub> 0.01 mg, Thiamin 0.4 mg, Agar 15 g, Distile su 1000 ml) çizgi ekim yöntemi ile; ayrıca filtrenin 10 ml steril fizyolojik suda yıkanması sonucu elde edilen sıvıdan 0.1 ml alınıp L bagetle tüm yüzeye yayılması suretiyle yukarıda bahsedilen ortamlara aktarılmıştır. 25°C'de 5 gün inkübasyon sonucu filamentli koloniler belirlenip saflaşincaya kadar kendi ortamlarına çizgi ekimleri yapılmıştır. Saf kültürlerin faz kontrast mikroskopla filamentli olup olmadıkları doğrulanmıştır (Dodero, 1961; Van Veen, 1973; Horan, 1988; Williams *et al.*

1985; Ziegler *et al.*, 1990; Hornsby ve Horan, 1994).

İzolatlar Nutrient Agar besiyeri içeren petrilere inokule edilerek 30°C'de 48 saat inkübasyon sonucunda kültürel özellikleri incelenmiş; ayrıca KOH testi ve Gram boyama yöntemi ile mikroskopik özellikleri ile yarı katı besiyerinde ve çukur lam yöntemi uygulanarak hareketli olup olmadıkları saptanmıştır. Tanımlamalarının yapılması için gerekli biyokimyasal testler Bergey's (1984) ve Procaryotes (1992)'a göre yapılmıştır. D (+) Glukoz, Sukroz ve Laktöz kullanılarak karbohidrat fermentasyonu; H<sub>2</sub>S üretimi; Nitrat redüksiyonu; İndol üretimi; Eskulin hidrolizi ve O/F testi (oksidatif/fermentatif testi) gibi biyokimyasal testlerin de yapıldığı izolatlar farklı sıcaklık ve pH denemelerine alınmıştır (Gerhardt *et al.*,1981; Tamer ve diğ.,1989).

İzolatların farklı sıcaklık derecelerinde büyüme özelliklerini incelemek amacıyla yapılan çalışmada 25°C'de 48 saat TY brothda büyütülen izolatlardan 0.1 ml alınarak 10 ml TY brotha aşılama yapılmış ve 20-40°C arasında her defasında sıcaklığı 5°C'er arttırarak 72 saat inkübe edilen kültürler sonikatörde 40 W 15 sn sonikasyonla parçalandıktan sonra 400 nm'de Shimadzu UV-visible spektrofotometre ile absorbansları ölçülmüştür (Gerhardt *et al.*, 1981).

İzolatların çeşitli pH'larda büyüme özelliklerini incelemek amacıyla yapılan çalışmada da pH 4-10 değerlerinde pH birer birer artırılmak suretiyle, daha önce yine 25°C'de 48 saat TY brothda büyütülen izolatlardan 0.1 ml alınarak 10 ml TY brotha aşılama yapılmış ve sabit 25°C sıcaklıkta 72 saat inkübasyon sonrası kültürler sonikatörde 40 W 15 sn sonikasyonla parçalandıktan sonra 400 nm'de Shimadzu UV-visible spektrofotometre ile absorbansları ölçülmüştür (Gerhardt *et al.*, 1981).

## Tartışma ve Sonuç

Toplam 32 farklı izolat arasında faz kontrast mikroskopla filamentli oldukları saptanan 4 izolatın Nutrient Agar'daki kolonileri yuvarlak, konveks,düz kenarlı ve nemli yüzeylidir; koloni rengi beyaz olup pigmentasyon yoktur; ekşimsi bir aroması vardır. GYC Agarda 30°C'de 48 saat inkübasyon sonucunda koloniler birbiri ile karışmakta ve tüm petri yüzeyi mukoid kolonilerle kaplanmaktadır; tüm izolatların hareketli oldukları saptanmıştır. Seçilen 4 izolat da Gram negatif çubuk şeklinde, oldukça büyük kapsüllü ve 0.6-1.9 µm boyutlarında bakterilerdir.

Seçilen 4 izolatın belirlenen biyokimyasal özellikleri Tablo 2'de verilmiştir.

Sıcaklık parametresi denemelerinde genel olarak tüm izolatlar 20 ve 40°C'de en düşük absorbans değerlerini göstermişlerdir. 8 no.lu izolat hariç diğer izolatlar 30°C'de en yüksek büyüme değerlerini göstermişler, ancak 8 no.lu izolat ise 35°C'de en yüksek büyüme değerini göstermiştir. Tablo 3'de izolatların farklı sıcaklıklardaki absorbans değerleri, Şekil 1'de ise farklı sıcaklıkların büyüme üzerindeki etkileri gösterilmiştir (Tablo 3, Şekil 1). pH değerlerine bakıldığında ise bütün izolatlar pH 4' de en düşük büyüme değerlerini göstermişlerdir. İzolat 4, pH 5'te en yüksek absorbans değerini

(A 1,203) göstermiş; izolat 3, 5 ve 8 ise nötr pH 7'de en yüksek absorbanı sırasıyla 1.257, 1.116 ve 1,349 olarak göstermişlerdir. Bu pH'dan uzaklaştıkça kademeli olarak absorbanlarda düşmeler gözlenmiştir (Tablo 4, Şekil 2).

**Tablo 2.** Seçilen 4 İzolatın biyokimyasal özellikleri.

Biyokimyasal Özellikler	Izolat 3	Izolat 4	Izolat 5	Izolat 8
Gram Reaksiyon	+	+	+	+
Hareketlilik	+	+	+	+
Laktoz	-	-	-	-
D(+)Glukoz	A	A	A	A
Sukroz	A	-	A	-
H <sub>2</sub> S Üretimi	-	-	-	-
Nitrat İnd.	(+)	+	+	+
İndol Üretimi	-	-	-	-
Eskülin Hidrolizi	-	(+)	(+)	-
Oksidatif	-	-	-	-
Fermentatif	-	-	-	-

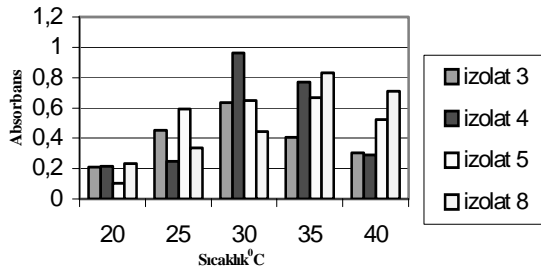
+: tipik pozitif; -: tipik negatif; (+): zayıf pozitif; A : Asit

**Tablo 3.** İzolatların farklı sıcaklıklarda büyüme değerleri.

İzolat No	Sıcaklık (°C)				
	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
3	0.210	0.452	0.637	0.404	0.305
4	0.213	0.246	0.960	0.772	0.290
5	0.101	0.592	0.650	0.667	0.523
8	0.235	0.336	0.442	0.831	0.709

**Tablo 4.** İzolatların farklı pH'larda büyüme değerleri.

İzolat No	pH Değerleri						
	4	5	6	7	8	9	10
3	0.0001	0.341	1.035	1.257	1.082	1.02	0.842
4	0.019	1.203	1.13	1.102	0.909	0.642	0.261
5	0.0049	0.338	1.14	1.16	1.038	0.824	0.716
8	0.010	0.910	1.277	1.349	1.207	1.017	0.970



**Şekil 1.** Sıcaklığın izolatların büyümesi üzerine etkisi.

İyi bir flok oluşumu için filamentli mikroorganizmaların flok oluşturucuların aktif çamurda dengede bulunması gerekmektedir. Genel olarak filamentli organizmaların aktif çamur sistemlerinde aşırı çoğalıp bulking sludge denilen şişkin çamur oluşumuna yol açması ve diğer bakterilere üstünlük sağlama nedenlerinden biri düşük pH şartları olduğundan, bizim çalışmamız da bu amaç doğrultusunda yürütülmüştür ve pH'nın filamentli organizmalar üzerine etkisinin 4 no.lu izolatta açıkça görülmektedir. Öte yandan diğer izolatların büyüme absorbanlarına da bakıldığında izolat 5 ve izolat 8'in pH 6'daki absorbanlarının pH 8'den daha yüksek olduğu açıkça görülmektedir. Bu nedenle bu iki izolatın da nötr pH'nın hemen altındaki pH'larda bazik pH'ya göre daha iyi büyüme gösterdiği belirlenmiştir.

## Kaynakça

- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984 vol 1-4. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Dodero, N. C., R. A Philips, H. Heukelekian, 1961. Isolation and Preservation of Cultures of Sphaerotilus, Appl. Microbiol. 9:365-388.
- Gerhardt *et al.*, 1981. Manual of Methods for General Bacteriology, Gerhardt, P., *et al.* (Eds). American society for microbiology, Washington, D.C., 791 p.
- Horan, N. J., A. M. Bu'Ali, C. R. Eccles, 1988. Isolation, identification and characterization of filamentous and floc-forming bacteria from activated sludge flocs, Environ. Tech. Let., 9:449-457.
- Hornsby, Horan., 1994. Isolation of Filamentous Bacteria From Activated Sludge Using Micromanipulation, Water Research, 28:2033-2034.
- Kampfer, P., 1997. Detection and Cultivation of Filamentous Bacteria from Activated Sludge, FEMS Microbiology Ecology, 23:169-181.
- Scruggs, C.E., C.W. Randall, 1998, Evaluation of Filamentous Microorganisms Growth Factor: in an Industrial Wastewater Activated Sludge System, Water Science Tech. 7: 263-270.
- Tamer, A. Ü., F. Uçar, E. Ünver, İ. Karaboz, M. Bursalıoğlu, R. Oğultekin, 1989. Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, 3. Baskı, Ege Üniv. Fen Fak. Tekstirler Serisi No:55, İzmir.
- The Prokaryotes, Second Edition, Vol I-IV, Springer Verlag, NewYork, Berlin, 1992.
- Van Veen, W. L., 1973. Bacteriology of Activated Sludge, in Particular The Filamentous Bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol., 39:139-205.
- Verstraete, W., E.V. Vaerenbergh, 1986. "Aerobik Activated Sludge", Biotechnology, Vol. 8 p.43-116, Edited by Rehm, H. J. and Reed, G., VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940, Weinheim, FRG.
- Williams, T. M., R. F. Unz, 1985. Isolation and Characterization of Filamentous Bacteria present in Bulking Activated Sludge, Appl. Microbiol Biotechnol., 22:273-282.
- Ziegler, M., M. Lange, W. Dott, 1990. Isolation and Morphological and Cytological Characterization of Filamentous Bacteria from Bulking Sludge, Appl. and Env. Microbiology, 24:1437-1451.