

ANAEROBİK AMONYUM OKSİDASYONU (ANAMMOX)

Tugba SARI* 
Bulent MERTOĞLU** 

Alınma:25.12.2018 ; düzeltme: 10.09.2019 ; kabul: 17.09.2019

Öz: Dünya atmosferinin ağırlıkça %75,5'ini, hacimce %78,06'sını oluşturan azot elementi ATP, klorofil, nükleik asitler, vitaminler gibi birçok önemli biyomolekülün yapısına katılmaktadır. Fakat azot gazı formunda (N₂) bulunan bu element, birincil üreticiler dahil canlılar için kullanılmaya elverişli formda değildir. Bu yüzden azot döngüsü yaşamın sürekliliğini sağlayan en önemli biyolojik proseslerden biridir. 1990'lı yılların sonunda anammox bakterilerinin keşfi ile birlikte azot döngüsü hakkındaki bulgular güncellenmiş olup, anammox uygulamaları günümüzde atık su arıtma tesislerinde kullanılan konvansiyonel nitrifikasyon/denitrifikasyon proseslerine alternatif bir teknoloji haline gelmiştir. Bu proses anoksik ortamda anammox bakterilerinin nitriti elektron alıcı olarak kullanarak amonyumu azot gazına dönüştürmesi olarak açıklanabilir. Şimdiye kadar, yedi anammox cinsi bulunmasına rağmen, saf kültürleri elde edilemediği için hepsine aday (*Candidatus*) statüsü verilmiştir. Buna ek olarak, bu bakteriler eşsiz metabolizmaları nedeniyle ekolojik araştırmalar ve moleküler biyoloji alanlarında bilimsel bir dönüm noktası olmuştur. Bu bağlamda, çalışmamızda anammox bakterilerinin büyümesi, hücre biyolojisi, moleküler mekanizması ile birlikte Anammox prosesinin çevre uygulamalarındaki rolü ve önemi detaylı olarak incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anammox bakterileri, Anammox metabolizması, Anammox uygulamaları

Anaerobic Ammonium Oxidation (ANAMMOX)

Abstract: The nitrogen element, which constitutes 75.5% by weight and 78.06% by volume of the Earth's atmosphere, participates in the structure of many important biomolecules such as ATP, chlorophyll, nucleic acids and vitamins. However, this element found as a form of dinitrogen gas (N₂) is not suitable form to use for living organisms, especially primary producers. Therefore, the nitrogen cycle is one of the most important biological processes that ensure the continuity of life. At the end of the 1990's, findings on the nitrogen cycle were updated along with the discovery of anammox bacteria, and anammox applications have now become an alternative technology to conventional nitrification/denitrification processes used in wastewater treatment plants. This process can be explained as a conversion of ammonium into the dinitrogen gas in anoxic environment by anammox bacteria using nitrite as an electron acceptor. Although seven anammox genera have been discovered up to now, all of them are named by the status of *Candidatus* since their pure cultures cannot be obtained. Furthermore, these bacteria have been a scientific turning point in the fields of ecological research and molecular biology due to their unique metabolism. In this context, the growth and cell biology, molecular mechanism of anammox bacteria and the role and importance of Anammox process in environmental applications were investigated in detail.

Keywords: Anammox bacteria, Anammox metabolism, Anammox applications

* Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Göztepe Kampüsü, 34722 Göztepe, İstanbul

** Sorumlu Yazar: Bülent Mertoğlu (bulent.mertoglu@marmara.edu.tr)

1. AZOT DÖNGÜSÜ VE ANAMMOX

1.1. Azot Döngüsü

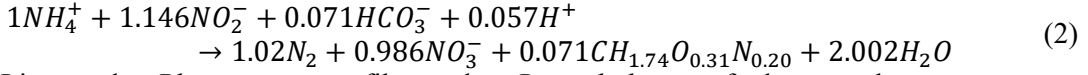
Atmosferin ağırlık olarak %75,5'ini, hacim olarak ise %78,06'sını oluşturan azot, evrende en çok bulunan element olarak bilinir (Luttrell, 2015). Deoksiribonükleik asit (DNA), protein veya enzim, ribonükleik asit (RNA), gibi önemli birçok biyomolekülün yapısında bulunduğu gibi (Denk ve diğ., 2017), canlıların kimyasal formüllerindeki ($\text{CH}_2\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,15}$) temel bileşenlerinden biridir (Jetten ve diğ., 2009). Doğada sadece azot gazı (N_2) formunda bulunan nitrojenin, N_2 formundaki üçlü bağların yıkımı için yüksek miktarda enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple, organizmalar için N_2 formu kullanılmaya elverişli değildir (Bernhard, 2010). Dolayısıyla, doğadaki nitrojeni biyosferde erişilebilir hâle getirebilmek ve daha sonra tekrar atmosfere kazanımını sağlayabilmek için birçok mikrobiyal reaksiyon gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonlar sırasında azot çeşitli oksidasyon derecelerinde bulunmaktadır (Tablo 1). Ayrıca doğadaki azotun bu devri azot döngüsü olarak adlandırılmaktadır (Kuypers ve diğ., 2018; Stein ve Klotz, 2016).

Tablo 1. Azotun yükseltgenme basamakları (Kuypers ve diğ., 2018; Stein ve Klotz, 2016)

Molekül Formülü	Molekül İsmi	Yükseltgenme Basamağı
$\text{NH}_3, \text{NH}_4^+$	Amonyak, Amonyum	-3
N_2H_4	Hidrazin	-2
NH_2OH	Hidroksilamin	-1
N_2	Azot	0
N_2O	Nitröz oksit	+1
NO	Nitrik oksit	+2
$\text{HNO}_2, \text{NO}_2^-$	Nitröz asit, Nitrit	+3
NO_2^-	Azot dioksit	+4
$\text{HNO}_3, \text{NO}_3^-$	Nitrik asit, Nitrat	+5

Azot döngüsünü oluşturan temel olarak 7 proses bulunmaktadır. Bu prosesler Şekil 1'de de gösterildiği gibi sırasıyla amonifikasyon (proses 1 veya 2), nitrifikasyon (proses 3 ve 4), denitrifikasyon (proses 6) ve anammox (proses 7) prosesleridir. Şekilde gösterilen 5 numaralı proses (nitratın nitrite indirgenmesi), proses 2, 6 veya 7 ile çiftleştirilebilir (Stein ve Klotz, 2016).

Amonifikasyon, topraktaki ölü hayvan veya bitki gibi organik maddelerin, çeşitli mantar ve prokaryotlar aracılığı ile amonyak formunda toprağa salınması olarak bilinir. Amonifikasyonun bir versiyonu olan azot fiksasyonu (proses 1) ise, azotun biyosfere bağlanma prosesidir ve bu proses döngüdeki en önemli proseslerden biridir. Çünkü azot gazı erişilebilir olmadığından dolayı, özellikle bitkiler gibi birincil üreticiler için büyüme ve enerji açısından sınırlayıcı bir besin maddesidir. Bu işlem sayesinde azot gazı mikroorganizmalar tarafından erişilebilir olan amonyak ya da amonyum formuna dönüştürülür. Azot fiksasyonu, şimşek, yıldırım gibi doğa olayları ya da endüstriyel azot üretimi (Haber-bosch prosesi) ile gerçekleştirilebildiği gibi toprakta serbest ya da simbiyotik yaşayan bakteriler tarafından da gerçekleştirilir (Bernhard, 2010; Denk ve diğ., 2017). Toprağa bağlanan amonyum iyonlarının nitrifikasyon bakterileri



Literatürde *Planctomycetes* filumunda, *Brocadiales* sınıfında tanımlanan anammox bakterilerinin günümüzde bilinen 7 cinsi vardır; "*Brocadia*", "*Kuenenia*", "*Anammoxoglobus*", "*Jettenia*", "*Scalindua*", "*Anammoxomicrobium*", "*Brasilis*". Farklı habitatlardan keşfedilen bu cinslerin çoğu atık su arıtma sistemlerinde saptanmıştır ve farklı tiplerdeki ekim çamurlarından farklı konfigürasyona sahip reaktörlerde zenginleştirilmiştir. Klasik mikrobiyolojik metotlar kullanılarak izole edilemeyen ve dolayısıyla saf kültürü bulunmayan bu cinslerin hepsine aday (*Candidatus*) statüsü verilmiştir (Pereira ve diğ., 2017; Peeters ve van Niftrik, 2019). Bu yüzden anammox ile ilgili bütün çalışmalar zenginleştirilmiş kültürler kullanılarak yapılmaktadır. Ek olarak, 2017 yılının ekim ayında yayınlanan bir makalede Dünyanın en büyük tatlı gölü olan Superior Gölü'nde daha önce keşfedilmemiş bir anammox cinsi bulunduğu raporlanmıştır (Crowe ve diğ., 2017).

Anammoxun keşfi, eşsiz metabolizması nedeniyle ekolojik araştırmalar ve moleküler biyoloji alanlarında bilimsel bir dönüm noktası olmuştur. Günümüzde birçok araştırma anammox bakterilerinin karakteristiği ve uygulama alanları üzerine odaklanmıştır.

1.2.1. Anammox Bakterilerinin Büyümesi

Literatürde anammox bakterilerinin spesifik maksimum büyüme hızı (μ_{max}) ilgi çeken konulardan biridir. Yavaş büyüyen anammox bakterilerinin ikiye katlanma süresi bir ile birkaç hafta arasında değişiklik gösterdiği gibi bu süre cinsten cinse göre de farklılık göstermektedir (Peeters ve van Niftrik, 2019). Strous ve diğ. (1998) keşfedilen ilk anammox bakterisinin (*Ca. Brocadia anammoxidans*) ikiye katlanma süresini 11 gün olarak belirlemiştir. Fakat literatürde bazı türlerde bu süre daha kısa bulunurken, bazı türlerin de büyüme hızının çok daha yavaş olduğu raporlanmıştır. Örneğin, *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* için ikiye katlanma süresi 8.3 ile 11 gün arasında değişirken, *Ca. Brocadia sinica* için 7 gün, *Ca. Brocadia sp. 40* için 2.1 gündür. Bunlara ek olarak, *Ca. Anammoxomicrobium moscowii* ve *Ca. Jettenia moscovienalis* türlerinin büyüme hızlarının çok düşük olduğu ve ikiye katlanma sürelerinin sırasıyla 32 ve 28 gün olduğu belirlenmiştir (Pereira ve diğ., 2017). İlk yapılan çalışmalarda, anammox bakterilerinin spesifik büyüme hızları 0.0033 ± 0.001 saat⁻¹ olarak belirlenmiştir. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar μ_{max} değerinin daha yüksek olabileceğini göstermiştir (Tomaszewski ve diğ., 2017). Örneğin, Lotti ve diğ. (2014a) nitrit yarı doygunluk sabitinin $35 \mu\text{g-N L}^{-1}$ 'e kadar düştüğü durumlarda μ_{max} değerini 0.21 gün⁻¹ bulmuşlardır. Fakat Zhang ve diğ. (2017) μ_{max} değerini revize ederek 37 °C'de bu değeri *Ca. Brocadia sinica* için 0.33 ± 0.02 gün⁻¹, *Ca. Jettenia caeni* için ise 0.18 gün⁻¹ bulmuşlardır. Bunların dışında yapılan çalışmalardan bazıları Tablo 2'de gösterilmektedir.

Table 2. Anammox bakterilerinin farklı sıcaklıklarda spesifik büyüme hızları ve iki katına çıkma süreleri

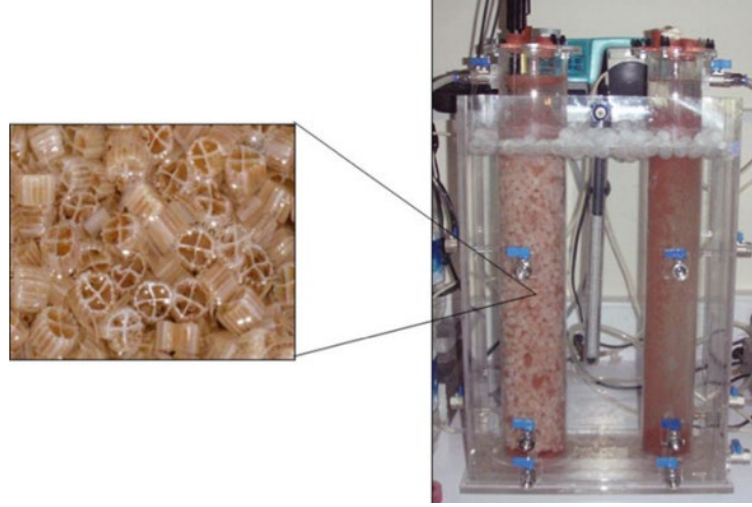
Spesifik Büyüme Hızı (gün ⁻¹)	İkiye Katlanma Süresi (gün)	Sıcaklık (°C)	Kaynak
0.190-0.130	3.6-5.4	37	(Tsushima ve diğ., 2007)
0.040	17	20	(Hendrickx ve diğ., 2012)
0.011	63	10	(Hendrickx ve diğ., 2014)
0.017	40	15	(Lotti ve diğ., 2014b)
0.020	35	20	(Lotti ve diğ., 2014c)
0.334	2.2	30	(Lotti ve diğ., 2014c)
0.140	4.9	30	(Sobotka ve diğ., 2017)

Anammox bakterilerinin büyümesi için ideal sıcaklık aralığı 20-43 °C olmasına rağmen bu bakterilerin varlığı ve aktivitesinin tespit edildiği sıcaklık aralığı çok geniştir. Çünkü anammox bakterileri 60-80 °C gibi yüksek sıcaklıktaki kaplıcalar veya hidrotermal menfezlerde bulunduğu gibi (*Ca. Kuenenia*, *Ca. Brocadia*, *Ca. Scalindua*), sıcaklığı -5 ile 4 °C arasındaki nehir ve deniz sedimanlarında da bulunmuştur (*Ca. Kuenenia*, *Ca. Brocadia*, *Ca. Jettenia*). Hatta, Japonya ve Grönland'daki deniz sedimanlarından zenginleştirilen anammox bakterilerinin optimum sıcaklıkları sırasıyla 25 ve 12 °C olarak belirlenmiştir (Tomaszewski ve diğ., 2017). Dalsgaard ve Thamdrup (2002) 37 °C'de anammox deniz türlerinde aktivite kaybı olduğunu raporlamıştır. Optimum pH aralığı 6.7-8.3 olan anammox bakterilerinin aktivite gösterdiği pH aralığı sıcaklık parametresinde olduğu gibi daha geniştir (6.7-9.3). Bununla birlikte, tatlı sularda saptanan aktif anammox bakterilerinin pH aralığının 3.88 ile 8.91 arasında olduğu raporlanmıştır. Bunun sebebi ise anammox bakterilerinin zar geçirgenliğinin düşük olmasının, bakterileri asidik ya da bazik olan ortamlarda koruduğu olarak ileri sürülmüştür (Zhu ve diğ., 2015).

Anammox bakterileri kendi substrat (NH₄⁺, NO₂⁻) konsantrasyonlarına karşı hassas bakterilerdir. Bu durum bakterilerin büyüme hızının yavaş olmasının sebeplerinden biri olabilir. Anammox prosesinin 1 g N/L amonyak konsantrasyonlarına kadar inhibe olmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte, bazı çalışmalarda yüksek amonyak konsantrasyonunun prosesi olumsuz etkilediği gözlemlenmiştir (Jin ve diğ., 2012). Amonyak inhibisyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada, amonyum için IC50 değeri 770 mg/L olarak bulunmuş ve anammox sisteminde inhibisyona serbest amonyağın neden olduğu saptanmıştır (Dapena-Mora ve diğ., 2007). Öte yandan birçok çalışma, nitrit konsantrasyonunun Anammox stabilitesi için kritik olduğunu ve belirli deney koşulları altında ciddi inhibisyona neden olduğunu doğrulamıştır. Fakat, bu çalışmalar, farklı deney koşulları ve çalışma modları altında gerçekleştirildiğinden dolayı raporlanan nitrit eşik konsantrasyonu 5 ile 280 mg N/L arasında değişiklik göstermektedir (Jin ve diğ., 2012). Strous ve diğ. (1999b) 100 mg N/L'lik nitrit çözeltisinde dağılmış Anammox biyokütle kümelerinin aktivitesini tamamen yitirdiğini bulmuştur. Isaka ve diğ. (2007) 280 mg/L'den fazla nitrit konsantrasyonunun Anammox reaksiyonunu inhibe ettiğini ancak 280 mg/L'nin altındaki nitrit konsantrasyonunun Anammox için uygun olduğunu raporlamışlardır.

Birçok araştırmada, anammox bakterilerinin zenginleştirilmesi ve miktarının artırılması amacıyla sıralı kesikli reaktörler uygulanmıştır (Kartal ve diğ., 2011a; Oshiki ve diğ., 2011; Strous ve diğ., 1998). Ayrıca, bu bakterileri kültürlenmek için, döner biyolojik kontaktörleri (Egli ve diğ., 2003), yukarı akışlı anaerobik çamur battaniyeleri (Imajo ve diğ., 2004, Ni ve diğ.,

2010) ve manuel beslemeli sistemler (Yasuda ve diğ., 2011) uygulanmıştır. Örnek anammox reaktörü Şekil 2’de gösterilmiştir.

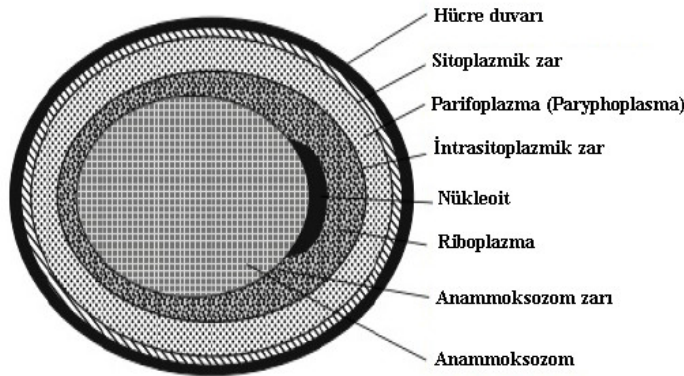


Şekil 2:

Laboratuvar ölçekli yukarı akışlı sürekli anammox reaktörü (Aktan ve diğ., 2012)

1.2.2. Hücre Biyolojisi

Anammox bakterilerinin hücre biyolojisi ile ilgili araştırmaların başlarında, transmisyon elektron mikroskobu altında bu bakterilerin *Planctomycetes* filumuna benzer bir hücre planına sahip olduğu bulunmuştur (Kartal ve diğ., 2012). Bu hücre yapısında içten dışa olmak üzere anammoksozom (anammoxosome), riboplazma ve periplazma olarak adlandırılan 3 tane bölüm bulunmaktadır (van Niftrik ve diğ., 2008a; 2008b). Ek olarak, bu bakteriler ince bir hücre duvarıyla çevrilmiştir. Bu hücre duvarı, kendisine yakın olarak konumlandırılmış sitoplazma zarı olarak da bilinen dış zar ile sarılmaktadır (Jetten ve diğ., 2009). DNA, ribozom ve glikojen granülleri gibi depolama materyalleri içeren riboplazma bölgesi, intrasitoplazmik ve anammoksozom zarları arasındaki bölgede bulunmaktadır. İntrasitoplazmik zar ile sitoplazmik zar arasında bulunan boşluk periplazma olarak isimlendirilmiştir (van Niftrik ve diğ., 2008b). Bu yapı hücredeki lokasyonundan dolayı Gram-negatif bakterileri anımsatmaktadır. Şekil 3’te Anammox hücre yapılarının belirlenen ilk şematik gösterimi verilmiştir.

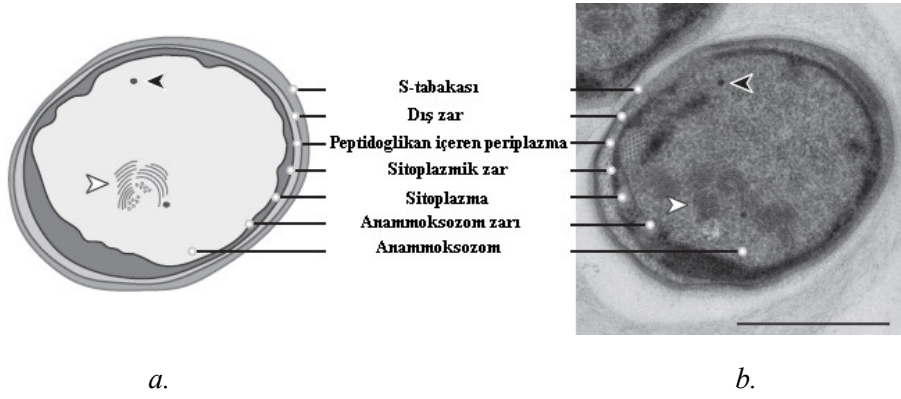


Şekil 3:

Anammox hücrelerinin ilk şematik gösterimi (Shehzad ve diğ., 2016’dan uyarlanmıştır.)

'*K. Stuttgartiensis*'de S-tabakasının ilk göstergeleri 2006 yılında bulunmuştur (Fuerst ve diğ., 2006). Ancak '*K. Stuttgartiensis*'teki hücrenin en dış tabakası olan altıgen (p6) simetriye sahip S-katmanlarının varlığı van Teeseling ve diğ. (2014) tarafından ispat edilmiştir.

2015 yılına kadar *Planctomyces* filumunun hücre yapısında, bakteri hücre duvarı polimeri olan peptidoglikan bulunmadığı biliniyordu. Dolayısıyla, tüm bakteri hücreleri arasında bunun bir istisna olduğu düşünülüyordu. *K. stuttgartiensis*'teki peptidoglikan tabakasının yeri hücrenin en dış zarında tespit edilmesinden sonra peptidoglikanın kompozisyonu, kalınlığı ve lokasyonu göz önüne alındığında *Planctomyces* şubesinin Gram-negatif bakteriler olarak yeniden tanımlanması önerilmiştir. Dahası, netice itibarıyla sonuçlar evrensel kuralları çığnemiştir ve *Planctomyces* filumunun peptidoglikan hücre duvarı eksikliği konusunda benzersiz olmadığı önerilmiştir (de Almeida ve diğ., 2015). S-tabakasının ve peptidoglikan polimerinin anammox hücrelerinde bulunmasıyla birlikte, bu bakterilerin mevcut hücre diyagramı güncellenmiştir (Şekil 4).

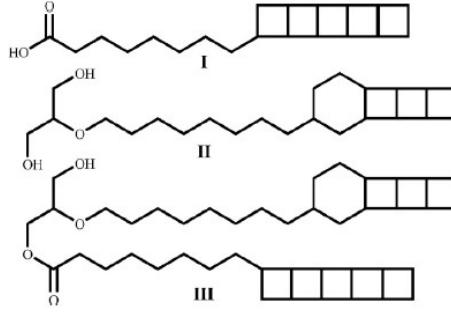


Şekil 4:

Anammox bakteri hücresinin kısımları (-500 nm) (de Almeida ve diğ., 2015'den uyarlanmıştır.)

a. Şematik gösterim b. Transmisyon elektron mikrofrafisi

Anammox hücrelerinin her bir kompartımanı çift tabakalı gliserolipitlerden oluşan zar ile çevrelenmiştir. Çift katmanlı bu yapıda, gliserol kısım ya ester bağıyla yağ asitlerine ya da eter bağıyla uzun alkol zincirlerine bağlanmıştır (Jetten ve diğ., 2009). Yağ asitleri ve alkoller, siklobütan veya sikloheksan halka yapılarıyla *cis* durumunda birbirlerine bağlanmaktadır. Bu olağanüstü zar yapısı merdiveni anımsattığı için 'ladderane' olarak adlandırılmıştır. X ve Y olmak üzere ladderane yapıyı oluşturan 2 tane halka sistemi tanımlanmıştır. Y halka sistemi, son karbonunda metil ester artığı içeren heptil zincirinin 5 tane doğrusal bağılı siklobütan halkasıyla bağ yapması sonucu oluşmuştur (Şekil 5, I). X halka sistemi ise üç siklobütan ve bir sikloheksan halkası içeren oktil zincirinin gliserole eter bağı ile bağlanmasıyla meydana gelmiştir (Şekil 5, II) (Sinninghe Damsté ve diğ., 2002; van Niftrik ve diğ., 2012).



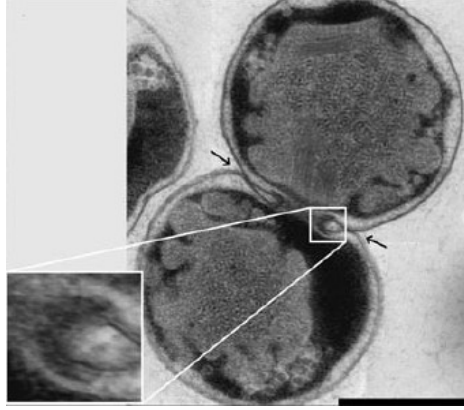
Şekil 5:

*Anammox bakterilerindeki 3 farklı karakteristik ladderane lipid yapısı (van Niftrik ve diğ., 2012)
(I: Y halka sistemi; II: X halka sistemi; III: İki sistemi de içeren ladderane gliserol eter/ester)*

Ladderane yapısı anammox bakterileri haricinde doğada başka bir canlıda bulunmamıştır. Bu yüzden doğada anammox bakterilerinin belirlenmesinde, anammox zarlarının yapısı biyo-işaret olarak kullanılmaktadır (Jaeschke ve diğ., 2007, 2009; Peeters ve van Niftrik, 2019). Buna ek olarak, anammox zarlarının toksik ya da değerli metabolitlerin difüzyonunu sınırlandırdığı düşünülmektedir (Peeters ve van Niftrik, 2019). Yoğun zarın az geçirgenliğinden dolayı hücrenin yapısal bütünlüğünü koruduğunu ve hücre konsantrasyon gradientini sürdürebilmek adına, hücre içinden dışına yayılan iyonlar ya da ara ürün olan hidrazin sınırlandırılan metabolitler olarak örnek gösterilebilir (Sinninghe Damsté ve diğ., 2002). Fakat 2014 yılında yayınlanan bir araştırma çift tabakalı ladderanelerin hidrazini zannedildiğinden daha çok geçirdiğini ileri sürmüştür (Chaban ve diğ., 2014).

Anammox zarları arasında ladderane miktarının en fazla olduğu zarın anammox hücrelerinde bütün katabolik reaksiyonların gerçekleştiği anammoksozom kompartmanını çevreleyen anammoksozom zarı olduğu bulunmuştur (van Teeseling ve diğ., 2013). Anammoksozom organeli toplam hücre hacminin %60'ını oluşturmaktadır. Ayrıca fazlaca kıvrımlı yapısından dolayı ökaryotik hücrelerdeki mitokondrinin kristasını andırmaktadır. Bu sayede zara bağlı gerçekleşen metabolik prosesler için zar üzerindeki uygun yüzey alanı da artmaktadır (van Niftrik, 2013). Çünkü anammox hücrelerinin metabolik aktiviteleri için gerekli olan enerji, ATP-sentaz enzimi tarafından üretilir. Bu nedenden dolayı anammoksozom organeli anammox hücrelerinin biyoenerjetik yeri olarak düşünülebilir (van Teeseling ve diğ., 2013).

Anammox bakterilerinin hücre bölünmesi *Planctomycetes* hücrelerinden farklıdır. Çünkü *Planctomycetes* hücreleri tomurcuklanarak çoğalırken (Fuerst, 1995), anammox hücreleri ikiye bölünerek çoğalırlar (van Niftrik ve diğ., 2009). Periplazmanın içeriği ve fonksiyonu halâ bilinmese de periplazmada yer alan hücre bölünme halkası olan bir yapı ispatlanmıştır. Periplazmada hücre bölünme halkasının görünümü, hücre bölünmesinin ilk basamağıdır. Ardından hücre duvarı kısmen içe doğru büzülür (Şekil 6) ve hücrenin elangasyonu ile birlikte hücre büyüklüğü iki katına çıkar. Bölünmenin sonunda neredeyse eşit boyutta anammoksozomu olan iki özdeş hücre oluşur (van Niftrik ve diğ., 2009). Ek olarak, birçok bakteri türünde hücre bölünme halkası FtsZ proteini tarafından oluşturulur. Ancak bu protein '*K. Stutgartensis*' genomunda bulunmamıştır. Anammox bakterilerinde hücre bölünmesi için sorumlu proteinin bulunduğu yere bağlı olarak '*K. Stutgartensis*'de kstd1438 geni tarafından kodlanabildiği düşünülmüştür (van Niftrik ve diğ., 2009; van Niftrik, 2013). Tüm bunlar açıkça gösteriyor ki anammox bakterileri karmaşık hücre planlarından dolayı kendi özgün hücre bölünmelerini geliştirmişlerdir.



Şekil 6:

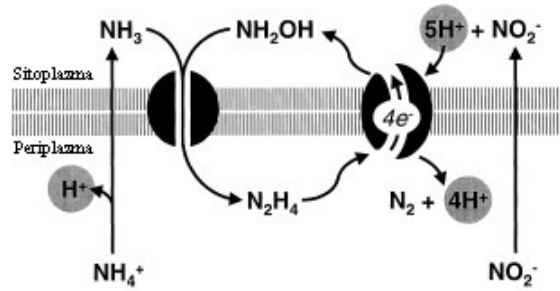
K. stuttgartiensis hücrelerinin bölünmesi sırasında elde edilmiş transmisyon elektron mikrofografisi (– 500 nm) (van Niftrik ve diğ., 2009)

2. ANAMMOX BAKTERİLERİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI

2.1. Merkezi Anammox Metabolizması

Anammox bakterilerinin anoksik ortamda amonyumu nitriti elektron alıcı olarak kullanarak azot gazına dönüştürdüğü bilinse de, 1997 yılına kadar bu bakterilerin temel reaksiyon mekanizmaları bilinmiyordu. Anammox bakterilerinin muhtemel reaksiyon mekanizmasıyla ilgili ilk kanıt hidroksilaminin (NH_2OH) anammox aktivitesi üzerine olan etkisini gözlemlemek için yaptıkları bir deney sırasında kazara bulunmuştur. Ek olarak, yapılan deney sırasında moleküler ağırlığı 32 olan ve hücrede geçici olarak biriken başka bir azotlu bileşiğin varlığına rastlamışlardır. Bu azotlu bileşiği hidrazin (N_2H_4) olarak tanımlamışlardır (van de Graaf ve diğ., 1997). Bu deney farklı bilim insanları tarafından farklı zamanlarda tekrarlanmış ve aynı sonuçlar elde edilmiştir (Strous ve diğ., 1999; Schalk ve diğ., 2000; Kartal ve diğ., 2007; 2008). Dahası, hidrosilaminin ve hidrazinin kültüre eklendiği zaman inaktif anammox kültürünü canlandırabildikleri için ikisinin de merkezi anammox metabolizmasının ara ürünleri oldukları düşünülmüyordu. Bunun sonucu olarak van de Graaf ve diğ. (1997) bu ara ürünleri kullanarak Şekil 7’de gösterilen anammox reaksiyonunu geliştirdiler.

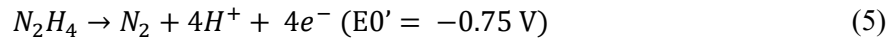
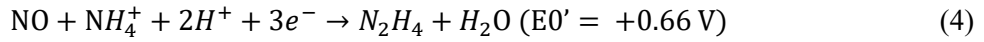
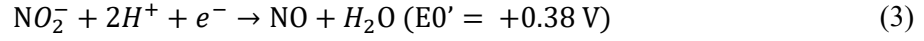
İlk aşamada hidroksilamin oksidredüktaz (HAO) enzimi ile nitrit, 4 elektron alarak hidrokasilamine indirgenmektedir. Hemen ardından hidrazinin oluşabilmesi için amonyum ve hidrosilamin tepkimeye girer. Son basamakta ise hidrazin oksitlenerek azot gazını oluşturur. Fakat ne hidroksilamin ne de hidrazin fiziksel koşullarda kanıtlanamamıştır.



Şekil 7:

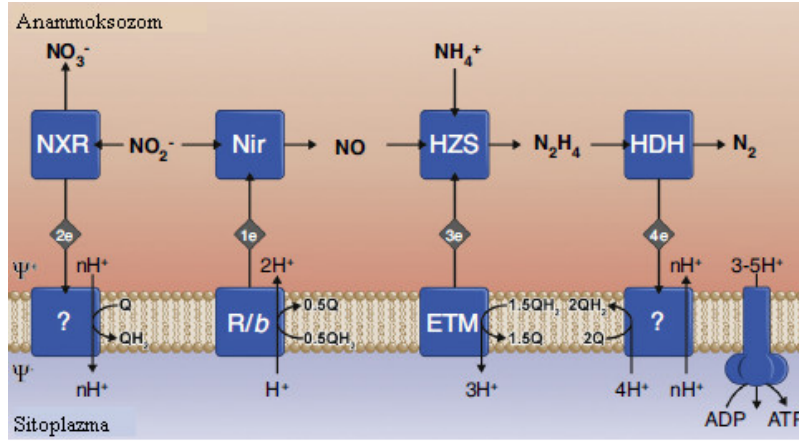
Anammox bakterilerinin oluşturulan ilk olası reaksiyon mekanizması (Jetten ve diğ., 1998'den uyarlanmıştır.)

Strous ve diğ. (2006) '*K. Stutgartiensis*' genomunu analiz etmiştir. Bu analize göre, nitriti indirgemek için hidroksilamin oksiredüktazı kodlayan bir gen yerine, nitriti nitrik okside (NO) katalize eden sitokrom cd1 nitrit redüktazı (NirS) kodlayan bir gen kümesi bulunmuştur. Bu yüzden, 3 adımlı yeni bir biyokimyasal model önermişlerdir (Peeters ve van Niftrik, 2019).



Bu yeni kimyasal modelde, nitrit öncelikle nitrik okside indirgenir (Denklem 3). Bu reaksiyonu gerçekleştiren enzimin heme d içeren NirS ya da bakır içeren NirK olduğu düşünülmektedir (Kartal ve Keltjens, 2016). Daha sonra denklem 4'te gösterildiği gibi nitrik oksit ve amonyum α , β ve γ altbirimlerinden oluşan hidrazin sentaz (HZS) ile hidrazine dönüştürülmektedir. α , β ve γ altbirimleri sırasıyla kuste2861, kuste2860 ve kuste2859 genlerinin ekspresyonundan meydana gelmiştir (Dietl ve diğ., 2015). Ayrıca, ilk iki basamaktaki reaksiyonların gerçekleşebilmesi için ihtiyaç duyulan elektronlar denklem 3'te gösterildiği gibi hidrazinden azot gazı üretimi sırasında açığa çıkan elektronlardan sağlanır. Son reaksiyon, kusc0694 ve kustd1340'ın gen ürünü olan HAO benzeri bir oktaheme proteini olan hidrazin dehidrogenaz (HDH) ile katalizlenir. Anammox metabolizmasında kullanılan bu üç enzim çözülebilir enzimlerdir. Yani, hiçbiri zara bağlı enzim değildir ve anammoksozom organelinin içinde bulunur (Şekil 8) (van Niftrik ve Jetten, 2012). Strous ve diğ. tarafından önerilen bu biyokimyasal mekanizma, Kartal ve diğ. (2011b) tarafından tam genom transkriptomik, proteomik, fizyolojik ve biyokimyasal deneylerden elde edilen sonuçlar ile doğrulanmıştır. Buna ek olarak, N_2H_4 ve NO ara ürünleri, nitritin ^{15}N -etiketlemesi, kombine edilmiş inhibisyon çalışmaları ve hücrelerin floresan etiketlenmesi ile doğrulanmıştır (Kartal ve diğ., 2013).

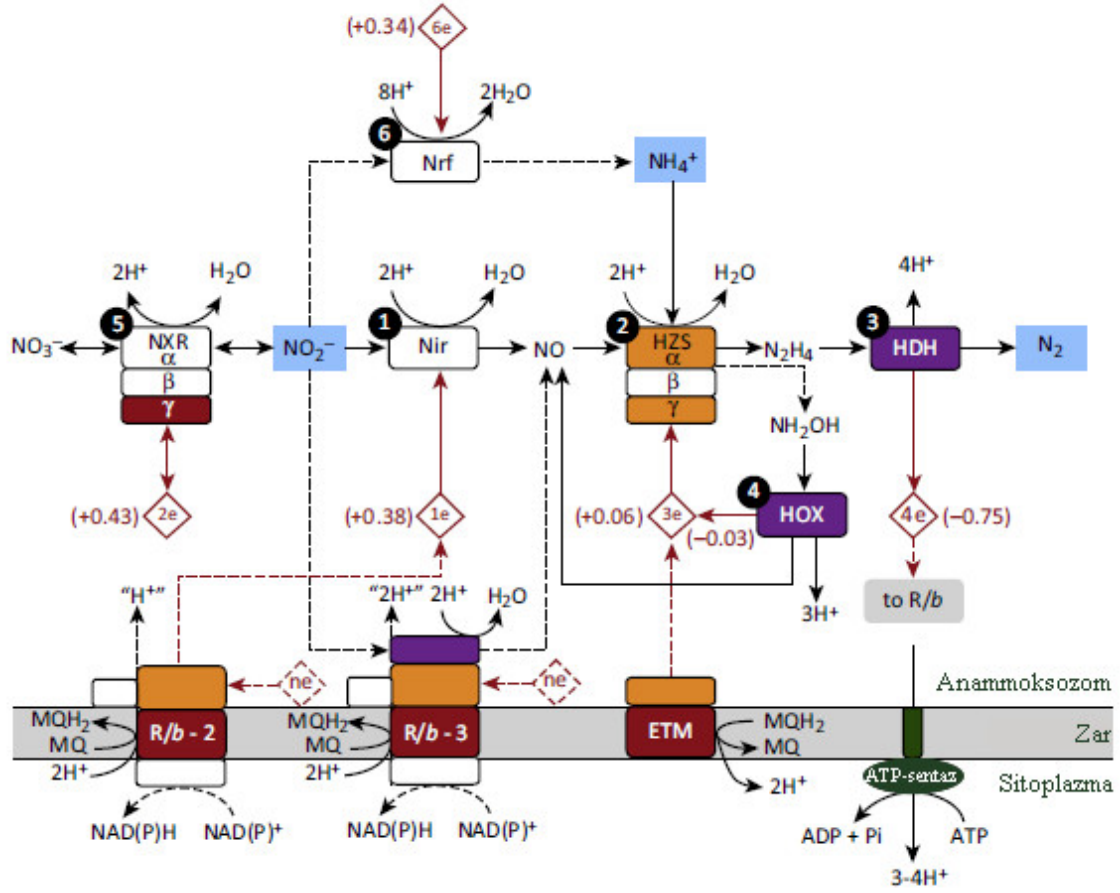
Anammox hücrelerinde anammoksozom zarı boyunca oluşan elektrokimyasal potansiyel gradientinin sabit tutulabilmesi için anammox metabolizması ve enerji korunumu arasında bir ilişki olduğu bulunmuştur. Döngüsel anammox yolundaki elektronlar varsayılan elektron taşıyıcıları ile taşınmaktadır. Farklı reaksiyonlar arasındaki elektron transfer olayları solunum kompleksleri ve elektron transfer modülü (ETM) ile gerçekleştirilmektedir (Şekil 8) (Kartal ve diğ., 2013).



Şekil 8:

Güncel ve basitleştirilmiş anammox metabolizması (Ferrousi ve diğ., 2017'den uyarlanmıştır.) (NXR: Nitrat redüktaz; Nir: Nitrit redüktaz; HZS: Hidrazin sentaz; HDH: Hidrazin dehidrogenaz; ETM: Elektron transfer modülü; R/b: Rieske-heme kompleksi; ψ^- ve ψ^+ : Zarın negatif ve pozitif tarafı)

Anammox metabolizmasındaki elektron döngüsünü sağlayan elektron taşıyıcıları, c-tipi heme ve mavi bakır proteinleri olarak kabul edilmiştir (Kartal ve Keltjens, 2016). Denklem 5'te türetilen 4 adet düşük potansiyelli elektronlar 2 tane yeni bulunmuş Rieske-heme *b* komplekslerini (*R/b*; *bc1* kompleksleri) besler. Bu kompleksler sırasıyla kuste1480-85 ve kuste4569-74 genlerinin ürünü olan *R/b-2* ve *R/b-3* kompleksleridir (Şekil 9). Menakinon-7'nin (MQ) menakinona (MQH₂) indirgenmesi sırasında, solunum komplekslerinde anammoxom zarından proton transferi gerçekleştirilir. Böylece protonu harekete geçirme kuvveti (proton motive force) oluşur. Bu olay da hem membrana bağlı H⁺-bağımlı F₁F₀-ATP sentaz (ATP-sentaz I) enziminin ATP sentezlemesine yol açar hem de NAD(P)⁺'nin NAD(P)H'ye indirgenmesini sağlar. Rieske/*cytb* solunum kompleksleri anammox enerji metabolizmasının merkezi olarak düşünülebilir. Çünkü termodinamik olarak uygulanabilir karmaşık prosesi gerçekleştirebilen sorumlu yapılar bu komplekslerde bulunmaktadır. Ayrıca kuste2855-56 gen ürünü olan ETM protein kompleksi, N₂H₄ ve NO sentezinde kullanılacak olan elektronları çevrimsel elektron akışından MQH₂'nin oksidasyonu ile tedarik etmektedir (de Almeida ve diğ., 2016). NAD(P)⁺'nin indirgenmesi sırasında kullanılan elektronlar da α , β , γ altbirimlerini içeren nitrit: nitrat oksidoreduktaz (NXR) enzimiyle nitritin nitrate oksidasyonu sayesinde yenilenmektedir. Altbirimler sırasıyla kuste1700/03/04 genlerini temsil etmektedir (de Almeida ve diğ., 2015). Bu yenileme aynı zamanda diğer bazı organik veya inorganik elektron vericilerin oksidasyonu sayesinde de gerçekleştirilir (Kartal ve diğ., 2013). Bunların yanı sıra nitrit, anammoxomda NrfA'nın bir varyantı veya yeni bir enzim olan dissimilatory nitrit redüktaz (Nrf) (pentaheme sitokrom c) ile amonyuma indirgenir (Şekil 9) (Kartal ve Keltjens, 2016).



Şekil 9:

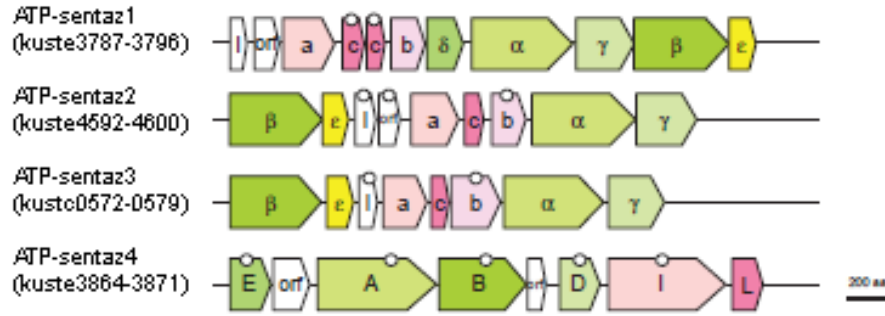
Detaylı anammox metabolizması (Kartal ve Keltjens, 2016'dan uyarlanmıştır.)
 (Siyah yuvarlaklar içindeki numaralar reaksiyonun sırasını gösterir. Nir: Nitrit redüktaz; HZS: Hidrazin sentaz; HDH: Hidrazin dehidrogenaz; HOX: Hidroksilamin oksidaz; NXR: Nitrit:nitrat oksiredüktaz; Nrf: Dissimilatory nitrit redüktaz; R/b, R/b-2, R/b-3: Rieske-heme b kompleksleri; ETM: Elektron transfer modülü; MQ: menakinon-7; MQH₂: Menakinon; Siyah ok: Substrat (amonyum ve nitrit) akışı; Kırmızı ok: Elektron akışı; Kırmızı baklava işareti: Taşınan electron; Kesikli çizgi: Tespit edilmesi gereken reaksiyonlar veya prosesler; Kırmızı, mor, turuncu: Sırası ile heme b, c-tipi octaheme ve multiheme proteinleri)

2.2. ATP Sentezi

'*K. Stutgartiensis*' genomundan 4 farklı ATP-sentaz enzimi (ATP-sentaz1, ATP-sentaz2, ATPsentaz3 ve ATPsentaz4) kodlanır (Şekil 10). '*K. Stutgartiensis*' türünde ATP sentezi için kullanılan ana enzim olan ATP-sentaz1, kuste3787-3796 gen ürünüdür. ATP-sentaz2, 3 ve 4 enzimleri sırasıyla kuste4592-4600, kuste0572-0579 ve kuste3864-3871 genleri ürünleridir. Ayrıca ATP-sentaz4, prokaryotik V-tipi ATP-sentaz enzimidir (van Niftrik ve diğ., 2010). ATP-sentaz2 ve 3, δ altbirimine sahip değildirler ve ek olarak 1 veya 2 tip membran altbirimlerini içerirler (AtpQ, kuste4594 ve kuste0574); AtpR, kuste4595). Bunun yanı sıra, bu enzimler F-ATP-sentaz olarak da bilinirler (van Niftrik ve diğ., 2010) ve sodyum (Na⁺) pompalayan ATP-sentaz hidrolazları gibi rol oynarlar (de Almeida ve diğ., 2016). Anammox hücrelerinin sitoplazmik membranlarında az miktarda ATP-sentaz1 enzimi bulunsa da bu enzim esasen anammoksozomda bulunmaktadır. '*K. Stutgartiensis*' genomundaki 4 ATP-sentaz enzimi resmedilen Şekil 10'da, gen ürünleri ATP-sentaz ile bağlantılı homolog altbirimlere göre

etiketlenmiştir. Üst kısımlarında beyaz çember ile etiketlenmiş olan genler, bilinmeyen proteinleri veya bilinen fakat benzer sekans uzunluklarına sahip olmayan proteinleri ifade etmektedir.

De Almeida ve diğ. (2016) NAD(P)H ile kuinonun indirgenmesinin 2 farklı solunum kompleksi tarafından yürütüldüğünü ispatlamıştır. Bunlardan biri proton pompalayan enzim iken diğeri bağlama iyonu olarak sodyum (Na^+) kullanan enzimdir (Na^+ -NQR). Kullanılan Na^+ iyonunun, Na^+ -NQR aksiyonu ve muhtemelen sodyum pompalayan N-ATP-sentazların etkisi ile birlikte sodyumu harekete geçirme kuvveti (sodium motive force (smf)) oluşturduğu iddia edilmiştir. Fakat smf termodinamik kuralları yönünden hücre karbon metabolizması için feredoksinin indirgenmesine yol açar (Peeters ve van Niftrik, 2019).



Şekil 10:

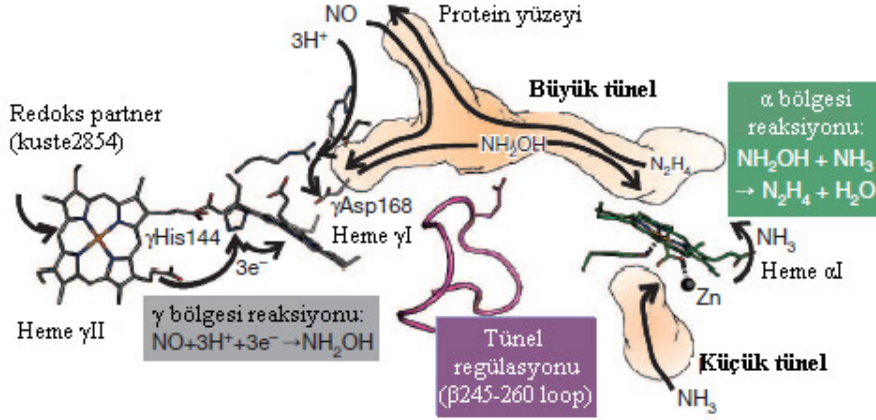
'K. Stutgartiensis' genomundan kodlanan 4 farklı ATP-sentaz gen kümesinin karşılaştırılması (Kartal ve diğ., 2013'den uyarlanmıştır.) (orf: açık okuma çerçevesi; aa: amino asit)

2.3. Hidrazin Sentezi

Hidrazin son derece reaktiftir ve bu yüzden roket yakıtı olarak kullanılan zehirli bir bileşiktir. Anammox bakterileri hidrazini azot gazı üretebilmek için ara madde olarak kullanırlar. Hücrede hidrazin oluşumu multiprotein kompleksi olan hidrazin sentaz enzimi (HZS) aracılığıyla gerçekleştirilir (Denklem 4) (Strous ve diğ., 2006). 2015 yılına kadar, hidrazin sentezinin enzimatik metabolizması bilinmiyordu. Dietl ve diğ. 'K. Stutgartiensis'ten multienzim kompleksini izole etmişlerdir ve hidrazin sentezi mebolizmasının detaylı yapısını doğrulamışlardır (Dietl ve diğ., 2015). Anammox bakterilerinin %20'lik protein tümlecini oluşturan HZS enzimi kuste2854-61 gen kümesinin bir parçası olan kuste2859-61 genlerinden kodlanmaktadır (Kartal ve Keltjens, 2016). Sırasıyla kuste2861, -2859 ve -2860 gen ürünleri olan α , β , ve γ altbirimlerinden oluşan HZS, $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ stokiyometrisine sahiptir. Tüm altbirimler 4 heme, 1 çinko iyonu ve birkaç kalsiyum iyonu içermektedir (Dietl ve diğ., 2015).

Dietl ve diğ. (2015) çalışmalarında biyolojik olarak hidrazinin üretilmesini detaylı bir şekilde açıklamıştır (Şekil 11). Heme αI ve heme γI 'nin aktif bölgeleri, iki yönde bölünen tünel sistemleri ile birbirine bağlıdır; bunlardan biri protein yüzeyine doğrudur, diğeri ise substrat ve ürünün giriş ve çıkışına izin verir. Tüneler β 245-260 döngüsü (loop) tarafından düzenlenir. Bu bağlantı göz önüne alındığında, iki yarım reaksiyon önerilmektedir. Birinci bölüm, redoks partnerinden (triheme sitokrom c) elde edilen 3 elektron ile γI alanında nitrit oksidin (+2 oksidasyon derecesi) hidroksilamine (-1 oksidasyon derecesi) indirgenmesi anlamına gelir (Denklem 6). Bu reaksiyonun amacı hidrazinde bulunan azot atomlarının -2 oksidasyon derecesine ulaşmasını sağlamaktır. Daha sonra, hidroksilamin tünelden α bölgesine yayılır ve burada, hidrazin sentezi gerçekleşir (Denklem 7). Bu reaksiyon 'comproportion reaksiyonu' olarak adlandırılmıştır. Reaksiyonun substratlarından biri olan amonyak küçük tünel aracılığı ile

tedarik edilir. Son olarak hidrazin, protein yüzeyine doğru olan tünelden salınır (Kartal ve Keltjens, 2016).



Şekil 11:

Biyolojik hidrazin sentezinin önerilen mekanizmasının şematik gösterimi (Dietl ve diğ., 2015'den uyarlanmıştır.)

Hidrazin, endüstride Raschig prosesi ile üretilmektedir. Bu proses, eşsiz olan biyolojik hidrazin sentezi mekanizmasına çok benzemektedir. Rasching mekanizmasında, hidroksilamin yerine kloramin (NH_2Cl) kullanılmaktadır; dolayısıyla amonyak kloramin ile reaksiyona girmektedir (Dietl ve diğ., 2015).

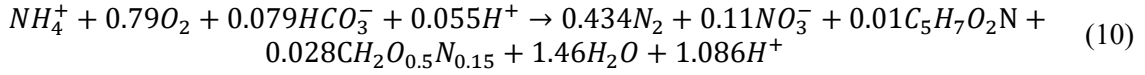
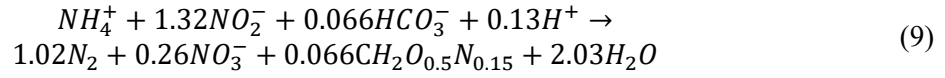
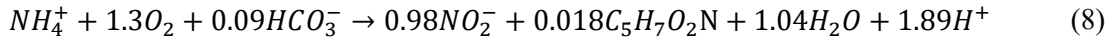
Son olarak, HZS canlı dışında olduğu zaman yavaş bir enzimdir. Çünkü 'K. Stuttgartiensis'ten izole edilmiş olan HZS enziminin spesifik aktivitesi 20 nmol/h/mg protein olarak bulunmuştur. Bu deney sırasında, hücrenin parçalanmasının ardından enzim aktivitesinde %90 oranında bir kayıp gözlemlenmiştir. Enzimin inaktif olması veya eşsiz kompleks yapısının bozulması bunun sebepleri olarak düşünülmektedir (Dietl ve diğ., 2015).

3. ANAMMOX BAKTERİLERİNİN ÇEVRE UYGULAMALARI

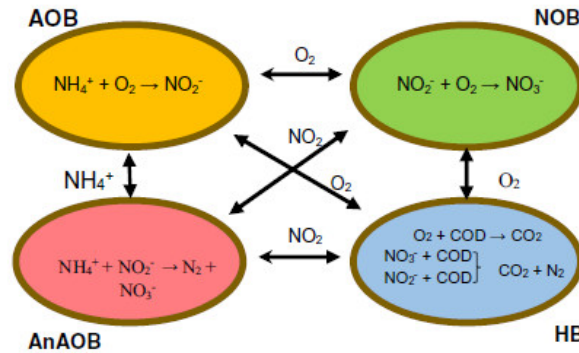
Amonyumun nitrit aracılığıyla direkt olarak azot gazına dönüştürülebilmesi nedeniyle, anammox uygulamaları özellikle endüstriyel ve kentsel atık su arıtma sistemlerinde uygulanmaya başlanmıştır (Kuenen, 2008). %100 organik madde tüketimini, %60 havalandırma maliyetini ve %80 çamur üretimini azaltması ve ayrıca sera gazı emisyonunun daha az olması bu prosesin beraberinde getirdiği avantajlardır. Bu nedenle, Anammox prosesi konvansiyonel nitrifikasyon/denitrifikasyon prosesiyle karşılaştırıldığı zaman, büyük ölçüde maliyeti düşürmektedir (Cao ve diğ., 2017). Bu prosesin düşük maliyetli ve çevre dostu olması özellikleri göz önüne alındığında, Anammox prosesi çamur digester sıvıları (Zhang ve diğ., 2015), çöp depolama sızıntı suyu (Miao ve diğ. 2014; Miao ve diğ., 2019; Wang ve diğ., 2016), monosodyum glutamat atıksuyu (Gonzalez-Martinez ve diğ. 2018; Shen ve diğ., 2012), siyah atıksu (DeGraaff ve diğ., 2011), hayvan gübresi digester likörü (Yamamoto ve diğ., 2011), patates işleme endüstrisi atıksuları (Gonzalez-Martinez ve diğ., 2015) ve semikondüktör fabrika atıksuları (Daverey ve diğ., 2012; 2013) gibi farklı tip endüstriyel atıksuların arıtım proseslerine başarıyla entegre edilmiştir (Li ve diğ., 2018). Fakat, anammox bakterilerinin

büyümesi için gerekli olan iz element ve besinlerin az miktarda ve ayrıca bazı toksik bileşiklerin yüksek miktarda bulunduğu farmasötik atıksular gibi endüstriyel atıksuların arıtımı ise Anammox prosesi ile zorlayıcı olmaktadır (Daverey ve diğ., 2012; Tang ve diğ., 2011). Ancak, bu prosenin beraberinde getirdiği yeniliklerden dolayı Anammox prosesinin farklı tip endüstriyel atıksulara entegrasyonu ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Tang ve diğ., 2011).

Anammox'un ilk ve temel uygulaması deamonifikasyon prosesi olarak da bilinen kısmi nitrifikasyon/anammox (PN/A) uygulamasıdır. Bu süreçte, amonyum öncelikle amonyum oksitleyen bakteriler (AOB) tarafından nitrite dönüştürülür (Denklem 8); ardından, nitrit, anammox bakterileri tarafından azot gazına çevrilir (Denklem 9) (Lackner ve diğ., 2014). Aynı zamanda bu reaksiyonlar kombine edilmiştir (Denklem 10) (Qian ve diğ., 2017).



PN/A sistemlerde, oksijenli ortamda nitriti nitrata dönüştürebilen nitrit oksitleyen bakterilerle (NOB) ilgili kaygı duyulmaktaydı (Lackner ve diğ., 2014). Çünkü NOB, nitriti substrat olarak kullanabildiği için anammox bakterilerine, oksijeni kullanabildiği için de AOB'ye potansiyel rakiptir (Şekil 12) (Cao ve diğ., 2017). Ortamdaki oksijen miktarı limitlenerek (Blackburne ve diğ., 2008) ve çamur bekletme süresi minimum seviyede tutularak (Hellings ve diğ., 1998) bu problemin üstesinden gelinmiştir.

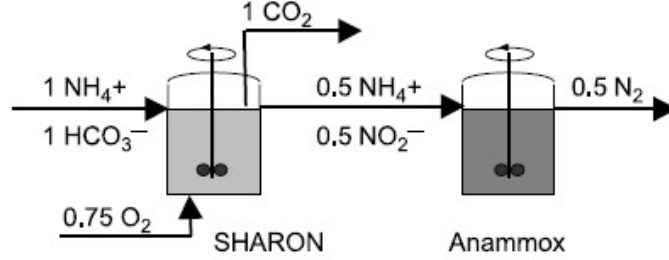


Şekil 12:

*Farklı mikroorganizmalar arasındaki substrat yarışması (Cao ve diğ., 2017)
(AOB: Amonyum oksitleyen bakteriler; NOB: Nitrit oksitleyen bakteriler; AnAOB: Anammox bakteriler; HB: Heterotrofik bakteriler)*

PN/A sistemlerinde, sıralı kesikli reaktörler, tanecikli çamur reaktörü, hareketli yataklı biofilm reaktörü, hibrit reaktör gibi çeşitli reaktörler kullanılabilir. PN/A sistemler, tek kademeli (CANON, ANITA MOX) veya iki kademeli (SHARON-anammox) (Şekil 13) olarak kategorize edilebilirler (Cao ve diğ., 2017; Gonzalez-Martinez ve diğ., 2018). Her iki sistemin de

avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin, tek kademeli sistemlerin altyapı ve operasyon maliyetleri az olduğu gibi, atmosfere daha az miktarda nitroz oksit yayarlar (Kampschreur ve diğ., 2009; Pérez ve diğ., 2014; Wett ve diğ., 2013). İki kademeli sistemlere gelince, bu tarz sistemlerde ayrı reaktörlerin optimizasyonu (Isanta ve diğ., 2015) ve anammox bakterileri için anoksik bir ortam yaratmak (Pérez ve diğ., 2014) daha kolaydır.



Şekil 13:

SHARON-anammox sisteminin gösterimi (Volcke ve diğ., 2005)

Tam ölçekli ilk PN/A sistem (2 kademeli), Hollanda, Rotterdam'da kurulmuştur. Lackner ve diğ. (2014) PN/A sistemlerde en çok kullanılan reaktör tipi olan sıralı kesikli reaktörlerin, kurulan tesislerin %50'sinden fazlasında bulunduğunu raporlamıştır. Buna ek olarak, tüm tesislerin %88'inin tek kademeli PN/A sistem kullandıkları ifade edilmiştir. Şimdiye kadar, kadar Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'da 200'den fazla tam ölçekli tesis kurulmuştur (Cao ve diğ., 2017) ve her tesis, PN/A stratejisine göre farklı konseptler ve reaktör konfigürasyonları kullanmaktadır (Lackner ve diğ., 2014). Türkiye'de Anammox prosesinin kullanıldığı tam ölçekli atıksu arıtma tesisi bulunmamakta olup 4 adet pilot tesis vardır. Bu tesislerden iki tanesi Bursa'da yer almaktadır. Bunlar, Bursa Doğu Atıksu Arıtma Tesisi (AAT) Ana akım 2 aşamalı deamonifikasyon granüler pilot tesisi (Uflaz, 2018) ve Bursa Doğu AAT ana akım deamonifikasyon hareket yataklı biyofilm reaktörü (HYBR) pilot tesisleridir. Diğer 2 tesis de Ataköy Atıksu Arıtma Tesisi'nde yer almakta olup biri henüz kuruluş aşamasındadır. Diğerisi ise Ataköy AAT Ana akım deamonifikasyon HYBR pilot tesisidir (Celik, 2018).

PN/A sistemi dışında, Anammox prosesi baz alınarak başka sistemler de geliştirilmiştir. Bu sistemlerden birisi SNAD olarak bilinen aynı anda kısmi nitrifikasyon, anammox ve denitrifikasyon proseslerinin gerçekleştirildiği sistemdir (Chen ve diğ., 2009; Wang ve diğ., 2010). Anammox prosesi boyunca, giriş atık suyundaki amonyum konsantrasyonu az olsa bile, çıkış atık suyunda nitrat birikebilmektedir. Örneğin, suyun içindeki 1,32 nitrit/amonyak oranı, toplam azotun %11'nin nitrata dönüşmesine sebep olabilir. Bu durumda, çıkış suyu boşaltılmadan önce nitratin uzaklaştırılması gerekmektedir. Sistemdeki çözünmüş oksijen konsantrasyonunun artması bu soruna neden olabilir (Wen ve diğ., 2016). SNAD sistem sayesinde, tüm reaksiyonlar aynı reaktörde gerçekleştirilebilir. Bu sistemde, amonyum öncelikle AOB'ler tarafından oksitlenir, hemen ardından da oluşan nitrit hem denitrifikasyon hem de anammox bakterileri tarafından kullanılabilir.

Kurulan sistemlerden ikincisi ise DEAMOX (denitrifikasyon/anammox) sistemleridir. Bu sistem, temel olarak evsel atık sularında bulunan azotu verimli bir şekilde uzaklaştırmak için kurulmuştur (Kalyuzhnyi ve diğ., 2006; Kalyuzhnyi ve Gladchenko, 2009). Bu teknoloji üç çeşit reaktörden oluşur. İlk reaktör sülfid ve amonyumun heterotrofik bakteriler tarafından üretildiği anaerobik reaktör, ikinci reaktör ise yüksek miktarda nitrat az miktarda nitritin üretildiği nitrifikasyon reaktörüdür. Son reaktör ise DEAMOX reaktörü olarak adlandırılan kısmi denitrifikasyon ve anammox işlemlerinin gerçekleştirildiği reaktördür (Dezotti ve diğ., 2018). Sülfat elektron verici olarak kullanılarak, heterotrof bakteriler tarafından nitrat nitrite

dönüştürülür. Böylece, anammox bakterileri reaktörde nitritten faydalanarak azot gazı oluştururlar. Bu prosesin bulunmasının ardından, sülfat yerine uçucu yağ asitlerinin kullanılmasıyla ilgili çalışmalar yapılmıştır. Fakat sonuçlar reaksiyon verimliliğinin düştüğünü göstermiştir (Kalyuzhnyi ve diğ., 2008).

4. DEĞERLENDİRME

1990'lı yılların sonunda keşfedilen anammox reaksiyonu, amonyumu direkt olarak azot gazına çevirebilmesi nedeniyle azot döngüsüyle ilgili mevcut kalıpları kırmış olup çevre biyoteknolojisi alanında önemli bir etki yaratmıştır. Metabolizmasında ara ürün olarak toksik bir madde olan hidrazin üretiminin yanı sıra hem hücre zarı yapısındaki hem metabolizmasındaki eşsizliğiyle moleküler biyoloji alanında da ilgi çeken çalışma konularından biri hâline gelmiştir. Şimdiye kadar 7 türü tespit edilen anammox bakterilerinin saf kültürü bulunmadığından tüm türlere *Candidatus* statüsü verilmiştir. Anammox bakterilerinin saf kültür olarak henüz elde edilememesi, bu bakterilerin metabolik yollarının araştırılmasını ve pratik uygulamalarda kullanılmasını ciddi şekilde kısıtlamaktadır. Bu kısıtlama anammox bakterileri ile yapılan laboratuvar ve büyük ölçekteki çalışmalarda hedeflerin sınırlı ve verimin düşük olmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle, henüz kültüre edilememiş olan anammox bakterilerinin saf kültür olarak elde edilmesi üzerinde çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Konvansiyonel nitrifikasyon/denitrifikasyon prosesiyle karşılaştırıldığı zaman maliyeti ciddi ölçüde azaltması nedeniyle dünya üzerinde şu anda çoğu Avrupa ülkelerinde olmak üzere 200'den fazla tam ölçekli Anammox prosesi uygulaması bulunmaktadır. Fakat düşük büyüme hızına sahip ve çevresel koşullara hassas olan bu bakteri türü için bazı endüstriyel atıksuların arıtımı zorlayıcı olmaktadır. Bu prosesin beraberinde getirdiği yeniliklerden dolayı gerek anammox bakterilerinin adaptasyonu gerekse farklı tip reaktör konfigürasyonları üzerinde çalışmalara ağırlık verilmelidir.

Türkiye'de biri kurulum aşamasında olan sadece 4 tane Anammox pilot tesisi bulunmaktadır. Bunun dışında laboratuvar ölçekli önemli çalışmalar yapılmıştır (Akgul, D. ve diğ., 2013; Erdim ve diğ., 2019; Güven ve diğ., 2005; Kalkan Aktan ve diğ., 2018; Kocamemi ve diğ., 2018; Yapsakli ve diğ., 2017). Laboratuvar ve pilot ölçekli çalışmalardan elde edilen sonuçlar ölçek büyütülerek tekrarlanmalıdır. Gerçek ölçekli çalışmalar evsel atıksu arıtma tesislerinden ziyade amonyum konsantrasyonunun yüksek olduğu endüstriyel atıksularla gerçekleştirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Akgul, D., Aktan, C.K., Yapsakli, K. ve Mertoglu, B. (2013) Treatment of landfill leachate using UASB-MBR-SHARON-Anammox configuration, *Biodegradation*, 24(3), 399-412. doi: 10.1007/s10532-012-9597-y
2. Aktan, C.K., Yapsakli, K. ve Mertoglu, B. (2012) Inhibitory effects of free ammonia on Anammox bacteria, *Biodegradation*, 23, 751–762. doi: 10.1007/s10532-012-9550-0
3. Bernard, A. (2010) The nitrogen cycle: processes, players and human impact, *Nature Education Knowledge*, 3(10), 25.
4. Blackburne, R., Yuan, Z. ve Keller, J. (2008) Partial nitrification to nitrite using low dissolved oxygen concentration as the main selection factor, *Biodegradation*, 19(2), 303-312. doi: 10.1007/s10532-007-9136-4
5. Broda, E. (1977) Two kinds of lithotrophs missing in nature, *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 17(6), 491-493. doi: 10.1002/jobm.3630170611
6. Cao, Y., van Loosdrecht, M.C. ve Daigger, G.T. (2017) Mainstream partial nitritation-anammox in municipal wastewater treatment: status, bottlenecks, and further studies,

- Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(4), 1365-1383. doi: 10.1007/s00253-016-8058-7
7. Celik, S. (2018). Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) in a moving bed biofilm reactor (MBBR) for sidestream treatment: A pilot study in Istanbul Atakoy Sewage Treatment Plant (STP), *Yüksek Lisans Tezi*, M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
 8. Chaban, V.V., Nielsen, M.B., Kopec, W. ve Khandelia, H. (2014) Insights into the role of cyclic ladderane lipids in bacteria from computer simulations, *Chemistry and Physics of Lipids*, 181, 76-82. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2014.04.002
 9. Chen, H., Liu, S., Yang, F., Xue, Y. ve Wang, T. (2009) The development of simultaneous partial nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) process in a single reactor for nitrogen removal, *Bioresource Technology*, 100(4), 1548-1554. doi: 10.1016/j.biortech.2008.09.003
 10. Crowe, S.A., Treusch, A.H., Forth, M., Li, J., Magen, C., Canfield, D.E., Thamdrup, B. ve Katsev, S. (2017) Novel anammox bacteria and nitrogen loss from Lake Superior, *Scientific Reports*, 7(1), 13757. doi: 10.1038/s41598-017-12270-1
 11. Dalsgaard T. ve Thamdrup B. (2002) Factors controlling anaerobic ammonium oxidation with nitrite in marine sediment, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3802-3808. doi: 10.1128/AEM.68.8.3802-3808.2002
 12. Dapena-Mora, A., Fernandez, I., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Méndez, R. ve Jetten, M.S.M. (2007) Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production, *Enzyme Microbial Technology*, 40, 859-865. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.06.018
 13. Daverey, A., Su, S.H., Huang, Y.T. ve Lin, J.G. (2012) Nitrogen removal from optoelectronic wastewater using the simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonium oxidation and denitrification (SNAD) process in sequencing batch reactor, *Bioresource Technology*, 113, 225-231. doi: 10.1016/j.biortech.2011.12.004
 14. Daverey, A., Su, S., Huang, Y., Chen, S., Sung, S. ve Lin, J. (2013). Partial nitrification and anammox process: A method for high strength optoelectronic industrial wastewater treatment, *Water Research*, 47, 2929-2937. doi: 10.1016/j.watres.2013.01.028
 15. de Almeida, N.M., Neumann, S., Mesman, R.J., Ferousi, C., Keltjens, J.T., Jetten, M.S.M., Kartal, B. ve Niftrik, L.V. (2015) Immunogold localization of key metabolic enzymes in the anammoxosome and on the tubule-like structures of *Kuenenia stuttgartiensis*, *Journal of Bacteriology*, 197(14), 2432-2441. doi: 10.1128/JB.00186-15
 16. de Almeida, N.M., Wessels, H.J., de Graaf, R.M., Ferousi, C., Jetten, M.S., Keltjens, J.T. ve Kartal, B. (2016) Membrane-bound electron transport systems of an anammox bacterium: a complexome analysis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1857(10), 1694-1704. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.07.006
 17. DeGraaff, M.S., Vieno, N.M., Kujawa-Roeleveld, K., Zeeman, G., Temmink, H. ve Buisman, C.J.N. (2011) Fate of hormones and pharmaceuticals during combined anaerobic treatment and nitrogen removal by partial nitritation-anammox in vacuum collected black water, *Water Research*, 45, 375-383. doi: 10.1016/j.watres.2010.08.023
 18. Denk, T.R.A., Mohn, J., Decock, C., Lewicka-Szczebak, D., Harris, E., Butterbach-Bahl, K., Kiese, R. ve Wolf, B. (2017) The nitrogen cycle: a review of isotope effects and isotope modeling approaches, *Soil Biology and Biochemistry*, 105, 121-137. doi: 10.1016/j.soilbio.2016.11.015

19. Dezotti, M., Lippel, G. ve Bassin, J.P. (2018) *Advanced Biological Processes for Wastewater Treatment*, Springer, İsviçre. doi: 10.1007/978-3-319-58835-3
20. Dietl, A., Ferousi, C., Maalcke, W.J., Menzel, A., de Vries, S.D., Keltjens, J.T., Jetten, M.S.M., Kartal, B. ve Barends, T.R. (2015) The inner workings of the hydrazine synthase multiprotein complex, *Nature*, 527(7578), 394-397. doi: 10.1038/nature15517
21. Egli, K., Bosshard, F., Werlen, C., Lais, P., Siegrist, H., Zehnder, A. ve Van der Meer, J.V. (2003) Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon, *Microbial Ecology*, 45(4), 419-432. doi: 10.1007/s00248-002-2037-5
22. Erdim, E., Yücesoy Özkan, Z., Kurt, H. ve Alpaslan Kocamemi, B. (2019) Overcoming challenges in mainstream Anammox applications: Utilization of nanoscale zero valent iron (nZVI), *Science Total Environment*, 651(Pt 2), 3023-3033. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.140
23. Ferousi, C., Lindhoud, S., Baymann, F., Kartal, B., Jetten, M.S. ve Reimann, J. (2017) Iron assimilation and utilization in anaerobic ammonium oxidizing bacteria, *Current Opinion in Chemical Biology*, 37, 129-136. doi: 10.1016/j.cbpa.2017.03.009
24. Fuerst, J.A. (1995) The planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology, *Microbiology*, 141(Pt 7), 1493-1506. doi: 10.1099/13500872-141-7-1493
25. Fuerst, J.A., Webb, R.I., van Niftrik, L., Jetten, M.S.M. ve Strous, M. (2006) *Microbiology Monographs Volume 2: Complex Intracellular Structures in Prokaryotes*, Springer-Verlag, Berlin, 259–283. doi: 10.1007/11497158
26. Gonzalez-Martinez, A., Munoz-Palazon, B., Rodriguez-Sanchez, A. and Gonzalez-Lopez, J. (2018) New concepts in Anammox processes for wastewater nitrogen removal: Recent advances and future prospects, *Fems Microbiology Letters*, 365(6), 10. doi: 10.1093/femsle/fny031
27. Gonzalez-Martinez, A., Osorio, F., Rodriguez-Sanchez, A., Martinez-Toledo, M.V., Gonzalez-Lopez, J., Lotti, T., van Loosdrecht, M.C. (2015) Bacterial community structure of a lab-scale anammox membrane bioreactor, *Biotechnology Progress*, 31, 186-193. doi: 10.1002/btpr.1995
28. Güven, D., Dapena, A., Kartal, B., Schmid, M.C., Maas, B., van de Pas-Schoonen, K., Sozen, S., Mendez, R., Op den Camp, H.J., Jetten, M.S., Strous, M., Schmidt, I. (2005) Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria, *Applied Environmental Microbiology*, 71(2), 1066-1071. doi: 10.1128/AEM.71.2.1066-1071.2005
29. Hellinga, C., Schellen, A., Mulder, J., van Loosdrecht, M.C.M. ve Heijnen, J.J. (1998) The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water, *Water Science and Technology*, 37(9), 135-142. doi: 10.1016/s0273-1223(98)00281-9
30. Hendrickx T.L.G., Wang Y., Kampman C., Zeeman G., Temmink H. ve Buisman C.J.N. (2012) Autotrophic nitrogen removal from low strength waste water at low temperature, *Water Research*, 46(7), 2187-2193. doi: 10.1016/j.watres.2012.01.037
31. Hendrickx T.L.G., Kampman C., Zeeman G., Temmink H., Hu Z., Kartal B. ve Buisman C.J.N. (2014) High specific activity for anammox bacteria enriched from activated sludge at 10°C, *Bioresource Technology*, 163, 214-221. doi: 10.1016/j.biortech.2014.04.025

32. Imajo, U., Tokutomi, T., Furukawa, K. (2004) Granulation of anammox microorganisms in up-flow reactors, *Water Science and Technology*, 49(5-6), 155–163. doi: 10.2166/wst.2004.0749
33. Isaka, K., Sumino, T. ve Tsuneda S. (2007) High nitrogen removal performance at moderately low temperature utilizing anaerobic ammonium oxidation reactions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103, 486–490. doi: 10.1263/jbb.103.486
34. Isanta, E., Reino, C., Carrera, J. ve Pérez, J. (2015) Stable partial nitrification for low-strength wastewater at low temperature in an aerobic granular reactor, *Water Resource*, 80, 149-158. doi: 10.1016/j.watres.2015.04.028
35. Jaeschke, A., Hopmans, E.C., Wakeham, S.G., Schouten, S. ve Sinninghe Damsté, J.S. (2007) The presence of ladderane lipids in the oxygen minimum zone of the Arabian Sea indicates nitrogen loss through anammox, *Limnology and Oceanography*, 52(2), 780-786. doi: 10.4319/lo.2007.52.2.0780
36. Jaeschke, A., Op den Camp, H.J., Harhangi, H., Klimiuk, A., Hopmans, E.C., Jetten, M.S., Schouten, S. ve Sinninghe Damsté, J.S. (2009) 16S rRNA gene and lipid biomarker evidence for anaerobic ammonium-oxidizing bacteria (anammox) in California and Nevada hot springs, *FEMS Microbiology Ecology*, 67(3), 343-350. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00640.x
37. Jetten, M.S.M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K.T., Schalk, J., van Dongen, U.G.J.M., van de Graaf, A.A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen, J.G. (1998) The anaerobic oxidation of ammonium, *FEMS Microbiology Reviews*, 22(5), 421-437. doi: 10.1111/j.1574-6976.1998.tb00379.x
38. Jetten, M.S., Niftrik, L.V., Strous, M., Kartal, B., Keltjens, J.T. ve Op den Camp, H.J.M. (2009) Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(2-3), 65-84. doi: 10.1080/10409230902722783
39. Jin, R-C., Yang, G-F., Yu, J-J ve Zeng, P. (2012) The inhibition of the Anammox process: A review, *Chemical Engineering Journal*, 197, 67-79. doi: 10.1016/j.cej.2012.05.014
40. Kalkan Aktan, C., Uzunhasanoglu, A.E. ve Yapsakli, K. (2018) Speciation of nickel and zinc, its short-term inhibitory effect on anammox, and the associated microbial community composition, *Bioresource Technology*, 268, 558-567. doi: 10.1016/j.biortech.2018.08.011
41. Kalvelage, T., Jensen, M.M., Contreras, S., Revsbech, N.P., Lam, P., Gunter, M., LaRoche, J., Lavik, G. ve Kuypers, M.M.M. (2011) Oxygen sensitivity of anammox and coupled N-cycle processes in oxygen minimum zones, *PLoS ONE*, 6(12), e29299. doi: 10.1371/journal.pone.0029299
42. Kalyuzhnyi, S., Gladchenko, M., Mulder, A. ve Versprille, B. (2006) New anaerobic process of nitrogen removal, *Water Science and Technology*, 54(8), 163-170. doi: 10.2166/wst.2006.729
43. Kalyuzhnyi, S.V., Gladchenko, M.A., Kang, H., Mulder, A. ve Versprille, A. (2008) Development and optimisation of VFA driven DEAMOX process for treatment of strong nitrogenous anaerobic effluents, *Water Science and Technology*, 57(3), 323-328. doi: 10.2166/wst.2008.044
44. Kalyuzhnyi, S. ve Gladchenko, M. (2009) DEAMOX-New microbiological process of nitrogen removal from strong nitrogenous wastewater, *Desalination*, 248(1-3), 783-793. doi: 10.1016/j.desal.2009.02.054

45. Kampschreur, M.J., Temmink, H., Kleerebezem, R., Jetten, M.S.M. and van Loosdrecht, M.C.M. (2009) Nitrous oxide emission during wastewater treatment, *Water Research*, 43(17), 4093-4103. doi: 10.1016/j.watres.2009.03.00
46. Kartal, B., Rattray, J., van Niftrik, L.A., van de Vossenberg, J.V., Schmid, M.C., Webb, R.I., Schouten, S., Fuerst, J.A., Damsté, J.S. ve Strous, M. (2007) Candidatus "Anammoxoglobus propionicus" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria, *Systematic and Applied Microbiology*, 30(1), 39-49. doi: 10.1016/j.syapm.2006.03.004
47. Kartal, B., van Niftrik, L.V., Rattray, J., van de Vossenberg, J.L., Schmid, M.C., Damsté, J.S., Jetten, M.S. ve Strous, M. (2008). Candidatus 'Brocadia fulgida': An autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium, *FEMS Microbiology Ecology*, 63(1), 46-55. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00408.x
48. Kartal, B., Geerts, W. ve Jetten, M.S. (2011a) Cultivation, detection, and ecophysiology of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria, *Methods in Enzymology*, 486, 89-108. doi: 10.1016/B978-0-12-381294-0.00004-3
49. Kartal, B., Maalcke, W.J., de Almeida, N.M., Cirpus, I., Gloerich, J., Geerts, Op den Camp, H.J.M., Harhangi, H.R., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.J., Stunnenberg, H.G., Keltjens, J.T., Jetten, M.S.M. ve Strous, M. (2011b) Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation, *Nature*, 479(7371), 127-130. doi: 10.1038/nature10453
50. Kartal, B., van Niftrik, L.V., Keltjens, J.T., Op den Camp, H.J. ve Jetten, M.S. (2012) Anammox-growth physiology, cell biology, and metabolism, *Advances in Microbial Physiology*, 60, 211-262. doi: 10.1016/B978-0-12-398264-3.00003-6
51. Kartal, B., Almeida, N.M., Maalcke, W.J., Op den Camp, H.J., Jetten, M.S. ve Keltjens, J.T. (2013) How to make a living from anaerobic ammonium oxidation, *FEMS Microbiology Reviews*, 37(3), 428-461. doi: 10.1111/1574-6976.12014
52. Kartal, B. ve Keltjens, J.T. (2016) Anammox biochemistry: a tale of heme c proteins, *Trends in Biochemical Sciences*, 41(12), 998-1011. doi: 10.1016/j.tibs.2016.08.015
53. Kocamemi, B.A., Dityapak, D., Semerci, N., Keklik, E., Akarsubası, A., Kumru, M. ve Kurt H. (2018) Anammox start-up strategies: the use of local mixed activated sludge seed versus Anammox seed, *Water Science and Technology*, 78(9), 1901-1915. doi: 10.2166/wst.2018.431
54. Kuenen, J.G. (2008) Anammox bacteria: from discovery to application, *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 320-326. doi: 10.1038/nrmicro1857
55. Kuypers, M.M.M., Marchant, H.K. ve Kartal, B. (2018) The microbial nitrogen-cycling network, *Nature Reviews Microbiology*, 16, 263–276. doi:10.1038/nrmicro.2018.9
56. Lackner, S., Gilbert, E.M., Vlaeminck, S.E., Joss, A., Horn, H. ve van Loosdrecht, M.C. (2014) Full-scale partial nitrification/anammox experiences-an application survey, *Water Research*, 55, 292-303. doi: 10.1016/j.watres.2014.02.032
57. Li, J., Li, J., Gao, R., Wang, M., Yang, L., Wang, X., Zhang, L. ve Peng, Y. (2018) A critical review of one-stage anammox processes for treating industrial wastewater: Optimization strategies based on key functional microorganisms, *Bioresource Technology*, 265, 498-505. doi: 10.1016/j.biortech.2018.07.013
58. Lotti, T., Kleerebezem, R., Lubello, C. ve van Loosdrecht, M.V. (2014a) Physiological and kinetic characterization of a suspended cell anammox culture, *Water Research*, 60, 1-14. doi: 10.1016/j.watres.2014.04.017

59. Lotti T., Kleerebezem R., Hu Z., Kartal B., Jetten M.S.M. ve van Loosdrecht M.C.M. (2014b) Simultaneous partial nitrification and anammox at low temperature with granular sludge, *Water Research*, 66, 111-121. doi: 10.1016/j.watres.2014.07.047
60. Lotti T., Kleerebezem R., van Erp Taalman Kip Ch., Hendrickx T.L.G., Kruit J., Hoekstra M. ve van Loosdrecht M.C.M. (2014c) Anammox growth on pretreated municipal wastewater, *Environmental Science and Technology*, 48(14), 7874-7880. doi: 10.1021/es500632k
61. Lotti T., Kleerebezem R., Abelleira J.M., Abbas B. ve van Loosdrecht M.C.M. (2015) Faster through training: the anammox case, *Water Research*, 81, 261-268. doi: 10.1016/j.watres.2015.06.001
62. Luttrell, W.E. (2015) Nitrogen, *Journal of Chemical Health and Safety*, 22(2), 32-34. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchas.2015.01.013>
63. Miao, L., Wang, K., Wang, S., Zhu, R., Li, B., Peng, Y., Weng, D. (2014) Advanced nitrogen removal from landfill leachate using real-time controlled three-stage sequence batch reactor (SBR) system, *Bioresource Technology*, 159, 258-265. doi: 10.1016/j.biortech.2014.02.058
64. Miao, L., Yang, G.Q., Tao, T. ve Peng, Y.Z. (2019) Recent advances in nitrogen removal from landfill leachate using biological treatments - a review, *Journal of Environmental Management*, 235, 178-185. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.01.057
65. Mulder, A., Graaf, A., Robertson, L. ve Kuenen, J. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor, *FEMS Microbiology Ecology*, 16(3), 177-184. doi: 10.1111/j.1574-6941.1995.tb00281.x
66. Ni, B.J., Hu, B.L., Fang, F., Xie, W.M., Kartal, B., Liu, X.W., Sheng, G.P., Jetten, M., Zheng, P. ve Yu, H. Q. (2010) Microbial and physicochemical characteristics of compact anaerobic ammonium-oxidizing granules in an upflow anaerobic sludge blanket reactor, *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8), 2652-2656. doi: 10.1128/AEM.02271-09
67. Oshiki, M., Shimokawa, M., Fujii, N., Satoh, H. ve Okabe, S. (2011) Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium 'Candidatus Brocadia sinica', *Microbiology*, 157(Pt 6), 1706-1713. doi: 10.1099/mic.0.048595-0}
68. Peeters, S.H. ve van Niftrik, L. (2019) Trending topics and open questions in anaerobic ammonium oxidation, *Current Opinion in Chemical Biology*, 49, 45-52. doi: 10.1016/j.cbpa.2018.09.022
69. Pereira, A.D., Cabezas, A., Etchebehere, C., de Lemos Chernicharo, C.A. ve de Araújo, J.C. (2017) Microbial communities in anammox reactors: a review, *Environmental Technology Reviews*, 6(1), 74-93. doi: 10.1080/21622515.2017.1304457
70. Pérez, J., Lotti, T., Kleerebezem, R., Picioreanu, C. ve van Loosdrecht, M.C.M. (2014) Outcompeting nitrite-oxidizing bacteria in single-stage nitrogen removal in sewage treatment plants: a model-based study, *Water Research*, 66, 208-218. doi: 10.1016/j.watres.2014.08.028
71. Qian, F., Wang, J., Shen, Y., Wang, Y., Wang, S. ve Chen, X. (2017) Achieving high performance completely autotrophic nitrogen removal in a continuous granular sludge reactor, *Biochemical Engineering Journal*, 118, 97-104. doi: 10.1016/j.bej.2016.11.017
72. Richard, F.A. (1965). *Chemical oceanography*, Academic Press, London, 611-645.

73. Schalk, J., de Vries, S.D., Kuenen, J.G. ve Jetten, M.S. (2000) Involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase in anaerobic ammonium oxidation, *Biochemistry*, 39(18), 5405-5412. doi: 10.1021/bi992721k
74. Shehzad, A., Qismat, S., Zeeshan, N. ve Ibrar, K. (2016) An insight to anammox bacterial communities and their detection strategies-mini review, *Journal of International Academic Research for Multidisciplinary*, 4(1), 222-239.
75. Shen, L., Hu, A., Jin, R., Cheng, D., Zheng, P., Xu, X., Hu, B. (2012). Enrichment of anammox bacteria from three sludge sources for the startup of monosodium glutamate industrial wastewater treatment system, *Journal of Hazardous Materials*, 199-200, 193-199. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.10.081
76. Sinninghe Damsté, J.S., Strous, M., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Geenevasen, J.A.J., van Duin, A.C.T., van Niftrik, L.A. ve Jetten, M.S.M. (2002) Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane, *Nature*, 419(6908), 708-712. doi: 10.1038/nature01128
77. Sobotka D., Tuszyńska A., Kowal. P., Ciesielski S., Czerwionka K. ve Makinia J. (2017) Long-term performance and microbial characteristics of the anammox-enriched granular sludge cultivated in a bench-scale sequencing batch reactor, *Biochemical Engineering Journal*, 120, 125-135. doi: 10.1016/j.bej.2017.01.007
78. Stein, L.Y. ve Klotz, M.G. (2016) The nitrogen cycle, *Current Biology*, 26(3), 94-98. doi: 10.1016/j.cub.2015.12.021
79. Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G. ve Jetten, M.S.M. (1998) The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(5), 589-596. doi: 10.1007/s002530051
80. Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K.T., Webb, R., Kuenen, J.G. ve Jetten, M.S.M. (1999a) Missing lithotroph identified as new planctomycete, *Nature*, 400(6743), 446-449. doi: 10.1038/22749
81. Strous, M., Kuenen, J.G. ve Jetten, M.S.M. (1999b) Key physiology of anaerobic ammonia oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 3248-3250.
82. Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M.W., Horn, M., Daims, H., Bartol-Mavel, D., Wincker, P., Barbe, V., Fonknechten, N., Vallenet, D., Segurens, B., Schenowitz-Truong, C., Médigue, C., Collingro, A., Snel, B., Dutilh, B.E., Op den Camp, H.J., van der Drift, C., Cirpus, I., van de Pas-Schoonen, K.T., Harhangi, H.R., van Niftrik, L., Schmid, M., Keltjens, J., van de Vossenberg, J., Kartal, B., Meier, H., Frishman, D., Huynen, M.A., Mewes, H.W., Weissenbach, J., Jetten, M.S., Wagner, M. ve Le Paslier D. (2006) Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome, *Nature*, 440(7085), 790-794. doi: 10.1038/nature04647
83. Tang, C.J., Zheng, P., Chen, T.T., Zhang, J.Q., Mahmood, Q., Ding, S.A., Chen, X.G., Chen, J.W. and Wu, D.T. (2011) Enhanced nitrogen removal from pharmaceutical wastewater using SBA-Anammox process, *Water Research*, 45(1), 201-210. doi: 10.1016/j.watres.2010.08.036
84. Tomaszewski, M., Cema, G. ve Ziemińska-Buczyńska, A. (2017) Influence of temperature and pH on the anammox process: a review and meta-analysis, *Chemosphere*, 182, 203-214. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.003

85. Tsushima I., Kindaichi T. ve Okabe S. (2007) Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR, *Water Research*, 41(4), 785–794. doi: 10.1016/j.watres.2006.11.024
86. Uflaz, H. (2018). Start-up of pilot scale partial nitrification and anammox reactors installed in a sewage treatment plant, *Yüksek Lisans Tezi*, M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
87. van de Graaf, A.A., de Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M. ve Kuenen, J.G. (1997) Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on basis of N-15 studies in a fluidized bed reactor, *Microbiology*, 143(7), 2415–2421. doi: 10.1099/00221287-143-7-2415
88. van Niftrik, L., Geerts, W.J., van Donselaar, E.G., Humbel, B.M., Webb, R.I., Fuerst, J.A., Verkleij, A.J., Jetten, M.S. ve Strous, M. (2008a) Linking ultrastructure and function in four genera of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: Cell plan, glycogen storage, and localization of cytochrome C proteins, *Journal of Bacteriology*, 190(2), 708–717. doi: 10.1128/JB.01449-07
89. van Niftrik, L., Geerts, W.J., van Donselaar, E.G., Humbel, B.M., Yakushevskaya, A., Verkleij, A.J., Jetten, M.S.M. ve Strous, M. (2008b) Combined structural and chemical analysis of the anammoxosome: a membrane-bounded intracytoplasmic compartment in anammox bacteria, *Journal of Structural Biology*, 161(3), 401–410. doi: 10.1016/j.jsb.2007.05.005
90. van Niftrik, L., Geerts, W.J.C., van Donselaar, E.G., Humbel, B.M., Webb, R.I., Harhangi, H.R., Op den Camp, H.J., Fuerst, J.A., Verkleij, A.J., Jetten, M.S. ve Strous, M. (2009) Cell division ring, a new cell division protein and vertical inheritance of a bacterial organelle in anammox planctomycetes, *Molecular Microbiology*, 73(6), 1009–1019. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06841.x
91. van Niftrik, L., van Helden, M., Kirchen, S., van Donselaar, E.G., Harhangi, H.R., Webb, R.I., Fuerst, J.A., Op den Camp, H.J., Jetten, M.S. ve Strous, M. (2010) Intracellular localization of membrane-bound ATPases in the compartmentalized anammox bacterium ‘Candidatus Kuenenia stuttgartiensis’, *Molecular Microbiology*, 77(3), 701–715. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07242.x
92. van Niftrik, L. ve Jetten, M.S.M. (2012) Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: unique microorganisms with exceptional properties, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(3), 585-596. doi: 10.1128/MMBR.05025-11
93. van Niftrik, L. (2013) Cell biology of unique anammox bacteria that contain an energy conserving prokaryotic organelle, *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(4), 489-497. doi: 10.1007/s10482-013-9990-5
94. van Teeseling, V.C.F., Neumann, S. ve van Niftrik, L. (2013) The anammoxosome organelle is crucial for the energy metabolism of anaerobic ammonium oxidizing bacteria, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 23(1-2), 104–117. doi: 10.1159/000346547
95. van Teeseling, M.C.F., de Almeida, N.M., Klingl, A., Speth, D.R., Op den Camp, H.J.M., Rachel, R., Jetten, M.S.M. ve van Niftrik, L. (2014) A new addition to the cell plan of anammox bacteria: ‘Candidatus Kuenenia stuttgartiensis’ has a protein surface layer (S-layer) as outermost layer of the cell, *Journal of Bacteriology*, 196(1), 80-89. doi: 10.1128/JB.00988-13
96. Volcke, E.I.P., Van Hulle, S.W.H., Donckels, B.M.R., van Loosdrecht, M.C.M. ve Vanrolleghem, P.A. (2005) Coupling the SHARON process with anammox: Model-based

- scenario analysis with focus on operating costs, *Water Science and Technology*, 52(4), 107-115. doi: 10.2166/wst.2005.0093
97. Wang, C.C., Lee, P.H., Kumar, M., Huang, Y.T., Sung, S. ve Lin, J.G. (2010) Simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonium oxidation and denitrification (SNAD) in a full-scale landfill-leachate treatment plant, *Journal of Hazardous Materials*, 175(1-3), 622-628. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.10.052
98. Wang, Z., Peng, Y., Miao, L., Cao, T., Zhang, F., Wang, S., Han, J. (2016) Continuous-flow combined process of nitrification and ANAMMOX for treatment of landfill leachate, *Bioresource Technology*, 214, 514-519. doi: 10.1016/j.biortech.2016.04.118
99. Wen, X., Zhou, J., Li, Y., Qing, X. ve He, Q. (2016) A novel process combining simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) with denitrifying phosphorus removal (DPR) to treat sewage, *Bioresource Technology*, 222, 309-316. doi: 10.1016/j.biortech.2016.09.132
100. Wett, B., Omari, A., Podmirseg, S.M., Han, M., Akintayo, O., Gómez Brandón, M., Murthy, S., Bott, C., Hell, M., Takács, I., Nyhuis, G. ve O'Shaughnessy, M. (2013) Going for mainstream deammonification from bench- to full-scale for maximized resource efficiency, *Water Science and Technology*, 68(2), 283-289. doi: 10.2166/wst.2013.150
101. Windey, K., De Bo, I. ve Verstraete, W. (2005) Oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification (OLAND) in a rotating biological contactor treating high-salinity wastewater, *Water Research*, 39(18), 4512-4520. doi: 10.1016/j.watres.2005.09.002
102. Yamamoto, T., Wakamatsu, S., Qiao, S., Hira, D., Fujii, T. and Furukawa, K. (2011) Partial nitrification and anammox of a livestock manure digester liquor and analysis of its microbial community, *Bioresource Technology*, 102(3), 2342-2347. doi: 10.1016/j.biortech.2010.10.091
103. Yapsakli, K., Aktan, C.K. ve Mertoglu, B. (2017) Anammox-zeolite system acting as buffer to achieve stable effluent nitrogen values, *Biodegradation*, 28(1), 69-79. doi: 10.1007/s10532-016-9778-1
104. Yasuda, T., Waki, M., Yoshinaga, I., Amano, T., Suzuki, K., Tanaka, Y., Yamagishi, T. ve Suwa, Y. (2011) Evidence of exponential growth of an anammox population in an anaerobic batch culture, *Microbes and Environments*, 26(3), 266-269. doi: 10.1264/jsme2.ME10181
105. Zhang, L., Narita, Y., Gao, L., Ali, M., Oshiki, M. ve Okabe, S. (2017) Maximum specific growth rate of anammox bacteria revisited, *Water Research*, 116, 296-303. doi: 10.1016/j.watres.2017.03.027
106. Zhang, L., Zhang, S., Peng, Y., Han, X., Gan, Y., (2015) Nitrogen removal performance and microbial distribution in pilot- and full-scale integrated fixed-biofilm activated sludge reactors based on nitrification-anammox process, *Bioresource Technology*, 196, 448-453. doi: 10.1016/j.biortech.2015.07.090
107. Zhu G., Xia C., Shanyun W., Zhou L., Liu L. ve Zhao S. (2015) Occurrence, activity and contribution of anammox in some freshwater extreme environments, *Environmental Microbiology Reports*, 7(6), 961-969. doi: 10.1111/1758-2229.12341

