

## Doğu Karadeniz Bölgesi'nde (Sürmene Koyu) Nitrifikasyon Bakterilerinin Aktivitesi

Nüket SIVRI, Hikmet KARAÇAM, Muzaffer FEYZİOĞLU  
Karadeniz Teknik Üniversitesi, Deniz Bilimleri Fakültesi, Trabzon-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 27.09.1996

**Özet:** Bu çalışmada, Aralık 1992-Ağustos 1994 döneminde, Trabzon yöresinde Sürmene Koyu'nda  $40^{\circ} 11' 19''$ - $40^{\circ} 15' 47''$  boylamları,  $40^{\circ} 55' 26''$ - $40^{\circ} 58' 00''$  N enlemleri arasında kalan sahada belirlenen 9 istasyondan alınan su örneklerinin, fiziko-kimyasal özellikleri ile nitrifikasyon bakterileri arasındaki ilişkiler, mikrobiyolojik ve kimyasal analizler yapılarak belirlenmiştir.

Istasyonlarda, su sıcaklığına ait ortalama değerler  $6.0$ - $25.9^{\circ}\text{C}$ , çözülmüş oksijen değerleri  $6.9$ - $9.1$  mg/l, ortalama nitrat, nitrit ve ortofosfat değerleri sırasıyla  $0.378$ - $0.5$  mg/l,  $0.023$ - $0.047$  mg/l,  $0.0055$ - $0.0455$  mg/l olarak saptanmıştır. Nitrifikasyon bakterilerinin 100 ml.'deki kuvvetle muhtemel sayısı *Nitrosococcus* genusuna ait bakteriler için  $12$ - $32$  hücre/100 ml ve *Nitrobacter* genusuna ait bakteriler için ise  $12$ - $29$  hücre/100 ml olarak tespit edilmiş ve diğer parametrelerle ilişkileri istatistiksel yönden karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular ışığında, çalışma alanının besleyici element konsantrasyonları ve nitrifikasyon yönünden oldukça verimli olduğu ortaya çıkmıştır.

**Anahtar Sözcükler :** Nitrifikasyon, Nitrifikasyon bakterileri, Besleyici elementler, Doğu Karadeniz

### Nitrifying Bacterial Activity In South Eastern Black Sea (Coast of Sürmene)

**Abstract:** In this, some physico-chemical properties of seawater and their relationships with nitrification process were studied. Monthly water samples were taken at 9 stations ( $40^{\circ} 11' 19''$ - $40^{\circ} 15' 47''$  E,  $40^{\circ} 55' 26''$ ,  $40^{\circ} 58' 00''$  N) along Sürmene coastline of South Eastern Black Sea during the period of December 1992 to August 1994.

Temperature, dissolved oxygen,  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N and  $\text{PO}_4^{3-}$ -P values were varied between  $6.5$ - $25.9^{\circ}\text{C}$ ,  $6.9$ - $9.1$  mg/l,  $0.378$ - $0.5$  mg/l,  $0.023$ - $0.047$  mg/l,  $0.0055$ - $0.0455$  mg/l respectively. Most probable number of *Nitrosococcus* and *Nitrobacter* were  $12$ - $32$  cell/100 ml and  $12$ - $29$  cell/100 ml. There were significant relationships between number of *Nitrosococcus* and  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N,  $\text{PO}_4^{3-}$ -P values.

Nutrient concentrations ( $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N,  $\text{PO}_4^{3-}$ -P) and nitrification process suggest that the study area appears to be quite productive.

**Key Words:** Nitrification, Nitrifying bacteria, Nutrients, Eastern Black Sea.

## Giriş

Deniz ortamında temel elementlerden olan azotun tekrar bitki besin maddesi olarak kullanımı nitrifikasyon işlemi ile gerçekleşmektedir. Nitrifikasyondan sorumlu mikroorganizmalar, Nitrobacteraceae familyasına ait *Nitrosococcus* ve *Nitrobacter* genuslarına ait bireyler olup, genellikle hücresel enerji ihtiyaçları için organik besin elementlerine ihtiyaç duymazlar. Enerji gereksinimlerini ya amonyağı veya nitriti oksitleyerek yada CO<sub>2</sub> fiksasyonu ile sağlarlar (1, 2, 3, 4).

Nitrifikasyon bakterileri zorunlu aerob organizmalardır (5, 6). Bu nedenle nitrifikasyon olayı ancak oksijenin var olduğu ortamlarda gerçekleşebilir. Sıcaklık istemleri 5-30°C arasında olup, optimum 22-26°C'dir. Denizlerde hem sıcaklık, hemde oksijen yönünden yüzeysel tabaka (özellikle de 3-10 m) bakterilerin gelişmesi için oldukça uygun bir bölge olarak alınabilir (5, 7). Aynı şekilde Karadeniz'deki çalışmalarda nitrifikasyonun öfotik zonda yoğun olarak gerçekleştiği belirtilmiş, ancak herhangi bir sayısal irdeleme yapılmamıştır (8).

Yoshida ve Kimata (9), yaptıkları çalışmada, bölgelere bağlı olarak bakterilerin değişik hücre sayıları göstermelerinin, bölgelerdeki besleyici elementlerle ilişkili olduğunu vurgulamıştır. Nitrifikasyon olayının ortamdaki amonyak, nitrit ve nitrat miktarı, nitrifikasyon bakterilerinin popülasyonu ile doğrudan ilgisi olduğu bir çok çalıştırıcı tarafından da vurgulanmıştır (7, 9, 10, 11).

Araştırma alanında, nitrifikasyon olayında etkili olan bakterilerin döngüye katkılarının belirlenmesi ile ilgili bir çalışmanın varlığına rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı, nitrifikasyon bakterilerinin mevsimsel dağılımları ve hücre sayılarının değişimini belirlemektir. Ayrıca, dönüşümde açığa çıkan nitrit ve nitrat miktarları ile bakteri sayıları arasındaki ilişkinin varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır.

## Materyal ve Yöntem

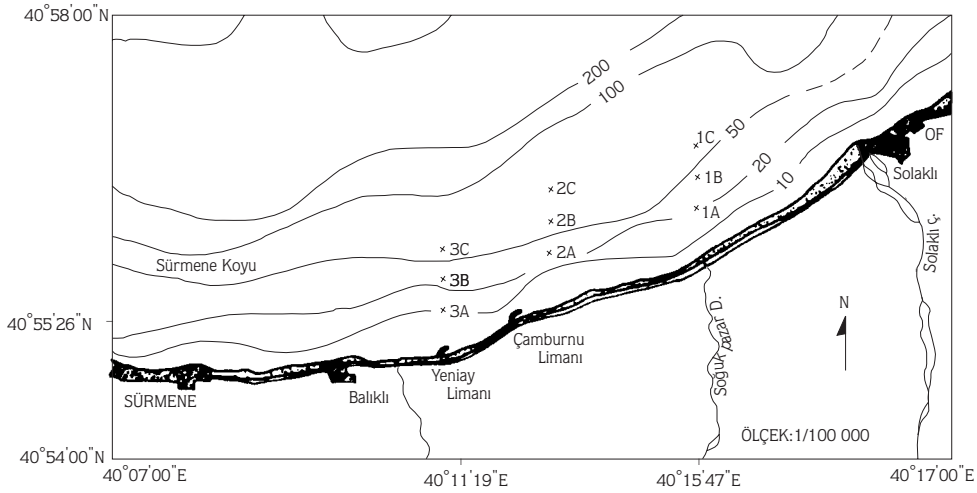
Bu çalışmadaki örnekler, Sürmene Koyu'ndan seçilen 9 sabit istasyondan Aralık 1992-Ağustos 1994 tarihleri arasında, 5 m. derinlikten, aylık olarak bakteriyolojik örnekleme şişesi ile alınmıştır (Şekil-1). Örnekler önceden steril edilmiş, 500 ml hacimli karanlık şişelere konularak, soğutucu ile 2 saat içerisinde laboratuvara getirilmiş ve hemen analizlere başlanmıştır.

Her istasyonda, çözülmüş oksijen YSI 51 B model oksijenmetre, deniz suyu sıcaklığı dönüşümlü termometre ile yerinde ölçülmüştür. Nitrat azotu (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) kadmiyum indirgeme; nitrit azotu (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N) diazotizasyon; ortofosfat fosforu (PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>-P) askorbik asit metodu uygulanarak (12) spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

Nitrifikasyon bakterilerinin tahmini popülasyon yoğunluğunun tespiti için çoklu tüp fermentasyon tekniği kullanılmış, her istasyona ait örneklerin 0.1 ml., 1.0 ml., 10.0 ml'lik dilüsyonları Winogradsky modifiye besiyerlerine ekilmiş (13), 22°C'de 45 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplerde bakteri varlığını tespit edebilmek için, Griess

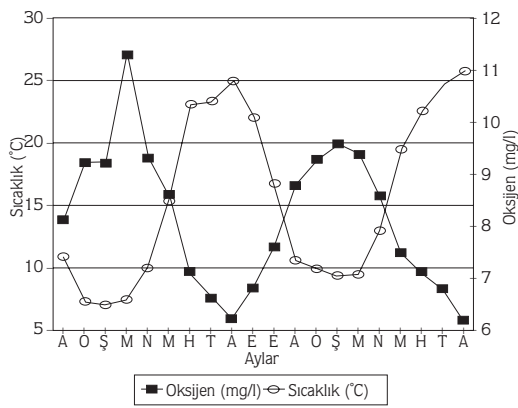
solüsyonu ve % 2 NaCl ihtiva eden difenilamin çözeltisi kullanılmıştır (14). Bakteri sayıları MPN (Most Probably Number=Kuvvetle Muhtemel Sayı) tabloları ile bulunmuştur. Araştırmada elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri QPRO-5.0® ve MINİTAB® paket programı (ANOVA ve Tukey testleri) ile değerlendirilmiştir.

Şekil 1. Araştırma istasyonları (x)



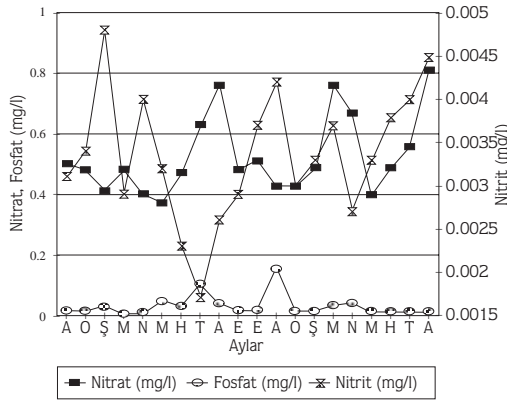
## Bulgular

Çalışma Aralık 1992-Ağustos 1994 tarihleri arasında yapılmıştır. Kasım 1993 tarihinde deniz şartlarının uygun olmaması sebebi ile denize çıkılamamış ve bu nedenle kasım ayına ait veriler eksik kalmıştır.



Şekil 2. Aylara göre sıcaklık ve oksijen dağılımı

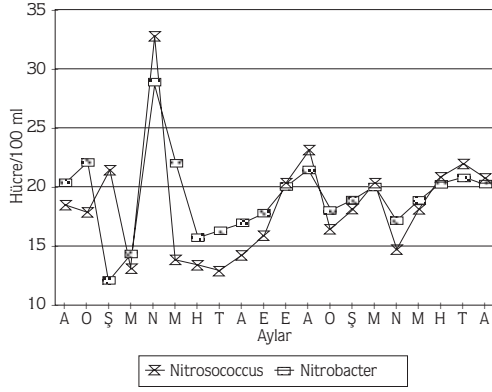
Sıcaklık ve oksijenin aylara bağlı olarak değişimi Şekil 2'de verilmiştir. İstasyonlar göz önünde tutulduğunda sıcaklığın istatistiki açıdan önemli bir fark göstermediği gözlenmiştir ( $p<0.005$ ). Sıcaklık değerlerine ait verilerin aylar arasındaki dağılımında ise önemli farklılıklar tespit edilmiştir ( $p<0.001$ ). Bu nedenle sıcaklık ve oksijene ait veriler sunulurken, aylara ait istasyon ortalamaları alınmış, tablo ve şekiller bu ortalama değerlerle hazırlanmıştır. Sıcaklık değerlerinin mevsimsel dağılımına bakıldığında, ılıman bölgelerdeki dağılımı gösterdiği görülmektedir. Araştırma esnasında ölçülen en düşük sıcaklık değeri 6.5 °C olarak Şubat 1993 tarihinde, en yüksek sıcaklık ise Ağustos 1994 tarihinde 25.9 °C olarak bulunmuştur.



Şekil 3. Aylara göre nitrit, nitrat ve fosfat değerleri.

Örnekleme periyodu süresince en yüksek nitrat değeri 0.81 mg/l ile Ağustos 1994 tarihinde, en düşük değer ise 0.37 mg/l ile Mayıs 1993 tarihinde belirlenmiştir. Şekil 3'de de görüldüğü gibi nitratın dağılımında düzenli bir dağılım gözlenmemiştir. Bunu nitratın deniz ortamında rejenerasyonun hızlı olmasına bağlamak mümkündür. Benzer bir yapı gösteren nitrit değerleri, 1993 yılında özellikle nitrat değerleri ile ters bir ilişki göstermiş, nitratın yüksek olduğu dönemlerde, nitrit değerlerinin genellikle azalma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. 1993-1994 yılı verilerine bakıldığında, nitritin en yüksek Şubat 1993 tarihinde 0.0048 mg/l, en düşük ise Temmuz 1993 tarihinde 0.0017 mg/l olduğu görülmüştür (Şekil 3).

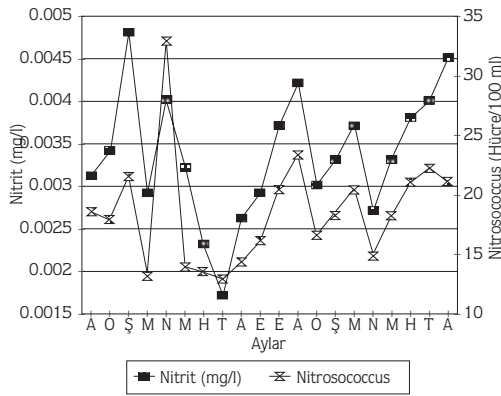
Fosfat değerlerinin örnekleme periyodu içindeki dağılımı nitrit ve nitrata oranla daha kararlı bir yapı göstermektedir. En yüksek fosfat değeri 0.154 mg/l ile Aralık 1993 tarihinde, en düşük ise 0.005 mg/l ile Mart 1993 tarihinde gözlenmiştir.



Şekil 4. *Nitrosococcus* ve *Nitrobacter* genusuna ait bakteri sayılarının aylara göre dağılımı.

Nitrat, nitrit ve fosfat değerlerinin istasyonlar arasındaki farkı istatistiksel açıdan önemli değilken, aylar arasındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ).

Denizel ortamda nitrifikasyondan sorumlu bakteriler olan *Nitrosococcus* ve *Nitrobacter* dağılımı Şekil 4'de verilmiştir. Bu bakterilerden *Nitrosococcus* bakterileri en düşük değeri Mart 1993'de 13 hücre/100 ml ile alırken, en yüksek değer Nisan 1993 tarihinde 32.8 hücre/100 ml olarak tespit edilmiştir. *Nitrobacter* genusuna ait bakterilerde de benzer durum izlenip, en düşük değer Mart 1993'de 14.3 hücre/100 ml, en yüksek değer Nisan 1993 tarihinde 28.9 hücre/100 ml olarak belirlenmiştir. Her iki bakteri arasındaki ilişkinin derecesi  $r = 0.67$  olarak bulunmuştur. Ayrıca nitrit ile *Nitrosococcus* arasında iyi bir lineer



Şekil 5. Nitritin ve *Nitrosococcus* genusuna ait bakteri sayılarının aylara göre dağılımı.

ilişkinin varlığından bahsedilebilir ( $r=0.74$ ). Diğer parametrelerle karşılaştırıldığında nitritin bakteri dağılımı üzerindeki etkisinin istatistiki açıdan önemli olduğu görülmektedir ( $p<0.001$ ).

*Nitrosococcus* grubu bakteriler, amonyumu ortamda nitrit haline dönüştürerek zararlı etkisini ortadan kaldırmakta ve fitoplankton açısından kullanılabilir forma dönüştürmektedir. Çalışma dönemi içinde nitrit ile *Nitrosococcus* bakterileri arasında  $r=0.74$  düzeyinde bir ilişkinin varlığına rastlanmıştır. Ocak 1993 ve Ağustos 1994 tarihleri dışında kalan dönemlerde bakteri artışına paralel olarak nitrit değerlerinde bir artışın varlığı gözlenmiştir. Temmuz 1993 tarihindeki nitrit ve *Nitrosococcus* genusuna ait bakteri sayılarının örnekleme periyodu boyunca en düşük değerde olduğu gözlenmiştir. Nitrit ve *Nitrosococcus* bakterilerine ait aylık dağılım Şekil 5'de verilmiştir.

### Tartışma ve Sonuç

Çalışma periyodunda, sıcaklık ve çözünmüş oksijen açısından bulunan değerlerin nitrifikasyon olayı için uygun olduğu gözlenmiştir. Çalışma süresince ölçülen oksijen değerlerinin de sıcaklığın etkisinde ve sıcaklıkla ters orantılı olduğu görülmüştür. Yapılan araştırmalarda, 7 mg/l'nin altındaki oksijen değerlerinin nitrit üretimini dolayısıyla da nitrifikasyon bakterilerini etkileyerek azalttığı bildirilmiştir (15, 16).

Nitrit genellikle karasal kaynaklı bir bileşen olup, sonbahar sonu ve kış aylarında nitrat ile ortak kaynaklara sahiptir. Nitrat fiziksel işlevlere bağımlılıkta belirli aylar hariç denizel kaynaklıdır. Özellikle amonyumun biyolojik aktivitenin etkisinde olduğu belirtilmektedir (17). Nitrit değerlerine bakıldığında, nitrat değerleri ile arasında ters bir ilişki olduğu görülmektedir. Ortamda bulunan nitrit *Nitrobacter* ler tarafından nitrata dönüştürülmektedir. Bu dönüşümde ortamdaki nitrit değerlerinin azalması ve nitrat değerlerinin artışı beklenen bir sonuçtur (3). Nitrifikasyon olayında nitritin nitrata dönüşmesinin amonyak dönüşümünden daha hızlı olduğu ve amonyak, nitrit, nitrat değerleri arttıkça bakterilerde de artış gözlenebileceğide çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (10, 11, 18).

Araştırma esnasında *Nitrosococcus* bakterilerinin sayısındaki artışın nitrit oluşumu üzerine etkisi test edilmiştir. Şekil 5'de görüldüğü üzere örnekleme periyodunun başladığı Aralık 1992 tarihinden itibaren, artış gösteren bakteri değerine karşın nitrit konsantrasyonlarında da aynı paralellikte artış kaydedilmiştir. Azalan bakteri değerlerine bağlı olarak nitrit miktarlarında azalma gözlenmiştir. Minimum nitrit ve *Nitrosococcus* değerleri Temmuz 1993 tarihinde tespit edilmiştir. Feyzioğlu (19) aynı bölgede yaptığı çalışmada, aynı yılın Haziran ayında fitoplankton biomassını açıklamak için kullandığı klorofil-a miktarlarının yüksek değerlere ulaştığını, bunda fitoplankton hücrelerinin sayısındaki artıştan kaynaklandığını belirtmiştir. Mayıs 1993 tarihindeki bakteri sayılarının kısmen sabit kalmasına rağmen Haziran 1993 tarihinde nitrit miktarlarındaki ani düşüşün fitoplanktonca kullanılabilir azotun azalmasından kaynaklanmış olabileceği söylenebilir. Nitrit tahmini için, *Nitrosococcus*, nitrat ve fosfat arasında uygulanan regresyon modelinde  $r$  (adj)=0.68 olarak bulunmuş ve aradaki lineer ilişkinin denklemi aşağıda verilmiştir.

$$\text{Nit}=0.00113 + 0.000120 \text{ NS} + 0.000108 \text{ Nat} - 0.00141 \text{ Fos}$$

Nit: Nitrit (mg/l)

NS: *Nitrosococcus* (hücre/100 ml)

Nat: Nitrat (mg/l)

Fos: Fosfat (mg/l)

Model sonucunda denklem içerisinde belirtilen *Nitrosococcus*'un nitrit miktarını etkileyen en önemli parametre olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.001$ ). Diğer parametrelerin ise fazla önemli olmadığı görülmektedir. Bu önemsizliğin başlıca nedeni; amonyumu okside ederek nitrit oluşturan *Nitrosococcus* bakterilerinden kaynaklanmaktadır. Bu bakteriler olmadan nitrit oluşumu söz konusu değildir. Nitrifikasyon olayında bir sonraki süreç nitritten nitrat oluşumudur. Ortamdaki nitriti kullanarak nitrat oluşturan bakteri grubu *Nitrobacter* grubu bakterilerdir. *Nitrosococcus* grubu bakterilerle karşılaştırıldıklarında, her iki grup bakteri arasında doğrusal bir ilişkinin varlığından bahsedilebilir. Şubat 1993 tarihinde nitrit değerleri en yüksek düzeyde iken, nitrat değerlerinde bir düşüş kaydedilmiştir. Aynı dönemde *Nitrosococcus* grubu bakterilerin yüksek buna karşın *Nitrobacter* grubu bakterilerin ise en düşük değeri aldığı görülmüştür. Nitrat değerinin düşük oluşunu aynı dönemde *Nitrobacter* sayılarındaki düşüşe bağlamak olasıdır. Şubat 1993 tarihinde ortamda nitrata dönüşecek yeterli nitrit konsantrasyonu ve uygun çevresel parametreler olmasına karşın, bakterilerin biyolojik aktivitesini etkileyen inhibitör madde varlığından bahsedilebilir. Yamamoto ve arkadaşları (20), nitrifikasyon bakterilerinin aktiviteleri hakkında yaptıkları araştırmada, nitrifikasyon oranının özellikle ağır metallerle kirlenmiş ortamlarda mikroorganizmaların bireysel aktivitelerinin azalmasından kaynaklanabileceğini söylemiştir. Bu tarihin dışında kalan örnekleme periyodu süresince her iki grup bakterisinde birbirini takip ettiği görülmektedir.

Araştırma süresince *Nitrosococcus* ve *Nitrobacter* genusuna ait bakteri sayılarının sırasıyla 13-32 hücre/100 ml ve 12-29 hücre/100 ml arasında değiştiği gözlenmiştir. Yoshida ve Kimata (9), Japonya'nın kıyısız bölgelerinde yaptıkları çalışmalarda, 1-10 m arasında derinliklerden alınan su örneklerinde nitrifikasyon bakterilerinden *Nitrosococcus* genusu için 40 hücre/100 ml, *Nitrobacter* genusu içinse 220 hücre/100 ml civarında değiştiğini saptamışlardır. Matulewich (7), Passaic körfezindeki bulgularında *Nitrosococcus* sayısını ortalama 395 hücre/100 ml ve *Nitrobacter* sayısını 30 hücre/100 ml olarak belirlemiştir. Aynı araştırmacı ile birlikte pek çok araştırmacı, sucul bitkilerin, besleyici elementlerin ve planktonik organizmaların bol bulunduğu bölgelerde nitrifikasyon bakterilerini daha yüksek sayılarda tespit etmişlerdir (11, 15). Garchow (11), çeşitli araştırmacıların çalışmalarına atıfta bulunarak, sedimentteki besleyici elementlerin ve nitrifikasyon bakterilerinin çeşitli dip çalışmaları ile su katmanlarını geçerek özellikle bahar aylarında büyük oranda artışa neden olabileceğini ortaya koymuştur. Özellikle nisan ayında her iki bakterisinde artış kaydetmesi sıcaklık ve besleyici elementlerinde bu aylarda artış ile açıklanabilir.

## Kaynaklar

1. Bormann, F.H., and Likens, G.E., Nutrient Cycling, Science, 155:424-429, 1967.
2. Colinaux, P., Ecology, New York, 1986, John Wiley Sons, 725 p.
3. Kuenen, J.G., and Robertson, L.A., Ecology of Nitrification and Denitrification in the Nitrogen and Sulphur Cycles, Cambridge, 1988, Cambridge University Press, 512 p.
4. Buchanan, R.E., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Baltimore, 1974, The Williams and Wilkins Company, 1246 p.
5. Schlegel, H.G., Allgemeine Mikrobiologie, Newyork, 1985, Thieme Verlag, 571 p.
6. Ingraham, J.L., Stainer, R.S., Adelberg, E.A., Gram-Negative Bacteria: The Chemoautotrophs and Methylotrophs. In: The Microbial World, London, 1974, Prentice Hall, 564-568.
7. Matulewich, V.A., and Finstein, M.S., Distribution of Autotrophic Nitrifying Bacteria in a Polluted River (The Passaic), Applied and Environmental Microbiology, 35, 1: 67-71, 1978.
8. Sorokin, Y.I., Sorokin, P.Y., Avdeev, V.A., Sorokin, D.Y., Ilchenko, S.V., Biomass, Production and Activity of Bacteria in the Black Sea, with Special Reference to Chemosynthesis and the Sulfur Cycle, Hydrobiologia, 308: 61-76, 1995.
9. Yoshida, Y., and Kimata, M., Distribution of Marine Nitrifying Bacteria and the Role Played by them in the Offshore Region, Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 27, 6: 578-585, 1967.
10. Sorokin, Y.I., The Black Sea, In: Ecosystem of the World 26, Estuaries and Enclosed Seas, ed. B.H. Ketchum, Chapter 11, Elsevier Sci. Pub., 253-293, 1983.
11. Garchow, H.L., Nitrifying bacteria used to determine water quality of Marinas, Master Thesis, Michigan University, Michigan, 1990.
12. Parson, R.T., Maita, Y., Lalli, C.M., Manual of Chemical and Biological Methods for Sea Water Analysis, Great Britain, 1984, Pergamon Press, 173 p.
13. Drews, G., Mikrobiologisches Praktikum, Heidelberg-New York, 1976, Springer Verlag, 32-34 pp.
14. Rodina, A.G., Methods in aquatic Microbiology, Baltimore and Butterworths, London, 1972, University Park Press, 447 p.
15. Yoshida, Y., Studies on The Marine Nitrifying Bacteria: With Special Referans to Characteristics and Nitrite Formation of Marine Nitrite Formers, Bulletin of Misaki Marine Biological Institute, 11: 1-58, 1967.
16. Goreau, T.J., Kaplan, A.W., et al., Production of NO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O by Nitrifying Bacteria at Reduced Concentration of Oxygen, Applied And Environmental Microbiology, 40: 3, 526-532, 1980.
17. Büyükkışık, B., ve Erbil, Ö., Izmir İç Körfezi'nde Nutrient Dinamikleri Üzerine Araştırmalar, Doğa Müh. ve Çevre, 11: 3, 379-395, 1987.
18. Heinonen-Tanski, H., and Araksinen, A-K., The Bacterial Denitrification In Groundwater, Wat., Sci., Tech., 20: 3, 225-226, 1988.
19. Feyzioğlu, A.M., Doğu Karadeniz Kıyısı Ekosisteminde Fitoplankton Dinamiğindeki Mevsimsel Değişimler, Doktora Tezi, KTÜ Deniz Bilimleri Fakültesi, Trabzon, 1996.
20. Yamamoto, H., Tatsuyama, K., Matsumoto, T., Influences of Cadmium on Soil Nitrification; Relation Between Nitrification Rate and The Population of Nitrifying Autotrophs in Cd Contaminated Soil, Bulletin of Faculty of Agriculture, Shimane Univesity, 20: 157-160, 1986.