



Üç-aşamalı (Karanlık Fermantasyon, Metanojenesis ve Fotofermantasyon) Sistemlerde Organik Atıklardan Entegre Biyohidrojen ve Metan Üretiminin Araştırılması

Program Kodu: 1001

Proje No: 112M252

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Tuba Hande ERGÜDER-BAYRAMOĞLU

Danışmanlar:

Prof. Dr. İnci EROĞLU
Prof. Dr. Ufuk GÜNDÜZ

Bursiyerler:

Ekin Güneş TUNÇAY
Melih Can AKMAN
Engin KOÇ

MAYIS 2015
ANKARA



ÖNSÖZ

TÜBİTAK, Mühendislik Araştırma Destek Grubu (MAG) tarafından desteklenen bu projede, özgün bir teknoloji konfigürasyonu (üç-aşamalı karanlık fermantasyon, metanojenesis ve fotofermantasyon entegre sistemi) önerilmiştir. Bu projenin amacı, birim organik maddeden elde edilen enerjiyi, diğer bir deyişle, toplam hidrojen ve metan üretimini arttırmak için, üç-aşamalı karanlık fermantasyon, metanojenesis ve fotofermantasyon konfigürasyonunun geliştirilmesidir. Bu amaçla, toplam enerji veriminin maksimizasyonu için her üç aşamanın en uygun işletim koşulları belirlenmiştir. Kesikli ve ardışık-kesikli modda işletilen her aşamanın, kademeli entegrasyonu ile optimizasyonu ve birim organik maddeden toplam enerji ve verim eldeleri hesaplanmıştır. Üç-aşamalı sistem, hem sentetik hem de orijinal karbon kaynağı (melas) ile işletilmiş; moleküler analizler gerçekleştirilerek popülasyon dinamiği belirlenmeye çalışılmıştır.

Önerilen üç-aşamalı sistemle, ülkemiz hedefleri arasında yer alan yenilenebilir enerji üretimi, atıkların düzensiz bertarafı ile çevreye verilecek zararların ve sera-gazı salınımının azaltımı için alternatif bir teknoloji ve sürdürülebilir kalkınma hedeflerine ulaşılması planlanmıştır. Nitekim, proje sonuçları, önerilen bu özgün teknolojinin, mevcut iki-aşamalı sistemlere (karanlık fermantasyon+metanojenesis ve karanlık fermantasyon+fotofermantasyon) ve teorik değerlere kıyasla birim organik maddeden (g KOİ) elde edilen enerjiyi %7 ile %50 arasında arttırdığını göstermiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xxv
ABSTRACT.....	xxvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Projenin amacı.....	5
1.2 Projenin Kapsamı.....	6
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	9
2.1. Anaerobik Çürütme (Bozundurma) - Biyogaz Üretimi.....	9
2.2. Biyohidrojen Üretimi.....	10
2.2.1 Karanlık Fermantasyon.....	11
2.2.2 Fotofermantasyon.....	13
2.3 İki-aşamalı Entegre Sistemler.....	15
2.3.1 İki-aşamalı Karanlık Fermantasyon ve Fotofermantasyonla Entegre Biyohidrojen Üretimi.....	15
2.3.2 İki-aşamalı Karanlık Fermantasyon ve Metanojenesis Sistemi.....	17
3. KESİKLİ KARANLIK FERMANTASYON REAKTÖR DENEYLERİ.....	20
3.1 Gereç ve Yöntem.....	21
3.1.1. Mikrobiyel Kültür.....	21
3.1.1.1 Karanlık Fermantasyon Kültürü.....	21
3.1.1.2 Anaerobik Kültür - Metanojenesis.....	21
3.1.1.3 Fotofermantasyon Kültürü.....	21
3.1.2 Deneysel Yöntem	23
3.1.2.1 Kesikli Karanlık Fermantasyon Reaktör Deneyleri.....	23
3.1.2.1.1 SET 1: Başlangıç pH etkisinin araştırılması.....	23
3.1.2.1.2 SET 2: Başlangıç pH ve KOİ (Kimyasal Oksijen İhtiyacı) etkisinin araştırılması.....	24
3.1.2.1.3 SET 3: Başlangıç pH, KOİ ve Besin/Mikroorganizma (S/X ₀)	25

değerlerinin karanlık fermantasyona etkisinin Tepki Yüzeyi Metodu ile araştırılması.....	
3.1.2.2. Kesikli Anaerobik Reaktör Deneyleri.....	26
3.1.2.3. Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyleri.....	28
3.1.2.3.1 SET-1: Başlangıç S/X_0 etkisinin araştırılması.....	28
3.1.2.3.2 SET-2: Başlangıç besin (S), mikroorganizma (X_0) ve ışık şiddetinin (I) Tepki Yüzeyi Metodu ile araştırılması.....	29
3.1.3 Analitik Yöntem.....	32
3.2 Bulgular ve Tartışma.....	34
3.2.1 Kesikli Karanlık Fermantasyon Deneyi Sonuçları.....	34
3.2.1.1 Karanlık Fermantasyon SET 1 Sonuçları: Başlangıç pH Değerinin Etkisi	34
3.2.1.2 Karanlık Fermantasyon SET 2 Sonuçları: Başlangıç pH ve KOİ Değerlerinin Etkisi.....	36
3.2.1.3 Karanlık Fermantasyon SET 3 Sonuçları: Başlangıç pH, KOİ ve S/X_0 Değerlerinin Etkisinin Tepki Yüzeyi Metodu ile İncelenmesi.....	40
3.2.2 Kesikli Anaerobik Reaktör Deney Sonuçları	49
3.2.3 Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deney Sonuçları.....	53
3.2.3.1 Kesikli Fotofermantasyon SET-1: Başlangıç S/X_0 Etkisi.....	53
3.2.3.2 Kesikli Fotofermantasyon SET-2: Başlangıç Besin, Mikroorganizma ve Işık Şiddetinin Etkisinin Tepki Yüzeyi Metodu ile İncelenmesi.....	59
3.3 Sonuç.....	67
4. ÜÇ-AŞAMALI SİSTEMDE KARANLIK FERMANTASYONUN OPTİMİZASYONU...	71
4.1 Gereç ve Yöntem.....	72
4.1.1. Mikrobiyel Kültür.....	72
4.1.1.1 Karanlık Fermantasyon Kültürü.....	72
4.1.1.2 Anaerobik Kültür - Metanojenezis.....	72
4.1.1.3 Fotofermantasyon Kültürü.....	72
4.1.2. Karanlık Fermantasyonda Kullanılan Ardışık Kesikli Reaktör (AKR) Düzenegi ve İşletim Prensibi.....	72
4.1.3 Deneysel Yöntem.....	75
4.1.3.1 AKR-Karanlık Fermantasyon Deneyleri	75
4.1.3.2 Üç-Aşamalı Sistemde; AKR-Karanlık Fermantasyon Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Anaerobik Reaktör Deneyleri.....	78
4.1.3.3 İki-Aşamalı Sistemde; AKR-Karanlık Fermantasyon Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyleri.....	81

4.1.3.4 Üç-Aşamalı Sistemde; Kesikli Anaerobik Reaktör Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyleri.....	82
4.1.4 Analitik Yöntem.....	83
4.2 Bulgular ve Tartışma.....	85
4.2.1 AKR-Karanlık Fermantasyon Deneyi Sonuçları.....	85
4.2.2 Üç-Aşamalı Sistemde; AKR-Karanlık Fermantasyon Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Anaerobik Reaktör Deneyleri.....	110
4.2.3 Üç-Aşamalı Sistemde; Kesikli Anaerobik (Metanojenesi) Reaktörlerin Çıkış Suları ile Kurulan Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyi Sonuçları.....	113
4.2.4 İki-Aşamalı Sistemde; 2.Aşama olan Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyi Sonuçları.....	118
4.3 Sonuç.....	125
5. ÜÇ-AŞAMALI SİSTEMDE METANOJENESİSİN OPTİMİZASYONU.....	134
5.1 Literatür Bilgisi.....	134
5.2 Gereç ve Yöntem.....	138
5.2.1. Mikrobiyel Kültür	138
5.2.1.1 Anaerobik Kültür - Metanojenesi.....	138
5.2.1.2 Fotofermantasyon Kültürü.....	138
5.2.2 Deneysel Yöntem	138
5.2.2.1 AKR-Metanojenesi Sistem Deneyleri	138
5.2.2.2 Üç-aşamalı Sistemde, AKR-Metanojenesi Sistemi Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyleri.....	142
5.2.3 Analitik Yöntem.....	143
5.3 Bulgular ve Tartışma	145
5.3.1 AKR-Metanojenesi Sistem Deneyleri Sonuçları.....	145
5.3.2 Üç-aşamalı Sistemde, AKR-Metanojenesi Sistemi Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyi Sonuçları	154
5.4 Sonuç.....	160
6. ÜÇ-AŞAMALI SİSTEMDE FOTOFERMANTASYONUN OPTİMİZASYONU.....	166
6.1 Gereç ve Yöntem	166
6.1.1 Mikrobiyel Kültür; Fotofermantasyon Kültürü	166
6.1.2 Deneysel Yöntem	167
6.1.2.1 Üç-Aşamalı Sistemde, AKR-Metanojenesi Sistemi Çıkış Suları ile Kurulan Ardışık-Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyleri	167
6.1.3 Analitik Yöntem	169
6.2 Bulgular ve Tartışma	169

6.2.1. Üç-Aşamalı Sistemde, AKR-Metanojenesis Sistemi Çıkış Suları ile Kurulan Ardışık-Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyleri Sonuçları.....	169
6.3 Sonuç	178
7. MELASLA GERÇEKLEŞTİRİLEN ÜÇ-AŞAMALI KESİKLİ REAKTÖR DENEYLERİ	183
7.1 Gereç ve Yöntem.....	184
7.1.1. Mikrobiyel Kültür	184
7.1.1.1 Karanlık Fermantasyon Kültürü.....	184
7.1.1.2 Anaerobik Kültür – Metanojenesis Kültürü.....	184
7.1.1.3. Fotofermantasyon Kültürü.....	184
7.1.2. Orijinal Organik Karbon Kaynağı; Melas.....	185
7.1.3. Deneysel Yöntem	186
7.1.3.1. Melasla Üç-Aşamalı Kesikli Sistem Deneyleri.....	186
7.1.3.1.1 Üç-aşamalı sistemde; melasla kesikli karanlık fermantasyon reaktör deneyleri.....	186
7.1.3.1.2 Üç-aşamalı sistemde; kesikli anaerobik (metanojenesis) reaktör deneyleri.....	189
7.1.3.1.3 Üç-aşamalı sistemde; kesikli fotofermantasyon reaktör deneyleri.	191
7.1.3.2. Melasla İki-Aşamalı Kesikli Sistem Deneyleri.....	193
7.1.3.2.1 İki-aşamalı sistemde, melasla kesikli anaerobik reaktör deneyleri.	193
7.1.3.2.2. İki-aşamalı sistemde, fotofermantasyon reaktör deneyleri.....	195
7.1.4. Analitik Yöntem.....	198
7.2. Bulgular ve Tartışma.....	199
7.2.1. Melasla Üç-Aşamalı Kesikli Sistem Deneyi Sonuçları.....	199
7.2.1.1 Üç-Aşamalı Sistemde; Melasla Kesikli Karanlık Fermantasyon Reaktör Deneyi Sonuçları.....	199
7.2.1.2. Üç-Aşamalı Sistemde; Kesikli Anaerobik Reaktör Deneyi Sonuçları....	209
7.2.1.3. Üç-Aşamalı Sistemde; Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyi Sonuçları	215
7.2.2. Melasla İki-Aşamalı Kesikli Sistem Deneyleri Sonuçları	217
7.2.2.1. İki-Aşamalı Sistemde; Melasla Kesikli Anaerobik Reaktör Deneyi Sonuçları	218
7.2.2.2. İki-Aşamalı Sistemde (Melasla); Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyi Sonuçları	223
7.3 Sonuç	226
8. ÜÇ-AŞAMALI SİSTEMDE MELASLA KARANLIK FERMANTASYONUN OPTİMİZASYONU	232

8.1 Gereç ve Yöntem	232
8.1.1. Mikrobiyel Kültür	232
8.1.1.1 Karanlık Fermantasyon Kültürü	232
8.1.1.2 Anaerobik Kültür – Metanojenesi	233
8.1.1.3 Fotofermantasyon Kültürü	233
8.1.2 Deneysel Yöntem	233
8.1.2.1 Melasla İşletilen AKR-Karanlık Fermantasyon Deneyleri	233
8.1.2.2 Üç-Aşamalı Sistemde; Melasla İşletilen AKR-Karanlık Fermantasyon Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Metanojenesi (Anaerobik) Reaktör Deneyleri... ..	235
8.1.2.3 Melasla Üç-Aşamalı Sistemde; Kesikli Metanojenesi Reaktör Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyleri	237
8.1.3 Analitik Yöntem	238
8.2 Bulgular ve Tartışma	239
8.2.1 Melasla İşletilen AKR-Karanlık Fermantasyon Deneyi Sonuçları	239
8.2.2 Üç-Aşamalı Sistemde; Melasla İşletilen AKR-Karanlık Fermantasyon Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Metanojenesi Reaktör Deneyi Sonuçları	249
8.2.3 Melasla Üç-Aşamalı Sistemde; Kesikli Metanojenesi Reaktör Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyi Sonuçları	252
8.3 Sonuç	257
9. POPÜLASYON DİNAMİĞİNİN BELİRLENMESİ	264
9.1 Literatür Taraması	265
9.2 AKR Sistemleri için Gerçekleştirilen Moleküler Çalışmalar	269
9.2.1 Gereç ve Yöntem	269
9.2.1.1 DNA İzolasyonu	269
9.2.1.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Yatay Elektroferez.....	270
9.2.1.3 Denatüre Gradyan Jel Elektrofrez (DGGE)	272
9.2.1.4 Sekans Analizi	273
9.2.2 Bulgular ve Tartışma	273
9.2.2.1 AKR-Metanojenesi Sistemine (IP 4) Ait Moleküler Analiz Sonuçları....	273
9.2.2.2 Sukrozla İşletilen AKR-Karanlık Fermantasyon Sistemine (IP 3) Ait Moleküler Analiz Sonuçları	280
9.2.2.3 Melasla İşletilen AKR-Karanlık Fermantasyon Sistemine (IP 7) Ait Moleküler Analiz Sonuçları	285
9.3 TUBİTAK 2221 Kapsamında Gerçekleştirilen qPCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Çalışmaları	288
9.3.1 Gereç ve Yöntem	288

9.3.1.1 Rekombinant <i>E. coli</i> Kültür Ekimi ve Stoklama Çalışmaları	288
9.3.1.2 Depolanmış Numunelerin Tekrar Büyütülerek Plasmid İzolasyonunun Gerçekleştirilmesi ve Restriksiyon Enzimi ile <i>Methanosaeta</i> ve <i>Methanosarcina</i> Türlerine Özgün DNA Parçalarının Kesilmesi	290
9.3.1.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Amplifikasyonu	290
9.3.1.4 Yatay Elektroforez Aşaması	291
9.3.1.5 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)	292
9.3.2 Bulgular ve Tartışma	293
9.3.2.1 Kültür Ekimi Çalışmalarının Sonuçları	293
9.3.2.2 DNA İzolasyonunun Gerçekleştirilmesine Dair Sonuçlar	294
9.3.2.3 PCR Amplifikasyon Sonuçları	295
9.3.2.4 Yatay Elektroforez Sonuçları	295
9.3.2.5 qPCR Sonuçları	296
9.4 Sonuç	299
10. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER	302
10.1 Entegre Sistemlerden Elde Edilen Verim ve Enerji Değerleri, Öneriler	302
10.2 Üç-aşamalı Sistemdeki Aşamaların Optimizasyon Sonuçları ve Öneriler.....	310
10.2.1 Karanlık Fermantasyon Aşaması	310
10.2.2 Metanojenesis Aşaması	314
10.2.3 Fotofermantasyon Aşaması	317
KAYNAKLAR LİSTESİ	322
EKLER	
EK-A	338
EK-B	342
EK-C	348
EK-D.....	352
EK-E.....	354
EK-F.....	361
EK-G.....	363
EK-H.....	364
EK-I.....	367
EK-J.....	371

TABLO LİSTESİ	Sayfa
Tablo 3.1. Karanlık fermantasyon deneylerinde kullanılan besiyer madde.....	23
Tablo 3.2. SET 2’de kullanılan reaktör tipleri ve içerikleri	24
Tablo 3.3. Box-Behnken tasarımında kullanılan faktörler ve seviyeler	25
Tablo 3.4. Kesikli anaerobik reaktör deneylerinde kullanılan reaktör tipleri ve özellikleri	27
Tablo 3.5. Kesikli anaerobik reaktör deneylerinde kullanılan besiyer çözelti içeriği (Speece, 1996)	27
Tablo 3.6. Kesikli fotofermantasyon deneylerinde kullanılan reaktörlerin özellikleri...	31
Tablo 3.7. Box-Behnken tasarımında kullanılan faktörler ve seviyeler.....	32
Tablo 3.8. Farklı başlangıç pH değerlerinde gaz üretim değerleri ve kompozisyonu ^a	34
Tablo 3.9. Farklı başlangıç pH ve KOİ derişimlerinde elde edilen hidrojen üretim miktarları ve çıkış pH değerleri (SET 2)	37
Tablo 3.10. SET 3’de kurulan 13 farklı reaktör çeşidinin hidrojen üretim verimi ve hız (prodüktivite) hesapları ^a	41
Tablo 3.11. Sükrozla gerçekleştirilen kesikli karanlık fermantasyon SET 3 deneylerinin UYA sonuçları	48
Tablo 3.12. Reaktörlere eklenen glikoz miktarına denk gelen teorik ve deneysel metan gazı üretim miktarları	51
Tablo 3.13. $S/X_0 = 1$ değerinin metan üretim verimi açısından karşılaştırması	52
Tablo 3.14. Üretilen toplam hidrojen miktarı ve süresi	54
Tablo 3.15. Farklı başlangıç S/X_0 oranlarında elde edilen verim değerleri ^a	55
Tablo 3.16. Hidrojen verimlerinin karşılaştırılması ^a	57
Tablo 3.17. Fotofermantasyon SET-2 deneylerinde elde edilen verim değerleri ^a	59
Tablo 4.1. Sükrozla çalışılan AKR-karanlık fermantasyon deneylerinde kullanılan besiyer çözelti	75
Tablo 4.2. Karanlık fermantasyonla hidrojen üretiminde HBS’nin etkisi	77
Tablo 4.3. Kesikli anaerobik reaktör deneylerinde kullanılan reaktör tipleri ve özellikleri	79
Tablo 4.4. Test 1 ve Test 2 reaktörlerinde substrat olarak kullanılan AKR-karanlık fermantasyon sisteminin çıkış suyu (sırasıyla <i>I.Kaynak</i> ve <i>II.Kaynak</i>) özellikleri ^a	80

Tablo 4.5. Kesikli anaerobik reaktör deneylerinde kullanılan besiyer çözelti içeriği ...	81
Tablo 4.6. Üç-aşamalı sistemde, kesikli fotofermantasyon reaktörleri için kullanılan giriş sularının özellikleri	83
Tablo 4.7. Beş farklı AKR-Karanlık fermantasyon çalışmasında elde edilen sonuçların özeti	109
Tablo 4.8. Üç-aşamalı sistemin ikinci aşamasını oluşturan metanojenesis reaktörlerinde elde edilen metan yüzdesi ve verim değerleri.....	111
Tablo 4.9. Giriş suyu 2 ile kurulan üçüncü aşama fotofermantasyon reaktör deneyinde elde edilen verim değerleri	116
Tablo 4.10. İki-aşamalı sistemde, AKR-karanlık fermantasyon çıkış suyuyla (II.Kaynak suyu, 5.işletme süreci) kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörlerin dönüştürme verimleri ve üretim hızları	120
Tablo 4.11. İki-aşamalı sistemde, AKR-karanlık fermantasyon çıkış suyuyla (II.Kaynak suyu, 5.işletme süreci) kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörlerin üretim verim değerleri ^a	120
Tablo 4.13. İki-aşamalı ve üç-aşamalı entegre sistemlerden elde edilen maksimum H ₂ veya CH ₄ üretim verimleri ve enerji değeri	130
Tablo 4.14. Entegre sistemlerin çıkış suyunun aerobik arıtımı için gerekecek enerji ihtiyacı	132
Tablo 5.1. Çeşitli tasarım parametrelerine göre işletilen anaerobik reaktör çalışmaları ve ilgili değerler	136
Tablo 5.2. AKR-Metanojenesis sisteminde substrat olarak kullanılan AKR karanlık fermantasyon sisteminin çıkış suyu özellikleri	139
Tablo 5.3. AKR-Metanojenesis sistemi için kullanılan besiyer çözelti içeriği (Speece, 1996)	140
Tablo 5.4. AKR-Metanojenesis sisteminde 81.-157.günler arasında uygulanan altı farklı periyot ve ilgili işletim parametreleri değerleri	141
Tablo 5.5. Fotofermantasyon reaktörleri için kullanılan giriş sularının özellikleri (AKR-Metanojenesis sistemi çıkış suları)	143
Tablo 5.6. Altı farklı işletim periyoduna ait işletim parametreleri, elde edilen metan üretim verimleri, çıkış çKOİ ve tUYA değerleri	146
Tablo 5.7. İki-aşamalı anaerobik sistemlerin metan üretim verimi ve hızı açısından karşılaştırması	152
Tablo 5.8. AKR-karanlık fermantasyon sisteminin farklı işletim koşullarında elde edilen çıkış suyunun AKR-Metanojenesis sisteminin metan üretim verimi ve hızına etkisi	154

Tablo 5.9. AKR-Metanojenezis sistemi çıkış suları ile kurulan kesikli fotofermantasyon deneyinde elde edilen verim değerleri ^a	157
Tablo 5.10. Üç-aşamalı sistemde her aşamada kullanılan giriş suları ve çıkış suları bilgisi	158
Tablo 5.11. Üç-aşamalı sistemde elde edilen maksimum H ₂ veya CH ₄ üretim verimleri ve enerji değeri ^a	164
Tablo 5.12. İki-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenezis sisteminde elde edilen maksimum H ₂ veya CH ₄ üretim verimleri ve enerji değeri ^a	165
Tablo 6.1. Üç-aşamalı sistemde, ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörleri için kullanılan giriş sularının özellikleri (AKR-Metanojenezis periyotlarına ait çıkış suları)	168
Tablo 6.2. Üç-aşamalı sistemde, 3.aşama olan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörleri kurulum özellikleri	168
Tablo 6.3. Ardışık-kesikli işletilen fotofermantasyon reaktörlerinde üretilen toplam hidrojen gazı miktarı	170
Tablo 6.4. Ardışık-kesikli işletilen fotofermantasyon reaktörlerinde gözlemlenen günlük hidrojen verimlerinin değişim aralıkları	173
Tablo 6.5. Ardışık-kesikli işletilen fotofermantasyon reaktörlerinde gözlemlenen hidrojen üretim hızları	175
Tablo 6.6. Üç-aşamalı (ardışık-kesikli) sistemde elde edilen maksimum H ₂ veya CH ₄ üretim verimleri ve enerji değeri ^a	180
Tablo 6.7. İlk karbon kaynağının sukroz olduğu üç-aşamalı 3 farklı entegre sistemin karşılaştırması	181
Tablo 7.1. Melasın karakterizasyonu	185
Tablo 7.2. Melastaki UYA içeriği ve derişimleri	186
Tablo 7.3. Melasla çalışılan karanlık fermantasyon setinin Box-Behnken'e göre tasarımında kullanılan faktörler ve seviyeler	186
Tablo 7.4. Tepki Yüzeyi Metoduna göre melasla kurulan reaktör çeşitleri ve içerikleri	188
Tablo 7.5. Kesikli anaerobik reaktör deneylerinde kullanılan reaktör çeşitleri ve özellikleri	190
Tablo 7.6. Üç-aşamalı sistemde kesikli anaerobik reaktörlerin çıkış suyu özellikleri ve kesikli fotofermantasyon reaktörlerinin özellikleri	192
Tablo 7.7. Melasla kurulan kesikli anaerobik reaktörlerin çeşitleri ve özellikleri.....	194
Tablo 7.8. İki-aşamalı sistemde kesikli anaerobik reaktörlerin çıkış suyu özellikleri...	196

Tablo 7.9. İki-aşamalı sistemde kesikli fotofermantasyon reaktörlerinin özellikleri....	197
Tablo 7.10. Vakum yapan reaktörlerin reaksiyon süreleri ve tüm reaktörlerin işletim sonu pH'ları	200
Tablo 7.11. Melasla kurulan 13 farklı reaktör çeşidinin hidrojen üretim verimi ve hız (prodüktivite) hesapları ^a	204
Tablo 7.12. Melasla kurulan kesikli karanlık fermantasyon reaktörleri çıkış asit çeşitleri ve derişimleri	208
Tablo 7.13. Üç-aşamalı sistemin ikinci aşamasını oluşturan metanojenesis reaktörlerinde elde edilen metan yüzdesi ve verim değerleri	213
Tablo 7.14. İki-aşamalı sistemde, kesikli anaerobik reaktörlerin üretim hızı, verimi ve artırılabilirlik sonuçları	220
Tablo 7.15. İnkübasyon öncesi (başlangıç) ve inkübasyon sonrası (çıkış) asit derişimleri	221
Tablo 7.16. Başlangıç S/X ₀ 'e göre çıkış çKOİ, pH ve tUYA-KOİ eşdeğerinin derişimi	222
Tablo 7.17. Farklı başlangıç S/X ₀ oranlarına göre başlangıç ve çıkış AKM ve UAKM derişimleri	223
Tablo 7.18. Melasla kurulan üç-aşamalı kesikli reaktör sisteminde, en yüksek verim ve hızın elde edildiği koşulların karşılaştırması	230
Tablo 8.1. Kesikli metanojenesis deneyinde substrat olarak kullanılan AKR-karanlık fermentasyon sisteminin çıkış suyu özellikleri	235
Tablo 8.2. Kesikli metanojenesis deneylerinde kullanılan reaktör tipleri ve özellikleri	236
Tablo 8.3. Fotofermantasyon reaktörleri için kullanılan giriş sularının özellikleri	238
Tablo 8.4. Melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin 1. ve 3. işletim süreçlerine ait hidrojen üretim verimleri ve hızları	242
Tablo 8.5. Melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon işletim süreçlerinden elde edilen sonuçlar ^a	248
Tablo 8.6. Malesla üç-aşamalı sistemin 2.şamasını oluşturan metanojenesis reaktörlerinde elde edilen metan yüzdesi ve verim değerleri	251
Tablo 8.7. Karanlık fermantasyon ve metanojenesis içeren iki-aşamalı sistem çalışmalarında 2.aşamayı oluşturan metanojenesis reaktörlerinin verim değerleri	251
Tablo 8.8. Test 1 ve Test 4 kesikli metanojenesis reaktörleri çıkış suları ile kurulan 3.aşama fotofermantasyon reaktörlerinin verim ve üretim hızı değerleri...	252
Tablo 8.9. İlk karbon kaynağının melas olduğu üç-aşamalı sistemde elde edilen maksimum H ₂ veya CH ₄ üretim verimleri ve enerji değeri ^a	261

Tablo 8.10. İlk karbon kaynağının melas olduğu iki-aşamalı sistemde (AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli Metanojenesis) elde edilen maksimum H ₂ veya CH ₄ üretim verimleri ve enerji değeri ^a	262
Tablo 9.1. PCR – DGGE analizlerinin gerçekleştirildiği karanlık fermantasyon çalışmalarına örnekler	265
Tablo 9.2. PCR – DGGE analizlerinin gerçekleştirildiği anaerobik çürütme çalışmalarına örnekler	266
Tablo 9.3 Moleküler analizlerde (PCR – DGGE) hidrojen üreticileri saptamaya yönelik yapılan çalışmalar ve kullanılan primerler	267
Tablo 9.4. DNA izolasyonunda kullanılan DNA kitleri, numune örnekleri ve analiz sonuçları	270
Tablo 9.5. Tüm AKR çamur numuneleri için kullanılan primer setleri ve sekansları...	271
Tablo 9.6. Master Karışımı için kullanılan kimyasal içerikleri ve hacimleri.....	272
Tablo 9.7. AKR-Metanojenesis reaktöründen farklı işletim günlerinde alınan çamur numunelerine ait archaea sekans analiz sonuçları	277
Tablo 9.8. AKR-Metanojenesis reaktöründen farklı işletim günlerinde alınan çamur numunelerine ait tüm bakteri-DGGE bantlarına karşılık gelen sekans analiz sonuçları	280
Tablo 9.9. Sukroz ile işletilen AKR-Karanlık fermantasyon deneyleri 4. ve 5.İşletim süreçlerinde alınan çamur numuneleri için tüm bakteri-DGGE bantlarına karşılık gelen sekans analiz sonuçları	283
Tablo 9.10. Melas ile işletilen AKR-Karanlık fermentasyon deneyleri 3.İşletim sürecinde alınan çamur numuneleri için tüm bakteri-DGGE bantlarına karşılık gelen sekans analiz sonuçları	287
Tablo 9.11. <i>Methanosarcina</i> ve <i>Methanosaeta</i> türlerinin seri seyreltme işleminden sonraki derişimleri	293
Tablo 9.12. DNA izolasyonu sonrası Nanodrop ölçüm sonuçları	295
Tablo 9.13. PCR sonrası nanodrop sonuçları	295
Tablo 9.14. qPCR sonucunda <i>Methanosarcina</i> türünün farklı oranlarda seyreltilmiş numunelerine karşılık gelen CT değerleri	297
Tablo 9.15. qPCR sonucunda <i>Methanosaeta</i> türünün farklı oranlarda seyreltilmiş numunelerine karşılık gelen CT değerleri	298
Tablo 9.16. qPCR sonucunda <i>Methanosarcina</i> ve <i>Methanosaeta</i> türünün gen kopyasını içermeyen negatif kontrol tüplerinde gözlemlenen CT değerleri	298
Tablo 10.1. Üç-aşamalı entegre sistemlerden elde edilen maksimum enerji ve verim değerlerinin karşılaştırması	304
Tablo 10.2. Üç-aşamalı entegre sistemlerden elde edilen maksimum enerji ve verim	306

değerlerinin yüzde bazında karşılaştırması	
Tablo EK-A1. Karanlık fermantasyon deneyleri-SET 3'de Tepki Yüzeyi Metoduna göre kurulan reaktör çeşitleri ve içerikleri	338
Tablo EK-B1. Karanlık fermantasyon SET 3'de kurulan her bir reaktöre ait hidrojen üretim verimi ve prodüktivite değerleri	343
Tablo EK-B2a. Hidrojen üretim verimi modelinin ANOVA incelemesi	344
Tablo EK-B2b. Hidrojen üretim verimi modeli parametrelerinin ANOVA incelemesi...	344
Tablo EK-B3. MathCad programıyla hesaplanan hidrojen üretim verimi denklemi ve bilgileri	345
Tablo EK-B4a. Hidrojen prodüktivitesi modelinin ANOVA incelemesi	346
Tablo EK-B4b. Hidrojen prodüktivitesi modeli parametrelerinin ANOVA incelemesi...	346
Tablo EK-B5. MathCad programıyla hesaplanan hidrojen prodüktivitesi denklemi ve bilgileri.....	347
Tablo EK-C1. Reaktör 27'ye ait H ₂ üretim değerleri (mL, 30°C)	348
Tablo EK-C2. Reaktör 27'de üretilen ortalama H ₂ hacminin etkin hacme oranı (L/L _o) ve zamana karşı değişimi	348
Tablo EK-D1. TYM ile kurulan SET-2 fotofermantasyon deneylerinde her bir reaktörde elde edilen verim değerleri	352
Tablo EK-D2a. Hidrojen prodüktivite modeli parametrelerinin ANOVA incelemesi.....	353
Tablo EK-D2b. Hidrojen prodüktivite modelinin ANOVA incelemesi..	353
Tablo EK-E1. Havayla sıyırma yöntemi deneyi için kullanılan giriş sularının amonyum iyonu derişimleri	355
Tablo EK-E2. Havayla sıyırma yöntemiyle elde edilen arıtım verimleri	356
Tablo EK-H1. AKR-2.işletim süreci için homoasetojenesis miktarları hesap tablosu..	365
Tablo EK-I1. İki-aşamalı sistemde, kesikli fotofermantasyon reaktör deneyinde besin olarak kullanılan AKR-karanlık fermantasyon sisteminin çıkış suyu özellikleri	367
Tablo EK-I2. İki-aşamalı sistemde, kesikli fotofermentasyon reaktör deneyinde elde edilen üretim hızları ve dönüştürme verimleri	368
Tablo EK-I3. İki-aşamalı sistemde, kesikli fotofermentasyon reaktör deneyinde elde edilen verim değerleri ^a	368
Tablo EK-J1. Vakum yapan reaktörlerin, vakuma başlama sırası	371
Tablo EK-J2.a. Hidrojen üretim verimi modelinin ANOVA incelemesi	372
Tablo EK-J2.b. Hidrojen üretim verimi modeli parametrelerinin ANOVA incelemesi ..	372
Tablo EK-J3.a. Hidrojen prodüktivitesi modelinin ANOVA incelemesi	373
Tablo EK-J3.b. Hidrojen prodüktivitesi modeli parametrelerinin ANOVA incelemesi..	373



Tablo EK-J4. Melas ile kurulan karanlık fermantasyon deneylerinde reaktör çıkış
UAKM, AKM ve çKOİ derişimleri

374

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Organik maddenin anaerobik çürütme serisi (Speece, 1996; Lam ve Lee, 2011)	10
Şekil 3.1. Fotofermantasyon deneylerinde kullanılmak üzere <i>Rhodobacter capsulatus</i> (DSM 1710) çoğaltma protokolü ve aşamaları	22
Şekil 3.2. Kesikli fotofermantasyon deneylerinde kullanılan deney düzeneği	29
Şekil 3.3. Kesikli fotofermantasyon (SET-2) deneylerinde kullanılan düzenekler	31
Şekil 3.4. Farklı başlangıç pH değerlerinde elde edilen toplam (ortalama) gaz üretimi (SET 1) (35°C, glikoz, 10 g/L KOİ)	35
Şekil 3.5. Toplam hidrojen gazı üretimi (SET 2) (35°C, glikoz)	38
Şekil 3.6. H ₂ üretim hızı, H ₂ miktarının ve çıkış pH değerinin, başlangıç pH değerine göre değişimi (SET 2, 35°C, glikoz)	39
Şekil 3.7. Verim, KOİ ve pH ilişkisini betimleyen a) yüzey grafiği, b) izdüşüm grafiği (35°C, sukroz)	43
Şekil 3.8. Prodüktivite, S/X ₀ ve pH ilişkisini betimleyen a) yüzey grafiği, b) izdüşüm grafiği (35°C, sukroz)	45
Şekil 3.9. Prodüktivite, KOİ ve pH ilişkisini betimleyen a) yüzey grafiği, b) izdüşüm grafiği (35°C, sukroz)	46
Şekil 3.10. Prodüktivite, KOİ ve S/X ₀ ilişkisini betimleyen a) yüzey grafiği, b) izdüşüm grafiği (35°C, sukroz)	47
Şekil 3.11. Kesikli anaerobik reaktör deneylerinde zamana karşı a) toplam biyogaz, ve b) metan gazı üretimi (35°C, glikoz)	50
Şekil 3.12. Farklı başlangıç S/X ₀ oranında üretilen toplam biyogaz ve metan gazı değerleri (35°C, glikoz)	52
Şekil 3.13. Toplam fotofermantatif hidrojen gazı üretimi (SET-1) (30°C, 4000 lux, 30 mM asetat)	54
Şekil 3.14. Farklı S/X ₀ oranlarında reaktörlerdeki <i>R.capsulatus</i> derişiminin zamana karşı değişimi (SET-1) (30°C, 4000 lux, 30 mM asetat)	58
Şekil 3.15. İnkübasyon boyunca reaktörlerde gözlenen pH değişimi (SET-1) (30°C, 4000 lux, 30 mM asetat)	58
Şekil 3.16. Fotofermantasyon SET-2'de gözlenen toplam hidrojen gazı üretimleri (30°C, asetat)	61

Şekil 3.17. H ₂ üretim hızı, besin (S) ve mikroorganizma (X ₀) ilişkisini betimleyen a) yüzey grafiği, b) izdüşüm grafiği grafiği (30°C, asetat)	63
Şekil 3.18. H ₂ üretim hızı için, mikroorganizma (X ₀)-Işık şiddeti (I) ilişkisini betimleyen a) yüzey grafiği, b) izdüşüm grafiği (30°C, asetat)	64
Şekil 3.19. H ₂ üretim hızı, Besin (S) ve Işık şiddeti (I) ilişkisini betimleyen a) yüzey grafiği, b) izdüşüm grafiği (30°C, asetat)	65
Şekil 3.20. Başlangıç X ₀ derişimi a) 0,35 g UAKM/L, b) 0,2 g UAKM/L, c) 0,05 g UAKM/L olan reaktörlerde <i>R.Capsulatus</i> derişiminin zamana karşı derişimi (30°C, asetat)	66
Şekil 4.1. AKR düzeneği	73
Şekil 4.2. Birinci AKR işletim sürecinde, a) Tepe gazı kompozisyonu ve günlük toplam gaz üretimi, b) H ₂ üretim verimi ve hızı, c) Çıkış suyu UYA derişimi, d) Ortalama pH, değerlerinin zamana göre derişimi (HBS: 36 saat; Döngü süresi: 24 saat; OYH: 7,5 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 11,2 g/L; ortalama KBS: 14,5 gün; T: 35°C, pH: 7'den 5,5'a düşürülmüştür)	87
Şekil 4.3. İkinci işletim sürecinde, a) Tepe gazı kompozisyonu ve günlük toplam gaz üretimi, b) H ₂ üretim verimi, hızı ve besin çözeltilisindeki tampon çözelti konsantrasyonu, c) Çıkış suyu UYA derişimi, d) Ortalama pH, değerlerinin zamana göre derişimi (HBS: 36 saat; Döngü süresi: 24 saat; OYH: 7,5 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 11,2 g/L; ortalama KBS: 9,8 gün; T: 35°C, pH: 5,5'dan 4,5'a düşürülmüştür)	90
Şekil 4.4. İkinci işletim sürecinin 22.gününde yapılan kinetik çalışmasının sonuçları; a) Tepe gazı kompozisyonu, b) Gaz üretim ve pH, c) Reaktör içi UYA derişimi, değerlerinin zamana bağlı derişimi (HBS: 36 saat; Döngü süresi: 24 saat; OYH: 7,5 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 11,2 g/L; ortalama KBS: 9,8 gün; T: 35°C, pH: 5,5)	92
Şekil 4.5. Üçüncü işletim sürecinde, a) Tepe gazı kompozisyonu ve günlük toplam gaz üretimi, b) H ₂ üretim verim ve hızı, c) Çıkış suyu UYA derişimi, d) Ortalama pH, değerlerinin zamana göre derişimi (HBS: 12 saat; Döngü süresi: 8 saat; OYH: 22,4 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 11,2 g/L; ortalama KBS: 10,3 gün; T: 35°C, pH: 5,5)	100
Şekil 4.6. Dördüncü işletim sürecinde, a) Tepe gazı kompozisyonu ve günlük toplam gaz üretimi, b) H ₂ üretim verim ve hızı, c) Çıkış suyu UYA derişimi, d) ortalama pH, değerlerinin zamana göre derişimi (HBS: 12 saat; Döngü süresi: 8 saat; OYH: 22,4 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 11,2	102

g/L; ortalama KBS: 9,5 gün; T: 35°C, pH: 5,5)	
Şekil 4.7. Dördüncü işletim sürecinin 13.gününde (pH 5,5, HBS 12 saat, döngü süresi 8 saat) yapılan kinetik çalışmasının sonuçları; a) Reaktör içi UYA derişimi, b) Gaz üretimi ve pH, c) Tepe gazı kompozisyonu, değerlerinin zamana bağlı değişimi (HBS: 12 saat; Döngü süresi: 8 saat; OYH: 22,4 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 11,2 g/L; ortalama KBS: 10,3 gün; T: 35°C; pH: 5,5)	104
Şekil 4.8. Beşinci İşletim sürecinde, a) Tepe gazı kompozisyonu ve günlük toplam gaz üretimi, b) H ₂ üretim verim ve hızı, c) Çıkış suyu UYA derişimi, d) Günlük ortalama pH ve KBS, değerlerinin zamana göre değişimi (HBS: 12 saat; Döngü süresi: 8 saat; OYH: 22,4 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 11,2 g/L; ortalama KBS: 4,2 gün; T: 35°C, pH: 5,5)	107
Şekil 4.9. Üç-aşamalı sistemde, kesikli anaerobik reaktörlerde üretilen toplam a) metan ve b) biyogaz miktarı	110
Şekil 4.10. Üç-aşamalı sistemin 2.aşaması olan kesikli anaerobik reaktörlerde zamana karşı toplam UYA derişimi ve kompozisyonlarındaki değişim (35°C, S/X ₀ : 1, pH: 7,3, çKOİ: 4,8 g/L (Test 2), çKOİ: 5,7 (Test 1))	112
Şekil 4.11. Giriş suyu 1 ile (2 tekrarlı) kurulan üçüncü aşama fotofermentasyon reaktörlerinde (a. Reaktör 1; b. Reaktör 2) ortalama UYA derişimlerinin zamana karşı değişimi (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	114
Şekil 4.12. Giriş suyu 1 ile (2 tekrarlı) kurulan üçüncü aşama fotofermentasyon reaktörlerinde <i>R.Capsulatus</i> derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	115
Şekil 4.13. Giriş suyu 2 ile (2 tekrarlı) kurulan üçüncü aşama fotofermentasyon reaktör deneyinde toplam hidrojen gazı üretimi (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	116
Şekil 4.14. Giriş suyu 2 ile kurulan üçüncü aşama fotofermentasyon reaktörlerinde ortalama UYA derişimlerinin zamana karşı değişimleri (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	117
Şekil 4.15. Giriş suyu 2 ile kurulan üçüncü aşama fotofermentasyon reaktörlerindeki <i>R.Capsulatus</i> derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	118
Şekil 4.16. İki-aşamalı sistemde, AKR-karanlık fermantasyon çıkış suyuyla (II.Kaynak suyu, 5.işletme süreci) kurulan kesikli fotofermentasyon reaktörlerinde üretilen ortalama toplam hidrojen gazı üretimi	119
Şekil 4.17. İki-aşamalı sistemde, a) I.Kaynak suyu ile, b) II.Kaynak suyu ile kurulan	122

kesikli fotofermentasyon reaktörlerinde <i>R.Capsulatus</i> derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	
Şekil 4.18. İki-aşamalı sistemde, a) II.Kaynak suyu, ve b) I.Kaynak suyu ile kurulan kesikli fotofermentasyon reaktörlerinde UYA derişimlerinin zamana karşı değişimleri (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	123
Şekil 5.1. Döngü başına, a) Bir döngü süresi, b) HBS ve OYH, c) Çıkış suyu çKOİ derişimi, d) Metan üretim verimi, e) Kümülatif biyogaz ve metan üretimi değerleri. (81. işletim gününden veya 17. döngüden itibaren kurgulanan altı farklı periyottan her birinin hangi döngüleri kapsadığı dikey kesikli çizgilerle gösterilmiştir.) (35 °C, pH: 7-7,5)	148
Şekil 5.2. a) HBS ve OYH, b) F/M ve KBS, c) CH ₄ üretim verimi, d) Kümülatif Biyogaz ve metan üretimi, değerlerinin zamana karşı değişimi (81. işletim gününü takiben, KBS değerinin kontrol edildiği dönem, kesikli çizgi ile ifade edilmiştir.) (35 °C, pH: 7-7,5)	149
Şekil 5.3. İşletim sürecinin farklı periyotlarında döngü bazında gözlemlenen asetik, propiyonik, bütirik ve tUYA derişimleri, a) I. Periyot, b) II. Periyot, c) III. Periyot, d) IV. Periyot, e) V. Periyot, f) VI. Periyot (35 °C, pH: 7-7,5)	151
Şekil 5.4. AKR-Metanojenesi sisteminin IV. ve V.periyodu çıkış sularıyla kurulan kesikli fotofermentasyon reaktörlerinde toplam hidrojen gazı üretimi (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	156
Şekil 5.5. AKR-Metanojenesi sistemi çıkış suları ile kurulan kesikli fotofermentasyon reaktörlerindeki <i>R.Capsulatus</i> derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	158
Şekil 5.6. AKR-Metanojenesi sisteminin a) IV. Periyot suyu, ve, b) V. Periyot suyu ile kurulan kesikli fotofermentasyon reaktörlerindeki ortalama UYA derişimlerinin zamana karşı değişimleri (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	159
Şekil 6.1. IV.periyot çıkış suyu ile kurulan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde üretilen günlük a) biyogaz b) hidrojen gazı miktarları (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	171
Şekil 6.2. V.periyot çıkış suyu ile kurulan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde üretilen günlük a) biyogaz b) hidrojen gazı miktarları (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	172
Şekil 6.3. a) IV.periyot, b) V.periyot çıkış suyu ile 2 tekrarlı kurulan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerindeki <i>R.Capsulatus</i> ortalama derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	173

Şekil 6.4. a) IV.periyot, b) V.periyot çıkış suyu ile 2 tekrarlı kurulan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde elde edilen hidrojen üretim verimleri (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	174
Şekil 6.5. IV.periyot çıkış suyu ile kurulan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerindeki UYA derişimlerinin zamana karşı değişimi, a) HBS=2; b) HBS=4; c) HBS=6 (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	176
Şekil 6.6. V.periyot çıkış suyu ile kurulan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerindeki UYA derişimlerinin zamana karşı değişimi, a) HBS=2; b) HBS=4; c) HBS=6 (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	177
Şekil 7.1. Kümülatif hidrojen üretiminin zamana karşı değişimi (35°C, melas) (TYM'e göre 6 tekrarlı kurulan KOİ=30, X ₀ =5000, pH=5,5 reaktörü için standart sapma değerleri verilmiştir).	203
Şekil 7.2. H ₂ üretim veriminin KOİ derişimine bağlı değişimi (35°C, melas)	206
Şekil 7.3. Üretim hızının (prodüktivitenin) KOİ'ye bağlı değişimi (35°C, melas)	207
Şekil 7.4. Üç-aşamalı sistemde, anaerobik reaktörlerde üretilen toplam a) metan ve b) biyogaz miktarı (35°C, S/X ₀ : 0,5 g KOİ/ g UAKM, pH: 7-7,5)	212
Şekil 7.5. Üç-aşamalı sistemde, anaerobik reaktörlerde zaman karşı toplam UYA derişimi ve kompozisyonlarındaki değişim (UYA analizleri, teknik sebepler nedeniyle, reaktörler sonlandırıldıktan sonra yapılabilmektedir; 49.gün sonunda yapılan UYA analizlerinde en yüksek 2,3 mM asetik aside rastlanmıştır). (35°C, S/X ₀ : 0,5 g KOİ/ g UAKM, pH: 7-7,5)	214
Şekil 7.6. Üç-aşamalı sistemde, kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde <i>R.Capsulatus</i> derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	217
Şekil 7.7. Melasla kurulan anaerobik reaktörlerde üretilen toplam a) metan gazı, b) biyogaz miktarı (35°C, KOİ: 3,5 g/L, pH: 8,2)	219
Şekil 7.8. Farklı başlangıç S/X ₀ oranında üretilen toplam biyogaz ve metan gazı değerleri (35°C, melas, KOİ: 3,5 g/L, pH: 8,2)	220
Şekil 7.9. Başlangıç S/X ₀ oranları a) 0,5 g KOİ/g UAKM, b) 1,0 g KOİ/g UAKM, c) 1,5 g KOİ/g UAKM, d) 2,0 g KOİ/g UAKM, e) 2,5 g KOİ/g UAKM, f) 3,0 g KOİ/g UAKM olan reaktörlerde <i>R.Capsulatus</i> derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	225
Şekil 8.1. AKR-Karanlık fermentasyon I.İşletim sürecinde, a) Tepe gazı kompozisyonu, b) Ortalama pH, c) Günlük gaz üretimi değerlerinin zamana göre değişimi (HBS: 12 saat; Döngü süresi: 8 saat; OYH: 20,9 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 10 g/L; ortalama KBS: 1,8 gün;	241

T: 35°C, pH: 5,5, çökme süresi: 20 dakika)	
Şekil 8.2. AKR-Karanlık fermantasyon 2.İşletim sürecinde, a) Tepe gazı kompozisyonu, b) Ortalama pH, değerlerinin zamana göre değişimi (HBS: 12 saat; Döngü süresi: 8 saat; OYH: 20,9 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 10 g/L; ortalama KBS: 3,1 gün; T: 35°C, pH: 5,5, çökme süresi: 40 dakika)	244
Şekil 8.3. AKR-Karanlık fermantasyon 3.İşletim sürecinde, a) Tepe gazı kompozisyonu, b) Ortalama pH, c) Günlük gaz üretimi, d) Çıkış suyu UYA çeşit ve derişim, değerlerinin zamana göre değişimi (HBS: 12 saat; Döngü süresi: 8 saat; OYH: 20,9 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 10 g/L; ortalama KBS: 3,0 gün; T: 35°C, pH: 5,5, çökme süresi: 40 dakika)	246
Şekil 8.4. Melasla üç-aşamalı sistemde, kesikli metanojenesis reaktörlerde üretilen kümülatif a) metan ve b) biyogaz miktarı (35°C, çKOİ: 5,2 g/L, pH: 7,3, S/X _o : 1 g KOİ/ g UAKM)	250
Şekil 8.5. Test 1 çıkış suyu ile iki tekrarlı kurulan 3.aşama fotofermantasyon reaktör deneyinde toplam hidrojen gazı üretimi (30°C, S/X _o : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	254
Şekil 8.6. Test 1 çıkış suyu ile iki tekrarlı kurulan 3.aşama fotofermantasyon reaktörlerinde <i>R.Capsulatus</i> derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X _o : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	254
Şekil 8.7. Test 4 çıkış suyu ile iki tekrarlı kurulan 3.aşama fotofermantasyon reaktör deneyinde toplam hidrojen gazı üretimi (30°C, S/X _o : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	255
Şekil 8.8. Test 4 çıkış suyu ile iki tekrarlı kurulan 3.aşama fotofermantasyon reaktörlerinde <i>R.Capsulatus</i> derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X _o : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	255
Şekil 8.9. Test 1 çıkış suyu ile iki tekrarlı kurulan 3.aşama fotofermantasyon reaktörlerinde ortalama UYA derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X _o : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	256
Şekil 8.10. Test 4 çıkış suyu ile iki tekrarlı kurulan 3.aşama fotofermantasyon reaktörlerinde ortalama UYA derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X _o : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	256
Şekil 9.1 AKR-Metanojenesis reaktörü; farklı işletim günlerinde alınan çamur numunelerinden archea için PCR ürünlerinin örnek yatay elektroforez görüntüsü (L: DNA Mass Ruler; NK: Negatif kontrol)	274

Şekil 9.2. AKR-Metanojenesis reaktöründen farklı işletim günlerinde alınan çamur numuneleri için archaea popülasyon dinamiğine dair DGGE jel görüntüsü (MRA: Metanojenesis reaktör-archaea)	275
Şekil 9.3. AKR-Metanojenesis reaktöründen farklı işletim günlerinde alınan çamur numuneleri için tüm bakteriler popülasyon dinamiğine dair DGGE jel görüntüsü (MRB: Metanojenesis reaktör-Bakteri)	279
Şekil 9.4. Sukroz ile işletilen AKR-Karanlık fermantasyon deneyleri 1.-4. işletim sürecinde alınan çamur numuneleri için tüm bakteriler popülasyon dinamiğine dair DGGE jel görüntüsü (HT: ısı ön-işlem uygulanan aşı çamuru)	281
Şekil 9.5. Sukroz ile işletilen AKR-Karanlık fermantasyon deneylerine ait 5. işletim sürecinde alınan çamur numuneleri için tüm bakteriler popülasyon dinamiğine dair DGGE jel görüntüsü (0.Gün: Isıl ön-işlem uygulanan aşı çamurunu temsil etmektedir; KFSB: Karanlık fermantasyon-Sukroz-Bakteri)	282
Şekil 9.6. Melas ile işletilen AKR-Karanlık fermantasyon deneyleri 3. işletim sürecinde alınan çamur numuneleri için tüm bakteriler popülasyon dinamiğine dair DGGE jel görüntüsü (0.Gün: Isıl ön-işlem uygulanan aşı çamurunu temsil etmektedir; KFMB: Karanlık fermantasyon-Melas-Bakteri)	286
Şekil 9.7. LB sıvı besiyer ile inkübasyon sonrası <i>E. coli</i> kültürünün çoğaltıldığına dair gözlem	294
Şekil 9.8. LB agar besiyer ile <i>E. coli</i> kültürünün çoğaltıldığına dair gözlem	294
Şekil 9.9. %1'lik agaroz jelde yürütülen PCR ürünlerinin yatay elektroforez sonucu görünümü	296
Şekil 9.10. Farklı oranlarda seyreltilerek qPCR işlemine tabi tutulmuş <i>Methanosaeta</i> türüne ait DNA parçalarının standart eğrisi	298
Şekil 9.11. Farklı oranlarda seyreltilerek qPCR işlemine tabi tutulmuş <i>Methanosarcina</i> türüne ait DNA parçalarının standart eğrisi	299
Şekil EK-A1. Fotofermantasyon deneylerinde kullanılan optik yoğunluk (OD) - UAKM kalibrasyon eğrisi	339
Şekil EK-A2. GC (Agilent)-TCD sistemi ile gaz kompozisyonlarını belirlemek için kullanılan kalibrasyon grafikleri	340
Şekil EK-A3. HPLC ile UYA derişimlerini belirlemek için kullanılan kalibrasyon grafikleri	341
Şekil EK-C1. L/Lc oranlarının zamana göre değişimi	349
Şekil EK-C2. L/Lc oranlarının zamana göre değişiminin lineer kısmının eğimi	349

Şekil EK-E1. Örnek 1 (sol) ve örnek 2 (sağ) için amonyum iyonu derişiminin zamana göre değişimi	356
Şekil EK-E2. Örnek 3 (sol) ve örnek 4 (sağ) için amonyum iyonu derişiminin zamana göre değişimi	357
Şekil EK-E3. Örnek 1 (sol) ve örnek 2 (sağ) için amonyum iyonunun doğal logaritmasının zamana göre değişimi	357
Şekil EK-E4. Örnek 3 (sol) ve örnek 4 (sağ) için amonyum iyonunun doğal logaritmasının zamana göre değişimi	357
Şekil EK-E5. 0,5 g klinoptilolit/50 mL giriş suyu ile çalışılan iki farklı giriş suyundaki amonyum iyonu değişiminin zamana göre değişimi	358
Şekil EK-E6. 1 g klinoptilolit/50 mL giriş suyu ile çalışılan iki farklı giriş suyundaki amonyum iyonu değişiminin zamana göre değişimi	359
Şekil EK-E7. 1,5 g klinoptilolit/50 mL giriş suyu ile çalışılan iki farklı giriş suyundaki amonyum iyonu değişiminin zamana göre değişimi	359
Şekil EK-E8. 2 g klinoptilolit/50 mL giriş suyu ile çalışılan iki farklı giriş suyundaki amonyum iyonu değişiminin zamana göre değişimi	360
Şekil EK-F1. GC (Thermo)-TCD sistemi ile gaz kompozisyonlarını belirlemek için kullanılan kalibrasyon grafikleri	361
Şekil EK-F2. GC-FID ile UYA derişimlerini belirlemek için kullanılan kalibrasyon grafikleri	362
Şekil EK-G1. AKR-Karanlık fermentasyon deneylerinde kullanılan AKR düzeneğinin fotoğrafları	363
Şekil EK-I1. İki-aşamalı sistemde, kesikli fotofermentasyon reaktörlerinde üretilen ortalama toplam hidrojen gazı üretimi (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	369
Şekil EK-I2. İki-aşamalı sistemde, kesikli fotofermentasyon reaktörlerinde <i>R.Capsulatus</i> derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	369
Şekil EK-I3. Üç tekrarlı çalışılan fotofermantasyon reaktörlerinde (a. Reaktör 1, b. Reaktör 2, c. Reaktör 3) UYA derişimlerinin zamana karşı değişimi (30°C, S/X ₀ : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)	370

ÖZET

Bu projenin amacı, birim organik maddeden elde edilen enerjiyi, diğer bir deyişle, toplam hidrojen ve metan üretimini arttırmak için, üç-aşamalı karanlık fermantasyon, metanojenesis ve foto-fermantasyon konfigürasyonunun geliştirilmesi ve enerji veriminin maksimizasyonu amacıyla üçlü sistemin uygun işletim koşullarının belirlenmesidir. Önerilen üç-aşamalı konfigürasyon bugüne kadar çalışılmamış, özgün bir sistemdir. Bu teknolojinin geliştirilmesi için her aşama, kesikli işletilen ve(ya) ardışık-kesikli modda sürekli işletilen reaktörlerle kademeli olarak entegre edilmiştir. Üç-aşamalı konfigürasyon, sentetik atıksu ve uygulama olarak şeker fabrikası atığı / yan ürünü melas ile çalıştırılmıştır. Baskın olan popülasyon dinamiğinin belirlenmesi için moleküler analizleri de gerçekleştirilmiştir.

Proje çıktıları, önerilen üç-aşamalı konfigürasyonlardan (kesikli veya ardışık-kesikli reaktör - AKR- entegrasyonlarından) elde edilen maksimum toplam (brüt) ısıl enerji değerinin 13,47-16,11 kJ/g $\text{çKOİ}_{\text{eklenen}}$, H_2 bazında maksimum verimin ise 9,18-10,80 mol H_2 /mol heksoz aralığında olduğunu göstermiştir. Bu değerler, iki-aşamalı karanlık fermantasyon + fotofermantasyon sistemlerinde bugüne kadar elde edilen en yüksek verimden (7,2 mol H_2 /mol heksoz) %27-50; iki-aşamalı hidrojen sistemlerinin kurulumu için ekonomik değer sınırını oluşturan 8 mol H_2 /mol heksoz veriminden de %14-37 fazladır.

Üç-aşamalı sistem konfigürasyonları, iki-aşamalı karanlık fermantasyon + metanojenesis sistemlerinden elde edilen enerjiye (13,15-14,64 kJ/g çKOİ) benzer ölçüde enerji üretmektedir. Bulgular, üç-aşamalı konfigürasyondan elde edilen enerjinin, iki-aşamalı karanlık fermantasyon + metanojenesis sistemlerinden elde edilebilecek teorik değere oldukça yakın (%89-96) olması açısından da önemlidir. Maksimum enerji ve verim eldesi (16,11 kJ/g çKOİ ve 10,80 mol H_2 /mol heksoz), AKR-Karanlık fermentasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon entegre sisteminde sağlanmıştır.

Bu projede önerilen konfigürasyonla, ülkemiz hedefleri içerisinde yer alan, yenilenebilir enerji üretimi, atıkların kontrolsüz bertarafı ve olası sera-gazı salınımının azaltımı için alternatif bir teknoloji, ve sürdürülebilir kalkınma hedefi gerçekleştirilebilmiştir. Ayrıca, yeşil teknolojinin iki



önemli ham maddesi, metan ve hidrojen, aynı konfigürasyonla ve önemli bir verim eldesiyle üretilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Enerji, fotofermantasyon, hidrojen, homoasetojenesis, karanlık fermantasyon, metan, metanojenesis, PCR-DGGE.

ABSTRACT

The aim of this project is to develop a three-stage dark-fermentation, methanogenesis and photofermentation configuration for improvement of total energy, in other words, total hydrogen and methane production from unit organic matter and determine the operational conditions of three-stage system for maximization of energy yield. Three-stage configuration proposed is an original system that has not been studied so far. In order to develop this configuration, each stage operated in batch and/or continuous sequencing-batch mode was gradually integrated. Three-stage configuration was operated with synthetic wastewater and the waste/by-product of sugar industry, i.e. molasses, the latter as an application. Molecular analysis were also performed to determine dominant microbial population dynamics.

Results revealed that maximum total(gross) heat energy of 13.47-16.11 kJ/g sCOD_{added} and maximum yield of 9.18-10.80 mol H₂/mol hexose were obtained via the proposed three-stage configurations (batch or sequencing batch reactor-SBR- integrations). These values are 27-50% greater than the maximum value (7.2 mol H₂/mol hexose) practically obtained so far from two-stage dark-fermantation+photofermantation systems, and 14-37% greater than 8 mol H₂/mol hexose defined to be the economic threshold for application of two-stage dark-fermantation+photofermantation systems.

Three-stage configuration produces an energy yield similar to that of two-stage dark-fermantation+methanogenesis systems (13.15-14.64 kJ/g sCOD). Results are also of significance for producing energy yields quite close (89-96%) to the theoretical values obtained from two-stage dark-fermantation+methanogenesis systems. Maximum energy and yield values (16.11 kJ/g sCOD and 10.80 mol H₂/mol hexose) were obtained in SBR-Dark fermentantion + SBR-Methanogenesis + Batch-photofermantation system.

With the configuration proposed in this project, country policies such as renewable energy production, an alternative technology for the reduction of uncontrolled waste disposal and greenhouse gas emissions, and sustainable development have been realized. In addition, two important raw materials of green technology, hydrogen and methane, have been gained in the same configuration with significant yields.



Anahtar Kelimeler: Dark fermentation, energy, homoacetogenesis, hydrogen, methane, methanogenesis, PCR-DGGE, photofermentation.



1. GİRİŞ

Hızlı sanayileşme, şehirleşme ve dünya nüfusundaki önlenemeyen artış beraberinde enerjiye ve dolayısıyla enerji üretimindeki en yüksek paya sahip fosil yakıtlara olan talebin her geçen gün daha da artmasına yol açmaktadır. Nitekim 2007 yılında 12 milyar ton petrol eşdeğeri (tep) olan dünya birincil enerji talebinin 2030 yılında 16,8 milyar tep'e ulaşacağı öngörülmektedir (Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı, 2012). Ülkemizde ise 2008 yılı toplam birincil enerji tüketiminin 106,3 milyon tep, üretiminin ise 29,2 milyon tep olduğu ve enerji tüketiminin 2030 yılına kadar yıllık %4 artacağı öngörülmektedir (Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı, 2012). Bu veriler, enerji kaynağında dışa bağımlılığımızı ortaya koyarken, enerji ihtiyacımızdaki açığın 2009–2011 yılları arasında giderek arttığı da bilinmektedir (Dünya Enerji Konseyi Türkiye Milli Komitesi, 2010). Ülkemizin 2008 yılı enerji tüketimindeki kaynakların payları incelendiğinde, enerji talebinin %32'sinin doğalgaz, %29,9'unun petrol, %29,5'inin kömür, geri kalan %8,6'sının ise yenilenebilir enerji kaynaklarından karşılandığı görülmektedir (Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı, 2012). Diğer bir deyişle, enerji talebinin %91,4'ü fosil yakıtlardan karşılanmaktadır. Enerjideki dışa bağımlılığımız ve fosil yakıt ihtiyacının sürekli artması, yenilenebilir olmayan fosil yakıt rezervlerinin hızla tükenmesine yol açmaktadır. Fosil yakıtların kullanımı, ayrıca, iklim değişikliği, küresel ısınma, hava kalitesinin bozunması gibi hem bölgesel hem de küresel çevre sorunlarını da gündeme getirmiştir. Örneğin, ülkemizde, 2004 yılı sera gazı emisyonlarının CO₂ eşdeğeri olarak %76,7'si enerji sektörü kaynaklıdır (Türkiye İstatistik Kurumu, 2007). Ayrıca, 2004 yılı toplam CO₂ emisyonlarının yaklaşık %92'si yakıtların yanmasından kaynaklanmaktadır (Türkiye İstatistik Kurumu, 2007). Bir başka deyişle, ülkemizde enerji tüketiminde %91'lik paya sahip fosil yakıtlar, küresel ısınmada en etkin rolü üstlenmektedir.

Hem çevresel sorunlar hem de fosil yakıt rezervlerinin sürdürülebilir olmayacak şekilde tüketilmesi ve enerjide dışa bağımlılık, yenilebilir enerji kaynaklarına olan talebi arttırmış ve kullanımını neredeyse zorunlu hale getirmiştir. Günümüzde yenilenebilir enerji kaynakları dünya toplam enerji talebinin sadece %2,5'ini karşılamakta olup, bu değer artırılması hedeflenmiştir (Dünya Enerji Konseyi Türkiye Milli Komitesi, 2010). Örneğin, Avrupa Birliği (AB) 2020'de toplam enerji tüketiminin %20'sini yenilenebilir enerji kaynaklarından sağlamayı hedeflemiştir (Dünya Enerji Konseyi Türkiye Milli Komitesi, 2010). Ülkemizde de yenilenebilir enerji kaynaklarına olan talebin artması amacıyla 'Yenilenebilir Enerji Kaynaklarının Elektrik



Enerjisi Üretimi amaçlı Kullanımına İlişkin Kanun'da 2011 yılında teşvik edici bir değişiklik yapılmış; bu kaynaklardan üretilen elektriğin satış fiyatı ciddi şekilde arttırılmıştır (Resmi Gazete, 2005; 2011). Ayrıca, DPT'nin (Kalkınma Bakanlığı) 9.Kalkınma Planı enerji alt başlığında 'Üretim sistemi içinde yerli ve yenilenebilir enerji kaynakları payının azami ölçüde yükseltilmesi, enerji talebi karşılanırken çevresel zararların en alt düzeyde tutulması' hedeflenmektedir (Resmi Gazete, 2006). Bilindiği üzere, ülkemiz, 24 Mayıs 2004 tarihi itibarıyla Birleşmiş Milletler İklim Değişikliği Çerçeve Sözleşmesine, 26 Ağustos 2009 tarihinde ise Kyoto Protokolü'ne taraf olmuştur. Hazırlanan 'İklim Değişikliği Ulusal Eylem Planı' (Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, 2011) doğrultusunda, iklim Değişikliği Çerçeve Sözleşmesine ilişkin yükümlülüklerin yerine getirilmesi amaçlanmıştır. Örneğin, sanayide kişi başı CO₂'nin 2023 yılına kadar azaltılması; 2017'den itibaren yeni binaların yıllık enerji ihtiyacının en az %20'sinin yenilenebilir enerji kaynaklarından sağlanması hedeflenmiştir (Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, 2011). Dolayısıyla, yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanılması, hem çevresel sorunların çözümü hem de enerji açığının karşılanması açısından ülkemiz politikasında önemli bir yer tutmaktadır.

Organik atıklar veya biyokütle/biyo-atıklar, karbon içerikleri sebebiyle önemli sürdürülebilir enerji kaynaklarıdır. AB Komisyonu tarafından biyo-atıkların (evsel gıda atıkları, park-bahçe atıkları, gıda endüstrisi atıkları) yönetiminde gelecekteki adımlar üzerine hazırlanan raporda AB ülkelerinde her yıl 118-138 milyon ton arasında biyo-atık üretildiği belirtilmiştir (Avrupa Birliği, 2012). Ülkemiz de atık biyokütle kaynakları bazında yüksek bir potansiyele sahiptir. Türkiye'deki tarımsal atık potansiyelinin araştırıldığı bir projede, tarım arazilerinden yıl bazında üretilen toplam tarım ve agro-endüstriyel atık miktarının 50-65 milyon ton olduğu belirtilmektedir (Başçetinçelik vd., 2015). Biyolojik arıtım yoluyla hidrojen ve metan gibi yenilenebilir enerji yakıtlarına dönüştürülebilecek organik atıklar, ne yazık ki etkin şekilde değerlendirilememektedir. AB ülkelerinde her yıl 118-138 milyon ton arasında üretilen biyo-atıkların ortalama %40'ı (bazı üye ülkelerde %100'ü) deponi sahalarına gönderilmekte olup, bu oranın ilgili direktifler doğrultusunda %35'lere indirilmesi gerektiği; biyo-atıkların daha etkili yönetilerek atık hiyerarşisi içerisinde anaerobik bozundurma ile arıtımı, ve biyogaz / gübre üretilmesi tavsiye edilmektedir (Avrupa Birliği, 2012). Ülkemizde üretilen katı atıklar genellikle kontrolsüz bir şekilde düzensiz depolama alanlarına dökülmekte olup; 2004 yılı Belediye Katı Atık envanterine göre toplamda yaklaşık sadece %31'i uygun şekilde (düzenli depolama ve kompostlaştırma) bertaraf edilmiştir (Çevre ve Orman Bakanlığı, 2015). İklim Değişikliği Ulusal Eylem Planı'na göre, ülkemizde düzenli depolama tesislerine kabul edilen biyobozunur atık miktarının 2015 ve 2025'de sırasıyla %75 ve %35'e düşürülmesi planlanmaktadır (Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, 2011). Dolayısıyla, ülkemizde de organik atıkların etkin şekilde kullanılması ve değerlendirilmesi gerekmektedir.

Sürdürülebilir enerji eldesinde kullanılacak organik atıklar, doğaya atılmadan bırakıldığında, hava ve toprak kirliliği, yüzeysel ve yeraltı su kaynaklarının bozunması, kontrolsüz çürüme sonucu sera gazlarının (CO_2 , CH_4 , N_2O) salınımı gibi insan ve çevre sağlığını tehdit eden sorunlara yol açmaktadır. Bu atıkların, kontrollü şekilde biyolojik bozundurulması sonucunda ise yenilebilir enerji kaynakları/yakıtları olan biyogaz ve biyohidrojen üretilebilir. Bu sayede hem enerji hem de çevre başlıklarına yönelik sorunların aynı anda giderilmesi sağlanarak, ülkemiz politika ve hedeflerine ulaşılmasında yol alınabilir.

Biyogaz, organik atıkların anaerobik bozundurulması sonucu oluşan yenilenebilir bir enerji kaynağıdır. Ülkemiz sera gazı emisyonlarında CO_2 eşdeğeri bazında enerji sektöründen sonra ikinci önemli kaynak, %9,3'le atık bertarafıdır (Türkiye İstatistik Kurumu, 2007). Ayrıca, 2004 yılı CH_4 emisyonlarının yaklaşık %60'ı atık bertarafından, %32,5'i de tarımsal faaliyetlerden kaynaklanmaktadır (Türkiye İstatistik Kurumu, 2007). Dolayısıyla, organik atıkların doğaya gelişigüzel atılması yerine kontrollü şekilde anaerobik bozundurulması ve oluşan biyogazın kullanılması, mevcut kaynakların anlamlı şekilde değerlendirilmesinde ve küresel ısınmayla mücadelede oldukça önemlidir. Biyogazın enerji üretiminde kullanılması fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltırken, yakılması sonucunda oluşan SO_x , NO_x , toz ve CO_2 emisyonları, diğer fosil yakıtların (petrol, kömür, doğal gaz gibi) yakılması sonucunda oluşan emisyon değerlerine kıyasla daha az olduğu için oldukça avantajlıdır (Klingler, 2015). Ayrıca, anaerobik bozundurma sırasında oluşan metan gazının kalorifik değeri 56 kJ/g'dır; bu durum, diğer yakıtlar (doğal gaz, kömür, benzin, odun vb.) arasında hidrojenen sonra en yüksek ikinci kalorifik değere sahip olan metanın üretim ve kullanımını daha anlamlı hale getirmektedir (Lam ve Lee, 2011).

Hidrojen yenilebilir ve bilinen tüm yakıtlar arasında en temiz yakıttır. Hidrojenin yakılması sonucunda sadece su oluşmaktadır; bu bağlamda, hidrojen üretimi çalışmaları sera gazı etkisinin azaltılması bazında en etkin yollardan birini oluşturmaktadır. Hidrojen, bugüne kadar bilinen tüm yakıtlar arasında 142 kJ/g kalorifik değeri ile en yüksek enerji ihtiva eden yakıttır (Das ve Veziroğlu, 2008). Ayrıca, hidrojen tıpkı metan gibi, yeşil teknolojide kullanılan en önemli ham maddeden birini oluşturmaktadır. Hidrojen, kimyasal, elektrokimyasal ve biyolojik yöntemlerle üretilebilir. Günümüzde, hidrojen üretiminin %88'si hidrokarbon içeren yakıtlardan (doğal gaz, kömür, nafta, ağır petrol), % 4'ü ise elektrolizden sağlanmaktadır (Das ve Veziroğlu, 2008). Bir diğer deyişle, en temiz yakıt olan hidrojen genellikle sürdürülebilir olmayan ve tükenmekte olan fosil yakıtlardan üretilmektedir. Biyolojik yöntemlerle hidrojen üretimi (biyohidrojen üretimi) ise organik atıkların kullanılması, doğaya verilecek zararın enerji olarak kazanımı ve doğal kaynakların korunması açısından önemli bir

alternatiftir. Ayrıca, biyohidrojen üretimi atmosfer basıncında ve ortam sıcaklığında gerçekleştirildiği için, kimyasal veya elektrokimyasal hidrojen üretim proseslerine kıyasla daha ekonomiktir. Biyohidrojen üretimi, merkezi olmaması; biyokütle üretiminin gerçekleştiği yere kurulabilmesi ve merkezi enerji hattına kıyasla nakliye masraflarının ve enerji harcamalarının düşürülmesi açısından avantajlıdır (Das ve Veziroğlu, 2008).

Sonuç olarak, organik atıkların biyohidrojen veya metana dönüştürüldüğü biyolojik sistemler, ülkemiz hedeflerine ulaşılmasında, atıkların arıtımı ve sera-gazı salınımının azaltılmasıyla çevrenin korunumunda, enerji ihtiyacına cevaben yenilenebilir/sürdürülebilir enerji üretiminde rol alan önemli teknolojilerdir. Metan üretiminin sağlandığı anaerobik çürütme birçok organik atık için dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyohidrojen üretim prosesleri de biyoatıklardan yenilenebilir ve (en) temiz enerji üretmesi sebebiyle yoğun olarak araştırılmaktadır. Fakat günümüzde, biyohidrojen üretiminin ekonomik boyutta uygulanabilir olmasının önünde bazı engeller bulunmaktadır. Biyohidrojen üretimini arttırmak için reaktör konfigürasyonunun geliştirilmesi, aşı çamurunun immobilizasyonu, genetik çalışmalarla mikrobiyel kültür genetiğinin değiştirilmesi, iki-aşamalı sistem uygulamaları, ham maddenin ön-arıtımı gibi konularda çalışılmaktadır. Birim organik maddeden daha fazla enerji eldesinin sağlandığı iki-aşamalı sistemlerde, ilk aşama olan karanlık-fermantasyonda oluşan organiklerden enerji geri kazanımı için, ardışık metanojenesis veya foto-fermantasyon uygulanır. Bu sayede, karanlık-fermantasyon çıkışındaki düşük karbonlu bileşikler takip eden sistemde besin olarak kullanılarak toplam H₂ veya CH₄ üretiminin artması sağlanmaktadır. Fakat bugüne kadar, hidrojen üretiminde başarı ile tanımlanabilecek ve ekonomik anlamda (iki-aşamalı) hidrojen üretiminin anlamlı olmasını sağlayabilecek 8 mol H₂/mol glukoz verimine (Yokoi vd., 2002) ulaşamamıştır (Argun ve Kargı, 2011). Başlıca sorun, büyük reaktör hacimlerini ve uzun bekletme sürelerini gerektiren düşük üretim verimi ve hızıdır. Fermantatif biyohidrojen üretimini arttırmak adına, hala, en uygun biyokütle/hammadde tipinin, ön-arıtım metotlarının, işletim koşullarının ve modunun, kültür tipinin ve proses akım şemasının araştırılması gerektiği; karanlık- ve foto-fermantasyonun entegrasyonunda en etkin reaktör konfigürasyonunun netleşmediği anlaşılmaktadır.

Bu projenin amacı, birim organik maddeden elde edilen enerjiyi, diğer bir deyişle, toplam hidrojen ve metan üretimini arttırmak için, üç-aşamalı karanlık fermentasyon, metanojenesis ve fotofermantasyon konfigürasyonunun geliştirilmesi ve enerji veriminin optimizasyonu amacıyla üçlü sistemin uygun işletim koşullarının belirlenmesidir. İki-aşamalı karanlık-fermantasyon ve metanojenesisin ikinci aşamasında organik madde genellikle tümüyle arıtılmamaktadır. Öte taraftan, karanlık fermentasyon ve fotofermantasyon ikilisinde, karanlık fermentasyonda oluşan düşük karbonlu organik derişimleri fotofermantasyon için

uygun olmamakta ve verimini düşürebilmektedir. Dolayısıyla, ardışık fotofermantasyon için, genellikle karanlık fermantasyon çıkışının seyreltilmesi gerekmektedir; bu da fotofermantasyon reaktör hacminin artmasına ve sistemin ekonomik olarak uygun olmamasına yol açmaktadır. Önerilen üç-aşamalı konfigürasyonla, 1) karanlık-fermantasyonda oluşan çeşitli organiklerin metanojenesis reaktöründe giderileceği, 2) karanlık fermantasyona kıyasla daha düşük derişime sahip olacak metanojenesis çıkış suyunun fotofermantasyon için daha uygun olacağı, verimini artıracacağı ve seyreltme ihtiyacını düşüreceği öngörülmektedir. Dolayısıyla, iki-aşamalı sistemlere kıyasla önerilen üç-aşamalı sistemde, birim organik maddeden elde edilen toplam biyohidrojen ve metan üretim verimi (toplam enerji verimi) artacaktır. Bu konfigürasyonun diğer bir avantajı, iki-aşamalı karanlık-fermantasyon ve metanojenesis sistemlerinde çıkış suyunun organik madde içeriğinin genellikle aerobik bir reaktörle arıtılıp deşarj standartlarına indirilmesi yerine, fotofermantasyonla temiz enerjiye dönüştürülmesidir.

Bu projede önerilen ve araştırılan üç-aşamalı konfigürasyon bugüne kadar çalışılmamış, özgün bir sistemdir. Bu teknolojinin geliştirilmesi için her aşama, kesikli işletilen ve(ya) ardışık-kesikli modda sürekli işletilen reaktörlerle kademeli olarak entegre edilmiştir. Her aşama için, üçlü konfigürasyonun toplam enerji veriminin maksimizasyonu esas alınarak, uygun işletim koşulları (optimizasyonu) araştırılmıştır. Üç-aşamalı konfigürasyon, sentetik atıksu ve uygulama olarak şeker fabrikası atığı melas ile çalıştırılmış ve konfigürasyonun hem toplam enerji hem de metan ve hidrojen üretim verimi araştırılmıştır. Farklı işletim koşullarında baskın olan popülasyon dinamiğinin belirlenmesi amacıyla, moleküler analizler uygulanarak proseslerin daha iyi tanımlanması ve kontrolüne yönelik öneriler geliştirilebilmiştir. Bu proje ile ülkemiz hedefleri arasında yer alan yenilenebilir enerji üretimi, atıkların düzensiz bertarafı ile çevreye verilecek zararların ve sera-gazı salınımının azalımı ve sürdürülebilir kalkınma hedeflerine ulaşılması planlanmıştır.

1.1 Projenin Amacı

Projenin amacı, birim organik maddeden elde edilen enerjiyi, diğer bir deyişle, toplam hidrojen ve metan üretimini arttırmak için üç-aşamalı karanlık fermantasyon, metanojenesis ve foto-fermantasyonu içeren özgün bir konfigürasyonunun geliştirilmesi ve enerji veriminin optimizasyonu amacıyla üçlü sistemin uygun işletim koşullarının belirlenmesidir. Üç-aşamalı konfigürasyonun uygulaması amacıyla, orijinal bir ürün; şeker fabrikası yan ürünü melas kullanılarak metan ve hidrojen üretim verimi araştırılmıştır.

Organik atıklardan biyohidrojen ve metan üretimi yoğun olarak çalışılan bir konudur. İki-aşamalı karanlık fermantasyon ve metanojenesis, veya, karanlık fermantasyon ve

fotofermantasyon konfigürasyonları, tek aşamalı kullanımlarına kıyasla, sırasıyla, daha yüksek metan ve hidrojen üretim verimi sebebiyle tercih edilmektedir. Fakat biyohidrojen fermentasyonu, H_2 üretim veriminin ve hızının düşük olması sebebiyle ekonomik olarak uygulanabilir aşamada değildir. Birim organik maddeden hidrojen üretim verimi ve hızının artırılması amacıyla araştırmalar yoğun olarak devam etmektedir. Fakat bugüne kadar elde edilen en yüksek verim 7,2 mol H_2 /mol glikozdur (veya 7,2 mol H_2 /mol heksoz) (Yokoi vd., 2002) ve hala ekonomik değer olarak tanımlanan 8 mol H_2 /mol glikoz verimine ulaşamamıştır (Argun ve Kargı, 2011).

Bu projede önerilen üç-aşamalı sistemle organik maddedeki enerjinin etkin bir şekilde enerjiye dönüşümünün sağlanması ve birim maddeden elde edilen yenilenebilir enerji veya toplam H_2 ve CH_4 miktarının artması beklenmektedir. Karanlık fermentasyon ve fotofermantasyon proseslerinin arasına yerleştirilen metanojenesis sistemi ve bu üçlü sistem için uygun işletim koşullarının belirlenmesi ile, fermentasyon çalışmalarında odaklanıldığı şekliyle sadece birim maddeden H_2 üretiminin maksimizasyonu değil, ekonomik olarak anlamlı sayılabilecek toplam enerji üretiminin artırılması sağlanabilecektir.

1.2 Projenin Kapsamı

Projenin stratejisi, üç-aşamalı sistemle birim organikten elde edilebilecek enerji veriminin optimizasyonudur. Bilindiği üzere, karanlık-fermantasyonda düşük H_2 üretimi, her zaman beraberinde düşük uçucu yağ asidi üretimi ve besin olarak kullanıldığı (takip eden) metanojenesiste düşük metan üretimi anlamına gelmeyebilir. Örneğin, karanlık-fermantasyonda homoasetojenlerin olası varlığı, hidrojen miktarını düşürürken asetat derişiminin artmasına ve metanojenesisin daha verimli olmasına neden olabilir (Speece, 1996). Ya da, yüksek H_2 üretimi, takip eden metanojenesis aşamasında her zaman yüksek metan üretimine, dolayısıyla enerji maksimizasyonuna yol açmayabilir. Dolayısıyla, bu projenin kapsamı, üç-aşamalı entegre bir sistemde toplam enerji veriminin maksimizasyonu için uygun işletim koşullarını belirlemektir. Bu amaçla, karanlık fermentasyon, metanojenesis ve fotofermantasyon dizinindeki sistemler kademeli olarak entegre edilmiştir. Her aşama için uygun işletim koşulları belirlenirken, üç aşamanın entegrasyonundan elde edilen toplam enerji verimi dikkate alınmıştır. Bu amaçla farklı işletim koşullarında çalıştırılan her aşamanın çıkış suyu takip eden aşamanın besinini oluşturmaktadır. Böylelikle, farklı işletim koşullarında ardışık-kesikli (fed-batch) modda sürekli olarak çalıştırılan ve/veya kesikli çalıştırılan üç-aşamalı karanlık fermentasyon, metanojenesis ve fotofermantasyon dizininin toplam metan ve hidrojen üretimi ve toplam enerji üretim verimi belirlenmiştir. Üç-aşamalı konfigürasyon, sentetik atıksu ve uygulama olarak şeker fabrikası yan ürünü / atığı melas ile çalıştırılmış ve konfigürasyonun hem toplam enerji hem de metan ve hidrojen üretim verimleri araştırılmıştır.

Ayrıca, prosesteki işletim koşullarının daha iyi tanımlanabilmesi ve kontrolüne yönelik öneriler sunulabilmesi için sürekli reaktörlerde popülasyon dinamiğinin belirlenmesi adına moleküler analizler uygulanmıştır.

Toplam sekiz iş paketinden oluşan bu projede, deneysel çalışmalar İş Paketi 2-8 bünyesinde gerçekleştirilmiştir. Tüm iş paketleri tamamlanmıştır. İş paketlerinin başlıkları ve kısaca içerikleri altta sunulmuştur.

- **İş Paketi 1** - Reaktör düzeneğinin tasarımı ve yaptırılması
- **İş Paketi 2** - Kesikli karanlık-fermantasyon deneyleri: Başlangıç işletme ve inhibisyona yol açan koşulların araştırılması
- **İş Paketi 3** - Üç-aşamalı sistemde karanlık fermentasyonun optimizasyonu: Ardışık-kesikli reaktörde sürekli çalıştırılan karanlık fermentasyon aşamasının optimizasyonu (işletme koşullarının belirlenmesi) ve çıkış suyunun takip eden sırasıyla kesikli metanojenesis ve fotofermantasyon reaktörlerine uygulanmasıyla üçlü sistemin toplam enerji veriminin araştırılması
- **İş Paketi 4** - Üç-aşamalı sistemde metanojenesisin optimizasyonu: Ardışık-kesikli reaktörde sürekli çalıştırılan metanojenesis aşamasının işletme koşullarının belirlenmesi ve çıkış suyunun takip eden kesikli fotofermantasyon reaktörlerine uygulanmasıyla üçlü sistemin toplam enerji veriminin araştırılması
- **İş Paketi 5** - Üç-aşamalı sistemde fotofermantasyonun optimizasyonu: Yarı-kesikli reaktörde fotofermantasyon aşamasının işletme koşullarının belirlenmesi ve üçlü sistemin toplam enerji veriminin araştırılması
- **İş Paketi 6** - Orijinal atıkla kesikli üç-aşamalı sistem deneyleri: Melas ile üç-aşamalı kesikli reaktör konfigürasyonunun işletilmesi, başlangıç işletme ve inhibisyona yol açan koşulların tanımlanması ve tüm sistemin toplam enerji veriminin araştırılması
- **İş Paketi 7** - Orijinal atıkla üç-aşamalı sistemde karanlık-fermantasyonun optimizasyonu: Melas ile üç-aşamalı ardışık-kesikli karanlık-fermantasyon, kesikli metanojenesis ve kesikli foto-fermantasyon konfigürasyonunun çalıştırılması, ilk aşamanın işletme koşullarının belirlenmesi ve üçlü sistemin toplam enerji veriminin araştırılması
- **İş Paketi 8** – Popülasyon dinamiğinin belirlenmesi: Ardışık-kesikli beslenen ve sürekli işletilen reaktör çalışmalarında farklı işletim koşullarında popülasyon dinamiğinin ve baskın türlerin moleküler analizlerle belirlenmesi

Üç-aşamalı sistemin entegrasyonunun araştırıldığı bu projede, neredeyse tüm iş paketlerinde iki- veya üç-aşama (karanlık fermentasyon, metanojenesis ve fotofermantasyon süreçleri) ve entegrasyonu araştırılmaktadır. Dolayısıyla, bütünlük sağlaması ve izlenebilmesi amacıyla,



her iş paketi ayrı bölümler halinde (Bölüm 3'den Bölüm 9'a), o iş paketinde gerçekleştirilen gereç ve yöntem, bulgular ve tartışma/sonuç kısımlarını içerecek şekilde yazılmıştır. Tüm iş paketleri başarıyla tamamlanmıştır. Raporda, tüm iş paketlerinden elde edilen genel sonuçların ve önerilerin yazıldığı Genel Sonuçlar ve Öneriler Bölümü de (Bölüm 10) yer almaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Bu projede araştırılan üç-aşamalı konfigürasyon, karanlık fermantasyon + metanojenesis + fotofermantasyon sıralı kombinasyonundan bir araya gelmesi planlanan, bugüne kadar çalışılmamış, özgün bir sistemdir. Bu konfigürasyonda yer alan tüm aşamalar ve ikili kombinasyonlarına özgü literatür özeti bu bölümde sunulmuştur.

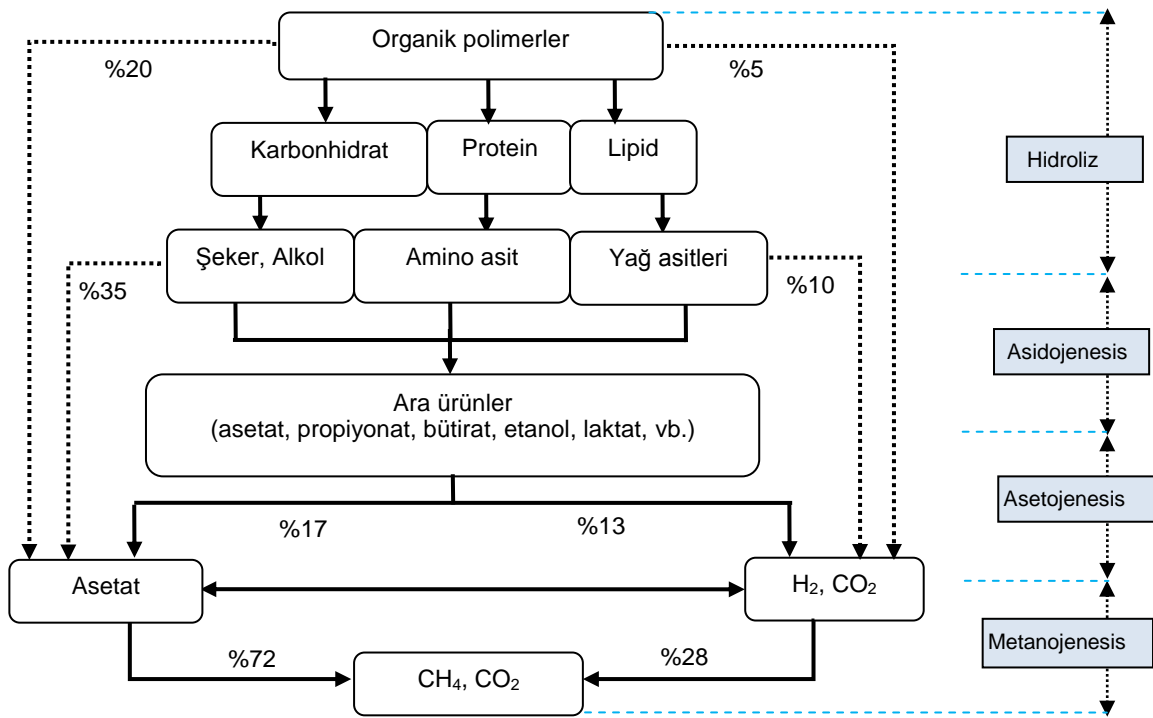
2.1 Anaerobik Çürütme (Bozundurma) - Biyogaz Üretimi

Anaerobik çürütme, birçok farklı mikroorganizma grubunun simbiyotik çalışması sonucu organik maddenin metan ve karbondioksit'e dönüştürülmesidir. Anaerobik çürütme, hidroliz, asidojenesis, asetojenesis ve metanojenesis olmak üzere başlıca 4 basamaktan oluşmaktadır (Şekil 2.1). Tek aşamalı sistemlerde 4 basamak da aynı anda, dengeli ve herhangi birinde akümülyasyon olmadan gerçekleşir. Şekil 2.1'de görüldüğü üzere, organik polimerler öncelikle hidrolize olarak şeker, alkol, amino asit ve yağ asitlerine dönüşür. Bu ürünler, sonraki asidojenesis basamağında fermentatif bakterilerce uçucu yağ asitleri (asetat, bütirat vb.), etanol, laktat gibi az karbonlu organiklere ve H₂ ve CO₂ gazlarına dönüştürülür. Üçüncü basamakta, asetojenik bakteriler uçucu yağ asitlerini asetat, H₂ ve CO₂'ye dönüştürür. Son basamak olan metanojeniste ise, metanojenler (asetoklastik ve hidrojenotrofik metanojenler, sırasıyla) asetat veya H₂+CO₂'yi CH₄ ve CO₂'ye dönüştürürler (Speece, 1996). Mikrobiyel büyüme göz ardı edildiğinde tek-aşamalı anaerobik çürütme sonucu, 1 mol glikozdan teorik olarak 3 mol CH₄ üretildiği Denklem 2.1'de gösterilmiştir.

Anaerobik çürütme ilk olarak atıksu arıtma tesisi çamurlarının çürütülmesinde kullanılmış olup, sonraları birçok endüstride yaygın olarak uygulanmıştır (Speece, 1996). Agro-endüstriyel atıklardan, mandıra atıkları, tavuk gübresi, büyük ve küçük baş hayvan gübreleri, kağıt endüstrisi atıksuyu, meyve işleme tesisleri atıkları, peynir-altı suyu vb. birçok atık/atıksu anaerobik çürütme yoluyla değerlendirilerek yenilenebilir enerji olan metan üretilebilmektedir (Erguder vd., 2000; Demirer vd., 2000; Erguder vd., 2001; Tezel vd., 2001; Alkaya vd., 2010).

Anaerobik çürütmeyi etkileyen faktörler arasında, substrat derişimi, mikroorganizma adaptasyonu, besiyer madde, substrat/mikroorganizma oranı, alkalinite, pH, sıcaklık, toksik madde tipi ve derişimi, yükleme hızları gibi faktörler yer almaktadır (Speece, 1996). Metan

üretim potansiyelinin maksimizasyonunda, optimum işletim koşullarının yanı sıra reaktör konfigürasyonu da önemlidir. Örneğin, metan üretim potansiyelini arttırmak amacıyla, iki-aşamalı sistemler çalışılmaktadır. İki-aşamalı anaerobik çürütmede, ilk aşama hidroliz ve asidojenesis; ikinci aşama ise asetojenesis ve metanojenesis kapsar (Şekil 2.1). Bu sistemlerde, ilk aşamanın ayrı bir reaktörde gerçekleştirilmesi, hidroliz ve asidojenesis aşamalarının daha kontrollü gerçekleşmesini ve asidifikasyon veriminin artmasını sağlamaktadır. Daha yüksek miktarda asit üretimi, ikinci-aşamanın da daha verimli olmasını ve toplamda tüm sistemin metan veriminin tek-aşamalı anaerobik çürütmeye kıyasla daha yüksek olmasını sağlar (Demirer ve Chen, 2004; Hawkes vd., 2007; Guwy vd., 2011). İki-aşamalı hidroliz/asidojenesis (veya karanlık fermantasyon) ve metanojenesis ile ilgili literatür bilgisi Bölüm 2.3.2'de sunulmuştur.



Şekil 2.1. Organik maddenin anaerobik çürütme serisi (Speece, 1996; Lam ve Lee, 2011)



2.2 Biyohidrojen Üretimi

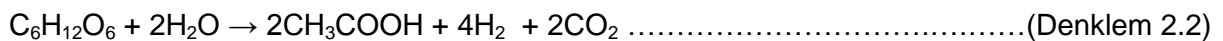
Biyohidrojen üretimi, suyun biyofotolizi (direk ve indirek biyofotoliz), fotofermantasyon (ışıklı-fermantasyon) ve karanlık fermantasyon (ışıksız fermantasyon) yöntemleriyle gerçekleştirilebilir (Das ve Veziroğlu, 2008). Suyun ışık enerjisi ile biyofotolizi biyohidrojen

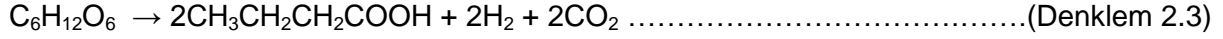
üretiminde en temiz yaklaşım olarak bilinse de, düşük H₂ üretim verimi, ışık ihtiyacına bağımlılık ve oksijen inhibisyonu karşılaşılan sorunlar arasındadır (Argun ve Kargı, 2011). Karbonhidrattan fermantasyon yoluyla H₂ üretimi, suyun biyofotolizi ile H₂ üretiminden çok daha hızlıdır ve karanlık fermantasyon veya fotofermantasyon biyofotolize göre daha avantajlıdır. Fakat karanlık fermantasyonun H₂ üretim hızı yüksek fakat H₂ verimi düşüktür; öte yandan fotofermantasyonun verim eldesi yüksek, üretim hızı düşüktür (Li vd., 2011; Guwy vd., 2011). Endüstriyel uygulamalarda, biyohidrojen üretiminin ekonomik anlamda değerli olabilmesi için, biyohidrojen üretim verim ve hızının artırılması gerekmektedir. Bu sebeple, birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, fermantatif biyohidrojen üretim proseslerinin geliştirilmesi, diğer bir deyişle, biyohidrojen üretim verimi ve hızının artırılmasına yönelik araştırmalar hala yoğun olarak devam etmektedir (Guwy vd., 2011). Fermantatif biyohidrojen üretimini artırmak adına, en uygun biyokütle/hammadde tipinin, ön-arıtım metotlarının, işletim koşullarının ve modunun (kesikli, sürekli, vb.), kültür tipinin (askıda, immobilize) ve proses akım şemasının araştırılarak tespit edilmesi gerekmektedir (Argun ve Kargı, 2011).

2.2.1 Karanlık Fermantasyon

Karanlık fermantasyon, organik maddelerin anoksik koşullarda başlıca asetat ve bütirat, alkol, H₂ ve CO₂ yan ürünlerine dönüştürmesi işlemidir. Pek çok heterotrofik bakteri, karanlık fermantasyon yapabilme özelliğine sahiptir. Genel olarak spor oluşturan *Clostridium* türü, fakültatif *Enterobacter* türü, *Bacillus* türü ve anaerobik asidojenik çamuru bu amaçla en çok kullanılan kültürlerdir (Argun ve Kargı, 2011).

Metabolik enerji ve yapı taşlarının sentezi için gereken enerji, organik substratların küçük organik bileşiklere oksidasyonu sırasında elde edilir. Oksidasyon reaksiyonu sonucu elektronlar üretilir ve bu elektronlar nötraleiteyi sağlamak amaçlı hücreden dışarı atılmalıdır. Anoksik ortamda, protonlar (H⁺) elektron alıcılar olarak davranarak indirgenir ve yan ürün olarak moleküler hidrojen (H₂) oluşur (Das ve Veziroglu, 2008). Karbonhidratlar, özellikle de glikoz gibi karbon kaynakları asetik asit, bütirik asit ve H₂ üretiminde tercih edilen substratlardır. Bir (1) mol glikozun karanlık fermantasyonla asetik asit (Denklem 2.2) ve bütirik aside (Denklem 2.3) dönüşmesi sonucu teorik olarak sırasıyla 4 mol ve 2 mol H₂ üretilir. Fakat mikrobiyel büyüme ve oksidasyon sırasında oluşan elektronların metabolik enerji için kullanılması sonucu, oluşan H₂ ürünü genelde teorik değerden daha azdır. Bir sürekli reaktör çalışmasında 1 mol glikozdan 1,7-2,8 mol H₂ verimi elde edilmiştir (Van Ginkel ve Logan, 2005a).





Karanlık fermantasyon ile hidrojen üretiminde glikoz, laktoz ve sukroz çok kolay parçalanabildikleri için en çok kullanılan substratlardır. Fakat bu substratlar saf olarak kullanıldığında sistem ekonomik olarak pahalı olmaktadır. Bu işlemin daha ekonomik olması için karbonhidrat içeriği fazla, nişasta ya da selüloz içeren katı atıklar ya da agro-endüstriyel atık/atıksular substrat olarak kullanılabilir (Kapdan ve Kargı, 2006). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda bu yolla hidrojen üretiminde kullanılan atıklar arasında şeker pancarı işleme atıksuyu, patates işleme atıksuyu, yemek atıkları gibi çeşitli atıklar bulunmaktadır (Hawkes vd., 2007; Ozkan vd., 2010; 2011; Guo vd., 2010; Argun ve Kargı, 2011; Guwy vd., 2011).

Karanlık fermantasyonla hidrojen üretimi verimini etkileyen ana faktörler sıcaklık, pH, giriş substrat tipi / derişimi, oluşan yan ürün tipi / derişimi ve biyohidrojenin kısmi basıncıdır. pH hidrojen üretim verimini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. pH'nın üretilen yan ürün tipi ve mikrobik dağılımı üzerine de etkisi vardır. Yemek atıkları için optimum pH aralığı 5,0-6,0 iken; ekin kalıntılarında karanlık fermantasyon ile hidrojen üretimi için optimum pH değeri 7,0 olarak belirtilmektedir (Guo vd., 2010). Dolayısıyla, substrat/organik madde türüne göre etkin pH değeri değışiklik gösterebilmektedir ve araştırılması gerekmektedir. Düşük pH değerlerinin (pH=4,5) etanol, bütanol ve aseton oluşumuna neden olarak hidrojen üretimini azalttığı belirtilmiştir (Argun ve Kargı, 2011).

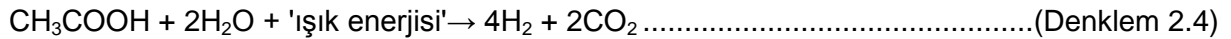
Karanlık fermantasyon mezofilik (25–40 °C), termofilik (40–65 °C) veya aşırı termofilik (>80 °C) gibi değışik sıcaklıklarda gerçekleştirilebilir. Termofilik üretimde, metabolik aktivitenin daha fazla olması ve hidrojen tüketen türlerin az büyümesi sebebiyle hidrojen üretiminin verimi daha yüksektir. Fakat daha az enerji gereksinimi sebebiyle mezofilik aralıkta hidrojen üretimi daha çok kullanılmaktadır (Argun ve Kargı, 2011).

Organik atıkların karanlık fermantasyonu sırasında üretilen yan ürün hidrojenin kısmi basıncı kısıtlayıcı bir faktördür ve düşük seviyelerde olması gerekmektedir (Guo vd., 2010). Ortamdaki hidrojen derişiminin artması sadece hidrojen üretimini etkilemez; aynı zamanda metabolik yollarda değışikliğe sebep olarak laktat, etanol, aseton ve bütanol birikimine sebep olmaktadır. Sistemdeki hidrojenin kısmi basıncının azaltılması için karıştırma, gazla uçurma gibi yöntemler uygulanabilir (Hawkes vd., 2007; Guo vd., 2010). Giriş substrat derişimi ve oluşan yan ürünlerin tipi/derişimi de H₂ üretim verimini etkilemektedir. Yüksek giriş substrat derişimlerinin (> 10 g/L Kimyasal Oksijen İhtiyacı, KOİ) enerji üretimi bazında verimli olacağı bilirse de, oluşan ürünler inhibisyona yol açabilir (Hawkes vd., 2007). Kim vd. (2006a) sürekli

reaktörlerde yüksek KOİ derişiminin H₂ üretimine etkisini araştırmış; 20 g/L KOİ'nin altında üretimin düştüğünü, 35 g/L KOİ'nin üstünde ise inhibisyonun gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Van Ginkel ve Logan (2005b) 40 g/L KOİ eşdeğeri glikoz yüklemesinde H₂ üretim veriminin düştüğünü belirtmiştir. Giriş substrat derişimi, H₂ kısmi basıncının yanında oluşan diğer yan ürünler, derişimleri ve formları da H₂ üretim verimini etkilemektedir. İyonize olmamış bütirik asit derişiminin 13 mM olduğu koşullarda hidrojen üretimi solvent üretimine sapmaya başlamakta fakat serbest asitler için çok geniş bir derişim aralığı eldesi sebebiyle metabolizma sapmasındaki eşik değer tanımlanamamaktadır (Van Ginkel ve Logan, 2005b). Serbest asetik asit ve bütirik asit derişimleri sırasıyla 50 ve 63 mM iken H₂ üretiminin tamamıyla inhibe olduğu belirtilmiştir (Van Ginkel ve Logan, 2005b). Öte taraftan, aynı miktarda asetik ve bütirik asit derişimi, ana besin olarak uygulandığında, yan ürün oldukları zamana kıyasla aynı inhibisyon etkisine yol amamaktadır (Van Ginkel ve Logan, 2005b). Yan ürünlerin toplam etkisi, örneğin, toplam uçucu yağ asidi (tUYA) derişimi de inhibisyonda ve metabolik yoldaki sapmada etkin olabilir.

2.2.2 Fotofermantasyon

Mor-kükürtlü ve mor-kükürtsüz bakteri işıklı ve oksijensiz ortamda fotosentez yapabilmekte ve ara ürün olarak hidrojen üretmektedir. Hidrojen üretimi yapabilen mor-kükürtsüz bakterilerden en iyi bilinenleri *Rhodobacter sphaeroides* O.U001, *Rhodobacter capsulatus*, *R. sphaeroides*-RV, *Rhodobacter sulfidophilus*, *Rhodopseudomonas palustris* ve *Rhodospirillum rubrum*'dur (Argun ve Kargı, 2011). Mor-kükürtsüz bakteri uçucu yağ asitlerini kullanarak işıklı ve oksijensiz ortamda H₂ ve CO₂ üretmektedir. Kullanılan uçucu yağ asitlerine asetik asit, laktik asit, formik asit ve glutamik asit örnek olarak verilebilir. Mor-kükürtsüz bakterinin asetik asitten H₂ ve CO₂ üretimi Denklem 2.4'de verilmektedir. Literatürde uçucu yağ asitlerinin yanı sıra glikoz ve sukroz gibi karbon kaynaklarının da hidrojen üretiminde kullanıldığı belirtilmiştir (Kim vd., 2006b); fakat, oluşabilecek uçucu yağ asidi derişimi kaynaklı inhibisyona dikkat edilmelidir.



Hidrojen fotosentetik bakteri tarafından nitrojenaz enzimi aracılığıyla üretilmektedir. Nitrojenaz enziminin yanı sıra hidrojenaz enzimi de hem hidrojen üretimi hem de üretilen hidrojenin tüketiminde aktif rol oynamaktadır. Mor-kükürtsüz bakteri ise hidrojen üretimini asıl olarak nitrojenaz enzimiyle gerçekleştirir. Nitrojenaz enzim kompleksi nitrojenin fikse edilmesinden sorumludur. Ortamda moleküler nitrojen ve oksijen yokken hidrojen üretimi katalizlenir (Denklem 2.5), fakat ortamda moleküler nitrojen (N₂) olduğu nitrojenaz enzimi amonyak üretimini katalizler.



Ortam pH'sı hidrojen üretimini etkileyen önemli bir faktördür. Sasikala vd. (1991) 6,0-9,0 pH aralığında büyüme gözlemlenmiş, büyüme için en uygun aralığın 6,8-7,0; hidrojen üretimi için en uygun pH değerininse 7,0 olduğunu belirtmişlerdir. Fotofermantasyon enzimatik bir süreç olduğu için bakteriler ortam sıcaklığından da etkilenmektedir. Yapılan bir çalışma büyüme için en uygun sıcaklığın 30-35°C, hidrojen üretimi için en uygun sıcaklığın ise 30-40°C olduğunu göstermiştir (Sasikala vd.,1991). *Rhodobacter* türleriyle hidrojen üretiminde en uygun sıcaklık aralığı 31-36°C olarak verilmektedir (Basak ve Das, 2007).

Işık şiddeti fotofermantatif hidrojen üretimini etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Koku vd., 2002) ve hidrojen üretimi için gereken enerji, ışık enerjisinin ATP'ye dönüştürülmesiyle elde edilir. Ayrıca, hidrojen üretimini katalizleyen nitrojenaz enziminin sentezi ışık şiddetinden etkilenmektedir. *R. sphaeroides* O.U. 001 ile yapılan bir çalışmada hidrojen üretiminin 270 W/m² ışık şiddeti değerine kadar arttığı; bu değer üzerinde ise bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Uyar vd., 2007). Nitrojenaz enzimi oksijen ve amonyaktan da etkilenmekte; enzim aktivitesi oksijen varlığında ve yüksek amonyak derişimlerinde engellenmektedir. *R. sphaeroides* O.U.001 ile hidrojen üretiminin, oksijenli ortamda (oksijensiz ortama kıyasla) azaldığı ve amonyum iyonu derişiminin 2 mM ve üzeri olduğu koşullarda durduğu belirtilmiştir (Akköse vd., 2009). Fotofermantatif hidrojen üretimini artırmak için nitrojen kaynağı olarak amonyak yerine glutamat kullanılması daha uygundur.

Atıklardan fotofermantasyonla hidrojen üretim potansiyeli atığın bolluğu, nispi maliyeti, karbonhidrat içeriği ve parçalanabilme kolaylığı gibi faktörler ile değişmektedir. Organik asit ve basit şeker içeren atıklar fotofermantasyon ile hidrojen üretimi için kullanılabilir. Fakat atıkların hidrojen üretiminde kullanılması bazı sorunları beraberinde getirmektedir: atıksuyun rengi (ışık geçişini azaltmaktadır), yüksek amonyak derişimleri (nitrojenaz enzimini inhibe etmektedir), yüksek Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) derişimi ve bazı toksik maddelerin (ağır metaller, fenoller, polisiklik aromatik hidrokarbon vb.) bulunması gibi. Bu sebeplerle, gıda-endüstriyel atıklarının / agro-endüstriyel atıkların fotofermantasyon öncesinde ön arıtıma tabi tutulması gerekebilir (Keskin vd., 2011).

Çeşitli karbon kaynaklarından fotofermantatif hidrojen üretimi kesikli, yarı-kesikli (ardışık-kesikli; fed-batch) ve sürekli reaktörlerde çalışılmıştır. Gliserolden biyohidrojen üretimi *Rhodobacter sphaeroides* KD131 (Kim vd., 2006b) ve *Rhodobacter palustris* (Sabourin-Provost ve Hallenbeck, 2009) ile kesikli reaktörlerde çalışılmış ve sırasıyla 0 ve 6 mol H₂/mol

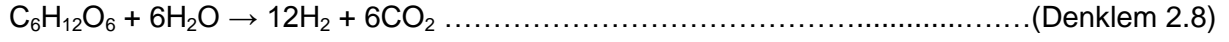
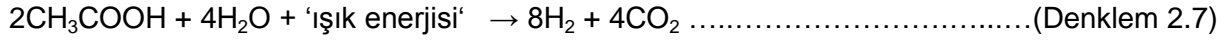
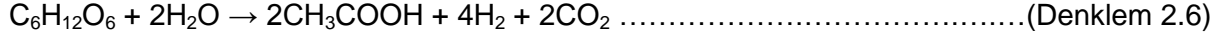
gliserol verim gözlenmiştir. Nişastanın kullanıldığı diğer iki çalışmada *Rhodobacter sphaeroides* KD131 ile (Kim vd., 2006b) hiç üretim gözlenmezken; *Rhodobacter sphaeroides* RV ile (Kapdan vd., 2009) 1,23 mol H₂/mol glikoz üretimi elde edilmiştir. Bu sonuçlar belli bir karbon kaynağından ne kadar üretim olacağına bakteri tipi ile değiştiğini göstermektedir. Kim vd. (2006b) karbon kaynağı olarak glikoz, sukroz, malat, laktat ve asetat kullandıkları kesikli reaktörlerde fotofermantasyon ile 0,13-0,80 mL H₂/mg kuru hücre ağırlığı üretim verimi elde etmiştir. Fotofermantatif hidrojen üretimi kesikli reaktörlerde çeşitli endüstri atıksuları için de denenmiştir. *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 kullanılarak zeytinyağı atıksuyu, bira fabrikası atıksuyu ve mandıra atıksuyundan hidrojen üretimi araştırılmış, sırasıyla, 13,9 L/L (Eroglu vd., 2004), 2,24 L/L (Seifert vd., 2010a) ve 3,62 L/L (Seifert vd., 2010b) hidrojen üretim potansiyeli elde edilmiştir.

Sürekli reaktör deneylerinde, singazdan, laktik asitten, belediye atıksuyundan fotofermantasyon ile hidrojen üretimi araştırılmış ve sırasıyla 397,5 mL H₂/g.saate (Najafpour vd., 2003), 75 mL H₂ /g.saate (Fascetti ve Todini, 1995) ve 100 mL H₂/g.saate (Fascetti vd., 1998) üretim hızları elde edilmiştir. Asetatın karbon kaynağı olarak kullanıldığı yarı-kesikli reaktör çalışmalarında da 7,7 mL H₂/L.saate (Boran vd., 2010) ve 37,2 mL H₂/L.saate (Ren vd., 2009) üretim hızları elde edilmiştir.

2.3 İki-aşamalı Entegre Sistemler

2.3.1 İki-aşamalı Karanlık Fermantasyon ve Fotofermantasyonla Entegre Biyohidrojen Üretimi

Biyolojik hidrojen üretiminde kullanılan tüm yöntemler arasında karanlık fermantasyon, kolay bir teknoloji olması, çeşitli substrat tipleri için kullanılabilmesi, ışığa gereksinim duymaması ve değerli yan ürünler üretmesi sebepleriyle en avantajlı olanıdır. Fakat karanlık-fermantasyonda hidrojen üretim verimi diğer yöntemlere kıyasla daha azdır; bu da bu yöntemi ekonomik olarak uygun olmaktan çıkarmaktadır (Nath vd., 2008). Biyohidrojen üretimini arttırmanın bir yolu karanlık fermantasyonu ve fotofermantasyonu içeren iki-aşamalı entegre sistemlerdir. Bu sistemin ilk aşaması olan karanlık-fermantasyonda organik substratlardan hidrojen ve düşük moleküler ağırlıklı uçucu yağ asitleri oluşur. İkinci aşamada ise oluşan bu uçucu yağ asitleri fotofermantasyonun substratları olarak kullanılır. Aşağıda verilen reaksiyonlardan görüleceği üzere 1 mol glikoz karanlık fermantasyon (Denklem 2.6) ve fotofermantasyon (Denklem 2.7) ile sırasıyla 4 mol ve 8 mol H₂ oluşmaktadır. Bu iki sistemin entegrasyonu ile substrat başına teorik olarak maksimum biyohidrojen oluşumu 12 mole çıkmaktadır (Denklem 2.8).



Bugüne kadar basit şekerler ve endüstriyel atık/atıksular gibi çeşitli kaynaklardan iki-aşamalı sistemlerde hidrojen üretilebilmiştir. Örneğin; karbon kaynağı olarak glikozdan 2,4 - 6,75 mol H₂/mol heksoz (Nath vd., 2005; Nath vd., 2008; Liu vd., 2009; Redwood vd., 2009), sukrozdan 3,32-7,10 mol H₂/mol heksoz (Tao vd., 2007; Chen vd., 2008; Zong vd., 2009), manyok nişastasından 2,92 ve 6,51 mol H₂/mol heksoz (Sue vd., 2009, Zong vd., 2009), yemek atığından 5,40 mol H₂/mol heksoz (Zong vd., 2009), melasdan 6,85 mol H₂/mol heksoz (Özgür vd., 2010), patates nişastasından 5,6 mol H₂/mol heksoz (Laurinavichene vd., 2010), peynir-altı suyundan 2-10 mol H₂/mol laktöz (Azbar ve Cetinkaya Dokgoz, 2010) verim elde edilmiştir. Aslında, iki-aşamının entegrasyonu ile hidrojen üretim verimi, tek-aşamalı işletimlerine kıyasla artmaktadır (Argun ve Kargı, 2011). Fakat, bugüne kadar, hidrojen üretiminde başarı ile tanımlanabilecek ve ekonomik anlamda (iki-aşamalı) hidrojen üretiminin anlamlı olmasını sağlayabilecek 8 mol H₂/mol glikoz verimine ulaşamamıştır (Argun ve Kargı, 2011); basit şekerler olan glikoz ve sukroz için dahi teorik değere yaklaşamamıştır (Guwy vd., 2011). Bugüne kadar elde edilen en yüksek verim 7,2 mol H₂/mol glikoz'dur (Yokoi vd., 2002). Bu verim, tatlı patates şekerinin kesikli-besleme modunda işletilen iki-aşamalı karanlık- ve foto-fermantasyon sisteminde elde edilmiştir.

İki aşamanın entegrasyonunda başlıca sorun, büyük reaktör hacimlerini ve uzun bekleme sürelerine neden olan düşük hidrojen üretim verimi ve hızıdır (Kapdan ve Kargı, 2006; Levin ve Chanine, 2010). Hidrojen verim ve hızını artırmak adına, genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların kullanımı, metabolik mühendislik, mikroorganizmaların immobilizasyonu amaçlı farklı dolgu maddelerinin kullanımı, reaktör tasarımlarının geliştirilmesi, biyokimyasal-destekli biyoreaktörlerin kullanımı ve iki-aşamalı sistemlerin geliştirilmesi gibi çeşitli konularda yoğun olarak çalışılmaktadır (Das ve Veziroglu, 2008). Örneğin, iki-aşamalı fermantatif sistemler, ardışık ve aynı reaktör içerisinde birleşik olarak çalışılmaktadır. İki-aşamalı ardışık karanlık- ve foto-fermantasyon sistemi, iki-aşamalı birleşik sisteme kıyasla daha yüksek hidrojen üretim verimi ve hızı sebebiyle tercih edilmektedir. Askıda ve immobilize kültürlerin H₂ üretim verim ve hızına etkisi karşılaştırıldığında ise, immobilize sistemlerde homojen bir ortam sağlanamaması sebebiyle, yüksek yoğunluklu askıda kültürün daha avantajlı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, reaktör işletim modunun (kesikli, kesikli-besleme ve sürekli) mikroorganizmayı, substratı ve oluşan ürünlerin derişimlerini etkilediği, en uygun

işletim modunun yüksek mikroorganizma derişiminde çalışan ve oluşan ürünlerin ortamdaki sürekli olarak uzaklaştırıldığı kontrollü bir kesikli-besleme modu olduğu belirtilmiştir (Argun ve Kargı, 2011).

İki-aşamalı karanlık fermantasyon ve fotofermantasyonun entegrasyonunda dikkat edilmesi gereken önemli faktörler karanlık fermantasyon sonucu oluşan organik azot kaynaklı amonyum iyonu derişimi, uçucu yağ asidi tipleri ve derişimidir (Guwy vd., 2011). Şeker pancarı (Özgür vd., 2010) ve peynir-altı suyunun (Azbar ve Cetinkaya Dokgoz, 2010) karanlık fermantasyona tabi tutulması sonrasında uygulanan fotofermantasyonda hidrojen veriminin amonyum iyonu sebebiyle düştüğü belirtilmektedir. Bu problemin çözümü için karanlık fermantasyon çıkışının, atık tipine göre 1:2-1:10 oranında seyreltilmesi veya amonyum giderimi için ön arıtım uygulanması gerekebilir (Guwy vd., 2011). Efektif entegre hidrojen üretimi için karanlık fermentasyon atıksuyu glikoz yönünden de az olmalı, uçucu yağ asidi (UYA) derişimi ise 2500 mg/L'den düşük olmalıdır (Argun vd., 2008). Bütirik ve asetik asit karışımları ile yapılan bir diğer çalışma (Su vd., 2009) 25 mM bütirik asit derişimi üstüne çıkıldığında fotofermantatif hidrojen üretiminin inhibe olduğunu göstermiştir. Karanlık-fermantasyonda çeşitli karbon kaynaklarından limit değerler üzerinde bütirik, asetik asit ve çeşitli yan organik ürünler oluşabilir ve genellikle üretilen UYA derişimi 2500 mg/L'nin üstündedir (Guwy vd., 2011). Dolayısıyla, karanlık- ve foto-fermantasyonun entegrasyonu için seyreltme ihtiyacı doğmaktadır. Seyreltmenin uygulanması, ikinci-aşamada daha büyük reaktör kullanımını gerektirir ki bu çözüm sistemin ekonomik olarak verimini düşürmektedir.

Konu hakkında birçok çalışma yapılsa da, fermantatif biyohidrojen üretimini artırmak adına, hala, en uygun biyokütle/hammadde tipinin, ön-arıtım metotlarının, işletim koşullarının ve modunun (kesikli, sürekli, kesikli-besleme gibi), kültür tipinin (askıda, immobilize) ve proses akım şemasının araştırılarak tespit edilmesi gerekmektedir. Argun ve Kargı (2011) yapmış oldukları çalışmada, bugüne kadar yapılan kritik çalışmalarının hiçbirinde proses konfigürasyonunun karanlık ve fotofermantatif H₂ üretim hızı ve verimine etkisinin incelenmediğini belirtmiştir. İki-aşamalı karanlık- ve foto-fermantasyon sisteminin entegrasyonunda optimizasyona ihtiyaç duyulmaktadır (Guwy vd., 2011). Literatür çalışmalarına bakıldığında, karanlık- ve fotofermantasyonun entegrasyonunda en etkin konfigürasyon tipinin hala netleşmediği ve araştırılması gerektiği belirtilmiştir (Guwy vd., 2011).

2.3.2 İki-aşamalı Karanlık Fermantasyon ve Metanojenesis Sistemi

Daha önce belirtildiği üzere, hidroliz+asidojenesis basamağının ayrı olarak çalıştırıldığı iki-aşamalı sistemler, tek-aşamalı anaerobik çürütmeye kıyasla daha yüksek dönüşüm verimine,

daha yüksek stabilizasyona, daha yüksek yükleme kapasitesine sahiptir (Hawkes vd., 2007; Guwy vd., 2011). Glukozun iki-aşamalı (asidojenesis ve metanojenesis) anaerobik çürütümü Denklem 2.9 ve 2.10'da gösterilmiştir. Tek-aşamalı anaerobik çürütmede mikrobiyel büyüme göz ardı edildiğinde 1 mol glikozdan teorik olarak 3 mol CH₄ üretilmektedir (Denklem 2.1). İki-aşamalı çalışıldığında ise teorik olarak 4 mol H₂ ve 2 mol CH₄ üretilerek toplam enerji üretim verimi artmaktadır. Hayvan gübresi ile yapılan bir çalışmada, tek-aşamaya kıyasla iki-aşamanın uçucu katı madde giderimini artırdığı; biyogaz üretiminin de uygulanan organik yükleme hızı ve katı bekletme süresine göre %7 ile %65 arasında arttığı belirtilmiştir (Demirer ve Chen, 2004). Lee ve Chung (2010) preslenmiş ve susuzlaştırılmış yemek atığından mezofilik tam-karışmalı biyohidrojen ünitesinde 1,82 mol H₂/mol glikoz değeri verim elde etmiş; bu ünitenin çıkışı ise 3,6 gün hidrolik bekletme süresinde çalıştırılan metanojenik reaktörde çürütülmüştür. Çalışma sonucunda, tek-aşamalı anaerobik çürütme sistemi ile iki-aşamalı biyohidrojen-metan sisteminin ilk kurum masraflarının farkının çok az olduğu, fakat, iki-aşamalı sistemde %10-12 arasında daha fazla enerji üretildiği anlaşılmıştır.

Asidojenesis: $C_6H_{12}O_6 + 4H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 4H^+ + 4H_2$ (Denklem 2.9)

Metanojenesis: $2CH_3COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_4 + 2HCO_3^-$ (Denklem 2.10)

İki-aşamalı karanlık fermantasyon ve metanojenesisin entegrasyonunda dikkat edilmesi gereken ilk aşamanın pH'sı, ve üretilen hidrojenin homoasetojenler tarafından tüketimini ve hidrojen kısmi basıncının sistemi inhibe etmesini önlemektir (Guwy vd., 2011). Karanlık fermantasyon sonucunda, organik azot içerikli substratlardan amonyum oluşmakta, yüksek dozlarda amonyum da takip eden metanojenesisini inhibe edebilmektedir. Dikkate alınması gereken diğer nokta, karanlık fermantasyon çıkışının düşük pH değeri kaynaklı metanojenesis öncesinde alkali ekimi, ve bu alkali ekimi sonucu K⁺, Na⁺, Ca²⁺ ve Mg²⁺ gibi iyonların birikerek metanojenesisini inhibe edecek derişimlere ulaşabilmesidir. Bu nedenle, seçilen alkali tipine dikkat edilmesi gerekmektedir (Guwy vd., 2011). Görüldüğü üzere, iki-aşamalı asidojenesis ve metanojenesis sisteminde hedef genellikle metan üretim veriminin artması yönündedir ve sistemler genellikle substrat artım verimi, çıkış suyu kalitesi ve organik yükleme gibi faktörler açısından irdelenmiştir. Bu sebeple, genellikle metanojenesis reaktör çıkış suyunun, asidojenesis reaktörüne geri-döngüsü yoluyla alkali ihtiyacının azaltılması yönünde çalışılırken; hidrojen üretimi amacıyla asidojenik reaktörün optimizasyonuna yoğun olarak odaklanılmamıştır (Hawkes vd., 2007). Zhu vd. (2008) sürekli ve yarı-sürekli işletilen iki-aşamalı asidojenesis ve metanojenesis sisteminde patates atığından 30 L H₂ / kg TKM (maksimum 68 L/kg TKM) ve 183 L CH₄ / kg TKM (maksimum 225 L/kg TKM) üretmişlerdir. Toplam enerji eldesinin (2,14 kWh/kg TKM) %5'i hidrojen



kazanılmıştır. Hidrojen kaynaklı enerji yüzdesinin artırılması için, ilk aşamanın optimizasyonun gerekliliği vurgulanmıştır. Bu çalışma sonucunda, %70 TKM ve %64 KOİ giderimi elde edilmiştir. Metanojenesis reaktör çıkışı atık derişimi 4300 mg/L KOİ içermekte ve ardışık bir arıtım sistemine ya da ikinci aşamanın da optimizasyonuna ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

DiStefano ve Paloma (2010) ilk defa hidrojen ve metan üretimini ayrı ayrı değerlendirmiş ve farklı reaktör konfigürasyonunun asidojenesis ve metanojenese etkisini araştırmıştır. Bu amaçla, tek- ve iki-aşamalı askıda ve granüler reaktörler çalıştırmış; iki-aşamalı reaktörlerin tek-aşamalılarına göre daha yüksek spesifik enerji üretimine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, proses konfigürasyonunun substratın asidifiye edildiği reaksiyonları etkilediğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, hidrojen ve metan üretiminin optimizasyonu için çalışılmamıştır. Nitekim, hidrojen üretimi kaynaklı enerji yüzdesi sadece %3'de sınırlı kalmış olup, kompleks (karbonhidrat, lipid, protein) substrat ile çalışıldığında, her iki aşamanın stabilizasyonuna odaklanması ve hidrojen üretiminin ikincil hedef olarak değerlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir (DiStefano ve Paloma, 2010). Dolayısıyla, hem karanlık fermantasyon hem de metan üretiminin optimizasyonu için uygun işletim koşullarının belirlenmesi gerekmektedir. Gıda atıkları ve ekinlerin iki-aşamalı sistemlerde işlendiği koşullarda, H₂ üretiminin ve alkali ekiminin optimizasyonu sağlanmalıdır (Hawkes vd., 2007).

3. KESİKLİ KARANLIK-FERMANTASYON REAKTÖR DENEYLERİ

Projenin ilk deneysel çalışmaları, kesikli karanlık fermantasyon işletiminin optimizasyonunu hedefleyen 2.İş Paketi'dir (İP 2). İP 2 kapsamında yapılması hedeflenen çalışmalar, başlangıç KOİ derişiminin ve başlangıç pH değerinin karanlık fermantasyona, H₂ ve UYA üretimine etkisinin araştırılması, ve maksimum verimin sağlandığı optimum başlangıç pH ve KOİ derişiminin belirlenmesidir. Ayrıca, olası inhibisyonun gerçekleştiği başlangıç substrat derişimi, başlangıç pH değeri ve çıkış UYA derişimlerinin araştırılması da hedeflenmiştir. Bu hedefler doğrultusunda, üç set kesikli karanlık-fermantasyon deneyi (SET 1, SET 2 ve SET 3) kurulmuştur. İlk iki reaktör deneyi setinde (SET 1 ve SET 2), başlangıç pH, başlangıç KOİ derişimi ve bu iki parametrenin etkileşimi araştırılmış; S/X_o (besin/mikroorganizma) parametresinin de önemli olabileceği belirlenmiştir. Bu bağlamda, proje önerisinde bulunmamasına rağmen, üç parametrenin (KOİ, pH ve S/X_o) ayrı ve beraber etkilerinin karşılaştırılabilmesini sağlayan Tepki Yüzeyi Metodu (Response Surface Methodology) kullanılarak, üçüncü kesikli karanlık-fermantasyon deney seti (SET 3) kurulmuştur. SET 3 sonuçlarının, ardışık-kesikli karanlık fermantasyon deneylerinde (İş Paketi 3) kullanılması planlanmıştır. Ayrıca, kinetik çalışmasının, optimum koşullarda işletilen bir reaktörde (Ardışık kesikli Reaktör-AKR) ve SET 3'ün sonuçları baz alınarak yapılması planlanmıştır.

Bu iş paketinde yer almamakla birlikte, sonraki iş paketlerinde yapılması planlanan fotofermantasyon deneylerine ön bilgi sağlama amacıyla, bazı parametrelerin etkisinin araştırılması için iki set kesikli fotofermantasyon deneyi çalışması (SET 1 ve SET 2) gerçekleştirilmiştir. SET 1- kesikli fotofermantasyon çalışmasında, hidrojen üretiminde önemli bir parametre olabilecek S/X_o oranının etkisi ve en yüksek verimin sağlandığı optimum S/X_o değeri araştırılmıştır. SET 2- kesikli fotofermantasyon çalışmasında ise Tepki Yüzeyi Metodu (TYM) kullanılarak, üç farklı parametrenin (başlangıç besin (S_o), mikroorganizma (X_o) ve ışık şiddetinin) etkisi ve en yüksek hidrojen üretiminin elde edildiği optimum kombinasyon değerleri araştırılmıştır.

Aynı şekilde, bu iş paketinde yer almamakla birlikte, sonraki iş paketlerine ön bilgi edinmek amacıyla, bir set kesikli anaerobik reaktör deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu deney setinde,

önemli bir işletim parametresi olan S/X_o (g KOİ/g UAKM) oranının metan üretimine ve yüzdesine etkisi araştırılmış ve en yüksek metan üretiminin elde edildiği oran belirlenmiştir.

3.1 Gereç ve Yöntem

3.1.1 Mikrobiyel Kültür

3.1.1.1 Karanlık Fermantasyon Kültürü

Karanlık fermantasyon deneyleri için Ankara Atıksu Arıtma Tesisi Anaerobik Çürütme Tankı çıkışından karışık anaerobik mikroorganizma kültürü alınmıştır. Bu çamurun (karışık anaerobik kültür) Askıda Katı Madde (AKM) ve Uçucu Askıda Katı Madde (UAKM) derişimleri sırasıyla 42888 ± 702 ve 20288 ± 218 mg/L'dir. Anaerobik çamur ön işleme tabi tutularak hidrojen üreten asidojenik bakterilerin seçilmesi ve üretilecek hidrojeni tüketebilecek hidrojenetrofik metanojenesis mikroorganizmalarının elimine edilmesi amaçlanmıştır. Diğer bir deyişle, ön işlem hidrojen tüketicilerin inaktivasyonu ve *Clostridium* gibi hidrojen üreticileri desteklemek amacıyla uygulanmıştır (Kim vd., 2006a). Bu amaçla, anaerobik çamura 1 saat 105°C 'de ısı işlem uygulanmıştır (Ozkan vd., 2010). Ön işlem sonunda SET 1 ve SET 2'deki reaktörlere aşılana karışık kültürün AKM ve UAKM derişimleri sırasıyla 23183 ± 922 ve 9433 ± 153 mg/L; pH değeri ise 8,6'dır. SET 3 reaktörlerine aşılana karışık kültürün AKM ve UAKM derişimleri ise sırasıyla 40700 ± 967 ve 19400 ± 540 mg/L; pH değeri ise 8,6'dır.

3.1.1.2 Anaerobik Kültür – Metanojenesis

Kesikli anaerobik reaktörlerde, Ankara Tatlar Atıksu Arıtma Tesisi anaerobik çürütme tankı çıkışından alınan karışık kültür (anaerobik çamur) kullanılmıştır. Anaerobik çamura herhangi bir ön işlem uygulanmamış; sadece konsantre çamur eldesi için anaerobik çamur oda sıcaklığında bir süre bekletilmiş ve çökmesi beklenmiştir. Konsantre anaerobik çamurun AKM ve UAKM derişimleri sırasıyla 66130 ± 7976 ve 24940 ± 2956 mg/L; pH değeri ise 8,6'dır.

3.1.1.3 Fotofermantasyon Kültürü

Fotofermantasyon deneylerinde ODTÜ Hidrojen Araştırma Laboratuvarı stoklarında bulunan mor-kükürtsüz bakteri türü olan *Rhodobacter capsulatus* (DSM 1710) kullanılmıştır. Bu bakteri, Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu-Leibniz DSMZ Enstitüsü'nden temin edilmiş olup, ODTÜ-Hidrojen Araştırma Laboratuvarı stoklarında -80°C 'de saklanmaktadır.

Fotofermantasyon için -80°C 'den alınan bakteri stokları oda sıcaklığında çözdürülerek içerisinde agar ve üreme besiyeri olan petri kaplara çizgi plaka yöntemiyle ekim yapılmıştır (Şekil 3.1a). Üreme besiyeri olarak 20 mM asetat ve 10 mM glutamat içeren değiştirilmiş Biebl ve Pfennig Besiyeri kullanılmıştır (Biebl ve Pfennig, 1981). Ekim yapılan petri kapları 30°C 'deki inkübatörde karanlık ortamda yaklaşık 7 gün bekletildikten sonra oluşan tekli koloniler (Şekil 3.1a), 1,5 mL Biebl ve Pfennig Besiyeri içeren Eppendorf tüplere aşılanmıştır. Bu tüpler 30°C 'deki inkübatör içerisinde karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Üç gün sonunda her bir 1,5 mL'lik Eppendorf tüpteki bakteri kültürleri, 15 mL'lik steril konik tüplere aşılanmış ve 30°C 'deki inkübatörde bu kez aydınlık ortamda 2 gün boyunca inkübe edilmiştir (Şekil 3.1b). Bunu takiben, 15 mL'lik tüplerde üretilen kültür %10'luk seyreltme olacak şekilde 50 mL'lik cam reaktörlere aşılanmıştır. Aşılama işleminden sonra oksijensiz ortam yaratmak amacıyla reaktörlerin içerisinde kalan hava argon gazı ile yıkanmış ve reaktörler 2 gün boyunca 30°C 'deki inkübatörde aydınlık ortamda üremeye bırakılmıştır (Şekil 3.1c). Bu süre sonunda aynı işlem bir kez de 50 mL'lik reaktörlerden 150 mL'lik reaktörlere geçiş için yapılmış ve yaklaşık 4-5 günlük aralıklarla 150 mL'lik reaktörler halinde çoğaltma işlemine devam edilmiştir. Tüm bu işlemler steril kabin içerisinde tamamen steril koşullarda yapılmış (Şekil 3.1d) ve kullanılan tüm malzemeler ve besiyer sıvılar 121°C 'de ve 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak kullanılmıştır. Bakteri çoğaltma işlemi proje süresince aralıklı olarak tekrarlanmıştır.



Şekil 3.1. Fotofermantasyon deneylerinde kullanılmak üzere *Rhodobacter capsulatus* (DSM 1710) çoğaltma protokolü ve aşamaları

3.1.2 Deneysel Yöntem

3.1.2.1 Kesikli Karanlık Fermantasyon Reaktör Deneyleri

3.1.2.1.1 SET 1: Başlangıç pH etkisinin araştırılması

SET 1-kesikli karanlık fermantasyon deneyi, hidrojen üretiminde en yüksek verimin sağlandığı pH değerlerini (aralığını) belirlemek ve başlangıç pH değerinin hidrojen üretimine etkisini araştırmak amacıyla kurulmuştur. Benzer anaerobik kültür ve sentetik atık ile yapılan karanlık fermantasyon çalışmalarında genellikle 4-7 pH aralığında çalışılmaktadır (Özkan vd., 2011; Argun ve Kargı, 2011; Wang ve Wan, 2009). Bu çalışmada da, başlangıç pH değeri olarak 5, 5,5, 6, 6,5 ve 7'de çalışılmış; pH dışındaki tüm değişkenler sabit tutulmuştur.

Deneyler 100 mL toplam ve 60 mL etkin hacme sahip kesikli modda işletilen cam reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Reaktörler UAKM derişimi 2500 ± 500 mg/L olacak şekilde ısıtma tabi tutulmuş karışık anaerobik kültür ile aşılacaktır. Besiyer çözelti olarak, Argun ve Kargı (2009) ve Ozkan vd. (2010)'nin kullandığı besiyer çözelti içeriği modifiye edilerek hazırlanmıştır (Tablo 3.1). Tablo 3.1'de belirtilen reaktör içi derişimleri sağlamak amacıyla besiyer çözülden reaktörlere gerekli miktarda eklenmiştir. Başlangıç KOİ derişimi 10 g/L olacak şekilde reaktörlere glikoz solüsyonu eklenmiştir. Reaktörlerin başlangıç pH değerleri (5, 5,5, 6, 6,5 ve 7) 2 M'lik NaOH ve HCl derişik çözeltileri ile ayarlanmıştır. Kalan hacim deiyonize su ile 60 mL'ye tamamlanmıştır. Farklı başlangıç pH değerine sahip her reaktör tipi ikişer tekrarlı çalışılmış; sonuçlar ortalama değerler alınarak sunulmuştur. Her pH değeri için, glikoz içermeyen kontrol reaktörleri de kurulmuştur. Glikoz içeren tüm reaktörlerdeki (test reaktörleri) Besin/Mikroorganizma (S/X_o , g KOİ/ g UAKM) oranı 4 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.1. Karanlık fermantasyon deneylerinde kullanılan besiyer madde

Besiyer madde içeriği	Reaktör içi derişim (mg/L)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	400
$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	40
KH_2PO_4	400
K_2HPO_4	400
Cysteine	10
NH_4Cl	400

Reaktörler, anaerobik koşulları sağlayabilmek için, plastik gaz geçirmez kapaklarla kapatılmış ve tepe gazları 5 dakika boyunca azot gazıyla uçurulmuştur. Reaktörler 175 rpm'lik karıştırıcıda ve $35 \pm 2^\circ C$ 'lik sabit sıcaklıkta 7 gün inkübe edilmiştir. Bu süreç boyunca,

reaktörlerin gaz üretimi ve gaz içeriği 24 ± 2 saatlik aralıklarla ölçülmüştür. İnkübasyon süresi sonunda, reaktörler açılarak uçucu yağ asidi (UYA) analizleri için örnek alınmış ve -20°C 'de saklanmıştır.

3.1.2.1.2 SET 2: Başlangıç pH ve KOİ (Kimyasal Oksijen İhtiyacı) etkisinin araştırılması

SET 2, başlangıç KOİ (kimyasal oksijen ihtiyacı) ve pH ikilisinin karanlık fermantasyona etkisini araştırmak ve en yüksek hidrojen üretiminin sağlandığı başlangıç KOİ ve pH çiftini belirlemek amacıyla kurulmuştur. Bu doğrultuda, üç farklı başlangıç KOİ derişimi (10, 25 ve 40 g/L) seçilerek; her KOİ derişimi için üç farklı başlangıç pH'sına (5, 6 ve 7) sahip reaktörler kurulmuştur.

Deneyler 100 mL toplam ve 60 mL etkin hacme sahip kesikli modda işletilen cam reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Reaktörler, UAKM derişimleri 2500 ± 500 mg/L olacak şekilde ısıtılıp tabii tutulmuş karışık anaerobik kültür ile aşılanmıştır. Reaktörlere besiyer çözelti (Tablo 3.1), başlangıç KOİ derişimini sağlamak için gerekli miktarda glikoz çözeltisi ve etkin hacme ulaşmak için deiyonize su eklenmiştir. Reaktörlerin başlangıç pH değerleri 2 M'lik NaOH ve HCl derişik çözeltileri ile ayarlanmıştır. Farklı başlangıç pH ve KOİ derişimine sahip her reaktör tipi üçer tekrarlı çalışılmış ve özellikleri Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Reaktörlerdeki S/X_0 (g KOİ/ g UAKM) oranları 4, 10 ve 16 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.2. SET 2'de kullanılan reaktör tipleri ve içerikleri

Başlangıç pH	Başlangıç KOİ derişimi (g/L)	Başlangıç glikoz derişimi ^a (g/L)	S/X_0 (g KOİ/g UAKM)	S/X_0 (g glikoz/g UAKM)
5	10	9,4	4	3,8
5	25	23,4	10	9,4
5	40	37,5	16	15
6	10	9,4	4	3,8
6	25	23,4	10	9,4
6	40	37,5	16	15
7	10	9,4	4	3,8
7	25	23,4	10	9,4
7	40	37,5	16	15

^a 1 g/L glikoz = 1,067 g/L KOİ

Reaktörlerde inkübasyon sonunda UYA, KOİ, AKM ve UAKM derişimlerindeki ve pH değerlerindeki değişimi belirlemek amacıyla, üç tekrarlı kurulan her reaktör tipinden bir

reaktör başlangıç analizlerini gerçekleştirmek üzere ayrılmıştır. Ayrılan reaktörlerden numuneler alınarak -20°C 'de stoklanmıştır. İnkübasyona tabi tutulacak diğer reaktörler plastik kapaklarla kapatılarak, tepe gazları 5 dakika boyunca azot gazıyla uçurulmuştur. Reaktörler 175 rpm'lik karıştırıcıda ve $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'lik sabit sıcaklıkta 8 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinde reaktörlerin gaz üretimleri ve içerikleri ilk olarak 12.saat sonunda ve sonraki süreçte 24 ± 2 saatlik aralıklarla ölçülmüştür. İnkübasyon süresi sonunda, reaktörler açılarak son durumdaki pH değerleri ölçülmüş ve UYA, KOİ, AKM ve UAKM analizleri için örnekler alınarak -20°C 'de saklanmıştır.

3.1.2.1.3 SET 3: Başlangıç pH, KOİ ve Besin/Mikroorganizma (S/X_0) değerlerinin karanlık fermantasyona etkisinin Tepki Yüzeyi Metodu ile araştırılması

SET 3, KOİ, pH ve Besin/Mikroorganizma (S/X_0) oranı değişkenlerinin karanlık fermantasyona etkisini araştırmak ve en yüksek hidrojen üretiminin sağlandığı değerleri belirlemek amacıyla Tepki Yüzeyi Metodu ile kurulmuştur. Üç faktörlü (pH, KOİ ve S/X_0) ve 3 seviyeli planlanan bu set, Tepki Yüzeyi Metodu - Box-Behnken Tasarım yöntemine göre tasarlanmıştır (Tablo 3.3). Üç KOİ derişimi (10, 30 ve 50 g/L), üç pH (4, 5,5 ve 7) ve üç S/X_0 değeri (4,12, 20) seçilerek; Tepki Yüzeyi Metod'unun önerdiği şekilde 30 reaktör (13 farklı çeşitte reaktör) kurulmuştur. Buna göre, orta değer olarak tanımlanan reaktör çeşidinden (başlangıç KOİ=30, $S/X_0 = 12$ ve pH=5,5 özelliklerindeki reaktör çeşidi) 6 adet, diğer 12 çeşitten ikişer adet kurulmuştur. Kurulan reaktör setinin ayrıntıları Tablo EK-A1'de verilmiştir (EK-A).

Tablo 3.3. Box-Behnken tasarımında kullanılan faktörler ve seviyeler

Bağımsız Değişken	Sembol	Aralık ve seviyeler		
		-1	0	1
pH	X0	4	5,5	7
KOİ	X1	10	30	50
S/X_0	X2	4	12	20

Deneyler 100 mL toplam ve 60 mL etkin hacme sahip kesikli modda işletilen cam reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Reaktörler, UAKM derişimleri planlanan S/X_0 değerlerini verecek şekilde, ısıtılma tabi tutulmuş karışık anaerobik kültür ile aşılanmıştır. Reaktörlere besiyer çözelti (Tablo 3.1), başlangıç KOİ derişimini sağlamak için gerekli miktarda sukroz (sakkaroz) çözeltisi ve etkin hacme ulaşmak için deiyonize su eklenmiştir. Bu sette, daha önce çalışılan karanlık fermantasyon deneylerinde kullanılan glikoz yerine sukrozun (sakkaroz) tercih edilmesinin sebebi, projenin sonraki aşamalarında kullanılacak olan orijinal

karbon kaynağı, melasın, şeker cinsinden yüksek miktarda ve çoğunlukla sukroz içermesidir. Melasın %49'unun sukroz içerdiği (Sağır, 2012), ve glikoz ve diğer şeker çeşitlerinin sukroza göre oldukça sınırlı olduğu bilinmektedir (Olbrich, 2015). Tüm ekimlerden sonra, reaktörlerin başlangıç pH değerleri 2 M'lik NaOH ve HCl derişik çözeltileri ile ayarlanmıştır.

Reaktörler, plastik kapaklarla kapatılarak tepe gazları 5 dakika boyunca azot gazıyla uçurulduktan sonra, 125 rpm'lik karıştırıcıda ve $35\pm 2^\circ\text{C}$ 'lik sabit sıcaklıkta 6 gün inkübe edilmiştir. Reaktörlerin gaz üretimleri sürekli olarak ölçülmüş; gaz kompozisyonları ise gaz kromatografında (GC) yaşanan sorunlar nedeniyle sadece 3. günde ölçülebilmştir. Deneilerin sonlanması ile birlikte UYA, KOİ, AKM ve UAKM analizleri için örnekler alınarak -20°C 'de saklanmıştır. Kontrol amacıyla, bazı reaktör çeşitleri (KOİ=10, $S/X_o=4$, pH5,5; KOİ=30, $S/X_o=12$, pH5,5; ve KOİ=50, $S/X_o=20$, pH5,5) üç tekrarlı çalışılmış; üçüncü reaktörler inkübasyona tabi tutulmayarak, başlangıç UYA, KOİ, AKM ve UAKM derişimlerini belirlemek üzere -20°C 'de saklanmıştır.

Tablo 3.3 kullanılarak tasarlanan ve kurulan deney setinin sonuçları, maksimize edilmek istenen sonuç parametreleri, diğer bir deyişle, H_2 üretim verim ve hız (produktivite) değerleri (tepkiler) işlenerek 3 boyutlu grafikler oluşturulmuş ve maksimum üretimi verecek olan üçlü değer kombinasyonu (optimum bağımsız değişken değerleri) diferansiyel denklemlerle hesaplanmıştır.

3.1.2.2. Kesikli Anaerobik Reaktör Deneyleri

Projede özgün bir teknoloji geliştirilmesi ve üç-aşamalı sistemde üretilecek en yüksek enerji veriminin hesaplanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, bu projede yer almamasına rağmen, sonraki iş paketlerinde ön bilgi edinmek amacıyla kesikli anaerobik reaktör deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler, önemli bir işletim parametresi olan S/X_o (g KOİ/g UAKM) oranının metan üretimine ve yüzdesine etkisini araştırmak ve en yüksek metan üretiminin elde edileceği oranı belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Yapılan literatür araştırması sonucunda karbon kaynağı olarak glikozun kullanıldığı anaerobik çürütme çalışmalarında genellikle 0,5-4,5 S/X_o aralığındaki oranlarda çalışıldığı ve yüksek oranlarda inhibisyonun gerçekleştiği belirlenmiştir (Xie vd., 2008; Giordano vd., 2010; Park vd., 2010; Cheng vd., 2012; Nasr vd., 2012). Bu bağlamda, bu çalışmada S/X_o için 0,5-4 aralığında çalışılmıştır (Tablo 3.4). Bu amaçla, farklı S/X_o oranına sahip ve her biri üçer tekrarlı çalışılan beş farklı test reaktör tipi ve karbon kaynağı içermeyen (3 tekrarlı) kontrol reaktörleri kurulmuştur (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Kesikli anaerobik reaktör deneylerinde kullanılan reaktör tipleri ve özellikleri

Reaktör Tipi	S/X _o (g KOİ / g UAKM)	Glikoz derişimi (g/L)	Teorik KOİ derişimi (g/L)
Kontrol	0	0	0
Test (1)	0,5	2,08	2,22
Test (2)	1	4,16	4,44
Test (3)	2	8,31	8,87
Test (4)	3	12,47	13,31
Test (5)	4	16,62	17,73

Deneylerde sentetik atıksu ile çalışılmıştır. Sentetik atıksu, besiyer çözeltilerinden ve karbon kaynağı olarak glikoz çözeltilerinden oluşmaktadır. Kesikli anaerobik reaktör deneylerinde kullanılan besiyer çözelti içeriği ve reaktör içi derişimleri Tablo 3.5'de verilmiştir (Gungor-Demirci ve Demirer, 2004).

Tablo 3.5. Kesikli anaerobik reaktör deneylerinde kullanılan besiyer çözelti içeriği (Speece, 1996)

Besiyer çözelti içeriği	Derişim (mg/L)	Besiyer çözelti içeriği	Derişim (mg/L)
NH ₄ Cl	1200	NH ₄ VO ₃	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	400	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,5
KCl	400	ZnCl ₂	0,5
Na ₂ S.9H ₂ O	300	AlCl ₃ .6H ₂ O	0,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	50	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	80	H ₃ BO ₃	0,5
FeCl ₂ .4H ₂ O	40	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,5
CoCl ₂ .6H ₂ O	10	Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	0,5
KI	10	Na ₂ SeO ₃	0,5
(NaPO ₃) ₆	10	Cysteine	10
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,5	NaHCO ₃	6000

Deneyler, 100 mL toplam ve 60 mL etkin hacme sahip kesikli modda işletilen cam reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Tüm reaktörler, reaktör içi UAKM derişimi 4156±493 mg/L olacak şekilde 10 mL karışık anaerobik kültür ile aşılacaktır. Tablo 3.4'de belirtilen besiyer çözelti derişimine ulaşmak amacıyla reaktörlere 10 mL konsantre besiyer çözelti ve 0,5-4 S/X_o oranını sağlayacak miktarda glikoz çözeltisi eklenmiştir. Kontrol reaktörlerine glikoz eklenmemiştir. Tüm ekimler yapıldıktan ve reaktör içi pH değerlerinin 8,3 olduğu belirlendikten sonra, reaktörler plastik kapaklarla kapatılmıştır. Reaktörlerin tepe gazları, N₂

gazı ile 4 dakika uçurularak oksijenin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Reaktörler 175 rpm'lik karıştırıcıda ve $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'lik sabit sıcaklıkta 39 gün süresince inkübe edilmiştir. Bu süreç boyunca, reaktörlerin gaz üretimi ve gaz içeriği günlük olarak ölçülmüştür.

3.1.2.3. Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyleri

3.1.2.3.1 SET-1: Başlangıç S/X₀ etkisinin araştırılması

Projenin ileriki iş paketlerinde yapılması planlanan fotofermantasyon deneylerine ön bilgi sağlaması amacıyla, projede yer almamasına rağmen, bu iş paketinde kesikli fotofermantasyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın amacı fotofermantasyon yoluyla hidrojen üretiminde önemli bir parametre olabilecek S/X₀ (besin/mikroorganizma) oranının etkisinin ve en yüksek verimin sağlandığı optimum S/X₀ değerinin araştırılmasıdır. Bu çalışmada 5, 7, 9, 12 ve 20 S/X₀ oranlarında çalışılmıştır.

Deneyler, 55 mL toplam ve 50 mL etkin hacme sahip kesikli modda işletilen cam reaktörlerde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Hidrojen üretme besiyeri olarak değiştirilmiş Biebl ve Pfennig Besiyeri kullanılmıştır (Biebl ve Pfennig, 1981). Bu besiyer, üreme besiyerinden farklı olarak 30 mM asetat ve 2 mM glutamat (30/2 A/G besiyeri) içermektedir. Reaktörler, 5 farklı S/X₀ oranına sahip olacak şekilde farklı miktarda (Bölüm 3.1.1.3'de çoğaltım protokolü belirtilen) *Rhodobacter capsulatus* kültürü ile aşılanmıştır. Aşılanacak kültür miktarı ve reaktör içi UAKM derişimi belirlenirken, optik yoğunluk (OD) analizleri yapılmış ve UAKM-OD kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır (Şekil EK-A1, EK-A). Reaktörlere, belirlenen 5 farklı başlangıç S/X₀ oranını elde etmek için, gerekli miktarda hidrojen üretme besiyeri (30/2 A/G besiyeri) eklenmiştir. Başlangıç KOİ derişimleri, kullanılan hidrojen üretme besiyeri içerisindeki asetat ve glutamatın KOİ eşdeğeri (besiyer: 2,208 g/L KOİ) dikkate alınarak hesaplanmıştır. Çalışılan her farklı S/X₀ oranı (5, 7, 9, 12 ve 20) üçer tekrarlı çalışılmıştır.



Şekil 3.2. Kesikli fotofermantasyon deneylerinde kullanılan deney düzeneği

Aşılama sonrasında, tüm reaktörlerin tepesi gazı argon ile yıkanmış ve reaktörler 30°C'de aydınlık ortamda (4000 lux) 8 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince reaktörlerden her gün düzenli olarak 2,5 mL örnek alınarak (1 mL numunede) pH ve optik yoğunluk analizleri yapılmıştır. Kalan örnek UYA analizleri için -20°C'de saklanmıştır. Üretilen gazın kompozisyonu reaktörlerin tepesi gazından alınan gaz örnekleri ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.3.2 SET-2: Başlangıç besin (S), mikroorganizma (X_0) ve ışık şiddetinin (I) Tepki Yüzeyi Metodu ile araştırılması

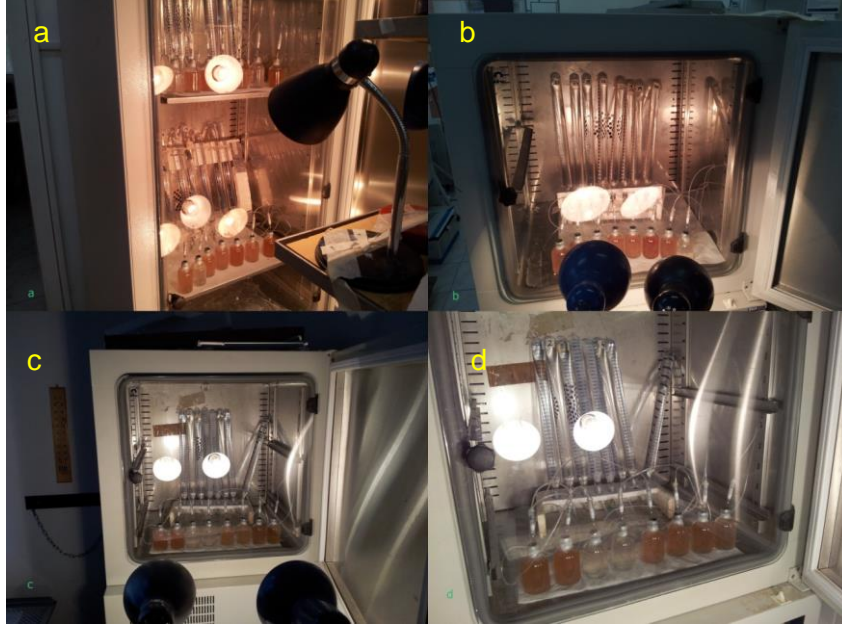
Projenin ileriki iş paketlerinde yapılması planlanan fotofermantasyon deneylerine ön bilgi sağlaması amacıyla, projede yer almamasına rağmen, kesikli fotofermantasyon ek deneylerine devam edilmiştir. Bu çalışmanın amacı başlangıç besin (S), mikroorganizma (X_0) ve ışık şiddetinin Tepki Yüzeyi Metodu ile optimizasyonunun gerçekleştirilmesi ve en yüksek hidrojen üretiminin (hidrojen üretim hızı-produktivite ve hidrojen veriminin) elde edildiği optimum değerlerin araştırılmasıdır.

Bu çalışmada besin olarak 20 mM, 40 mM ve 60 mM derişimlerinde asetat ile çalışılmıştır. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, sık çalışılan asetat derişimlerinin genellikle 10-80 mM aralığında olduğu (Eroğlu vd., 2008; Özgür vd., 2010; Androga vd., 2011; Lo vd., 2011), hatta 168 mM (Asada vd., 2008) derişimine kadar çıktığı saptanmıştır. Bu nedenle, seçilen

derişim aralığının, fotofermantasyon çalışmaları kapsamında yüksek olmadığı düşünülmektedir. Ayrıca *R.capsulatus* için önerilen optimum asetat derişiminin 30 mM (Özgür vd., 2010), başka bir *Rhodobacter* kültürü için 21-42 mM (Asada vd., 2008) ve *Rhodopseudomonas* çeşitleri için 22 mM (Barbosa vd., 2001) olması sebebiyle, aralık için sınır değerler 20 ile 60 mM olarak belirlenmiştir. Mikroorganizma derişimleri olarak ise, reaktör içi UAKM derişimleri 0,05 g/L, 0,2 g/L ve 0,35 g/L olacak şekilde *R.capsulatus* kültürü aşılacaktır. Deneylerde, ışık şiddeti 1500 lux (100 W/m^2), 3000 lux (200 W/m^2) ve 4500 lux (300 W/m^2) olacak şekilde aydınlatma sağlanmıştır. Işık şiddeti mor-kükürtsüz bakterilerle hidrojen üretiminde en önemli parametrelerden biridir (Sevinç vd., 2012). Sevinç vd. (2012), 1500-5000 lux ışık şiddetlerinde çalışmış ve bu aralığın mor-kükürtsüz bakteriler için hidrojen üretiminde uygun olduğunu belirtmiştir. Projenin bu ek çalışmasında, 1500-5000 lux ışık şiddeti aralığında üç değer çalışılarak hidrojen artışını en iyi şekilde etkileyen ışık şiddetinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Deneyler, 55 mL toplam ve 50 mL etkin hacme sahip kesikli modda işletilen 30 cam reaktörde gerçekleştirilmiştir. Hidrojen üretme besiyeri olarak değiştirilmiş Biebl ve Pfennig Besiyeri kullanılmıştır (Biebl ve Pfennig, 1981). Bu besiyer, üreme besiyerinden farklı olarak 20 mM, 40 mM ve 60 mM asetat ve, sırasıyla, 1,33 mM, 2,67 mM ve 4 mM derişimlerinde glutamat içermektedir. Böylece tüm reaktörlerin C/N oranları 15 olacak şekilde sabit tutulmuştur. Aşılacak bakteri kültür miktarı ve reaktör içi UAKM derişimi belirlenirken, OD analizleri yapılmış ve UAKM-OD kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır (EK-A, Şekil EK-A1). Deneyler üç farklı ışık şiddetini sağlamak amacıyla üç farklı inkübatör içerisinde gerçekleştirilmiştir. Otuz (30) reaktörden 8 tanesi 1500 lux ışık şiddetinde (Şekil 3.3c-d), 8 tanesi 4500 lux ışık şiddetinde (Şekil 3.3b) ve 14 tanesi 3000 lux ışık şiddetinde (Şekil 3.3a) inkübe edilmiştir. Reaktör çeşitleri ve sayıları Tepki Yüzeyi Metodu – Box-Behnken Tasarım yöntemine girilen sınır değerler ile program tarafından oluşturulmuştur. Buna göre, 3 değişkenin orta noktaları ($S=40 \text{ mM}$, $X_o=0,2 \text{ g UAKM/L}$, $I=3000 \text{ Lux}$) için 6 tekrarlı (6 eş reaktör kurularak); diğer reaktör çeşitleri (üç değişkenin farklı kompozisyonlarına sahip reaktör çeşitleri) ise 2 tekrarlı çalışılmıştır. Deneylerde kurulan reaktörlerin özellikleri Tablo 3.6'da, tasarım yöntemi tarafından belirlenen tasarım tablosu ise Tablo 3.7'de verilmiştir.

Aşılama sonrasında, tüm reaktörlerin tepe gazı argon ile yıkanmış ve reaktörler 30°C 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince reaktörlerden her gün düzenli olarak 2,5 mL örnek alınarak; (1 mL numunede) pH ve optik yoğunluk analizleri yapılmıştır. Kalan örnekler UYA analizleri için ayrılmıştır. Üretilen gazın kompozisyonu reaktörlerin tepe gazından alınan gaz örnekleri ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Kesikli fotofermantasyon (SET-2) deneylerinde kullanılan düzenekler

Tablo 3.6. Kesikli fotofermantasyon deneylerinde kullanılan reaktörlerin özellikleri

Reaktör numarası	UAKM Derişimi- X_0 (g/L)	Besin-S (mM Asetat)	Aydınlatma (Lux)	Hesaplanan S/X_0 (g KOİ/g UAKM)
1	0,35	40	1500	8,4
2	0,35	40	1500	8,4
3	0,05	40	1500	58,9
4	0,05	40	1500	58,9
5	0,2	20	1500	7,4
6	0,2	60	1500	22,1
7	0,2	60	1500	22,1
8	0,2	20	1500	7,4
9	0,05	20	3000	29,4
10	0,2	40	3000	14,7
11	0,35	60	3000	12,6
12	0,05	60	3000	88,4
13	0,2	40	3000	14,7
14	0,05	20	3000	29,4
15	0,35	20	3000	4,2
16	0,2	40	3000	14,7
17	0,05	60	3000	88,4
18	0,2	40	3000	14,7

Reaktör numarası	UAKM Derişimi- X_0 (g/L)	Besin-S (mM Asetat)	Aydınlatma (Lux)	Hesaplanan S/ X_0 (g KOİ/g UAKM)
19	0,2	40	3000	14,7
20	0,35	60	3000	12,6
21	0,2	40	3000	14,7
22	0,35	20	3000	4,2
23	0,2	60	4500	22,1
24	0,35	40	4500	8,4
25	0,05	40	4500	58,9
26	0,2	20	4500	7,4
27	0,2	20	4500	7,4
28	0,35	40	4500	8,4
29	0,2	60	4500	22,1
30	0,05	40	4500	58,9

Tablo 3.7. Box-Behnken tasarımında kullanılan faktörler ve seviyeler

Bağımsız Değişken	Sembol	Aralık ve seviyeler		
		-1	0	1
X_0	X0	0,05	0,2	0,35
S	X1	20	40	60
I	X2	100	200	300

3.1.3 Analitik Yöntem

AKM ve UAKM ölçümleri Standart Metod'a göre gerçekleştirilmiştir (APHA, AWWA, WEF, 2005). KOİ (çKOİ) analizleri için EPA onaylı reaktör çürütme metodu uygulanmıştır (Hach Water Analysis Handbook, 1989). çKOİ analizinde, örnekler öncelikle Sartorius marka filtrelerden (0,7 μ m) süzölmüştür.

Fotofermantasyon reaktörlerinden alınan örneklerin optik yoğunluk ölçümleri 660 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu UV-1201) gerçekleştirilmiştir. Ölçülen her bir optik yoğunluk için kuru kütle ağırlığı hesaplanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve reaktörlerde zamana karşı UAKM derişimi izlenmiştir (EK-A, Şekil EK-A1).

Reaktörlerde üretilen tepe gazı hacmi su-yer değiştirme cihazı (water displacement device) ile ölçülmüştür (Erguder vd., 2001). Fotofermantasyon deneylerinde üretilen toplam gaz hacmi, aynı yaklaşımla, her reaktör için ayrı yaptırılmış olan gaz toplama tüplerine deney süresi boyunca biriktirilerek hesaplanmıştır (Şekil 3.2). Reaktörlerin tepe gazı H₂ analizleri, Termal Kondaktivite Detektörü (TCD) ve Supelco Carboxen 1010 kolonu ile donatılı olan GC (Agilent Technologies 6890N) ünitesinde yapılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak Argon kullanılmış ve 26 mL/dakika akış ayarlanmıştır. Enjektör sıcaklığı 160°C, detektör sıcaklığı 170°C'de sabit tutulmuş, fırın sıcaklığı ise 140°C'ye ayarlanmıştır. Reaktörlerin CH₄ kompozisyonu Thermal Conductivity Detector (TCD) ve Capillary Column CP-Sil 8 (CP8752, Varian) ile donatılı GC (Agilent 6890) ünitesinde yapılmıştır. Bu GC'de, enjektör sıcaklığı 100°C ve detektör sıcaklığı 250°C'de sabit tutulmuş, taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmış ve 4,11 psi sabit basınçta ve 45°C fırın sıcaklığında çalışılmıştır. Gaz numunelerindeki kompozisyonu belirlemek için kullanılan kalibrasyon grafikleri Şekil EK-A2'de sunulmuştur.

UYA kompozisyonu ve derişimleri refractive index detektörü kullanan HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) (SHIMADZU 20A) cihazı ile ölçülmüştür. Buna göre, laktik, formik, asetik, propiyonik, izo-bütirik, bütirik ve izo-valerik asitleri analiz edilmiştir. Analiz edilen numune miktarı 10 µL'dir. Fırın sıcaklığı 66°C'ye ayarlanmış ve HPLC kalitesinde 0,085 M'de sülfürik asit çözeltisi mobil faz olarak kullanılmıştır. Akış hızı 0,4 mL/dakika'ya ayarlanmıştır. Numunelerdeki UYA derişimleri, standart asit karışım solüsyonu ile hazırlanan kalibrasyon grafiklerine göre hesaplanmıştır (EK-A, Şekil EK-A3). Toplam UYA (tUYA) derişimini hesaplamak için, her bir asit derişimi moleküler ağırlığına bölünmüş ve asetik asidin moleküler ağırlığıyla çarpılmıştır; tüm asitlerin asetik asit (HAc) cinsinde eşlenik derişimlerinin toplamı tUYA derişimini vermektedir (Yılmaz ve Demirer, 2008).

Karanlık fermentasyon ve fotofermantasyon çalışmalarında, reaktör setlerinin tasarımı ve gaz üretim sonuçlarının modellenmesi için MiniTab (Minitab Pro 16.1.0.0) programı kullanılmıştır. Deney setlerinin tasarımında, bu programın Tepki Yüzeyi Metodu (Response Surface Methodology) - Box-Behnken tasarım yöntemi kullanılmıştır (Wang ve Wan, 2008). Box-Behnken tasarım yöntemi, MiniTab tarafından ardışık deneyler yapılmadığında, diğer bir deyişle, deney seti yalnızca bir kez kurulacaksa önerilen tasarım modelidir ve daha az tasarım noktasına ihtiyaç duymaktadır. Box-Behnken tasarımı veri noktalarını kapsayan bir küp tanımlar, böylece çalışılan parametre aralıklarında sonuç verir. Örneğin, bir diğer tasarım modeli Central Composite Design yönteminde olduğu gibi çalışılan veri aralığının dışında bir sonucu optimize edilmiş sonuç olarak önermez. Gaz üretim sonuçlarının modellenmesi için öncelikle hidrojen üretim verimi ve hızı (prodüktivite) değerleri hesaplanmıştır. Kullanılan bağımsız değişkenlerin (başlangıç pH, KOİ ve S/X₀ (veya X₀)), maksimize edilmek istenen

hidrojen üretim verimi ve hızı (prodüktivite) değerlerine (tepkilere) etkisi, MiniTab programının grafiksel ve istatistiksel analizleri aracılığıyla incelenmiştir. Diğer bir deyişle, MiniTab programı ile, deneysel veriler kullanılarak üç boyutlu grafikler oluşturulmuş ve maksimum üretim hızını ve(ya) verimini ifade edecek olan bağımsız değişkenli denklemler (teпки modelleri) hesaplanmıştır. Oluşturulan modellerin (denklemlerin) anlamlılığını denetlemek amacıyla MiniTab programında ANOVA analizleri yapılmıştır. Bu istatistiksel analiz sonuçlarına göre, tepki modelleri (denklemleri) modifiye edilmiştir. Denklemlerin geçerliliği, ANOVA'ya ek olarak MathCad (15) programında yapılan ayrı bir matris hesabıyla da kontrol edilmiştir. Oluşturulan modellere göre, tepkilerin (hidrojen üretim verimi ve hızı (prodüktivite)) maksimum değere ulaşmasını sağlayacak bağımsız değişkenler ve değerleri, MiniTab programının Tepki Optimizasyonu uygulaması kullanılarak elde edilmiştir.

3.2 Bulgular ve Tartışma

3.2.1 Kesikli Karanlık Fermantasyon Deneyi Sonuçları

Kurulan her üç sette de reaktörlerde metan gazı üretimi gözlenmemiştir. Bu sonuç, karışık anaerobik kültüre uygulanan ısıl işlemin, metanojenleri engellemekte başarılı olduğunu göstermektedir.

3.2.1.1 Karanlık Fermantasyon SET 1 Sonuçları: Başlangıç pH Değerinin Etkisi

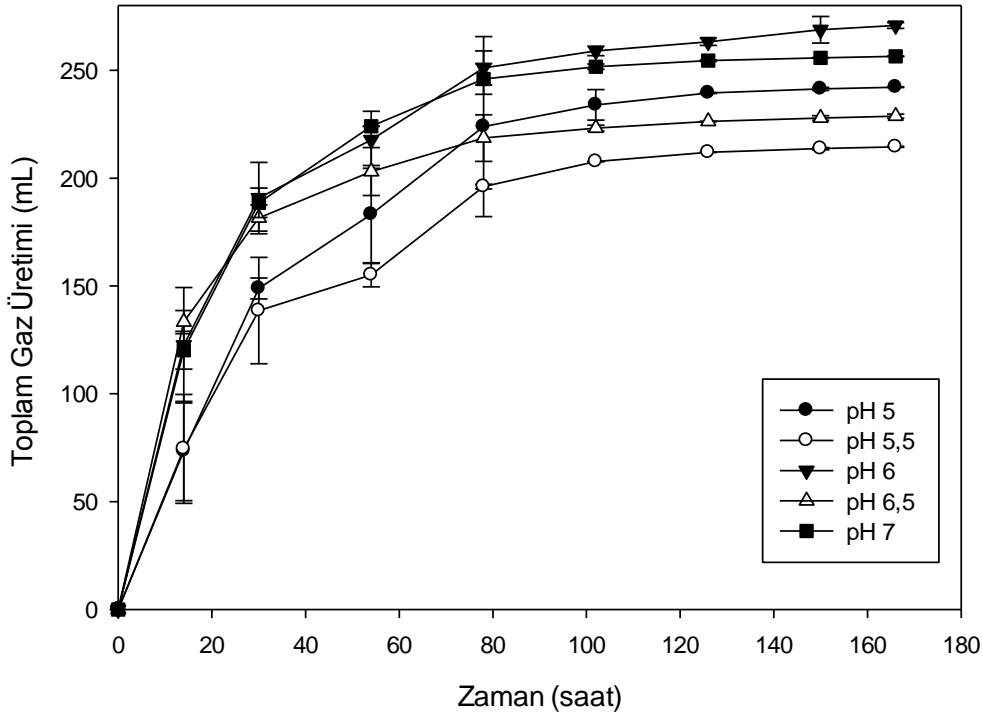
Set 1, sentetik atıksudan (glikoz) karanlık fermantasyonla hidrojen üretiminde en yüksek verimin sağlandığı başlangıç pH değerini (aralığını) tespit etmek ve başlangıç pH değerinin hidrojen üretimine etkisini araştırmak amacıyla kurulmuştur. Sonuçlar (üretilen ortalama toplam gaz ve hidrojen miktarları) Şekil 3.4 ve Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8. Farklı başlangıç pH değerlerinde gaz üretim değerleri ve kompozisyonu ^a

Başlangıç pH	Gaz üretim miktarı (mL) ^b		Hidrojen gazı yüzdesi (%)
	Toplam gaz	Toplam H ₂	
5	242 ± 53	73 ± 4	30,2 ± 0,2
5,5	215 ± 5	66 ± 1	30,6 ± 0,2
6	271 ± 49	92 ± 3	34,1 ± 0,1
6,5	229 ± 25	73 ± 2	32 ± 0,2
7	256 ± 24	81 ± 2	31,7 ± 0,2

^a Her başlangıç pH değeri için kurulan kontrol reaktörlerindeki gaz üretimi 10-13 mL arasındadır (Bu hacim eşleniği olan test reaktörlerinde üretilen miktarın %2-3'üdür).

Tablo 3.8’de görüldüğü üzere, başlangıç pH değerleri 5-7 arasında değişen beş farklı reaktör tipinde ortalama toplam gaz ve hidrojen gazı üretim miktarları sırasıyla 215-272 mL ve 66-92 mL arasında; hidrojen gazı yüzdeleri ise %30-34 arasında değişmektedir. Sonuçlar, çalışılan başlangıç KOİ derişiminde (10 g/L), 5-7 arasında değişen başlangıç pH değerlerinin hidrojen üretimini ve hidrojen gazı yüzdesini çok belirgin şekilde etkilemediğini göstermiştir. Daha yüksek KOİ derişimlerinde, pH etkisinin daha belirgin olacağı düşünülmektedir. Yüksek karbon derişimleri, fermantasyon sonucu üretilen UYA derişiminin daha fazla olmasına ve ortam pH’sının daha hızlı düşmesine sebep olabilir. Dolayısıyla, başlangıç pH değerinin etkisi, ortam pH’sının değişim hızını ve sonuç olarak H₂ üretim miktarı ve hızını etkileyeceği için, yüksek başlangıç KOİ derişimlerinde (>10 g/L) daha fark edilebilir.



Şekil 3.4. Farklı başlangıç pH değerlerinde elde edilen toplam (ortalama) gaz üretimi (SET 1) (35°C, glikoz, 10 g/L KOİ)

Şekil 3.4 ve Tablo 3.8’de görüldüğü gibi, üretilen gaz miktarı ve yüzdeleri çok farklı olmasa da, sıralama yapıldığında, yüksek pH değerlerinde daha yüksek bir üretim olduğu saptanmıştır. En yüksek hidrojen üretimi (92,4 mL) başlangıç pH’sının 6 olduğu koşulda, en az üretim ise pH 5,5’da gözlenmiştir. Üretilen hidrojen miktarı başlangıç pH değerinin artışına ya da azalışına paralel şekilde bir sıralama izlememektedir. Fakat Şekil 3.4’e bakıldığında, başlangıç pH’sı ile gaz üretim hızı arasında bir ilişki olduğu ve yüksek pH (pH 6; 6,5 ve 7)

koşullarındaki gaz üretim hızının düşük pH değerlerine göre (pH 5 ve 5,5) daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Tüm bu sonuçlar, literatür verileriyle uyum göstermektedir (Chen vd., 2008; Sağnak vd., 2010). Sürekli reaktörlerde H₂ üretiminin yüksek olduğu optimal pH değeri 5-5,5 arasında iken (Fang vd., 2002; Van Ginkel ve Logan, 2005b; Mariakakis vd., 2011); kesikli reaktörlerde optimum değer 6,5-7 aralığına çıkmaktadır (Chen vd., 2008; Sağnak vd., 2010). Dolayısıyla, çalışılan başlangıç KOİ ve pH değerlerinde ve kesikli işletimde, yüksek başlangıç pH değerlerinin (pH 6-7), daha yüksek hidrojen üretimine yol açtığı tespit edilmiştir. Nitekim en yüksek H₂ yüzdeleri de (%32-34), pH 6-7 arasında gözlenmiştir. Bu durum, hidrojen ve UYA üretimine paralel olarak gözlenen ortam pH'sındaki düşüşün yüksek başlangıç pH değerlerinde daha yavaş gerçekleşmesi ve bu süreçte daha fazla miktarda H₂ üretilmesi ile açıklanabilir. Öte yandan, düşük başlangıç pH değerleri (5-5,5), asidojenik bakteriler için daha uygun olmasına rağmen, H₂ üretimi ile birlikte UYA derişimindeki artış ve ortam pH'sındaki düşüşün (pH 3,5-4,5) daha kısa sürede gözlenmesine; dolayısıyla, inhibisyon ve H₂ üretiminin sonlanmasının daha kısa sürede gerçekleşmesine yol açmaktadır.

En yüksek H₂ üretiminin gözleendiği başlangıç pH değeri (pH 6) için üretim verimi 1,16 mol H₂/mol glikoz_{eklenen} olarak hesaplanmıştır (EK-B). Glikozun karanlık fermantasyonla asetik aside dönüşmesi sonucu teorik olarak 4 mol, bütirik aside dönüşmesi sonucu ise 2 mol H₂ üretildiği bilinmektedir. Fakat gerçek verimler glikozun bir kısmının mikroorganizma üremesi için harcanması sebebiyle daha düşüktür. Ayrıca, eklenen glikoz miktarı üzerinden yapılan bu sonuçların tüketilen glikoz bazında değerlendirilmesi gerekmektedir. Hidrojen üretim verimleri, daha kapsamlı olan SET 2'de daha ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

3.2.1.2 Karanlık Fermantasyon SET 2 Sonuçları: Başlangıç pH ve KOİ Değerlerinin Etkisi

SET 2, başlangıç KOİ ve pH ikilisinin karanlık fermantasyona etkisini araştırmak ve en yüksek hidrojen üretiminin elde edildiği başlangıç KOİ ve pH çiftini belirlemek amacıyla kurulmuştur. Deney sonuçları Tablo 3.9, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da verilmiştir.

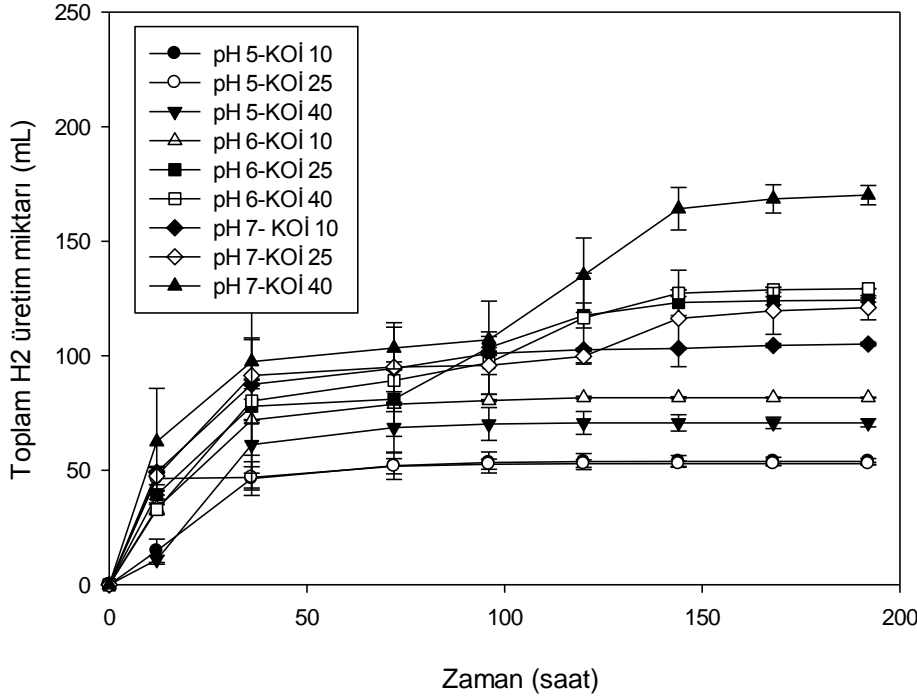
SET 1'de elde edilen sonuçlara paralel şekilde, bu sette de hidrojen üretimlerinin sonlandığı noktada çıkış pH değerlerinin düştüğü ve 3,6-4,74 arasında değiştiği gözlenmiştir (Tablo 3.9). Başlangıç pH değerinden bağımsız olmak üzere, başlangıç KOİ derişimi 10'dan 40 g/L'ye arttıkça, çıkış pH'sının genellikle paralel olarak düştüğü saptanmıştır (Şekil 3.6a).

Şekil 3.5 ve 3.6c'de görüldüğü gibi, en fazla hidrojen üretimi, en yüksek başlangıç pH ve KOİ derişimine sahip reaktörde gerçekleşmiştir (pH= 7 ve KOİ= 40 g/L). Bunu takip eden ikincil

yüksek hidrojen üretimi ise, sırasıyla, pH 6-KOİ 40 g/L; pH 6-KOİ 25 g/L ve pH 7-KOİ 25 g/L ikililerinde gözlenmiştir. Bu sonuçlar, SET 1’de elde edilen ‘6-7 gibi yüksek pH’da daha fazla üretim’ bulgusunu desteklemektedir. Kesikli reaktörlerde pH kontrol edilemediği için, ortam pH’sının 3,5-4,5 değerlerine düşmesi hidrojen üretiminin inhibe olmasına neden olmaktadır. Başlangıç pH’sı yüksek olan (pH 7) reaktörlerde, KOİ derişimi yüksek olsa dahi, üretimi inhibe edecek pH değerine varılana kadar daha uzun bir süre geçmekte ve bu da daha fazla gaz üretilmesine olanak sağlamaktadır. Öte yandan, başlangıç pH’sının düşük olduğu koşullarda (pH 5), UYA üretimi ve pH düşüşü daha kısa sürede gerçekleştiği için, toplam hidrojen üretim miktarı az olmaktadır. Nitekim en düşük hidrojen üretim miktarları başlangıç pH’sının 5 olduğu reaktörlerde gözlenmiştir (Şekil 3.5, Şekil 3.6c). Bu bulguları destekler şekilde, çalışılan tüm KOİ derişimleri için, başlangıç pH değeri düştükçe hidrojen üretim miktarının ve hızının genel olarak düştüğü saptanmıştır (Tablo 3.9 ve Şekil 3.6b, c). En yüksek hidrojen üretim hızı olan 1,17 mL/saat, başlangıç pH ve KOİ değerlerinin sırasıyla 7 ve 40 g/L olduğu koşullarda (Tablo 3.9) elde edilmiştir.

Tablo 3.9. Farklı başlangıç pH ve KOİ derişimlerinde elde edilen hidrojen üretim miktarları ve çıkış pH değerleri (SET 2)

Başlangıç pH	Başlangıç KOİ derişimi (g/L)	İnkübasyon sonu ortalama pH değerleri	H ₂ üretim hızı (mL/saat)	H ₂ yüzdesi (%)	H ₂ üretim verimi (mol H ₂ /mol glikoz _{eklenen})
5	10	3,77	0,72	29,2	0,68
5	25	3,64	0,84	30,2	0,27
5	40	3,65	0,55	40,9	0,22
6	10	4,13	0,72	34,2	1,03
6	25	4,16	0,98	30,6	0,63
6	40	3,6	0,83	35,2	0,41
7	10	4,74	0,95	34,5	1,32
7	25	4,03	0,88	33,5	0,61
7	40	3,74	1,17	33,2	0,54



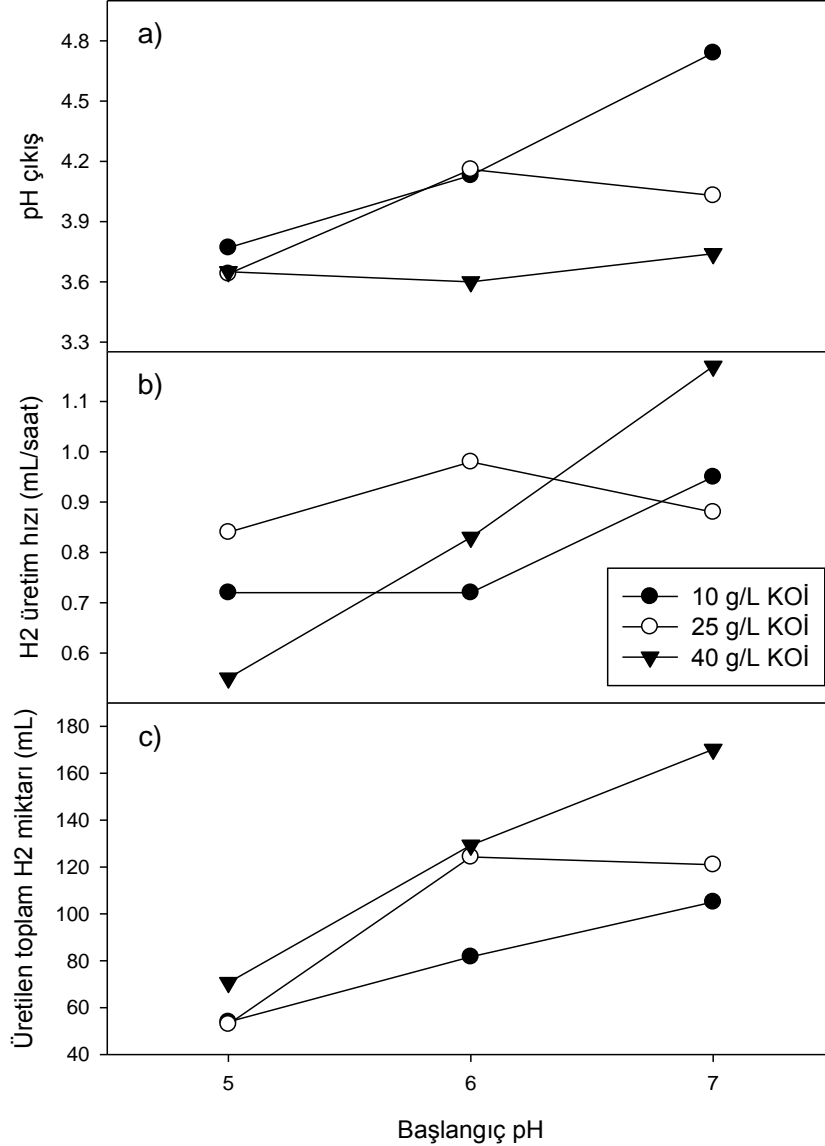
Şekil 3.5. Toplam hidrojen gazı üretimi (SET 2) (35°C, glikoz)

Şekil 3.5’de görüldüğü üzere, çalışılan tüm pH-KOİ çiftlerinde, hidrojen üretimi yaklaşık ilk 40 saat içerisinde tamamlanmaktadır. Ancak, başlangıç pH değerinin 6 ve 7 olduğu reaktörlerde ve özellikle 25 ve 40 g/L KOİ derişimlerinde, 75 ile 100.saat aralığında hidrojen üretiminin yeniden başladığı gözlenmiştir. Bu durum, reaktör içi pH değerinin düşerek ilgili asidojen bakteri türü için daha uygun ortam koşullarına (pH değeri veya UYA tipine) ulaşılması ve bu mikroorganizmaların baskın hale gelerek hidrojen üretimine başlamaları ile açıklanabilir.

Tepe gazı analizlerine bakıldığında, hidrojen gazı yüzdesinin %29-41 arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 3.9). Başlangıç pH-KOİ değerlerinin sırasıyla 5 ve 40 g/L olduğu reaktör tipi dışında, %33-35 olan daha yüksek hidrojen gazı yüzdesinin genellikle başlangıç pH’sının 6 ve 7 olduğu reaktörlerde gerçekleştiği anlaşılmaktadır. SET 1’deki sonuçlarla örtüşen bu bulgu, farklı başlangıç KOİ-pH değerlerinde üretilen UYA tipi ve derişimine göre baskın hale gelen asidojen bakterilerinin farklılaşması ile ilişkilendirilebilir.

Hidrojen üretim verimleri, reaktörlere eklenen glikoz miktarı ($\text{mol H}_2/\text{mol glikoz}_{\text{eklenen}}$) bazında hesaplanmıştır (Tablo 3.9 ve EK-B). Tablo 3.9’da görüldüğü üzere, H_2 üretim verimleri 0,22-1,32 $\text{mol H}_2/\text{mol glikoz}_{\text{eklenen}}$ arasında değişmektedir. Başlangıç pH değerinden bağımsız olarak, başlangıç KOİ derişimi 10’dan 40 g/L’ye arttıkça verim düşmektedir. Bu bulgu, UYA derişiminin artan KOİ ile artması ve ortam pH’sının düşmesi sonucunda hidrojen üretiminin olumsuz etkilendiği yorumunu desteklemektedir (Van Ginkel ve Logan, 2005b). Diğer bir

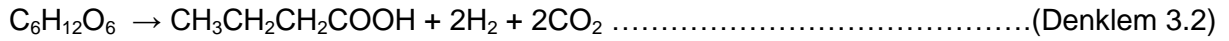
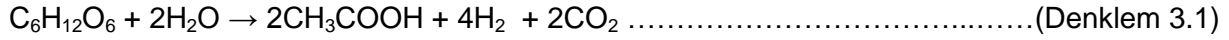
değişle de, aynı başlangıç KOİ derişimlerinde, başlangıç pH değeri arttıkça hidrojen üretim veriminin genellikle arttığı tespit edilmiştir. Eklenen glikoz başına en yüksek hidrojen üretim verimi, başlangıç KOİ derişiminin 10 g/L (9,4 g/L glikoz) ve başlangıç pH'sının 6 ve 7 olduğu reaktörlerde (sırasıyla 1,03 ve 1,32 mol H₂/mol glikoz_{eklenen}) gözlenmiştir.



Şekil 3.6. H₂ üretim hızı, H₂ miktarının ve çıkış pH değerinin, başlangıç pH değerine göre değişimi (SET 2, 35°C, glikoz)

Glikozdan karanlık fermantasyonla hidrojen üretimini sağlayan 2 yol Denklem 3.1 ve Denklem 3.2'de gösterilmiştir. Birinci denklemde glikozdan asetik asit yan ürünü ile hidrojen elde edilirken, ikinci denklemde bütirik asit yan ürünü elde edilmektedir. Denklem 3.1'de görüldüğü gibi, tüm glikozun sadece asetik asit olarak UYA'ya dönüştüğü ideal durumda bir mol glikozdan 4 mol hidrojen elde edilmektedir. Ama gerçek verimler her zaman bunun

altında olmaktadır; çünkü glikozun bir kısmı mikroorganizma üremesi ve gelişmesi için harcanmaktadır. Genellikle karanlık fermantasyon çalışmalarında hidrojen verimi 1,5-2,5 mol hidrojen/mol glikoz_{tüketilen} aralığındadır. Hem asetik hem de bütirik asit üretildiği durumda, üretilen deneysel hidrojen miktarı 2,51-2,93 mol/mol glikoz_{tüketilen} arasında değişmektedir (Krupp ve Widmann, 2009). Hidrojen veriminin 2,5 mol H₂/mol glikoz olduğu durumda üretilen gazdaki karbondioksit oranı %40, hidrojen oranı da %60 olmaktadır. Bu çalışmada elde edilen %29-41'lik hidrojen gazı yüzdeleri ve en yüksek hidrojen üretim verimleri (1,03-1,32 mol H₂/mol glikoz_{eklenen}), beklenen aralıklara yakın olsa da, üretilebilecek miktarın altında kaldığını göstermiştir. Bu durum, karanlık fermantasyonda asetik asit üretim yolu yerine başka bir yolun daha ağırlıklı olarak tercih edildiğini gösterebilir. Göreceli daha düşük elde edilen hidrojen üretim verimlerinin bir diğer sebebi de, verim hesabının tüketilen yerine eklenen glikoz bazında yapılması olabilir.



Sonuç olarak, kesikli reaktörlerde karanlık fermantasyonla hidrojen üretiminde, başlangıç pH ve KOİ değerlerinin önemli parametreler olduğu tespit edilmiş ve pH-KOİ etkileşimlerinin dikkate alınması gerektiği anlaşılmıştır. Başlangıç KOİ derişimlerinin yüksek olduğu koşullarda (40 g/L), yüksek başlangıç pH değerleri (pH 7) daha yüksek üretim hızlarında daha fazla miktarda hidrojen üretilmesini sağlamaktadır. Hidrojen verimi baz alındığında, yüksek pH değerlerinin (pH 6 ve 7) daha verimli olduğu anlaşılmıştır. Hidrojen üretim veriminin daha artırılması için, bu pH değerlerinde (6-7), başlangıç KOİ derişiminin 10 g/L'den kademeli olarak (aklimasyonla) artırılması uygun olabilir. Başlangıç pH değerinin düşük olduğu (pH 5) kesikli işletimler, inhibisyona yol açan pH değerlerine daha kısa sürede ulaşılmasına neden olmaktadır. İnhibisyona yol açan nedenler arasında üretilen UYA derişimi ve tipi de yer almaktadır. Nitekim UYA analiz sonuçları, kesikli karanlık fermantasyon sistemlerinde yüksek miktarda UYA üretimi olduğunu göstermiştir. Asetik asit ve tUYA derişimlerinin sırasıyla 30 mM ve 66 mM'a kadar çıktığı koşullar tespit edilmiştir. Bu durumun karanlık fermantasyonla H₂ üretiminde, inhibisyona yol açtığı düşünülmektedir (veriler sunulmamıştır). UYA kaynaklı inhibisyona yönelik yorumlar, SET 3'de (Bölüm 3.2.1.3) ve Bölüm 4'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

3.2.1.3 Karanlık Fermantasyon SET 3 Sonuçları: Başlangıç pH, KOİ ve S/X₀ Değerlerinin Etkisinin Tepki Yüzeyi Metodu ile İncelenmesi

SET 3, daha önce belirtildiği üzere, Tepki Yüzeyi Metoduna (TYM) göre sukroz kullanılarak kurulmuştur. TYM ile hidrojen üretiminin maksimize edilebileceği bir üçlü parametre

kombinasyonu (en uygun başlangıç pH, KOİ ve S/X₀ değeri kombinasyonu) bulunması amaçlanmıştır. SET 3'ün sonuçları, her reaktör çeşidi için tekrarlı çalışılan reaktörlerin ortalama değerleri hesaplanarak, Tablo 3.10'da verilmiştir. Her bir reaktör için hesaplanan ayrıntılı verim ve üretimi değerlerine Tablo EK-B1'den ulaşılabilir (EK-B).

Tablo 3.10. SET 3'de kurulan 13 farklı reaktör çeşidinin hidrojen üretim verimi ve hız (prodüktivite) hesapları ^a

KOİ (g/L)	Başlangıç		Çıkış pH	Toplam üretilen gaz ^d	Tepegazı ortalama H ₂ (%) ^b	Toplam H ₂ üretimi ^d	Verim (mL H ₂ /g sukroz) ^c	Verim (mol H ₂ /mol sukroz)	Üretim hızı (mL H ₂ / L _{reaktör} . saat) ^c
	S/X ₀	pH							
10	12	7	3,65	231	34,6	80,3	9	2,3	10,6
30	20	7	3,6	207	33,7	70,0	2,6	0,67	9,2
50	12	7	3,58	198	35,5	71,0	1,6	0,41	9,3
10	4	5,5	3,39	185	32,7	60,3	6,8	1,73	7,9
50	4	5,5	3,49	153,3	35,1	53,7	1,2	0,31	7,1
10	20	5,5	3,47	170,2	35,9	60,5	6,8	1,73	7,9
30	4	7	3,62	215,05	34,9	75,0	2,8	0,72	9,9
50	20	5,5	3,44	146,6	28,8	42,3	0,9	0,24	5,6
30	12	5,5	3,7	225±29	32±3	72±12	3±0,5	0,7±0,1	10±1
30	4	4	3,78	117,7	18,7	21,2	0,8	0,2	2,8
10	12	4	4,17	124,55	16,4	20,3	2,3	0,58	2,7
30	20	4	3,68	178,15	15,5	27,6	1	0,26	3,6
50	12	4	3,83	188,65	9,5	18,8	0,4	0,11	2,5

^a Değerler 2 tekrarlı çalışılan reaktörlerin ortalama değerleridir. Yalnızca KOİ=30, pH= 5,5, S/X₀=12 koşuluna sahip reaktör TYM tasarımına göre 6 tekrarlı çalışılmış ve standart sapmaları verilmiştir.

^b Tepegazının içeriği 3. günde ölçülmüştür.

^c Değerler, üretilen gaz miktarları standart koşullara (0°C sıcaklık ve 1 atm) çevrilerek hesaplanmıştır.

^d mL, 35°C

Tablo 3.10'da görüldüğü gibi maksimum verim 2,3 mol H₂/mol sukroz_{eklenen}'e kadar çıkmıştır. Bu değer, daha genel sayılan heksoz cinsinden ifade edilirse 1,21 mol H₂/mol heksoz'a denk gelmektedir. Sukrozun kullanıldığı bazı çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir; Van Ginkel vd. (2001) sukroz ile kesikli karanlık fermantasyon deneylerinde 2,5 mol H₂/mol heksoz_{eklenen} verim elde ederken, Wu vd. (2002)'nin elde ettiği verim 2 mol H₂/mol heksoz_{eklenen}'dir. Khanal vd. (2004) ise 1,7 mol H₂/mol heksoz verimi elde etmiştir. Sukroz (disakkarit) ile çalışılan bu setin verim sonuçları, daha basit bir substrat (monosakkarit) olan glikozun kullanıldığı kesikli çalışmalarımızda elde edilen en yüksek verimin (SET 2; 1,32 mol H₂/mol glikoz_{eklenen} veya 1,32 mol H₂/mol heksoz_{eklenen}) gerisinde kalmıştır.

SET 3, TYM'una göre kurulduğu için, en yüksek hidrojen üretiminin sağlandığı koşulları birebir Tablo 3.10'a bakarak yorumlamak sağlıklı olmayacaktır. Bu bağlamda, TYM ile analitik yöntem bölümünde belirtildiği gibi, grafiksel ve istatistiksel analizler yapılmıştır. TYM, 3 değişkenin (başlangıç KOİ, pH ve S/X_0) tepki (hidrojen üretim verimi ve hızı (prodüktivite)) üzerindeki etkilerini ayrı yorumlatabildiği gibi, bu değişkenlerin ilişki içindeyken tepki üzerindeki etkilerini de yorumlamaya imkan tanımaktadır. Bu nedenle, her bir tepki için, Surface (yüzey) ve Contour (izdüşüm) grafikleri çizilmiş, ANOVA analizleri yapılmış ve bu sonuçlar birlikte yorumlanmıştır.

Tepki Yüzeyi Metodu (TYM) - Hidrojen üretim verimi

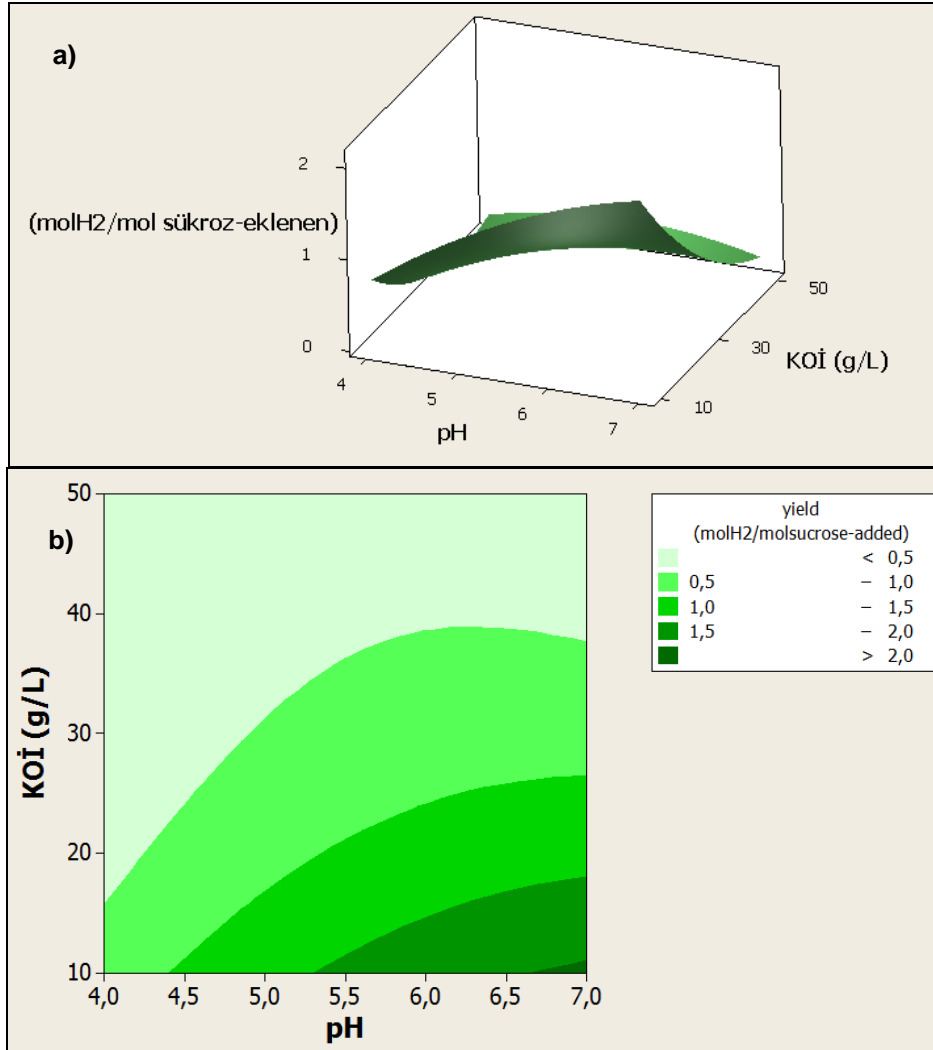
Tepki Yüzeyi Metodu, öncelikle, hidrojen üretim veriminin maksimum değere ulaştığı bağımsız değişken değerlerini belirlemek amacıyla uygulanmıştır. Metodun tepki değerlerini incelemesi sağlanmış ve ilk ANOVA tablosu oluşturulmuştur. İlk ANOVA tablosunda bazı parametrelerin (S/X_0 gibi) ve ilişkilerinin (interactions) ($KOİ \cdot pH$, $KOİ \cdot S/X_0$ gibi) anlamlılığı çok düşük çıkmıştır. Dolayısıyla, model değişkenleri ve(ya) ilişki terimleri iteratif şekilde modelden çıkartılarak, ardışık ANOVA analizleri gerçekleştirilmiş ve üretim verimini en iyi tanımlayan model (denklem) belirlenerek aşağıda sunulmuştur (Denklem 3.3). Elde edilen modelin uyumluluğu yüksek derece anlamlıdır (tüm p değerleri, $p < 0,05$). Bu modelin R-Sq (R^2) değeri %94,76 çıkmıştır. Diğer bir deyişle, verimin (Tepki-Bağımlı Değişken) birbirinden farklı değerler alması, bağımsız değişkenler (tasarım değişkenleri) tarafından %94,76 oranında açıklanabilmektedir. Detaylı ANOVA sonuçları Tablo EK-B2'de verilmiştir (EK-B). Denklem 3.3'de görüldüğü üzere, hidrojen üretim verimini anlamlı (significant) şekilde etkileyen değişkenler pH ve KOİ; etkileşimleri ise $pH \cdot pH$, $KOİ \cdot pH$ ve $pH \cdot KOİ$ 'dir. Bazı terimler ($pH \cdot S/X_0$, $KOİ \cdot S/X_0$ vb.) ve S/X_0 değişkeni anlamlı olmadıkları için modelde yer almamıştır. Analiz sonuçları S/X_0 değişkeninin hidrojen üretim verimi üzerinde etkisiz olduğunu; sukrozla gerçekleştirilen karanlık fermantasyonda hidrojen verimini etkilemediğini göstermiştir. Bu çalışma, bilindiği kadarıyla, S/X_0 'in karanlık fermantasyona etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Denklem 3.3 (hidrojen üretim verimi):

$$\text{Verim (mol H}_2\text{/mol sukroz}_{\text{eklenen}}) = -3,30051 + 1,47150 \cdot \text{pH} - 0,0160232 \cdot \text{KOİ} - 0,0828632 \cdot \text{pH} \cdot \text{pH} + 0,000758894 \cdot \text{KOİ} \cdot \text{KOİ} - 0,0110417 \cdot \text{pH} \cdot \text{KOİ}$$

Yüzey ve izdüşüm grafikleri birbirlerini tamamlayıcı bir görev üstlenmektedir. İzdüşüm grafiği, yüzey grafiğinin KOİ-pH yüzeyini (x-z plane) ifade eder. Bu sayede grafiklerin

yorumlanmasını kolaylaştırıcı bir işlev sunar. Verim, KOİ ve pH ilişkisini betimleyen yüzey ve izdüşüm grafikleri Şekil 3.7a ve 3.7b'de verilmiştir.



Şekil 3.7. Verim, KOİ ve pH ilişkisini betimleyen a) yüzey grafiği, b) izdüşüm grafiği (35°C, sukroz)

Şekil 3.7a ve 3.7b'de görüldüğü üzere, başlangıç pH ve KOİ değerleri H₂ üretim verimini radikal şekilde etkilemektedir. Başlangıç KOİ değeri 10 g/L'den 50 g/L'ye artarken verim azalmakta, pH 4'ten 7'ye artarken ise verim artmaktadır. Bu sonuçları destekler şekilde, Wang ve Wan (2008), maksimum verimi pH 7,2 noktasında; Won ve Lau (2011) maksimum verimi düşük KOİ derişimlerinde (10-20 g/L KOİ değerleri arasında) gözlemlemişlerdir. SET 3'ün sonuçları, SET 1 ve SET 2 sonuçlarını da desteklemektedir. Her iki sette de (SET 1 ve SET 2) verimin en yüksek çıktığı pH değeri 7 olarak belirlenmiş ve 10, 25 ya da 30 g/L gibi düşük KOİ derişimleri daha yüksek (50 g/L KOİ gibi) derişimlere kıyasla daha yüksek verim sağlamıştı. SET 3 çalışmasında, S/X₀ parametresi ANOVA sonucunda verimi etkileyen bir değişken olarak görülmediği için yüzey ve izdüşüm grafikleri çizilememiştir.

Daha önce belirtildiği gibi, TYM model optimizasyonu yapmaya da imkan sağlamaktadır. Optimizasyon analizine göre çalışılan aralıkta maksimum verimin elde edildiği değerler “global solution” olarak $\text{pH} = 7$ ve $\text{KOİ} = 10 \text{ g/L}$ olarak belirlenmiştir. Bu değişken değerleri kullanıldığında tahmini tepki değeri (maksimum hidrojen üretim verimi) $2,08240 \text{ mol H}_2/\text{mol}$ sukroz olarak hesaplanmıştır.

Bu optimizasyon ve hidrojen üretim verimi modeli, kontrol amacıyla MathCad programına tanımlanan 2.dereceden bir denklem olarak da hesaplatılmıştır. Bu denklem ve MathCad ile ilgili ayrıntılar Tablo EK-B3’de görülebilir (EK-B). MathCad’de yapılan denklem çözümü (denklemin maksimum değeri aldığı noktayı bulmak için yaptırılan diferansiyel hesap) sonucu verimin maksimum olduğu nokta $\text{KOİ} = 10 \text{ g/L}$, $\text{pH} = 7$, $S/X_0 = 8,405$ olarak hesaplanmıştır. Mathcad, Minitab’ın aksine, değişkenler arasında bir anlamlılık karşılaştırması yapmamaktadır; dolayısıyla, S/X_0 değişkeni de optimize edilen bir parametre olarak görülmektedir. Bu bağlamda, istatistiksel analizlerin iteratif olarak gerçekleştirildiği MiniTab’ın sonuçlarını esas almak doğru olacaktır. Bununla birlikte, Mathcad’ın KOİ ve pH için bulunduğu denklem çözümleri (değerleri) MiniTab’ın sonuçları ile uyum içerisindedir.

Tepki Yüzeyi Metodu (TYM)- Hidrojen üretim hızı (prodüktivite)

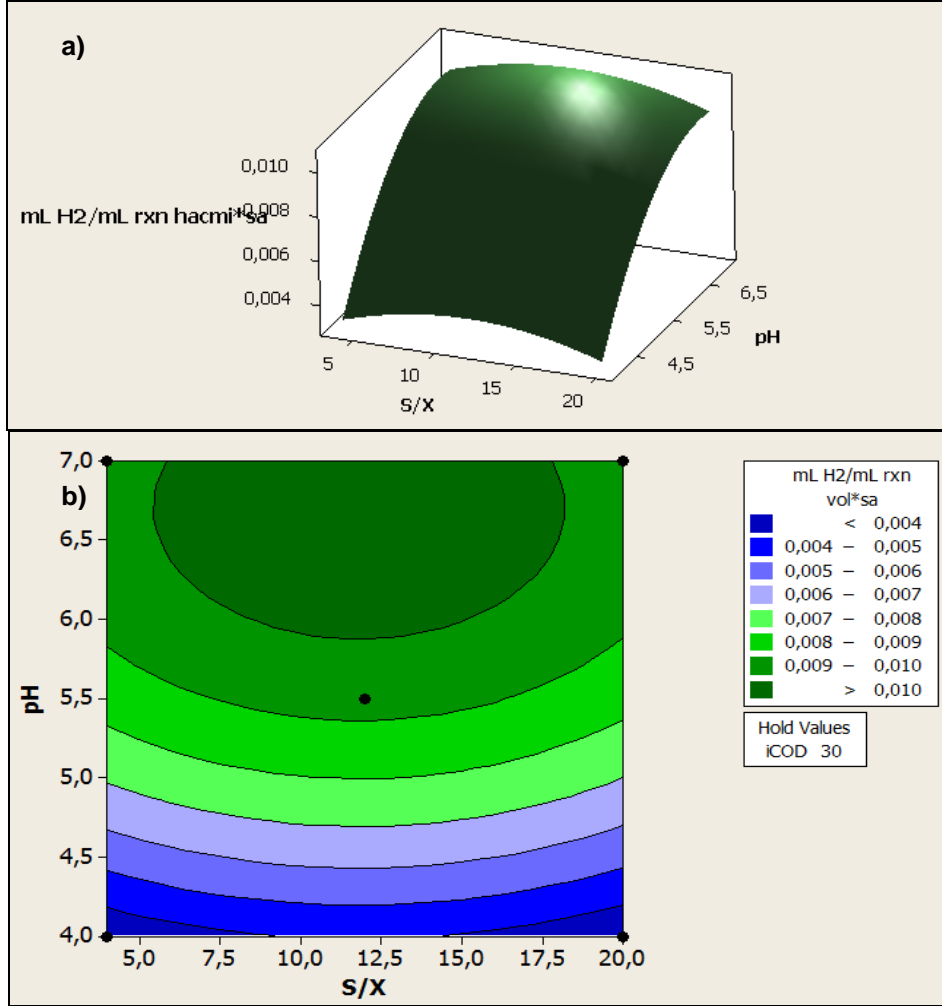
TYM, hidrojen üretim hızının (prodüktivite, $\text{mL H}_2/\text{L}_{\text{reaktör}} \cdot \text{saat}$) maksimum değere ulaştığı noktaları belirlemek için de uygulanmıştır. Verim tepkisi için uygulanan iteratif ANOVA uygulaması prodüktivite için de uygulanmıştır. Metodla öncelikle tepki değerleri incelenmiş ve ilk ANOVA tablosu oluşturulmuştur. Bu tabloda bazı parametrelerin ve ilişkilerin anlamlılığı çok düşük çıkmıştır. İteratif şekilde yapılan model değişiklikleri (değişken ya da ilişki terimlerinin modele eklenmesi ve(ya) çıkarılması) ve ardışık ANOVA analizleri sonucu üretim hızını en iyi tanımlayan model aşağıda sunulmuştur (Denklem 3.4). Modelin R-Sq değeri %89,58 çıkmıştır; prodüktivitenin (Tepki-Bağımlı Değişken) birbirinden farklı değerler alışı, bağımsız değişkenler tarafından %89,58 oranında açıklanabilmektedir. Modelin detaylı ANOVA sonuçları Tablo EK-B4’ten görülebilir (EK-B).

Denklem 3.4 (hidrojen üretim hızı-prodüktivite):

$$\text{Prodüktivite (mL H}_2/\text{L}_{\text{reaktör}} \cdot \text{saat)} = -0,0333995 + 0,000195 * \text{KOİ} + 0,000355 * S/X + 0,011916 * \text{pH} - 0,000004 * \text{KOİ} * \text{KOİ} - 0,000015 * S/X * S/X - 0,000888 * \text{pH} * \text{pH}$$

Denklem 3.4’de görüldüğü üzere, kuartatik modeldeki bazı terimler ($\text{pH} * S/X_0$, $\text{KOİ} * S/X_0$ vb.) anlamlı olmadıkları için modelde yer bulamamışlardır. S/X_0 değişkeninin, H_2 üretim verim

modelinden farklı olarak, H₂ üretim prodüktivitesi üzerinde anlamlı bir etkisi olduğu anlaşılmıştır. Değişkenlerin tepki üzerindeki etkileri Şekil 3.8, 3.9 ve 3.10'da verilmiştir.

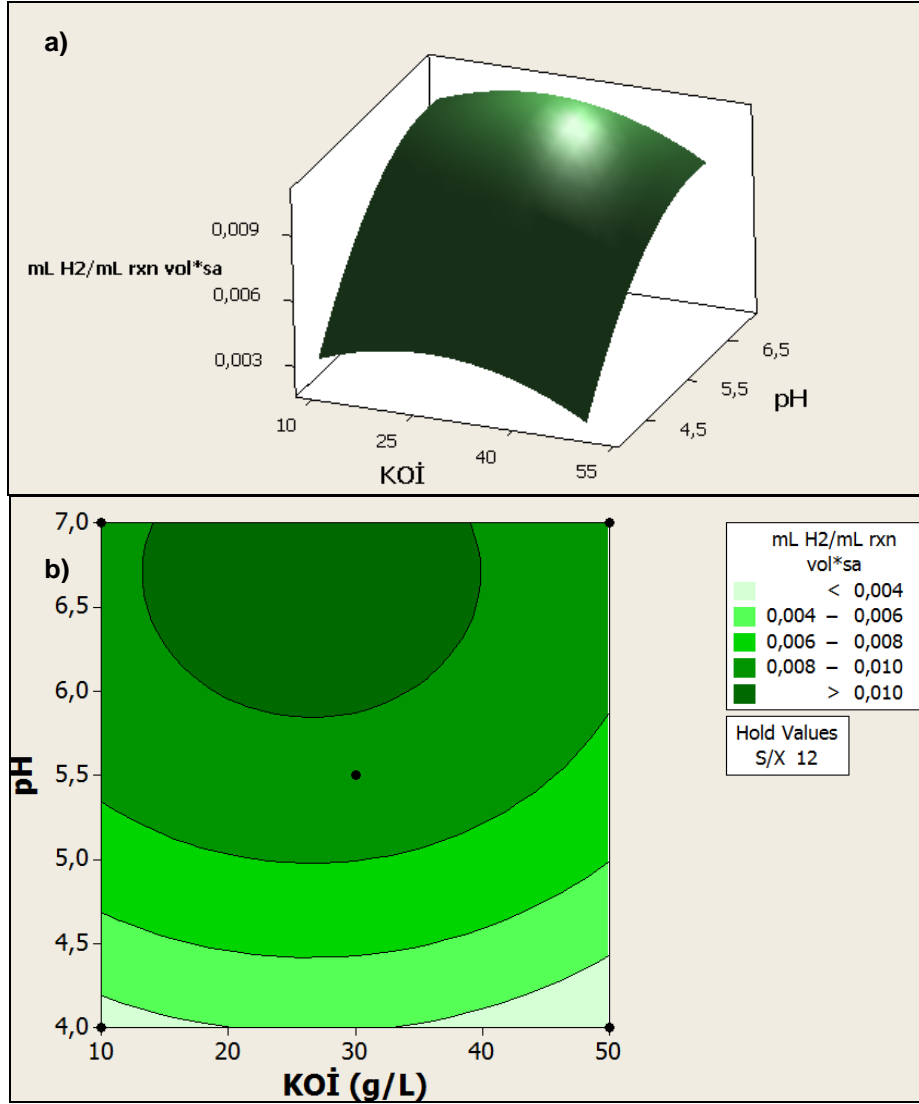


Şekil 3.8. Prodüktivite, S/X₀ ve pH ilişkisini betimleyen a) yüzey grafiği, b) izdüşüm grafiği (35°C, sukroz)

Şekil 3.8a ve 3.8b'den görülebileceği gibi, pH değerleri 4'ten 7'ye doğru artarken hız (prodüktivite) belirgin bir şekilde artmaktadır. Oysa S/X₀ değişkeni için, 12 değeri civarında bir maksimum hız gözlenirse de, S/X₀'in (çalışılan değerler içinde) artması veya azalmasının prodüktivite üzerinde belirgin bir etkisi görülmemektedir.

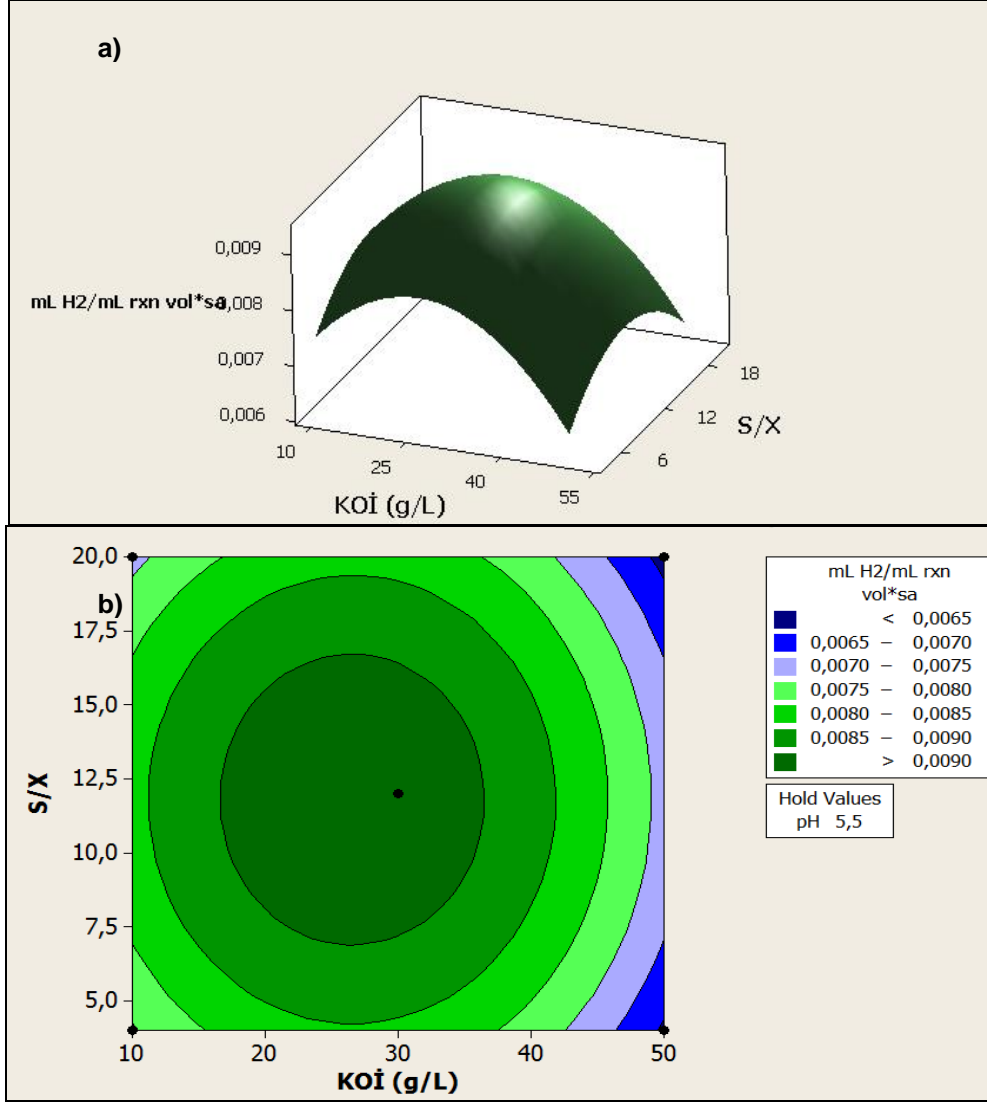
Şekil 3.8'de olduğu gibi, Şekil 3.9a ve 3.9b'de de pH değerleri 4'ten 7'ye doğru artarken prodüktivite belirgin bir artış göstermektedir. KOİ değişkeni için ise, maksimum tepki (üretim hızı) 20-25 g/L KOİ civarında tespit edilmiştir. KOİ değerinin daha düşük ve daha yüksek

olduğu değerlerde, üretim hızının göreceli azaldığı anlaşılmaktadır. Fakat KOİ'nin üretim hızına etkisi pH'ın etkisi kadar radikal değildir.



Şekil 3.9. Prodüktivite, KOİ ve pH ilişkisini betimleyen a) yüzey grafiği, b) izdüşüm grafiği (35°C, sukroz)

Şekil 3.10a ve 3.10b'de, üretim hızı üzerindeki etkileri benzer kuvvette olan KOİ ve S/X₀ değişkenlerinin tepki ile ilişkisini tanımlayan, sırasıyla, yüzey ve izdüşüm grafikleri gösterilmektedir. Tepkinin maksimum olduğu nokta her iki değişkenin de ortalama değerleri seviyesinde (S/X₀~12, KOİ~25) elde edilmiştir. Diğer bir deyişle, 3.10a ve 3.10b'de, ortalama S/X₀ (12) ve KOİ (25 g/L) değerlerinden daha yüksek veya daha düşük değerlerde, hidrojen üretim hızının düştüğü anlaşılmaktadır.



Şekil 3.10. Prodüktivite, KOİ ve S/X_o ilişkisini betimleyen a) yüzey grafiği, b) izdüşüm grafiği (35°C, sukroz)

Sonuç olarak, tüm yüzey ve izdüşüm grafikleri incelendiğinde, çalışılan değer aralıklarında ve yüksek olmayan KOİ (<20 g/L) değerlerinde, üretim hızının (prodüktivitenin) pH'la birlikte arttığı gözlenmektedir. pH'nın prodüktivite üzerinde belirlenen bu radikal etkisi diğer çalışma sonuçlarını desteklemektedir (Wu vd., 2002; Lin ve Zhu, 2013). KOİ ise prodüktivite üzerinde parabolik bir etki oluşturmaktadır (Şekil 3.10).

TYM ile yapılan optimizasyon analizlerine göre çalışılan aralık değerlerinde maksimum üretim hızının elde edildiği değerler "global solution" olarak başlangıç KOİ=26,566 g/L, S/X_o=11,758 ve pH=6,697 olarak belirlenmiştir. Bu değişken değerleri kullanıldığında elde edilecek tahmini tepki değeri (maksimum hidrojen üretim hızı) 10,7 mL H₂/(L_{reaktör}.saat)'tir.

Bu optimizasyon ve elde edilen model (Denklem 3.4) kontrol amacıyla MathCad programına tanımlanan 2.dereceden bir denklem olarak da hesaplatılmıştır. Bu denklem ve MathCad ile ilgili ayrıntılar Tablo EK-B5'de görülebilir (EK-B). MathCad'de yapılan denklem çözümü (denklemin maksimum değeri aldığı noktayı bulmak için yaptırılan diferansiyel hesap) sonucu verimin maksimum olduğu nokta $KOİ= 27,11$ g/L, $pH=7$, $S/X_0=6,81$ olarak hesaplanmıştır. Bu değerler, S/X_0 dışında, MiniTab'ın sonuçları ile uyum içerisindedir.

UYA sonuçları

UYA analizleri, giriş (başlangıç) UYA derişimlerinin, beklenildiği gibi, oldukça düşük ve ihmal edilebilir olduğunu göstermiştir ($<0,1$ mM) (veriler sunulmamıştır). Reaktörlerin çıkış UYA analiz sonuçları ve tUYA değerleri ise ayrıntılı olarak Tablo 3.11'de verilmiştir. Çıkış UYA çeşitlerine bakıldığında, en fazla laktik, asetik ve bütirik asit olmak üzere formik ve propiyonik asit de üretildiği; iso-bütirik ve iso-valerik asitlerin ise üretilmediği belirlenmiştir.

Tablo 3.11. Sukrozla gerçekleştirilen kesikli karanlık fermantasyon SET 3 deneylerinin UYA sonuçları

Başlangıç			Asit çeşitleri ve çıkış derişimleri (mM) ^a					Toplam
KOİ (g/L)	S/X ₀	pH	Laktik	Formik	Asetik	Propiyonik	Bütirik	UYA (mM, HAc)
10	12	7	19,38	2,72	13,64	0,15	10,39	37,31
10	4	5,5	18,54	0,61	9,02	0,02	9,07	28,37
10	20	5,5	15,92	0,49	6,94	0	6,3	22,49
30	12	5,5	12,1±5	0,33±0,2	6,1±3,1	0,04±0,01	6,49±2,4	21,9±7,4
30	4	7	13,52	1,77	6,77	0,06	5,59	21,95
30	20	7	20,77	3,36	11,04	0,11	6,71	33,93
10	12	4	2,75	0,2	2,63	1,75	0,41	6,41
50	12	7	23,33	3,3	9,83	0,21	7,21	34,77
50	4	5,5	13,57	0,46	7,29	0	7,03	21,73
30	20	4	7,9	0,35	1,49	1,48	0,55	8,79
50	20	5,5	18,74	1,05	6,41	0	6,21	24,5
30	4	4	5,78	0,31	3,39	0,6	0,15	8,23
50	12	4	5,45	0,15	1,19	0,94	0,01	5,78

^a Asitlerin moleküler ağırlıkları (g/mol); Laktik Asit 90,08; Formik Asit 46,03; Asetik Asit (HAc) 60,05; Propiyonik Asit 74,08; İso-Bütirik Asit 88,11; Bütirik Asit 88,11; İso-valerik Asit 102,13.

SET 3'ün UYA analizlerine göre, karanlık fermentasyon reaksiyonları sonucunda en fazla üretilmesi beklenen asetik ve bütirik asitler, beklenildiği gibi, üretim miktarı bakımından öne çıkmaktadır. Asetik asit maksimum 13,64 mM; bütirik asit 10,69 mM üretilmiştir. Fakat laktik asit en çok üretilen asit olmuştur (maksimum üretim 23,33 mM). Laktik asit üreten bakterilere karanlık fermentasyonda sık rastlandığı ve laktik asit üretimi arttıkça H₂ veriminde bir düşüş yaşandığı da bilinmektedir (Guo vd., 2010). Laktik asit bakterilerinin yüksek organik yükleme sırasında dominant olduğu da gözlenmiştir (Oh vd., 2004). Bu gözlem, kesikli çalışılan SET 3'de elde edilen sonuçlarla kıyaslanamasa da, yüksek KOİ derişimlerinde yüksek laktik asit üretimi belirgindir (KOİ=50, S/X₀=12, pH=7 reaktör çeşidinde maksimum laktik asit üretimi, 23,33 mM). Bir diğer sonuç, pH 7'den 4'e düşerken laktik asit üretiminin belirgin şekilde azaldığıdır.

En yüksek verimin gözlemlendiği reaktör çeşidi, aynı zamanda en yüksek asetik ve bütirik asit üretimlerinin olduğu reaktörler olmuştur (KOİ=10, S/X₀=12, pH=7). Yüksek pH'larda (pH 7 ve 5,5) asit üretimi miktarları, H₂ üretimi gibi, fazla olmuştur. Bu beklenen bir durumdur; çünkü hidrojen karanlık fermentasyon reaksiyonlarında asit üretimi sırasında oluşan bir yan üründür. UYA, düşük pH değerlerinde (pH=4), başlangıç KOİ ya da S/X₀ değeri ne olursa olsun, çalışılan diğer pH değerlerine (5,5; 7) kıyasla az üretilmiştir. Tüm reaktörlerin sonlanma anındaki pH'larının neredeyse aynı (pH = 3,4-3,8; Tablo 3.9) olduğu dikkate alındığında, yüksek başlangıç pH değerinin, üretilen asit miktarındaki artışları tamponladığı ve sistemin inhibisyonunu geciktirdiği görülmektedir. Bu sonuç, kesikli işletilen SET 1 ve SET 2'nin sonuçlarını da destekler niteliktedir. SET 3 de, yüksek başlangıç pH değerlerinin, daha uzun süre ve dolayısıyla fazla miktarda H₂ üretimini sağladığını göstermiştir.

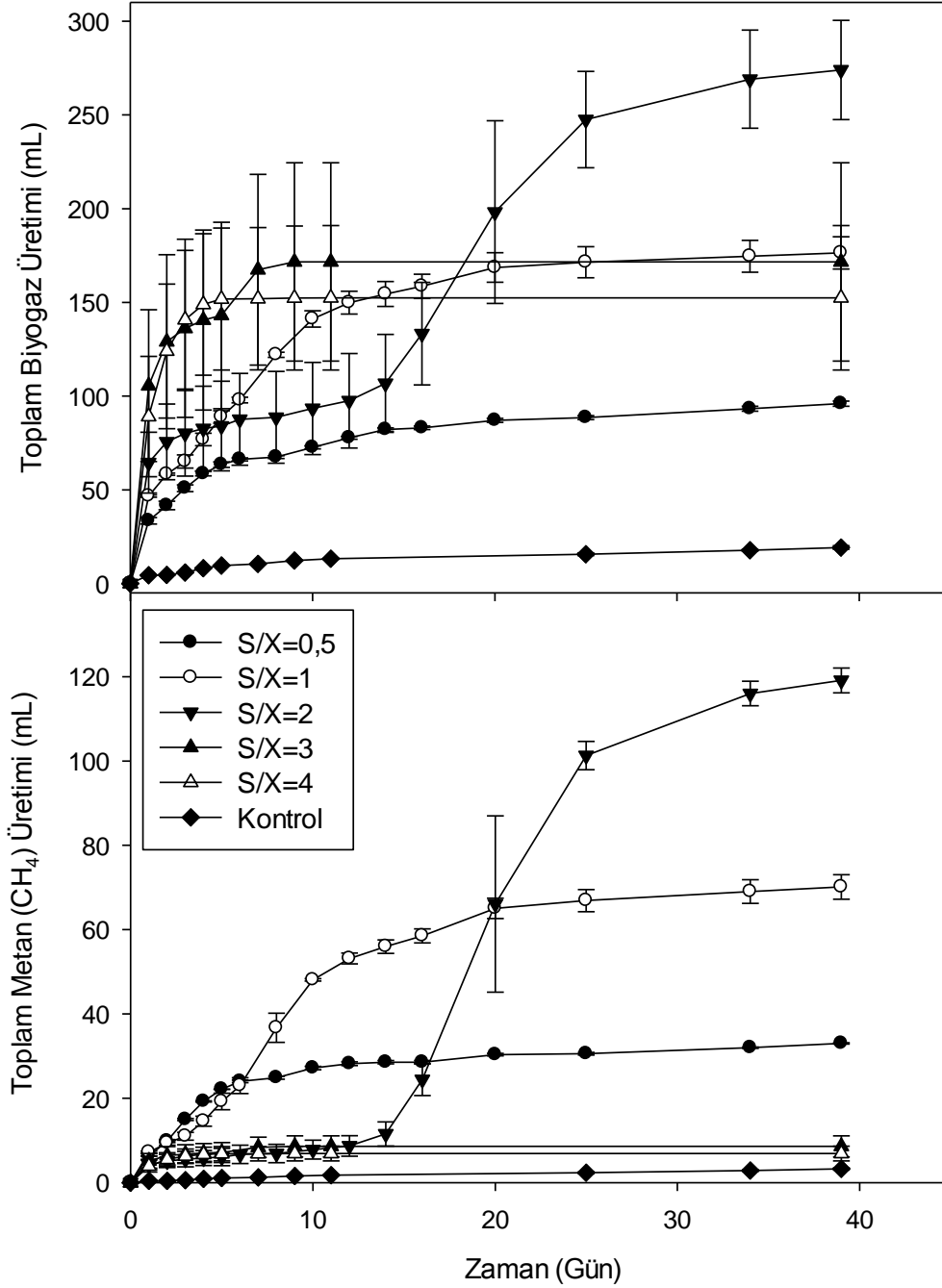
Tüm reaktörlerin çıkış AKM, UAKM ve çKOİ analizleri yapılmıştır (veriler sunulmamıştır). KOİ giderimi, karanlık fermentasyonda beklenildiği üzere, tüm reaktörlerde oldukça az miktarda gerçekleşmiştir. Örneğin KOİ=10 g/L reaktörleri için maksimum KOİ giderimi %5-10 arasında gözlenmiştir.

3.2.2 Kesikli Anaerobik Reaktör Deney Sonuçları

Kesikli anaerobik reaktör deneyleri 35 gün sürmüştür. Bu süreçte üretilen toplam biyogaz ve metan gazı miktarları Şekil 3.11 ve Tablo 3.12'de gösterilmiştir. Toplam metan gazı üretiminin başlangıç S/X₀ oranına göre değişimi Şekil 3.12'de sunulmuştur.

Şekil 3.11'de görüldüğü üzere, glikoz eklenmeyen kontrol reaktörlerinde metan üretimi yok denecek kadar azdır. En yüksek metan üretim miktarı (119 mL) başlangıç S/X₀ oranının 2

olduğu koşullarda gözlenmiştir (Şekil 3.11 ve 3.12). Bunu takip eden yüksek metan üretim miktarları 0,5 ve 1 S/X_0 oranlarında kaydedilmiştir. S/X_0 oranı, 0,5'den 2'ye arttırıldıkça üretilen toplam metan miktarı 33 mL'den 119 mL'e artmaktadır.



Şekil 3.11. Kesikli anaerobik reaktör deneylerinde zamana karşı a) toplam biyogaz, ve b) metan gazı üretimi (35°C, glikoz)

S/X_0 oranının 2'nin üstünde olduğu 3 ve 4 değerlerinde ise, üretimin durduğu ve inhibisyonun gerçekleştiği gözlenmektedir. Bu reaktörlerin (S/X_0 oranı 3 ve 4) metan gazı yüzdeleri ve

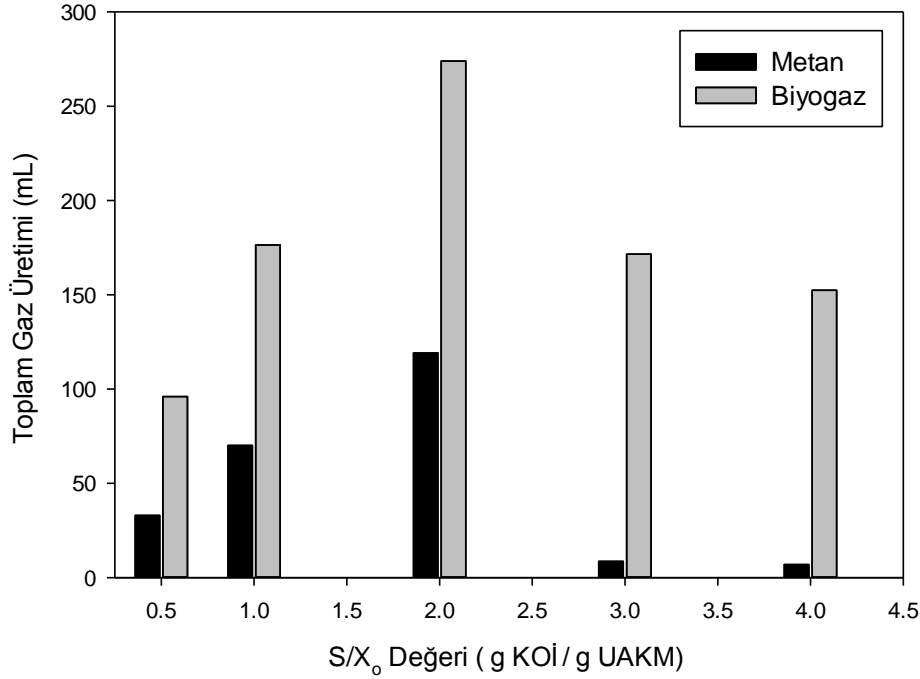
toplam metan üretim miktarları sırasıyla %5 ve yaklaşık 7-9 mL olarak ölçülmüştür (Tablo 3.12). Buna bağlı olarak anaerobik arıtılabilirlik yüzdeleri (metan üretim verimi) sadece %2-3 oranlarında kalmıştır (Tablo 3.12). Bu durum, S/X_0 'in 2'nin üstünde olduğu koşullarda, farklı ve ardışık aşamalardan oluşan anaerobik çürütme dizisinde UYA üretiminin birikmesi ve düşük pH ve yüksek UYA derişimlerinde metanojenlerin inhibe olması ile açıklanabilir. Bu çalışmanın sonuçları, literatür verilerini destekler niteliktedir (Chen vd., 1995; Raposo vd., 2006). Chen vd. (1995)'in 0,7-10,5 S/X_0 değerlerinde glikozla gerçekleştirdiği çalışmada S/X_0 değerinin 0,7'den 1,5'a artmasıyla metan üretim veriminin düştüğü gözlemlenmiştir (Chen vd., 1995). Besin olarak mısırın kullanıldığı ve 1-3 S/X_0 değerlerinde çalışıldığı bir diğer kesikli reaktör çalışmasında ise, S/X_0 oranının 1'den 3'e artırılmasıyla metan gazı yüzdesinin %59'dan %53'e; metan üretim veriminin ise 233 mL CH_4 / g KOİ'den 196 mL CH_4 / g KOİ'ye düştüğü belirlenmiştir (Raposo vd., 2006).

Tablo 3.12. Reaktörlere eklenen glikoz miktarına denk gelen teorik ve deneysel metan gazı üretim miktarları

S/X_0 (g KOİ / g UAKM)	Üretilmesi beklenen teorik metan gazı miktarı ^a (mL)	Üretilen toplam metan gazı miktarı (mL)	Anaerobik arıtılabilirlik yüzdesi ^b (%)	Metan gazı yüzdesi (%)
0,5	52,5	33 ± 0,3	63 ± 0,3	54,4 ± 0,1
1	105,1	70 ± 1,7	68 ± 2,8	65,8 ± 1,0
2	210,2	119 ± 3,6	57 ± 1,4	69,8 ± 4,8
3	315,3	8,6 ± 2,3	3 ± 0,8	5,0 ± 0,1
4	420,4	6,9 ± 1,7	2 ± 0,4	4,8 ± 0,0

^a 1 gr glikoz = 1,067 KOİ ; 1 gr KOİ tüketilen = 395 mL CH_4 (35°C) (Myburg vd., 1993)
^b (Üretilen toplam metan gazı miktarı) x (100) / (Teorik metan gazı miktarı)

Tablo 3.12'de görüldüğü üzere, S/X_0 değeri 0,5'den 1'e ve 2'ye çıkarıldığında üretilen toplam metan gazı miktarların yanı sıra metan gazı yüzdeleri de artarak yaklaşık %55'den, yaklaşık %66 ve %70'e yükselmektedir. Anaerobik arıtılabilirlik yüzdeleri ise 0,5; 1 ve 2 S/X_0 değerleri için sırasıyla %63, 68 ve 57 olarak hesaplanmıştır. Bu bağlamda, çalışılan 0,5-4 S/X_0 oranları arasında, 1 S/X_0 oranının en verimli koşulları oluşturduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, en yüksek metan üretim verimi de (267±5 mL CH_4 /g glikoz) 1 S/X_0 oranında elde edilmiştir. Bu sonuç, literatürdeki diğer benzer çalışmalarla karşılaştırılabilir niteliktedir (Tablo 3.13). Besiyer madde olarak glikozun kullanıldığı Xie vd. (2008), Giardino vd. (2010) ve Chen vd. (1995)'nin çalışmalarında da S/X_0 değerinin yaklaşık olarak 1 olduğu reaktörlerde en yüksek metan verimine (248-267 mL CH_4 /g glikoz) ulaşılmıştır.



Şekil 3.12. Farklı başlangıç S/X₀ oranında üretilen toplam biyogaz ve metan gazı değerleri (35°C, glikoz)

Tablo 3.13. S/X₀ = 1 değerinin metan üretim verimi açısından karşılaştırması

S/X ₀ (g KOİ / g UAKM)	Metan üretim verimi (mL CH ₄ /g glikoz)	Karbon kaynağı	Referans ^a
1,07	267±13	Glikoz	Giardino vd. (2010)
1,07	248	Glikoz	Xie vd. (2008)
1,4	248	Glikoz	Chen vd. (1995)
1,0	267±5	Glikoz	Bu çalışma

^a Belirtilen çalışmalar kesikli anaerobik reaktörlerde gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.11'de görüldüğü üzere, S/X₀ değerinin 2 olduğu reaktörlerde metan üretimi ilk 2-3 gün düşük miktarlarda seyretmiş; yaklaşık 10 günlük bir bekleme süresi sonrasında 13.gün itibariyle dikkate değer bir şekilde artmıştır. Bu durum S/X₀'ın 2 olduğu koşullarda metanojenlerin ortam koşullarına adaptasyonu için gereken aklımasyon süresi ihtiyacı ile açıklanmıştır. S/X₀ oranı arttıkça mikroorganizmaların metan üretimi açısından aktif hale gelme süresi uzamaktadır (Chen vd., 1995; Raposo vd., 2006). Chen vd. (1995)'in çalışmasında S/X₀ değerinin 0,72 olduğu kesikli reaktörde metan üretimi ilk günden itibaren aktif olarak gerçekleşirken, S/X₀ değerinin 10,4 olduğu koşullarda metan üretimi ancak 80

günlük bir aklımasyon sonrasında gerçekleşmiştir (Chen vd., 1995). Benzer şekilde, Raposo vd. (2006) S/X_0 değeri 2 olan koşullarda, S/X_0 değeri 1 ve 1,5 olan koşullara kıyasla, metan üretiminde daha uzun aklımasyon sürelerine (yaklaşık 7 gün) ihtiyaç duyulduğunu gözlemlemiştir (Raposo vd., 2006).

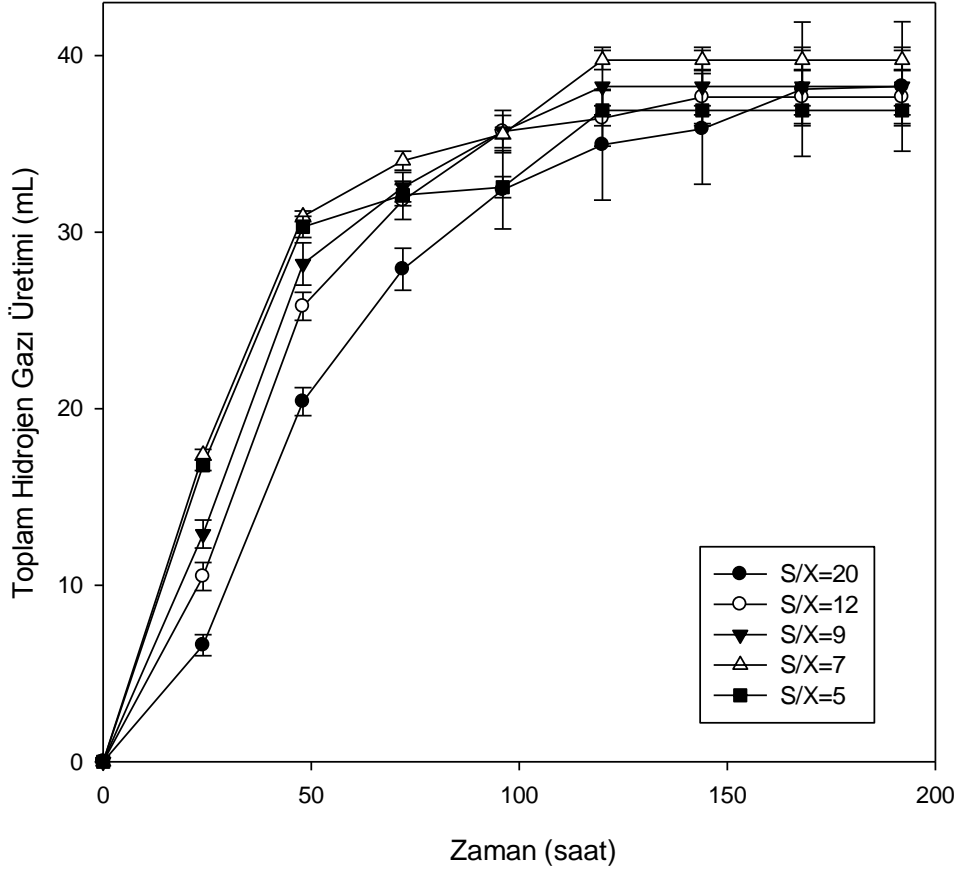
Sonuç olarak, bu çalışma ile S/X_0 değerinin anaerobik artırılabilirlik, metan üretim verim ve yüzdesini etkileyen önemli bir parametre olduğu belirlenmiştir. S/X_0 'in 2'nin altında olduğu koşullarda %55'in üzerinde artırılabilirlik sağlanabilmektedir. Fakat en yüksek verim, S/X_0 'ün 1 olduğu koşullarda (%68 artırılabilirlik, 267 ± 5 mL CH_4 /g glikoz) gerçekleşmektedir. S/X_0 'ün 2 olduğu işletimlerde, metanojenler zorlu koşullara maruz kalabilmekte, metan üretiminin gerçekleşmesi için bir aklımasyon sürecine ihtiyaç duyulmaktadır. S/X_0 'ün 2'nin üzerinde olduğu koşullar metanojenlerin inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır. Metan üretim verimini arttırmak için, reaktörlere yüklenen organik karbon miktarı (veya organik yükleme hızları) belirlenirken S/X_0 değerine dikkat edilmesi gerekmektedir (Sbizris, 2010).

3.2.3 Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deney Sonuçları

3.2.3.1 Kesikli Fotofermantasyon SET-1: Başlangıç S/X_0 Etkisi

Bu çalışmada, S/X_0 oranının fotofermantasyonla hidrojen üretimine etkisi ve en yüksek verimin sağlandığı S/X_0 değerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışılan 5 farklı S/X_0 oranında (5, 7, 9, 12 ve 20) zamana karşı üretilen toplam hidrojen gazı miktarları Şekil 3.13 ve Tablo 3.14'de gösterilmiştir.

Reaktörlerin hidrojen üretimi, 20 değerindeki yüksek S/X_0 oranında 192 saat (8 gün) sürmüş; 5, 7, 9 ve 12 S/X_0 oranlarında ise 120-144 saat içerisinde (5-6 günde) tamamlanmıştır. Şekil 3.13 ve Tablo 3.14'de görüldüğü gibi, reaktörlerde başlangıç S/X_0 oranından bağımsız olmak üzere birbirine yakın toplam hidrojen miktarları elde edilmiştir. S/X_0 oranının 7 olduğu koşulda üretilen toplam hidrojen miktarı (39,8 mL) diğer oranlara kıyasla biraz daha fazla olsa da; sonuçlar, çalışılan 5-20 aralığındaki S/X_0 oranlarının fotofermantasyonla üretilen toplam hidrojen miktarını belirgin şekilde etkilemediğini göstermiştir.



Şekil 3.13. Toplam fotofermantatif hidrojen gazı üretimi (SET-1) (30°C, 4000 lux, 30 mM asetat)

Tablo 3.14. Üretilen toplam hidrojen miktarı ve süresi

S/X ₀ (g KOİ / g UAKM)	Toplam hidrojen miktarı (mL)	Hidrojen üretim süreleri (saat)
5	36,9 ± 0,3	120
7	39,8 ± 0,5	120
9	38,3 ± 2,2	120
12	37,7 ± 1,5	144
20	38,3 ± 3,7	192

Çalışmada elde edilen hidrojen üretim hızları, verimleri ve ışık dönüştürme verimi EK-C'de belirtilen denklemler kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 3.15'de gösterilmiştir. Hesaplanan verim ve hız değerleri aşağıda belirtilmiştir;

- Hidrojen üretim hızı (H₂ productivity), mg H₂/ L.saat

- Hidrojen üretim verimi (H_2 production yield), g H_2 / g Asetat
- Besin dönüştürme verimi (substrate conversion efficiency, %) (üretilen $H_2 \times 100$ /teorik H_2)
- Işık dönüştürme verimi (light conversion efficiency), %
- Hidrojen üretim hızı (H_2 molar productivity), mmol/ L.saat

Tablo 3.15. Farklı başlangıç S/X_0 oranlarında elde edilen verim değerleri ^a

S/X_0 oranı (g KOİ/g UAKM)	Toplam üretilen H_2 (mmol)	H_2 üretim hızı (mg H_2 / L.saat)	Verim (g H_2 / g asetat) ^b	Besin dönüştürme verimi (%)	Işık dönüştürme verimi (%) ^c	H_2 üretim hızı (mmol / L.saat)
5	1,51 ± 0,02	1,03 ± 0,06	0,033	12,6 ± 0,2	0,201	0,52 ± 0,03
7	1,63 ± 0,04	1,06 ± 0,06	0,036	13,6 ± 0,3	0,200	0,53 ± 0,03
9	1,57 ± 0,16	0,97 ± 0,25	0,034	13,1 ± 1,3	0,208	0,48 ± 0,14
12	1,54 ± 0,11	0,75 ± 0,02	0,034	12,9 ± 0,9	0,171	0,38 ± 0,01
20	1,57 ± 0,26	0,73 ± 0,04	0,034	13,1 ± 2,2	0,130	0,36 ± 0,02

^a L= Reaktör etkin hacmi (50 mL)
^b Standard sapma 0,0004-0,0058 ve varyasyon katsayısı %1-17 arasında değişmektedir.
^c Standard sapma 0,001-0,012 ve varyasyon katsayısı %0,5-6 arasında değişmektedir.

Tablo 3.15'de verilen değerler karşılaştırıldığında, S/X_0 oranının 7 olduğu reaktörlerde hidrojen üretim hızı ve verimlerinin diğer oranlara kıyasla biraz daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Yukarıda da bahsedildiği gibi, farklı S/X_0 oranlarında üretilen H_2 hacmi (mol) karşılaştırıldığında, belirgin bir fark olmadığı anlaşılmaktadır (Tablo 3.14 ve 3.15). Fakat hidrojen üretim hızına bakıldığında (mg H_2 / L.saat), 5, 7 ve 9 gibi düşük S/X_0 oranlarının daha yüksek verim eldesi sağladığı (yaklaşık ≥ 1 mg H_2 /L.saat) anlaşılmaktadır (Tablo 3.15). Bu oranlar arasında bir kıyaslama yapıldığında ise en yüksek hızın S/X_0 'in 7 olduğu koşulda (1,06 mg H_2 /L.saat) gerçekleştiği görülmektedir. S/X_0 oranı 7'den 20'ye arttıkça, H_2 üretim hızı kademeli olarak azalmış ve en düşük değerler S/X_0 20 oranında gözlenmiştir (sırasıyla 0,73 mg H_2 /L.saat veya 0,36 mmol/L.saat).

Besin dönüştürme verimi ve birim kütle asetat başına elde edilen hidrojen verimi (g H_2 / g asetat) değerlerine bakıldığında, S/X_0 oranının bu verimlere etkilerinin çok belirgin olmadığı, fakat S/X_0 7 oranının diğer oranlara kıyasla biraz daha yüksek verime yol açtığı görülmektedir. Buna göre, en yüksek verim 0,036 g H_2 / g asetat (1,08 mol H_2 / mol asetat) ile S/X_0 7 oranında elde edilmiştir. Birim kütle asetat başına elde edilen hidrojen üretim verimi,

tüketilen besin kaynağı (asetat) bazında hesaplanmaktadır. Fakat bu çalışmada UYA analizleri gerçekleştirilmediği için, hesaplar reaktörlere eklenen asetat miktarı üzerinden ve tüm asetatın tüketildiği varsayılarak yapılmıştır.

Işık dönüştürme verimleri karşılaştırıldığında ise 5, 7 ve 9 gibi düşük S/X_0 oranlarının daha yüksek verim eldesi sağladığı (yaklaşık $\geq \% 0,20$) anlaşılmaktadır (Tablo 3.15). S/X_0 oranının 9'un üzerine çıktığı ve kademeli olarak artırıldığı değerlerde (12 ve 20) veriminin kademeli olarak düştüğü tespit edilmiştir.

Rhodobacter capsulatus ve aynı besiyer maddenin (30/2 A/G içeren değiştirilmiş Biebl & Pfennig besiyeri) kullanıldığı benzer bir çalışmada elde edilen veriler (Özgür vd., 2010), bu çalışmada elde edilen en yüksek verilerle ($S/X_0 = 7$) karşılaştırılmış ve Tablo 3.16'da sunulmuştur. Bu çalışmada $S/X_0 = 7$ oranında elde edilen en yüksek hidrojen üretim hızı olan 1,06 mg H_2/L .saat (0,53 mmol H_2/L .saat), Özgür vd. (2010) tarafından bulunan 1,36 mg H_2/L .saat (0,68 mmol H_2/L .saat) değerine yakındır. Fakat diğer verimler karşılaştırıldığında, bu çalışmada elde edilen verimlerin düşük kaldığı gözlenmektedir. Bunun nedeni, ortamdaki UAKM derişimi ve bakteri üremeleri ile açıklanabilir. Şekil 3.14'de görüldüğü üzere, bu çalışmada 0,3 g UAKM/L gibi bir başlangıç derişimi kullanılmış ve maksimum bakteri derişimi 1,3 g UAKM/L'ye kadar çıkmıştır. Ancak Özgür vd. (2010)'un yaptığı çalışmada sadece maksimum derişim 0,26 g UAKM/L'dir. Dolayısıyla, düşük verimlerin gözlendiği bu çalışmada, bakterilerin besini H_2 üretiminde kullanmalarından çok üreme/PHB depolama amacıyla kullandıkları yorumu yapılabilir. Bu durum kuru hücre ağırlığında artışa, yüksek UAKM derişimleri de ışığın etkin dönüştürülmesini engelleyerek verimlerde düşüğe sebep olmuş olabilir. Tablo 3.16'da görüldüğü üzere, ışık dönüştürme verimi (%0,20), Özgür vd. (2010) tarafından bulunan %0,68 değerinin neredeyse üçte biridir. Nitekim maksimum bakteri derişiminin benzer şekilde yüksek olduğu (1,6 g UAKM/L) *Rhodobacter sphaeroides* ve 30 mM asetat (aynı besiyer) kullanılarak yapılan bir başka çalışmada da (Uyar vd., 2009), bu çalışmaya benzer şekilde düşük ışık dönüştürme verimi (%0,185) ve H_2 üretim verimi (0,04 g H_2/g asetat) elde edilmiştir.

Bu çalışmada $S/X_0 = 7$ 'de elde edilen 0,036 g H_2/g asetat veriminin, yüksek UAKM derişimine sahip Uyar vd. (2009)'un çalışmasının dışında, Tablo 3.16'da sunulan diğer verim değerlerinden (0,06 ve 0,088 g H_2/g asetat) daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum, yukarıda bahsedilen gerekçelerle açıklanabilir. Buna ek olarak, verim hesabının tüketilen asetat yerine reaktörlere eklenen asetat miktarı bazında hesaplanmış olması da dikkate alınmalıdır.

Tablo 3.16. Hidrojen verimlerinin karşılaştırılması

Biyokütle (g UAKM /L)	S/X ₀ (g KOİ/g UAKM)	H ₂ üretim hızı (mg H ₂ /L.saat)	Verim (g H ₂ /g asetat)	Besin dönüştürme verimi (%)	Işık dönüştürme verimi (%)	H ₂ üretim hızı (mmol/ L.saat)	Referans ^b
1,3	7	1,06	0,036	13,6	0,20	0,53	Bu çalışma
0,26	-	1,36	0,088	75	0,68	0,68	1
1,6 ^a	-	-	0,04	33	0,185	0,37	2
0,8	-	-	0,06	25	0,153	0,50	3

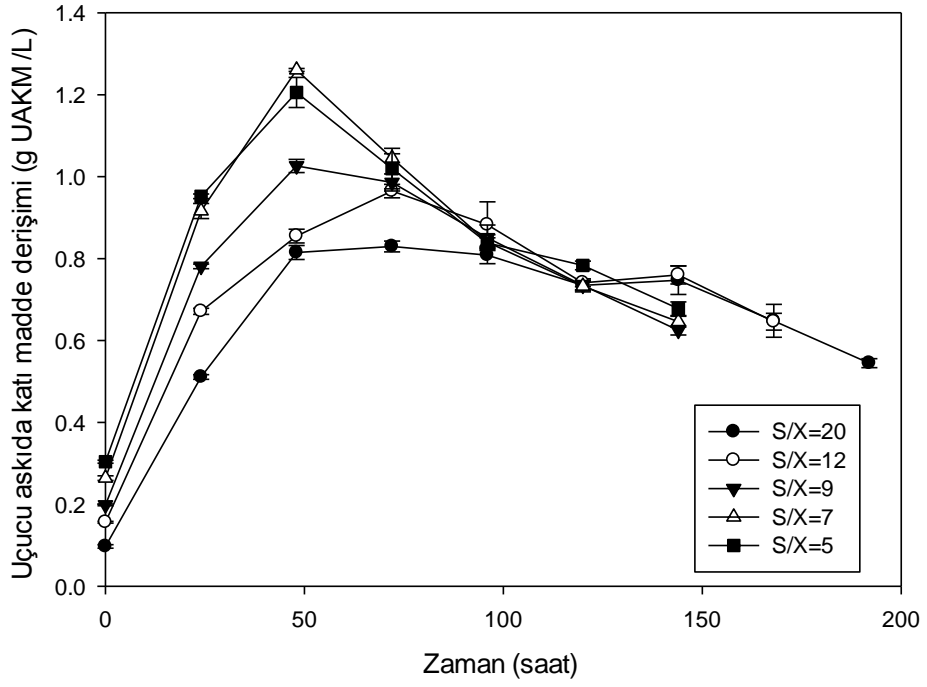
^a *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 derişimi

^b 1: Özgür vd. (2010), 2: Uyar vd. (2009), 3: Sevinç vd. (2012)

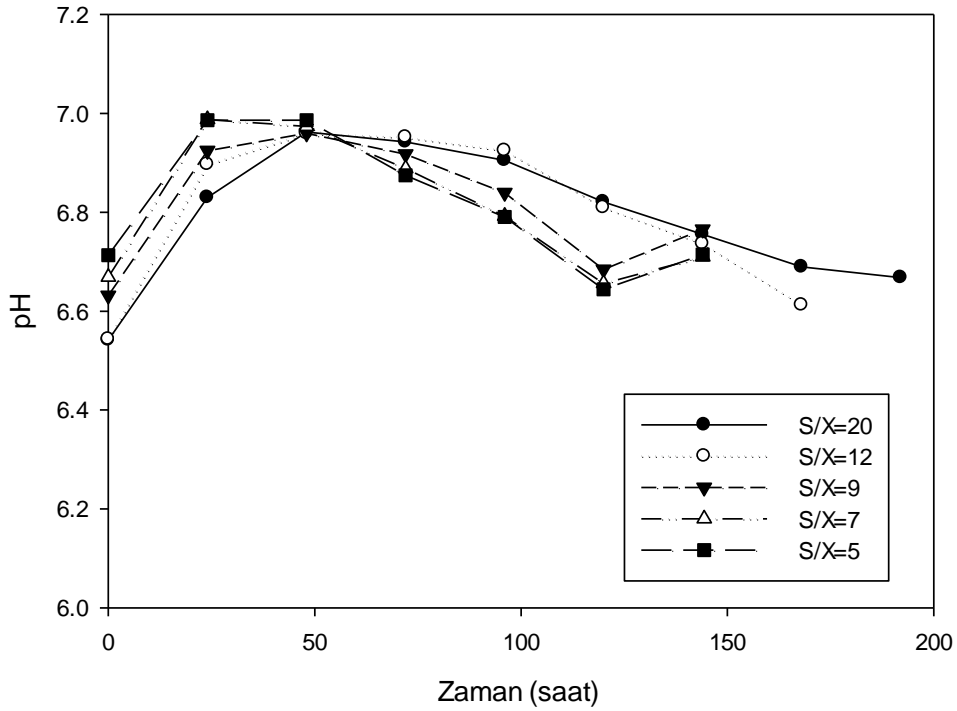
Özgür vd. (2010) farklı giriş asetat derişimlerinde (10-50 mM) ve farklı C/N oranlarında (15-55) gerçekleştirdikleri çalışmada, en yüksek üretim hızı, verimi ve ışık dönüştürme verimini, 30 mM asetat derişiminde (C/N:35) elde etmişlerdir. Daha düşük veya daha yüksek asetat derişimlerinde hidrojen üretim hızı ve veriminin düştüğünü; bunun sebebini de başlangıç asetat derişimi kaynaklı asetat tüketim metabolizmasındaki olası sapmalarla açıklamışlardır (Özgür vd., 2010). Asetat tüketim mekanizmasının sapmasında, asetat derişimi ve C/N oranı kadar, S/X₀ oranının da etkin olabileceği düşünülmektedir.

Şekil 3.15'de farklı S/X₀ değerine sahip reaktörlerde inkübasyon süresince gözlenen pH değişimi verilmiştir. Yaklaşık 6,6 başlangıç pH'sı ile inkübasyonun başlatıldığı reaktörlerde, pH yaklaşık 7'ye kadar çıkmış, hidrojen üretimlerinin azalması ve inkübasyonun sonuna doğru neredeyse tekrar başlangıç değeri olan 6,6'ya düşmüştür (Şekil 3.15). Tüm S/X₀ oranlarında benzer pH değişiminin olması, aynı miktarda asetat tüketiminin gerçekleştiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada, araştırılan 5-20 S/X₀ oranları arasında, düşük S/X₀ oranlarının (5-9) hidrojen üretim hızını / verimini ve ışık dönüştürme verimini daha olumlu etkilediği anlaşılmıştır. Özellikle, hidrojen üretim hızı, verimi ve besin dönüştürme verimi bazında en iyi üretim S/X₀ 7 oranında sağlanmaktadır. S/X₀ oranı 9'dan 20'ye çıkartıldığında üretim hızı ve ışık dönüştürme verimi kademeli olarak düşmektedir. Elde edilen hidrojen üretim verim ve hız değerleri, maksimum UAKM derişiminin ve başlangıç besin derişiminin yakın olduğu çalışmalarla kıyaslandığında, karşılaştırılabilir niteliktedir (Uyar vd., 2009; Sevinç vd., 2012).



Şekil 3.14. Farklı S/X_0 oranlarında reaktörlerdeki *R.capsulatus* derişiminin zamana karşı değişimi (SET-1) (30°C, 4000 lux, 30 mM asetat)



Şekil 3.15. İnkübasyon boyunca reaktörlerde gözlenen pH değişimi (SET-1) (30°C, 4000 lux, 30 mM asetat)

3.2.3.2 Kesikli Fotofermantasyon SET-2: Başlangıç Besin, Mikroorganizma ve Işık Şiddetinin Etkisinin Tepki Yüzeyi Metodu ile İncelenmesi

Bu çalışmada, başlangıç besin derişiminin (S, mM asetat), başlangıç bakteri derişiminin (X_0 , g UAKM/L) ve ışık şiddetinin (lux - W/m^2) hidrojen üretimine etkisi Tepki Yüzeyi Metodu (TYM) ile araştırılmış; en yüksek hidrojen üretimini sağlayan koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. Reaktör çeşidi ve içerikleri TYM'e göre yapıldığı ve sonuçlar bu bağlamda değerlendirildiği için, reaktörlerden elde edilen sonuçları TYM için kullanılan yöntemler dışında yorumlamaya çalışmak; bir diğer deyişle, özellikle üç değişkenin olduğu durumlarda reaktörleri direk ham verilerle karşılaştırarak optimum koşulları bulmaya çalışmak sonuçları doğru yansıtmayabilir. Fakat EK-C'de belirtilen denklemler kullanılarak her bir reaktör için elde edilen hidrojen üretim hızları, verimleri ve ışık dönüştürme verimleri, fikir elde etmek amacıyla karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, 2 tekrarlı ve 6 tekrarlı çalışılan reaktör çeşitlerinin ortalama değerleri alınarak Tablo 3.17'de sunulmuştur. Ayrıntılı sonuç tablosu Tablo EK-D1'de gösterilmiştir (EK-D).

Tablo 3.17. Fotofermantasyon SET-2 deneylerinde elde edilen verim değerleri ^a

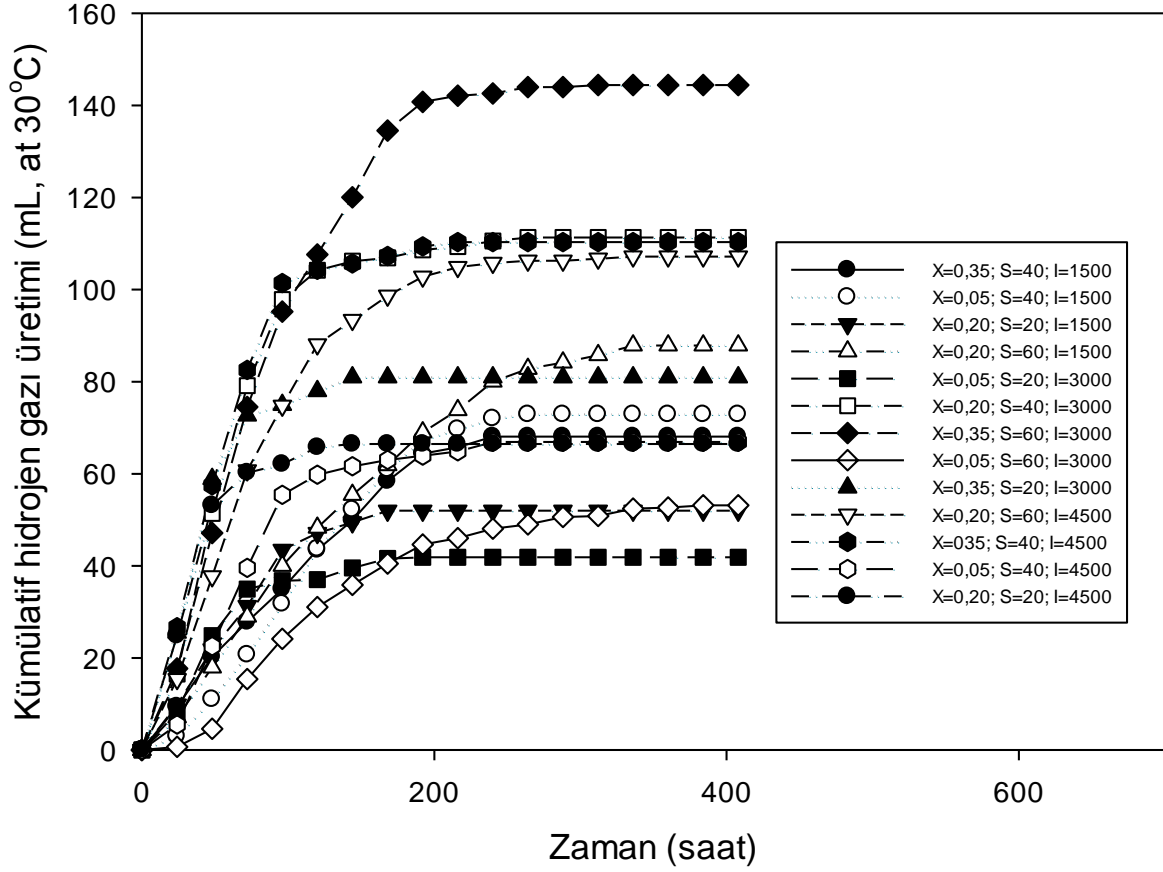
X_0 (g/L UAKM)	S (Asetat , mM)	I (lux)	H ₂ üretim hızı (mg H ₂ /L.saate)	H ₂ üretim hızı (mmol H ₂ /L.saate)	Besin dönüştürme verimi (%)	Verim (g H ₂ /g asetat)	Işık dönüştürme verimi (%)	Toplam üretilen H ₂ (mmol)
0,35	40	1500	0,55	0,27	34,9	0,05	0,41	2,8
0,05	40	1500	0,64	0,32	37,4	0,05	0,40	3,0
0,20	20	1500	0,74	0,37	53,3	0,07	0,43	2,1
0,20	60	1500	0,64	0,32	30,0	0,04	0,36	3,6
0,05	20	3000	0,83	0,42	42,9	0,06	0,16	1,7
0,2	40	3000	1,74±0,32	0,87±0,16	57,1±4,4	0,08±0,01	0,31±0,06	4,6±0,35
0,35	60	3000	1,47	0,73	49,4	0,07	0,35	5,9
0,05	60	3000	0,56	0,28	18,2	0,02	0,11	2,2
0,35	20	3000	1,72	0,86	83,0	0,11	0,39	3,3
0,2	60	4500	1,37	0,68	36,6	0,05	0,17	4,4
0,35	40	4500	1,77	0,88	56,5	0,08	0,27	4,5
0,05	40	4500	1,21	0,60	34,3	0,05	0,14	2,7
0,2	20	4500	1,82	0,91	68,1	0,09	0,22	2,7

^a Değerler 2 tekrarlı çalışılan reaktör çeşitlerinin ortalama değerleridir. Yalnızca S=40 mM, X_0 =0,2 g UAKM/L ve I=3000 lux olduğu değerler TYM tasarımına göre 6 tekrarlı çalışılmış ve standart sapmaları verilmiştir.

Tablo 3.17’de görüldüğü üzere, hidrojen üretim hızları (prodüktivite) 0,27-0,91 (mmol H₂/L.saat) arasında değişmektedir. En yüksek hidrojen üretim hızı başlangıç besin, mikroorganizma ve ışık şiddeti değerlerinin sırasıyla 20 mM, 0,2 g UAKM/L ve 4500 lux olduğu reaktörlerde 0,91 mmol H₂/L.saat olarak elde edilmiştir. Sonraki en yüksek hızlar ise, S=40 mM, X₀=0,35 g UAKM/L ve I=4500 lux olduğu reaktörlerde 0,88 mmol H₂/L.saat ve S=40 mM, X₀=0,2 g UAKM/L ve I=3000 lux olduğu reaktörlerde (6 tekrarlı olan reaktörler) 0,87 mmol H₂/L.saat olarak elde edilmiştir. Fotofermantasyon SET-1 ile kıyaslanacak olursa, bu çalışmada elde edilen hidrojen üretim hızlarının çoğu, ilk çalışmada optimum S/X₀=7 oranına sahip olan ve maksimum hızın (0,53 mmol/L.saat) gözleendiği değerden daha yüksektir (Tablo 3.17). Bu durum, S/X₀ etkisinin yanı sıra, ışık şiddetinin de üretim hızını etkileyen önemli bir faktör olması ile açıklanabilir. Ayrıca başlangıç X₀ değeri ışığın etkin kullanımını, dolayısıyla, hidrojen üretimini de etkileyebilir. Nitekim SET-1’de, daha az ışık şiddeti (4000 lux) ve daha yoğun bakteri derişiminde (0,3 g/L) çalışılmıştır; dolayısıyla başlangıç X₀ derişimi ışığın kullanımını etkileyen önemli bir parametre olabilir.

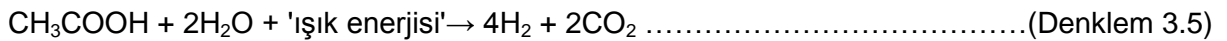
R.capsulatus kullanılan bir fotofermantasyon çalışmasında, melas ile kurulmuş karanlık fermantasyonun 86 mM asetat derişimine sahip çıkış suyu 4 farklı şekilde seyreltilerek (1/2, 1/3, 1/5, 1/10) fotofermantasyon deneylerinde kullanılmıştır (Mars vd., 2010). Mars vd. (2010) tarafından bulunan en yüksek hidrojen üretim hızı (1,10 mmol/L.saat), asetat derişiminin 29 mM olduğu koşulda (1/3 seyreltme) elde edilmiştir. Bu çalışmada ise 0,9-1,0 mmol/L.saat gibi üretim hızları, özellikle 40 mM asetat derişimine sahip reaktörlerde gözlenmiştir (Tablo 3.17). Mars vd. (2010)’nin buldukları en yüksek üretim hızı ile karşılaştırılırsa yakın değerler elde edildiği görülmektedir. *Rhodobacter capsulatus* ve aynı besiyer maddenin (Biebl & Pfennig besiyeri) farklı asetat derişimlerinin (10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM) kullanıldığı bir çalışmada, en yüksek hidrojen üretimi 40 mM asetat derişiminde (1,17 mg/L.saat), en yüksek besin dönüştürme verimi ise 30 mM asetat derişiminde (%72) elde edilmiştir (Özgür vd., 2010). Bu çalışmanın ileriki bölümlerinde TYM-optimizasyon analizleri yapılarak, en yüksek H₂ üretim hızını sağlayacak asetat derişiminin 35,35 mM olduğu bulunmuştur. Literatür verileri, fotofermantasyon deneyi sonuçlarını, optimum asetat derişimi bazında destekler niteliktedir (Özgür vd., 2010; Mars vd., 2010).

Üretilen toplam hidrojen gazı miktarlarına bakıldığında, üretimin en yüksek olduğu reaktörlerin başlangıç besin, mikroorganizma ve ışık şiddeti değerlerinin sırasıyla 60 mM asetat, 0,35 g UAKM/L ve 3000 lux olduğu görülmektedir (Şekil 3.16). İkinci en yüksek üretimin olduğu reaktörler ise S=40 mM, X₀=0,20 g UAKM/L I=3000 lux; S=60 mM, X₀=0,20 g UAKM/L I=4500 lux; ve S=40 mM, X₀=0,35 g UAKM/L I=4500 lux olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.16. Fotofermantasyon SET-2'de gözlenen toplam hidrojen gazı üretimleri (30°C, asetat)

GC ölçümlerinde, reaktörlerde tepe gazının %92'sinin H₂ gazı olduğu belirlenmiştir (veriler sunulmamıştır). Teorik olarak *R.Capsulatus*'un 1 mol asetik asitten 4 mol H₂ gazı ve 2 mol CO₂ gazı elde etmesi beklenmektedir (Denklem 3.5). Ölçülen H₂ yüzdesinin teorik değerden yüksek olması karbondioksit-karbonik asit dengesi ile açıklanabilir. İnkübasyon süresince reaktörlerdeki pH değeri 6,5-8 arasında değişmiştir (veriler sunulmamıştır). Bilindiği üzere, pH'nın 6,5-8 olduğu aralıkta CO₂ su içerisinde çözüldüğünde, bikarbonat (HCO₃⁻) dominant olan üründür. Dolayısıyla, fotofermantasyon sırasında oluşan CO₂ gazının çoğunluğunun reaktör içerisinde bikarbonat olarak bulunması sebebiyle, tepe gazındaki hidrojen yüzdesinin %92'lere çıktığı öngörülmektedir.



Tepki Yüzeyi Metodu- Hidrojen üretim hızı (prodüktivite)

Hidrojen üretim hızı bazında elde edilen sonuçlar MiniTab kullanılarak Tepki Yüzey Metodu (TYM) uygulandığında ve ilgili ardışık ANOVA analizleri yapıldıktan sonra aşağıdaki denklem elde edilmiştir (Denklem 3.6). Metoda ait detaylı ANOVA sonuçları Tablo EK-D2'de verilmiştir (EK-D). Fotofermantasyonla hidrojen üretim hızını ifade eden bu model, verileri %89 açıklamaktadır. Modelde görüldüğü üzere, araştırılan üç değişken de (asetat derişimi, ışık şiddeti, mikroorganizma derişimi) hidrojen üretim hızını (prodüktivitesini) etkilemektedir. Ayrıca, X*I, S*S, I*I, X*X etkileşimleri de modeli anlamlı şekilde etkilemektedir.

Denklem 3.6 (Hidrojen üretim hızı):

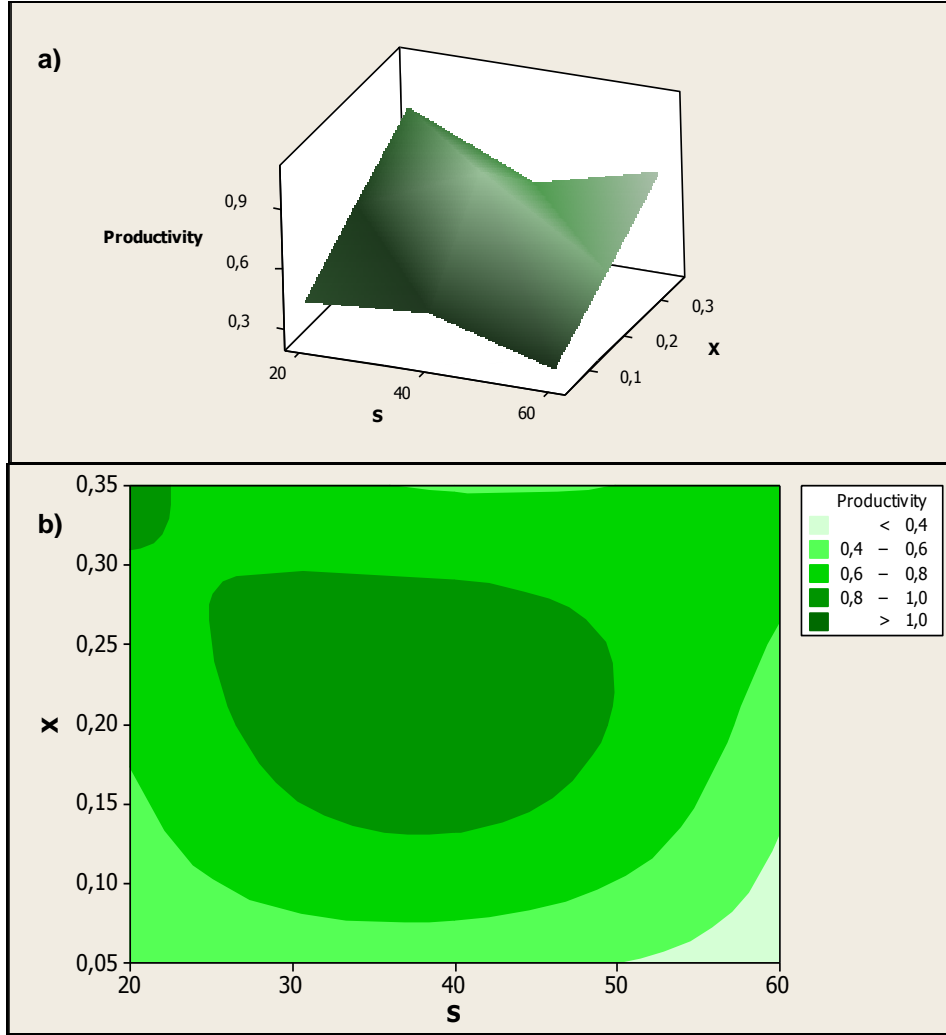
$$\text{Üretim hızı (mmol/L.saat)} = 0,92833 + 0,14377*X - 0,06750*S + 0,22127*I - 0,20669*X^2 - 0,14914*S^2 - 0,20919*I^2 + 0,08995*X*I$$

$$X = \text{UAKM (g UAKM/L)} ; S = \text{Besin (Asetat) (mM)} ; I = \text{Işık Şiddeti (W/m}^2\text{)}$$

Hız (prodüktivite) denklemi için optimizasyon analizleri uygulandığında, çalışılan değer aralıklarında, en yüksek hidrojen üretim hızının elde edileceği optimum değerler; S= 35,35 mM Asetat; X_o= 0,27 g UAKM/L; I= 3955 lux (263,6 W/m²) olarak bulunmuştur. Bu değerler kullanıldığında elde edilecek tahmini tepki değeri (hidrojen üretim hızı) 1,04 mmol H₂/L.saat olmaktadır. Mathcad değişkenler arasında bir anlamlılık karşılaştırması yapmadığı için, fotofermantasyon çalışmasında, denklemin optimum değişken değerleri Mathcad kullanılarak yeniden araştırılmamıştır. İteratif istatistiksel analizlerin gerçekleştirildiği MiniTab sonuçlarının yeterli olduğu düşünülmektedir.

Her bir değişkenin birbirleri ve üretim hızı ile olan ilişkilerini betimleyen TYM grafikleri Şekil 3.17, 3.18 ve 3.19'da verilmiştir. Şekil 3.17'de görüldüğü üzere, X_o değerinin 0,15-0,30 g UAKM/L olduğu derişim aralığı ile 30-50 mM asetat derişimi aralığı yüksek üretim hızı değerlerinin gözlemlendiği bölgedir. Denklemin vermiş olduğu optimum noktadaki değerler, grafiklerdeki koyu bölgeli alan içerisinde yer almaktadır. Şekil 3.18'de, mikroorganizma-ışık şiddeti ikilisini karşılaştıran grafikler incelendiğinde hidrojen üretim hızının yüksek olduğu (koyu) bölgelerin, X_o değeri için 0,15-0,35 g UAKM/L aralığı, ışık şiddeti için ise 200-300 W/m² (3000-4500 lux) aralığı olduğu görülmektedir. Asetat derişimi - ışık şiddeti ikilisinin hidrojen üretimine etkisi karşılaştırıldığında (Şekil 3.19) ise, hidrojen üretim hızının özellikle ışık şiddetinin yüksek (200-300 W/m²; 3000-4500 lux) olduğu ve asetat derişiminin 30-45 mM arasında değiştiği bölgede yüksek olduğu söylenebilir. Metodun (Denklem 3.6) maksimum

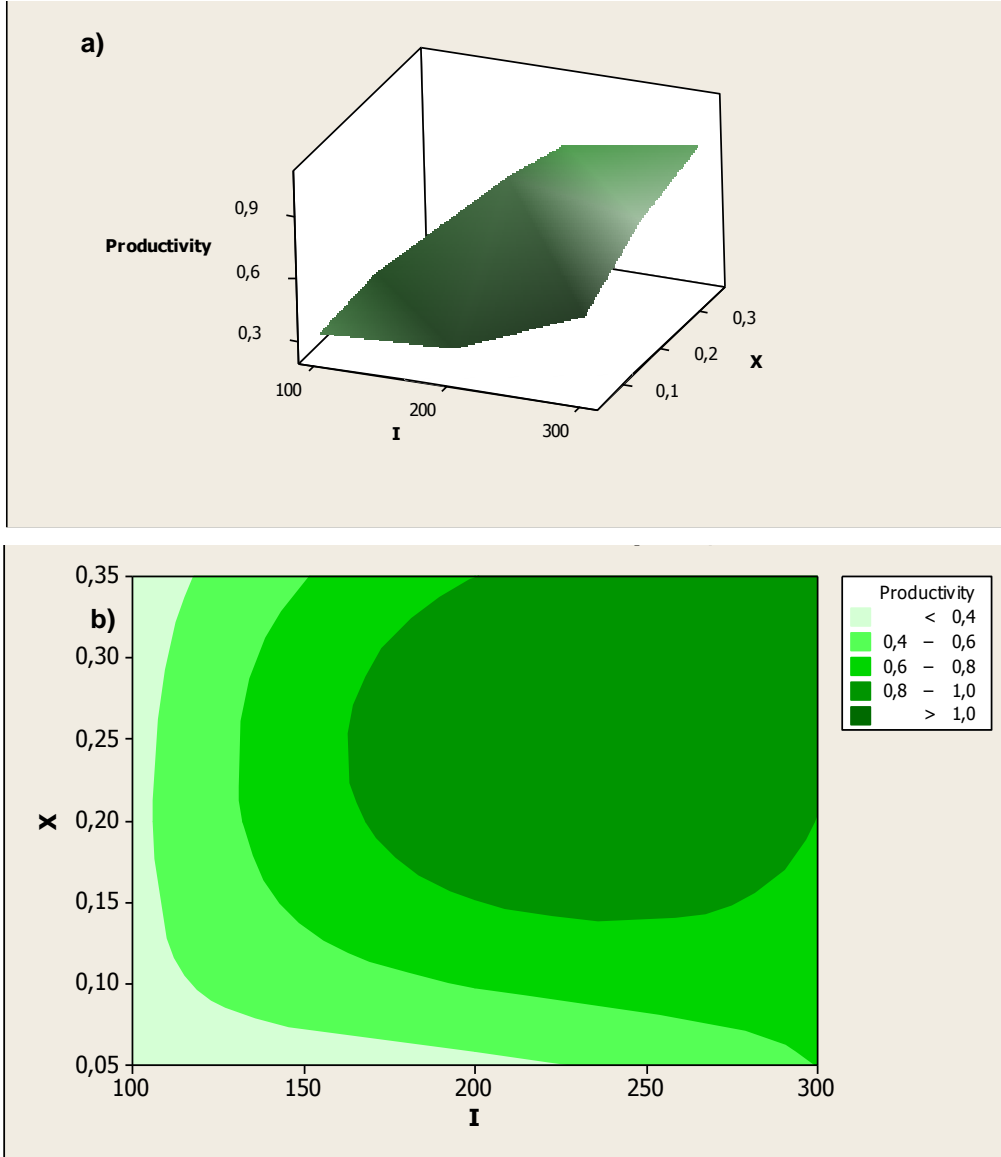
hidrojen üretimi için vermiş olduğu optimum değerler, Şekil 3.17b-3.19b'de yüksek hidrojen üretim aralığının koyu bölgelerle gösterildiği izdüşüm grafikleri ile örtüşmektedir.



Şekil 3.17. H₂ üretim hızı, besin (S) ve mikroorganizma (X₀) ilişkisini betimleyen a) yüzey grafiği, b) izdüşüm grafiği (30°C, asetat)

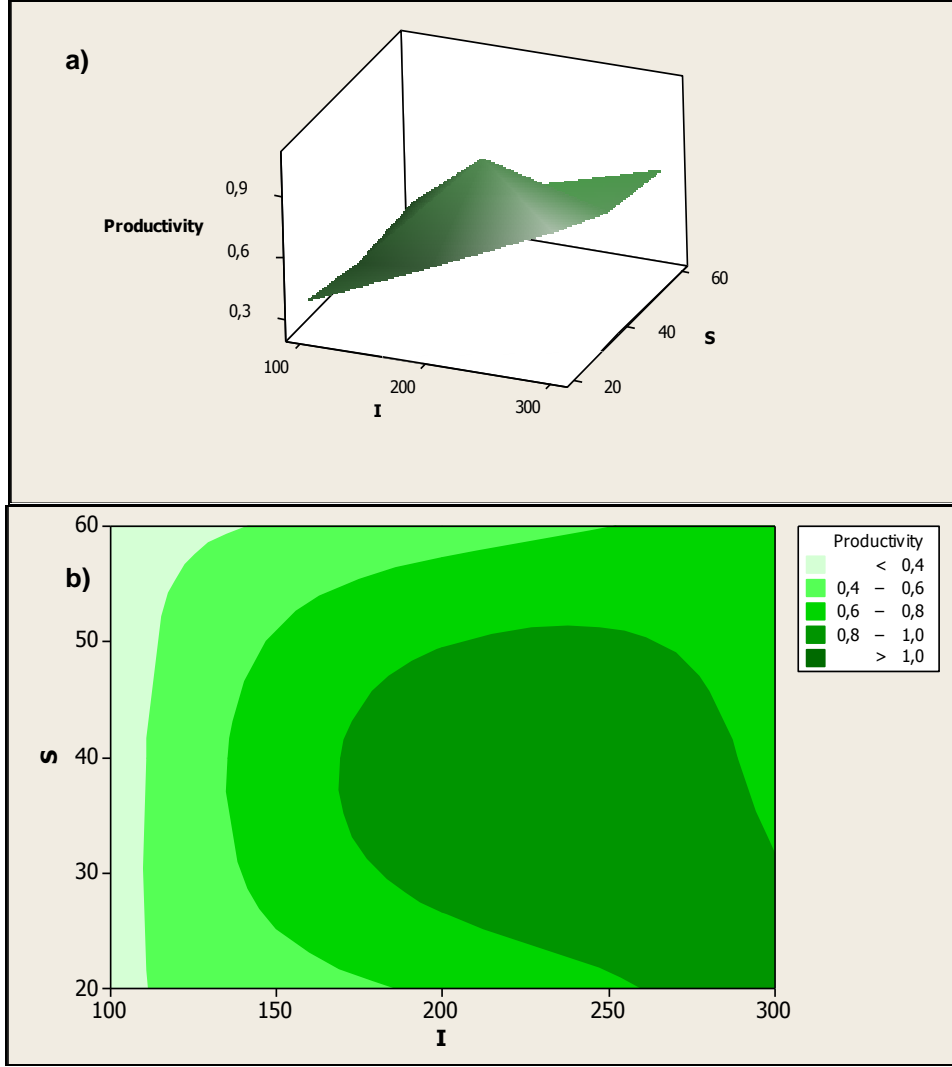
Daha önce belirtildiği üzere, metodun vermiş olduğu optimum değerler S, X₀ ve Işık şiddeti için sırasıyla 35,35 mM asetat, 0,27 g UAKM/L ve 3955 lux (263,6 W/m²)'dir. Reaktörlerdeki C/N oranları 15 olduğu için optimum besin derişimi olan 35,35 mM asetata karşılık gelen glutamat değeri 2,36 mM olarak hesaplanmaktadır. Bu derişimlere karşılık gelen KOİ değeri (2603 mg KOİ/L) ve modelde sunulan optimum başlangıç X₀ değeri göz önüne alındığında, en yüksek üretim hızını sağlayan S/X₀ oranının 9,4 g KOİ/g UAKM olduğu hesaplanmaktadır. Fotofermantasyon SET-1 deneyinde, S/X₀ oranının 7 ve 9 g KOİ/g UAKM olduğu reaktörlerde (diğer reaktörlere kıyasla az da olsa) daha yüksek üretim hızı elde edildiği belirtilmişti. Bu çalışmada bulunan 9,4 g KOİ/g UAKM değeri, SET-1'de elde edilen sonucu

desteklemektedir. Bilindiği kadarıyla, S/X_0 bazındaki bu sonuçlar fotofermantasyon çalışmalarında ilk defa elde edilmiştir.



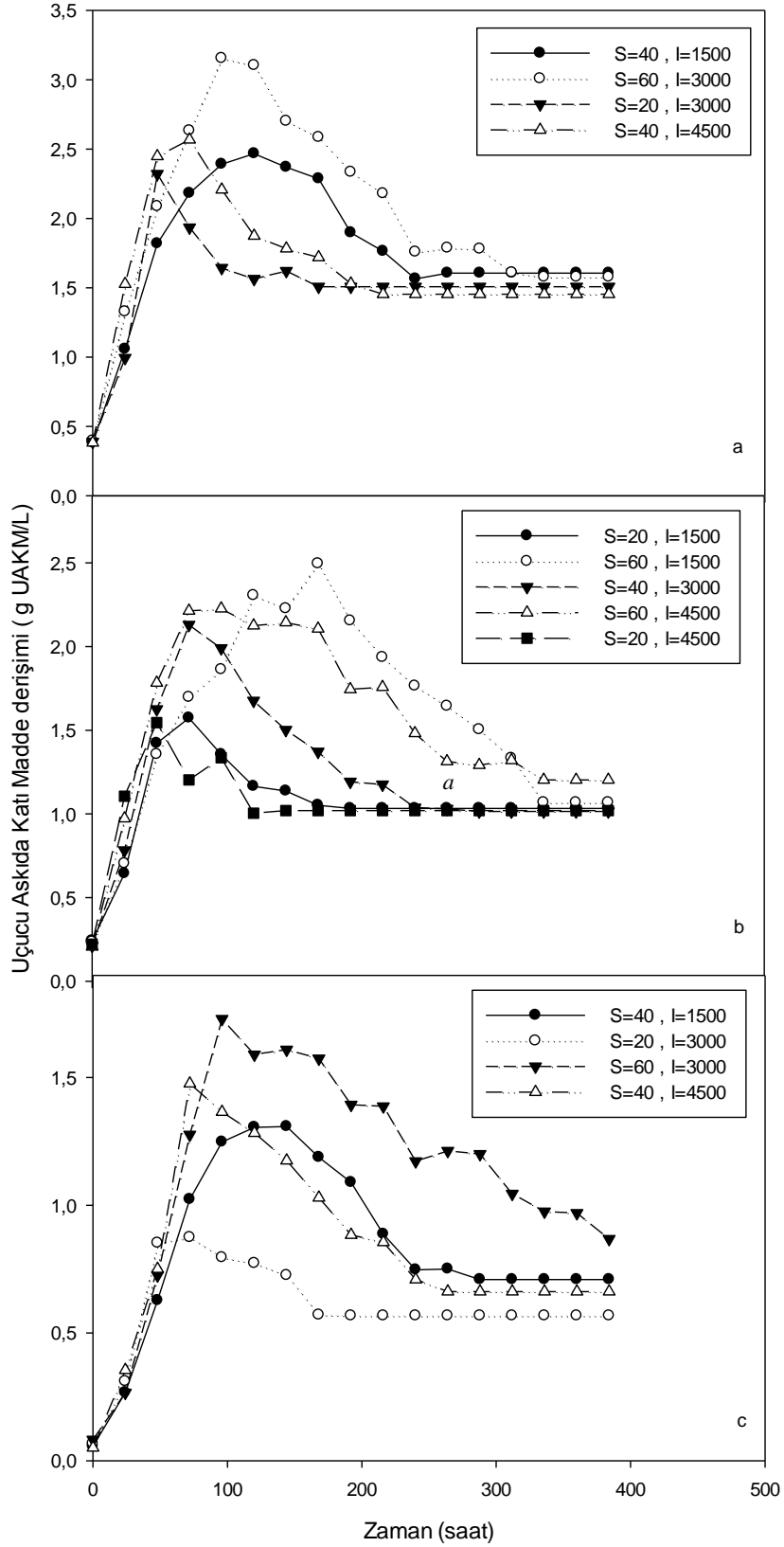
Şekil 3.18. H_2 üretim hızı için, mikroorganizma (X_0)-Işık şiddeti (I) ilişkisini betimleyen a) yüzey grafiği, b) izdüşüm grafiği ($30^\circ C$, asetat)

TYM kullanılarak hidrojen verimleri ve ışık dönüştürme verimleri için de ANOVA ve optimizasyon denemeleri yapılmıştır. Ancak incelenen ANOVA analizi sonuçları, modelin hidrojen verimi ve ışık dönüştürme verimlerini açıklayamadığını göstermiştir. Elde edilen denklemlerin anlamlılığı ANOVA analizleri sonucunda sadece %10-%50'de sınırlı kalmıştır. Diğer bir deyişle, hidrojen üretim verimi ve ışık dönüştürme verimi, S , X_0 ve ışık şiddeti değişkenleri ve(ya) etkileşimleri ile açıklanamamakta, optimizasyonu başarılı olmamaktadır. Bu nedenle TYM yalnızca hidrojen üretim hızı sonuçları doğrultusunda optimize edilmiştir.



Şekil 3.19. H₂ üretim hızı, Besin (S) ve Işık şiddeti (I) ilişkisini betimleyen a) yüzey grafiği, b) izdüşüm grafiği (30°C, asetat)

Yöntem bölümünde anlatıldığı üzere, hidrojen üretiminde besin etkisinin yanı sıra başlangıç mikroorganizma derişimi de önemli olduğu için, bu çalışmada derişim aralığı araştırılan değişkenlerden biri olarak seçilmiştir. Reaktörlere 3 farklı başlangıç derişiminde (0,05; 0,20 ve 0,35 g UAKM/L) mikroorganizma aşılacaktır. Her bir farklı başlangıç kültür derişiminin zamana karşı değişimi Şekil 3.20'de verilmiştir.



Şekil 3.20. Başlangıç X_0 derişimi a) 0,35 g UAKM/L, b) 0,2 g UAKM/L, c) 0,05 g UAKM/L olan reaktörlerde *R.Capsulatus* derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, asetat)

Çalışmada, başlangıç besin derişiminin yüksek olduğu reaktörlerde ($X_0=0,35$ g UAKM/L) *R.capsulatus* derişimleri 2,5-3,5 g UAKM/L değerlerine kadar artmıştır (Şekil 3.20a). Buna karşılık, başlangıç derişimi 0,20 g UAKM/L olan reaktörlerdeki *R.capsulatus* derişimleri 2-2,5 g UAKM/L (Şekil 3.20b); 0,05 g UAKM/L olan reaktörlerdeki *R.capsulatus* derişimleri ise 1-1,8 g UAKM/L değerlerine kadar yükselbilmiştir (Şekil 3.20c). Şekil 3.20'de görüldüğü üzere, aynı başlangıç X_0 derişimi ve aynı ışık şiddetinde, başlangıç S derişiminin daha yüksek olduğu reaktörlerin mikroorganizma derişimindeki artış, belirgin şekilde daha fazladır. Aynı başlangıç X_0 ve asetat derişiminde ise, başlangıç ışık şiddetinin daha yüksek olduğu reaktörlerin mikroorganizma derişimindeki artış hızı daha yüksektir; bu koşullarda mikroorganizma derişiminin çok belirgin şekilde farklı olmadığı anlaşılmaktadır.

3.3 Sonuç

İş Paketi 2 kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özet olarak sunulmuştur.

Kesikli karanlık fermantasyon deneyleri (SET 1 ve SET 2);

- Hidrojen üretiminde, başlangıç pH ve KOİ değerleri önemli parametrelerdir; pH-KOİ etkileşimlerinin dikkate alınması gerekmektedir.
- Çalışılan başlangıç KOİ değerlerinde (10, 25 ve 40 g/L), pH 5'den 7'ye çıktıkça, hidrojen üretim verimi ve hızı genellikle artmaktadır. Başlangıç pH'sının üretim hızına etkisi özellikle 40 g/L KOİ'de belirgindir.
- Sabit başlangıç pH değerinde, başlangıç KOİ değeri 10'dan 40 g/L'ye artıkça, hidrojen üretim verimi düşmektedir. Üretim hızı bazında ise, başlangıç KOİ değerinin 10'dan 40 g/L'ye arttırılması başlangıç pH değeri 5 iken üretim hızını düşürmekte; pH 7 iken ise üretim hızını arttırmaktadır.
- Başlangıç KOİ derişimlerinin yüksek olduğu koşullarda (40 g/L), yüksek başlangıç pH değerleri (pH 7) daha yüksek üretim hızlarında daha fazla miktarda hidrojen üretilmesini sağlamaktadır.
- Hidrojen üretim verimi baz alındığında, yüksek pH değerlerinin (pH 6 ve 7) daha verimli olduğu anlaşılmıştır.
- Hidrojen üretim veriminin artırılması için, pH 6-7 değerlerinde başlangıç KOİ derişiminin 10 g/L'den kademeli olarak (aklimasyonla) artırılması uygun olacaktır.
- Başlangıç pH değerinin düşük olduğu (pH 5) kesikli işletimler, inhibisyona yol açan pH veya UYA değerlerine daha kısa sürede ulaşılmasına neden olmaktadır.

Karbon kaynağı olarak sukrozun kullanıldığı SET 3 kesikli karanlık fermantasyon deneyi Tepki Yüzeyi Metodu (TYM) ile tasarlanmış ve yorumlanmıştır.

- TYM sonuçlarına göre, maksimum hidrojen üretim veriminin sağlanacağı başlangıç pH değeri 7; KOİ değeri ise 10 g/L'dir. pH ve KOİ kombinasyonu, üretim verimini anlamlı şekilde açıklayabilmektedir.
 - Başlangıç KOİ değeri 10 g/L'den 50 g/L'ye artırıldığında verim azalmakta; pH değeri 4'ten 7'ye arttıkça verim artmaktadır.
 - Başlangıç S/X_o değerinin, üretim verimi üzerinde bir etkisi yoktur.
- TYM sonuçlarına göre, maksimum hidrojen üretim hızının (prodüktivitesinin) sağlanacağı başlangıç değerleri KOİ=26,6 g/L, S/X_o=11,8 ve pH=6,7'dir.
 - pH 4'ten 7'ye doğru artarken hız belirgin şekilde artmaktadır.
 - KOİ'nin üretim hızına etkisi pH'nın etkisi kadar radikal değildir.
 - S/X_o=12 civarında maksimum hız gözlenirse de, S/X_o'in (çalışılan değerler içinde) artması veya azalmasının prodüktivite üzerinde, pH değişkeninde olduğu gibi, belirgin bir etkisi yoktur.
- Deneysel verilere göre, maksimum H₂ üretim verimi, başlangıç KOİ, S/X_o ve pH değerlerinin sırasıyla, 10 g/L, 12 g KOİ/g UAKM ve pH=7 olduğu kombinasyonda sağlanmıştır. Bu koşullarda, 2,3 mol H₂/mol sukroz_{eklenen} (1,21 mol H₂/mol heksoz veya 6,3 mmol H₂/g KOİ) verim elde edilmiştir.
- H₂ üretim veriminde olduğu gibi, en yüksek üretim hızı başlangıç KOİ, S/X_o ve pH değerlerinin sırasıyla, 10 g/L, 12 g KOİ/g UAKM ve pH=7 olduğu kombinasyonda (10,6 mL H₂/L_{reaktör}·saat) elde edilmiştir.
- Yan ürün olarak en fazla (sırasıyla) laktik, asetik ve bütirik asit üretilmiştir.
 - En yüksek verim ve hızın gözlemlendiği koşullar (KOİ=10, S/X_o=12, pH=7), aynı zamanda en yüksek asetik ve bütirik asit üretimlerinin olduğu koşullardır.
 - Yüksek başlangıç KOİ derişimlerinde (50 g/L) laktik asit üretimi artmakta; hidrojen üretimi düşmektedir. Başlangıç pH değeri düştükçe, laktik asit üretimi de düşmektedir.
- Yüksek başlangıç pH değeri, üretilen asit miktarındaki artışı tamponlayarak inhibisyonu geciktirmektedir.

Kesikli anaerobik reaktör deneyleri;

- S/X_o oranı anaerobik arıtılabilirlik, metan üretim verim ve yüzdesini etkileyen önemli bir parametredir.

- En yüksek metan üretim verimi (267 ± 5 mL CH_4/g glikoz) veya anaerobik artırılabilirlik yüzdesi (%68) S/X_0 oranının 1 olduğu koşullarda gerçekleşmektedir.
- S/X_0 oranının 2'den az olduğu koşullarda %55'in üzerinde verim sağlanabilmektedir.
- S/X_0 'in 2 olduğu işletimlerde aklimasyona ihtiyaç duyulurken, 2'den yüksek S/X_0 oranları metanojenlerin inhibe olmasına sebep olmaktadır.

Kesikli fotofermantasyon deneyleri (SET-1 ve SET-2);

- S/X_0 oranı özellikle hidrojen üretim hızını ($\text{mg H}_2/\text{L.saat}$ veya $\text{mmol H}_2/\text{L.saat}$) etkileyen bir parametredir.
- Araştırılan 5-20 S/X_0 oranları arasında, en yüksek hidrojen üretim hızı ve verimi, ve besin dönüştürme verimi S/X_0 7 oranında elde edilmiştir.
- Düşük S/X_0 oranları (5-9), daha yüksek hidrojen üretim hızlarına ve ışık dönüştürme verimlerine yol açmaktadır.
- S/X_0 oranı 9'dan 20'ye arttıkça hidrojen üretim hızı ve ışık dönüştürme verimi kademeli olarak düşmektedir.

SET-2 kesikli fotofermantasyon deneyi TYM ile tasarlanmış ve yorumlanmıştır;

- TYM ile başlangıç S (asetat), X_0 (UAKM) ve I (Işık şiddeti) parametrelerinin ve etkileşimlerinin hidrojen üretimine etkisi araştırılmıştır.
- Araştırılan bu üç parametre de hidrojen üretim hızını (prodüktivitesini) önemli şekilde etkilemektedir. X_0 ve I etkileşimi de önemlidir. Hidrojen üretim hızı ışık şiddetindeki değişimlere daha hassastır.
- En yüksek hidrojen üretim hızının elde edildiği optimum değerler; $\text{S} = 35,35$ mM Asetat; $\text{X}_0 = 0,27$ g UAKM/L; $I = 3955$ lux ($263,6$ W/m^2) olarak bulunmuştur.
 - Bu değerler kullanıldığında elde edilecek tahmini en yüksek hidrojen üretim hızı $1,04$ $\text{mmol H}_2/\text{L.saat}$ 'tir.
 - En yüksek hidrojen üretimi sağlayacak S/X_0 oranı $9,4$ g KOİ/g UAKM'dir. Glutamat-KOİ dışında sadece asetat-KOİ eşdeğeri baz alındığında, en uygun S/X_0 oranı $8,3$ g KOİ/g UAKM'dir ($7,7$ g asetat/g UAKM).
 - Deneysel olarak ise, hidrojen üretim hızları (prodüktivite) $0,27$ - $0,91$ ($\text{mmol H}_2/\text{L.saat}$) arasında; hidrojen üretim verimleri ise $0,02$ - $0,11$ g H_2/g asetat ($0,019$ - $0,10$ g H_2/g KOİ) arasında değişmektedir.
- Deneysel verilere göre, en yüksek hidrojen üretim hızı başlangıç besin, mikroorganizma ve ışık şiddeti değerlerinin sırasıyla 20 mM asetat, $0,2$ g UAKM/L ve 4500 lux olduğu reaktörlerde elde edilmiştir.

- Bu koşullarda en yüksek üretim hızı 0,91 mmol H₂/L.saat'tir (20,4 mL H₂/L.saat, STP).
- Bu koşullarda elde edilen verim 0,09 g H₂/g asetat'tır (2,7 mol H₂/ mol asetat; 41,5 mmol H₂/ g KOİ-HAc).
- İkinci büyük besin dönüştürme verimi %68,1 ile yine bu reaktör çeşidinde elde edilmiştir.
- Deneysel verilere göre, en yüksek hidrojen üretim verimi ise başlangıç besin, mikroorganizma ve ışık şiddeti değerlerinin sırasıyla 20 mM asetat, 0,35 g UAKM/L ve 3000 lux olduğu reaktörlerde elde edilmiştir.
 - Elde edilen en yüksek verim 0,11 g H₂/g asetat'tır (3,3 mol H₂/ mol asetat; 51,6 mmol H₂/ g KOİ-HAc).
 - Bu koşullarda elde edilen üretim hızı 0,86 mmol H₂/L.saat'tir (19,3 mL H₂/L.saat, STP).
 - En yüksek besin dönüştürme verimi %83 ile bu reaktör çeşidinde elde edilmiştir.
- TYM sonuçlarına göre, hidrojen üretim ve ışık dönüştürme verimleri, S, X_o ve ışık şiddeti değişkenleri ve(ya) etkileşimleri ile (bu 3 değişkenli model ile) açıklanamamıştır.

4. ÜÇ-AŞAMALI SİSTEMDE KARANLIK FERMANTASYONUN OPTİMİZASYONU

Projenin 3.İş Paketi (İP 3) kapsamında yapılması hedeflenen çalışmalar aşağıda sunulmuştur;

- Bir ardışık kesikli reaktör (AKR) kurularak karanlık fermantasyon çalışmasının yapılması
 - Bu AKR'nin, İş Paketi 2'de sukrozla çalışılan kesikli karanlık fermantasyon deneyi sonuçlarına göre, belirlenen optimum koşullarda (S/X_0 , başlangıç KO_I ve pH) işletilmesi
 - AKR'nin farklı hidrolik bekletme sürelerine (HBS) tabi tutulması ve HBS'nin (ya da farklı organik yükleme hızlarının) karanlık fermantasyona etkisinin araştırılması
 - Her HBS değerinde kararlı koşullar oluştuğunda çıkış sularının toplanması ve takip eden diğer reaktör aşamaları için $-20^{\circ}C$ 'de saklanması
- Her HBS'de ayrılan karanlık fermantasyon çıkış sularının, öncelikle, kesikli anaerobik (metanojenesis) reaktörlerde besin olarak kullanılması yoluyla, metan üretim veriminin araştırılması
- Kesikli anaerobik reaktörlerin çıkış sularının kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde besin olarak kullanılması ve hidrojen üretim veriminin araştırılması

Yukarıda bahsedilen üç-aşamalı sistem ile maksimum enerji üretiminin (veya sonuçlara göre H_2/CH_4 veriminin) elde edildiği koşullar, karanlık fermantasyon için optimum işletim koşulları olarak tanımlanmıştır. Böylelikle, işletim koşullarının ardışık olarak üç-aşamaya ve tüm aşamalardan elde edilen toplam metan ve hidrojen üretimine (toplam enerji verimine) etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bu iş paketinde yer almamasına rağmen, AKR'den alınan çıkış numuneleri ile kesikli fotofermantasyon reaktörleri de kurulmuştur. Bu sayede, üç-aşamalı sistem (karanlık fermantasyon-metanojenesis-fotofermantasyon) ile iki-aşamalı sistemin (karanlık fermantasyon-fotofermantasyon) karşılaştırılması; diğer bir deyişle, kesikli anaerobik reaktör aşamasının etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

4.1 Gereç ve Yöntem

4.1.1 Mikrobiyel Kültür

4.1.1.1 Karanlık Fermantasyon Kültürü

AKR Karanlık fermantasyon deneyleri için Ankara Atıksu Arıtma Tesisi Anaerobik Çürütme Tankı çıkışından karışık anaerobik çamur (mikroorganizma kültürü) alınmıştır. Bu çamurun ortalama AKM ve UAKM derişimleri sırasıyla 40644 ± 1002 ve 9108 ± 890 mg/L'dir. Anaerobik çamur ön işleme tabi tutularak 1 saat 105°C 'de ısı işlem uygulanmıştır (Ozkan vd., 2010). Bu sayede, hidrojen üreten asidojenik bakterilerin seçilmesi ve üretilecek hidrojeni tüketebilecek hidrojenetrofik metanojenesis mikroorganizmalarının elimine edilmesi amaçlanmıştır.

4.1.1.2 Anaerobik Kültür-Metanojenesis

Kesikli anaerobik reaktörler deneylerinde, Ankara Tatlar Atıksu Arıtma Tesisi anaerobik çürütme tankından alınan karışık kültür kullanılmıştır. Kültüre herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. Üç-aşamalı sistem deneylerinde, kullanılan karışık anaerobik kültürün AKM ve UAKM derişimleri sırasıyla 36600 ± 1052 ve 16650 ± 560 mg/L; pH değeri ise 8,6'dır.

4.1.1.3 Fotofermantasyon Kültürü

Fotofermantasyon deneylerinde ODTÜ Hidrojen Araştırma Laboratuvarı stoklarında bulunan mor-kükürtsüz bakteri türü olan *Rhodobacter capsulatus* (DSM 1710) kullanılmıştır. Bu bakteri, İş paketi 2'de de belirtildiği gibi (Bölüm 3.1.1.3), Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu-Leibniz DSMZ Enstitüsü'nden temin edilmiş olup, ODTÜ-Hidrojen Araştırma Laboratuvarı stoklarında -80°C 'de saklanmaktadır. Fotofermantasyon deneylerinde aşı kültürü olarak kullanılan *Rhodobacter capsulatus* (DSM 1710), Bölüm 3.1.1.3'de belirtilen protokole göre steril ortamda çoğaltılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

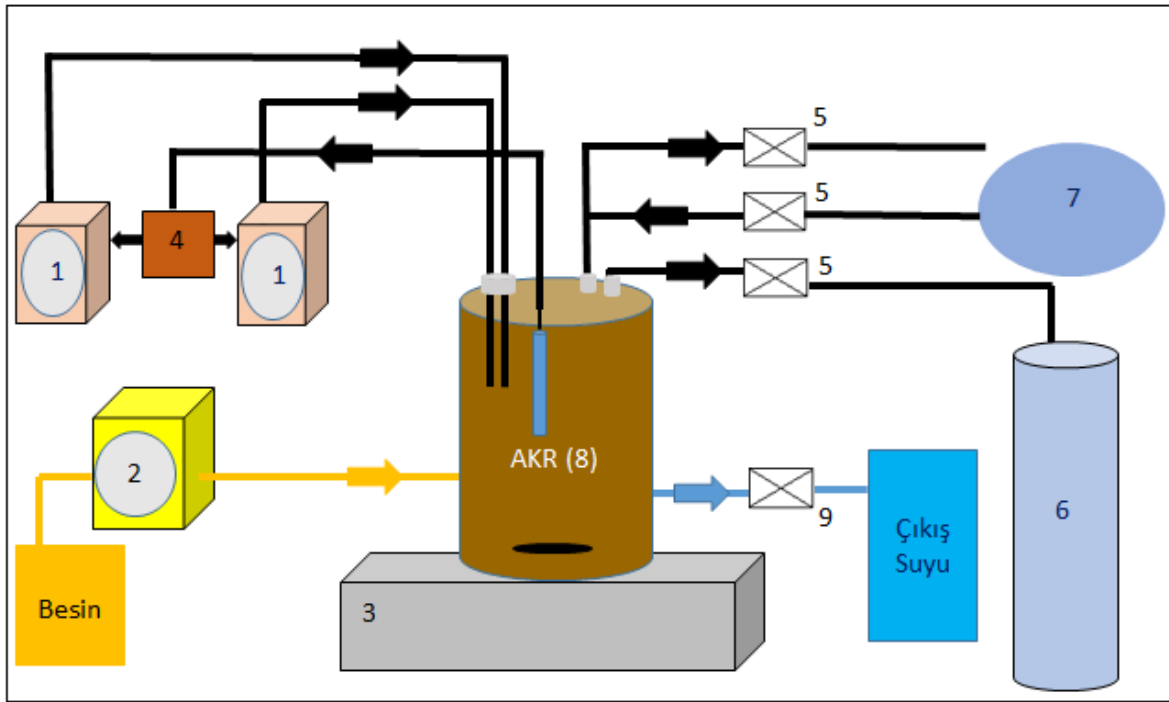
4.1.2 Karanlık Fermantasyonda Kullanılan Ardışık Kesikli Reaktör (AKR) Düzenegi ve İşletim Prensibi

Şekil 4.1'de gösterilen AKR düzenegi aşağıdaki bileşenlerden (1-9) oluşmaktadır:

- 1) Asit ve baz pompaları
- 2) Besin pompası
- 3) Manyetik karıştırıcı
- 4) pH-stat cihazı

- 5) Hidrojen (veya) metan gazlarının olası yan etkilerine karşı dayanıklı gaz selonoid vanaları
- 6) Üretilen gaz miktarını ölçmek amacıyla su-yer değiştirme ünitesi (7,5 L cam silindir)
- 7) Azot (N_2) gazı torbası
- 8) Silindirik pleksiglas reaktör (AKR)
- 9) Sıvı boşaltma vanası (selonoid)

Selonoid vanalar ve diğer elektrikli cihazlar, sistemin otomatik olarak işletilmesi (açılıp/kapatılması) amacıyla zamanlayıcılara bağlanmıştır.



Şekil 4.1. AKR düzeneği

Şekil 4.1'de gösterilen AKR, 15 cm çap, 30 cm yükseklik ve 5 L iç hacme sahip silindirik pleksiglas malzemeden yaptırılmıştır. AKR'nin toplam ve etkin hacmi sırasıyla 5 ve 3,6 L'dir. AKR'nin işletimi, besleme, anaerobik periyot (karıştırma), çökme ve boşaltma olmak üzere 4 periyot içeren döngülerden oluşmaktadır. Besleme, anaerobik reaksiyon (karıştırma) ve boşaltma periyotları, zamanlayıcılarla otomatik olarak başlatılıp durdurulabilecek şekilde kontrol edilmektedir.

Reaktörün giriş noktası besin pompasına bağlıdır. Besleme periyodu sırasında sukroz çözeltisi besin pompası ile AKR'ye beslenmektedir. Besleme periyodunun sonunda, anaerobik periyot başlamakta, ve paralel olarak reaktör içeriği (zamanlayıcı ile kontrol edilen

manyetik karıştırıcının başlaması ile) homojen bir şekilde karıştırılmaktadır. Anaerobik periyot sırasında, manyetik karıştırıcı çalışırken, reaktör içeriğinin pH değeri pH-stat cihazı yardımı ile istenilen seviyede tutulmaktadır. Şekil 4.1'de görüldüğü üzere, pH-stat cihazı, biri baz değeri asit pompalamak üzere iki adet peristaltik pompaya ve reaktör içerisinde devamlı ölçüm yapacak olan pH probuna bağlıdır. Dolayısıyla, karanlık fermantasyon sırasında reaktör içi pH değerinin değişimi durumunda, prob, pH-stat cihazı ve asit / baz pompaları arasındaki sinyalizasyon ile pH değeri (gerektiğinde baz ya da asit içerikli çözeltilerin pompalanması sayesinde) sabit tutulmaktadır. pH-stat cihazı sadece anaerobik reaksiyon/karıştırma periyodunda çalışacak şekilde zamanlayıcılarla kontrol edilmektedir. Anaerobik periyodun başlaması ile birlikte, reaksiyon sırasında oluşacak gazın depolanması ve hacim ölçümü için, reaktörün üst kısmındaki çıkış noktasının su-yer değiştirme cihazına bağlandığı selonoid vana açılmaktadır. Reaktörün üst kısmında yer alan ve N₂ gaz torbasına bağlı olan diğer çıkış noktası ise anaerobik periyot sırasında zamanlayıcı ve selonoid vana yardımıyla kapalı durumdadır. Anaerobik periyodun sonlanması ve çökme periyodunun başlaması ile birlikte, selonoid vana ve zamanlayıcılar sayesinde, su-yer değiştirme cihazına bağlanan gaz hattı kapatılmakta; N₂ gaz torbasına bağlı gaz hattı ise açılmaktadır. Bu sayede, bir sonraki periyot olan boşaltma periyodu sırasında, reaktör içerisindeki sıvının N₂ gazı ile yer değiştirmesi ile vakumun önlenmesi amaçlanmaktadır. Boşaltma periyodunun sona ermesi ile birlikte, çıkış noktasındaki selonoid sıvı boşaltma vanası kapanmakta ve bir sonraki döngüye geçilmektedir. Bir sonraki döngünün ilk periyodu olan besleme süresince, açık havaya bağlı olan gaz hattı açılarak, reaktör içindeki mevcut (çoğunlukla N₂) gazın, tek yönlü vana ile dışarı atılması sağlanarak, besleme sırasında reaktör içi basıncın atmosfer basıncına eşit olması sağlanmaktadır. Sonraki periyot ve döngüler yukarıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmektedir.

AKR işleyişinde hidrojen gazı ile çalışıldığı için, materyali olumsuz etkileme olasılığına karşılık ve de özellikle olası yanıcı ve patlayıcı kazalardan korunmak amacıyla, özel gaz selonoid vanalar kullanılmıştır. Bu vanalar, gaz toplanmasını sağlayan su-yer değiştirme cihazı hattına, N₂ gaz torbasına bağlanan gaz hattına ve (besleme sırasında) reaktör içi basınç oluşumunu engellemek için reaktörün üst kısmına yerleştirilen bir diğer çıkış gaz hattına yerleştirilmiştir.

4.1.3 Deneysel Yöntem

4.1.3.1 AKR-Karanlık Fermantasyon Deneyleri

Sürekli karanlık fermantasyon çalışmasında AKR tipi bir reaktörün seçilmesindeki amaç, düşük HBS değerlerinde çalışıldığında, çökme periyodu sayesinde, sürekli çalışan (ve çökme periyodunun olmadığı) işletimlere kıyasla hidrolik çamur kaybının önlenilmesidir. AKR'lerde yoğun kültür derişimi, dolayısıyla yüksek katı bekletme süreleri sağlanabilmektedir. Ayrıca, AKR sayesinde, reaktör içeriğinin (sıvı ve gaz faz) kesikli olarak boşaltılması yoluyla, karanlık fermantasyon son ürünlerinin (H_2 ve yüksek UYA derişimlerinin) mikroorganizmalar üzerindeki inhibisyon etkilerinin azaltılması hedeflenmiştir.

İş Paketi 2'de belirtildiği üzere, SET 3-sukrozla yapılan kesikli karanlık fermantasyon çalışması sonuçlarına göre, en yüksek H_2 üretim hızı / veriminin elde edildiği koşullar $pH=7$ ve KOI (sukroz olarak) = 10 g/L'dir (Bölüm 3.3). SET 3'ün sonuçları, yapılan istatistiksel analizlerde S/X_0 değerinin verim ya da prodüktiviteyi etkileyen anlamlı (etkili) bir parametre olmadığını göstermiştir. İş Paketi 6'da melasla kurulan kesikli karanlık fermantasyon çalışmasında, bu nedenle, 3.bağımsız değişken olarak S/X_0 yerine X_0 seçilmiştir (Bölüm 7). Fakat bu çalışma sonuçlarında da (Bölüm 7.2.1.1), X_0 karanlık fermantasyonla hidrojen üretiminde anlamlı bir parametre olarak belirlenememiştir. Öte yandan, deneysel veriler başlangıç KOI derişimi 10 g/L ve reaktör içi UAKM derişimi 5000 mg/L olduğunda verimin en yüksek değere ulaştığını göstermiştir (Bölüm 7.2.1.1). Bu sonuçlar esas alınarak, AKR çalışmasında, 10 g/L sukroz çözeltisi ($KOI= 11,2$ g/L) besin olarak kullanılmıştır. Çalışma süresince, giriş KOI değeri 11,2 g/L'de sabit tutulmuştur. Sukroza ek olarak çeşitli nütriyentleri içeren besiyer çözelti de eklenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Sukrozla çalışılan AKR-karanlık fermantasyon deneylerinde kullanılan besiyer çözelti

Besiyer madde içeriği	Reaktör içi derişim (mg/L)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	400
$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	40
KH_2PO_4	400
K_2HPO_4	400
Cysteine	10
NH_4Cl	400

Tablo 4.1'den görüldüğü gibi AKR'de alkalinite bazında kullanılan tampon çözelti KH_2PO_4 - K_2HPO_4 çiftidir. Tampon çözeltisi çiftlerinden her biri için 400 mg/L olan derişim AKR işletimi süresince kademeli arttırılmıştır. Reaktör, başlangıç UAKM derişimi 5000 mg/L olacak şekilde ön işlemden geçirilmiş karışık anaerobik kültür ile aşılansmıştır. Reaktör içeriğı (pH-stat düzeneğı sayesinde) pH 7'de sabitlenmiştir. AKR karanlık fermentasyon deneyi sonuçlarında anlatılacağı üzere işletimin sonraki aşamalarında pH değeri 5,5'a düşürülmüş ve reaktör içi pH değeri 5,5'da seyredecek şekilde çalışılmıştır.

AKR, öncelikle, 36 saatlik HBS'de çalıştırılmaya başlanmıştır. Bu değer, AKR-karanlık fermentasyon çalışmaları için gözlenen 4-96 saat aralığında (Tablo 4.2.; Chen vd., 2009; Badiei vd., 2011; Wu vd., 2009; Wu vd., 2013; Won ve Lau; 2011; Saraphirom ve Reungsang, 2011) ve sürekli beslenen reaktörlerde araştırılan 6-84 saat HBS aralığında (Tablo 4.2; Azbar vd., 2009a; Sagnak vd., 2010; Ozmihci ve Kargi, 2011) yer almaktadır. Döngü süresi, araştırılması hedeflenen HBS değerine göre 24 saat olarak belirlenmiştir. Bu kapsamda, bir döngü 5 dakika besleme periyodu, 22 saat anaerobik periyot (ve karıştırma), 6 saat çökme ve 5 dakika boşaltma olmak üzere 4 periyottan oluşmaktadır. HBS'nin (veya organik yükleme hızının) karanlık fermentasyona etkisini araştırmak üzere, çalışmanın ileriki aşamasında HBS değeri 36 saatten 12 saate düşürülmüştür. Bu bağlamda, 1 AKR döngüsü yeniden planlanarak, besleme periyodu 5 dakika, anaerobik periyot (ve karıştırma) 6,7 saat, çökme 72 dakika ve boşaltma periyodu 2 dakika olarak ayarlanmıştır. Çalışılan her HBS değerine özgü H_2 üretim verimi ve üretim hızı değerlerinin (reaktör performansının) kararlı durumda (*pseudo steady-state*) saptanması hedeflenmiştir. Kararlı durum, ardışık iki ölçümde biogaz üretim miktarı ve tepe gazındaki hidrojen yüzdesi farkının %10'un altında gözleendiğı koşul olarak tanımlanmıştır (Badiei vd., 2011).

Sonuç bölümünde (Bölüm 4.2.1) ayrıntılı olarak anlatıldığı üzere, AKR işletme koşulları (pH, HBS gibi) hidrojen üretimini arttırmak amacıyla süreç içerisinde iyileştirilmeye çalışılmıştır. Bu sebeple, AKR 5 defa yeni aşu çamuru ile aşılansarak yeniden kurulmuş ve 5 farklı işletim sürecine tabi tutulmuştur. Bu süreçte, Katı Bekleme Süresinin (KBS, Solid Retention Time (SRT)) önemli bir işletim parametresi olabileceğı belirlenmiştir. Dolayısıyla, AKR işletiminin son aşamasında (5.İşletim süreci) KBS'nin H_2 üretimine etkisi de incelenmiştir.

Tablo 4.2. Karanlık fermantasyonla hidrojen üretiminde HBS'nin etkisi

Besin	KOİ (g/L.gün) ^{a,b}	Optimum pH	Maksimum H ₂ Verimi (mol/mol heksoz)	Çalışılan HBS aralığı (saat) ^b	Belirlenen optimum HBS (saat)	Kaynakça
Sıvı domuz atığı	40--> 120 g glikoz/gün	-	1,63	24 --> 12 --> 8	12	Wu vd. (2009)
Tatlı Sorgum Şurubu	25 g/L KOİ	-	0,68	96->48->24->12	24	Saraphirom ve Reungsang (2011)
Sukroz	11,8 g/L KOİ (6 saat HBS'de)	4,5	2,16	60-> 30-> 20	30 (pH 4,5)	Won ve Lau (2011)
Palmiye yağı değirmen çıkış suyu	6,6 g/L.gün KOİ (72 saat HBS'de)	-	0,34 L H ₂ /g KOİ	96->72->48->36	72	Baiei vd. (2011)
Nişasta	9 g/L toplam şeker	-	130 mL H ₂ /g şeker	60--->6	24	Sagnak vd. (2010)
Melaz + sıvı domuz atığı	10 g şeker /L	5,50	1,57 mol H ₂ /mol şeker	30-->24-->18-->12-->6	16	Wu vd. (2013)
Melaz	-	5,0-6,0	-	3-6-->9-->18-->48	<8	Guo vd. (2010)
Çeşitli atıklar	-	5,50	1,3	-	8-->12	Jung vd. (2011)
Mısır nişastasası	26,7--> 32-->40 --->53,3-->80-->120 g/L.gün	-	0,51	18->15->12->9->6->4	12	Arooj vd. (2008)
Glikoz	10 ile 2,5 g/L KOİ	-	2,8	10->5->2,5->1	10	Van Ginkel ve Logan (2005a)
Yiyecek atığı	27 g/L KOİ	-	1,12	24-> 30->36->42	30	Kim vd. (2008)
Sukroz	40-->48-->60-->80-->120 kg KOİ/m ³ .gün	-	1,3	12-->10-->8-->6-->4	8	Lin ve Jo (2003)
Asit-hidrolize buğday nişastasası	3,5--> 35 g toplam şeker/L.gün	7	130 mL H ₂ /g toplam şeker	60 --> 6	24	Sagnak vd. (2010)
Atık buğday nişastasası	0,54 – 5,52 g toplam şeker /gün	5,5	109 mL/g toplam şeker	60 --> 6	6	Ozmihci ve Kargi (2011)
Peyniraltı suyu ^c	21, 35, 47 g KOİ/L.gün	5,5	3-22 mmol/g KOİ	84, 18, 24	24	Azbar vd. (2009a)

^a Parantez içinde verilen değerler belirtilen OYH veya KOİ değerleri için sunulan optimum HBS değerlerini göstermektedir.
^b ---> İlgili parametrede çalışılan farklı değerleri ve geçişleri göstermektedir.
^c Çalışma, termofilik koşullarda gerçekleştirilmiştir.

4.1.3.2 Üç-Aşamalı Sistemde; AKR-Karanlık Fermantasyon Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Anaerobik Reaktör Deneyleri

AKR-karanlık fermantasyon çıkış suyu ile öncelikle iki farklı kesikli anaerobik reaktör seti kurulmuştur. Bu çalışmalarda amaç, karanlık fermantasyon çıkış suyu ile kurulan kesikli anaerobik reaktörlerde, hem metan üretimi eldesi hem de fotofermantasyon sistemi için uygun (toksik olmayacak) UYA derişimi eldesini sağlamaktır. Ancak bu setlerde karşılaşılan çeşitli sorunlar nedeniyle (aşı çamurunda yaşanan sorun) metan üretimi elde edilememiş; dolayısıyla yeni bir set kurulmuştur. Fakat kurulan bu iki farklı kesikli anaerobik reaktör seti çalışması sonucunda, ek analizler-araştırmalar yapılarak, sorunun kaynağı tespit edilmiştir. Bu doğrultuda elde edilen ve sonrasında kurulan setlere alt yapı oluşturan çıkarımlar aşağıda özet olarak sunulmuştur:

- Reaktörlerde $\text{NH}_4\text{-N}$ (39 mg/L) ve K derişiminden (397 mg/L) kaynaklı bir inhibisyon olmadığı belirlenmiştir. Literatüre göre, inhibisyon ihtimali, $\text{NH}_4\text{-N}$ derişiminin 200 mg/L ve K derişiminin 400 mg/L'nin üzerinde olduğu şartlarda değerlendirilmektedir.
- Reaktörlerin çıkış pH değerleri 7,0-7,5 arasındadır ve dolayısıyla metanojenesis açısından uygundur.
- Her iki setin inkübasyon sürecinde aralıklarla alınan numunelerde tUYA derişiminin 1200 ve 1800 mg/L aralığında değiştiği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, metanojenesis reaksiyonunu inhibe edebilecek bir derişime rastlanılmamıştır. Ayrıca propiyonik asit derişimleri de metanojenesisin inhibe olmasına neden olacak değerlerin (2000-3000 mg/L) altındadır (Pullammanappallil vd., 2001; İnanç vd., 2005; Wang vd., 2006).
- Karanlık fermantasyon (KF) çıkış suyunun methanojenesis için uygun olduğu belirlenmiştir (Mikroorganizma kaynağı olarak Amasya Maya Fabrikası'ndan alınan anaerobik granüllerle kurulan reaktörlerde KF çıkış suyu ile inkübasyon sonucunda metan üretim verimi 255 mL CH_4 /g çKOİ olarak ölçülmüştür).
- Setlerde kullanılan anaerobik çamur kaynağının, KF çıkış suyu ile metanojenesis için uygun olmadığı, dolayısıyla mikroorganizma kaynağının değiştirilmesi ve/ya KF çıkış suyuna aklime edilmesi gerektiği anlaşılmıştır. (Yukarıdaki bilgiye ek olarak, mikroorganizma kaynağı olarak Ankara Tatlar Atıksu Arıtma Tesisi'nden alınan konvansiyonel anaerobik çamur kullanılan reaktörlerde, KF çıkış suyu ile inkübasyon sonucunda metan üretim verimi 112 mL CH_4 /g çKOİ , asetik asit ile kurulan reaktörlerde ise 72 mL CH_4 /g çKOİ olarak ölçülmüştür).
- KF çıkış suyu içerisinde mevcut bulunan KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 kaynaklı alkalinite, metanojenesis için yeterli bulunmuştur; daha sonraki çalışmalarda öncekilerin aksine besiyer çözeltinin içeriğine NaHCO_3 eklenmemesine karar verilmiştir.

Yukarıda bahsedilen bilgiler ışığında yeni bir kesikli anaerobik reaktör seti kurulmuştur. Bu sette de süzölmüş AKR-karanlık fermantasyon çıkış suyunun metanojenesis reaktörlerinde kullanılmasının UYA derişimi ve metan gazı üretimine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Buna ek olarak, sukroz ile kurulan karanlık fermantasyon çıkış suyunun anaerobik (metanojenesis) reaktörlerde karbon kaynağı olarak kullanımının, UYA kompozisyonuna ve derişimine etkisinin zamana karşı izlenmesi planlanmıştır.

Kurulan bu son sette işletilen anaerobik reaktörlerin ayırt edici özelliğı substrat kaynaklarıdır. Anaerobik reaktörlerin kurulum şartları Tablo 4.3'de paylaşılmaktadır. Test 1 reaktörlerinde AKR-karanlık fermantasyon reaktörünün 1., 2., 3. ve 4. işletim süreçlerinin çıkış suyu homojen bir şekilde karıştırılarak (*I.Kaynak*), Test 2 reaktörlerinde ise 5. işletim sürecinin çıkış suyu homojen şekilde karıştırılarak (*II.Kaynak*) kullanılmıştır. Bu çıkış suları öncelikle 8000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve ardından filtre kağıtlarından (0,7 µm) süzölmüştür. Söz konusu süzöntü suların (*I. ve II.Kaynak*) karakterizasyonu Tablo 4.4'de verilmektedir. Test 3 ve 4 reaktörlerinde sukroz kullanılmıştır. Test 3 ve 4 reaktörleri, sırasıyla, Test 1 ve 2 reaktörlerinin tek-aşamalı anaerobik sistemi niteliğinde kurgulanmış ve dolayısıyla reaktör içi çKOİ derişimleri buna göre düzenlenmiştir. Ayrıca, Bölüm 3.2.2'de en uygun S/X_o oranı olarak belirlenen ve AKR-Metanojenesis sistemi (Bölüm 5) için planlandığı üzere, S/X_o oranları tüm reaktörlerde "1" olarak belirlenmiştir. Test 1 ve 2 üç, Test 3 ve 4 reaktörleri ikişer replika olarak kurulmuştur. Mikroorganizma içermeyen, sadece eşleniğı olan test reaktörlerindeki eş çKOİ içeren şahit reaktörler ve sadece anaerobik aşı çamuru içeren kontrol reaktörler de kurulmuştur.

Tablo 4.3. Kesikli anaerobik reaktör deneylerinde kullanılan reaktör tipleri ve özellikleri

Reaktör Tipi ^a	S/X _o (g KOİ / g UAKM)	Substrat kaynağı ^b	Reaktör içi çKOİ derişimi (g/L)	Başlangıç pH
Test 1	1	Süzölmüş KF çıkış suyu	5,7	7,3
Test 2	1	Süzölmüş KF çıkış suyu	4,8	7,3
Test 3	1	Sukroz	5,7	7,3
Test 4	1	Sukroz	4,8	7,3
Şahit 1	-	Süzölmüş KF çıkış suyu	5,7	7,3
Şahit 2	-	Süzölmüş KF çıkış suyu	4,8	7,3
Kontrol	-	-	-	7,3

^a Test 1: AKR-karanlık fermantasyon reaktörünün 1., 2., 3. ve 4. işletim süreçlerinin homojen çıkış suyu (*I.Kaynak* suyu) kullanılmıştır, Test 2: AKR-karanlık fermantasyon reaktörünün 5. işletim sürecinin homojen çıkış suyu (*II.Kaynak* suyu) kullanılmıştır, ^b KF: karanlık fermantasyon

Reaktörlerin gaz üretimi ve gaz içeriği günlük olarak ölçülmüştür. İnkübasyon sırasında reaktörlerden her gün UYA analizi yapılması amacıyla günlük sıvı numune alınmıştır. Böylelikle, üç-aşamalı sistemin üçüncü aşaması için, diğer bir deyişle, metanojenesis reaktörlerinin ardışık reaktörlerini oluşturacak fotofermantasyon deneyleri için, anaerobik reaktörlerin çıkış suyu UYA içeriği ve zamana karşı değişimi araştırılabilmektedir.

Deneyler, 250 mL toplam ve 190 mL etkin hacme sahip kesikli modda işletilen cam reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Karanlık fermentasyon çıkış suyu öncelikle 8000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve ardından filtre kağıtlarından (0,7 µm) süzölmüştür. Tüm reaktörlere çeşitli mikro-makro nutrijent içeren besiyer çözeltilerden Tablo 4.5'de belirtilen reaktör içi derişimleri sağlayacak miktarda eklenmiştir. Test reaktörlerinde, başlangıç pH değerini 7-7,5'ye ayarlamak için 1 N NaOH çözeltisi kullanılmıştır. Reaktörlerin tepe gazları, N₂ gazı ile 4 dakika uçurularak oksijenin ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır. Reaktörler 125 rpm'de çalıştırılan sallayıcıda ve 35±2°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir.

Tablo 4.4. Test 1 ve Test 2 reaktörlerinde substrat olarak kullanılan AKR-karanlık fermentasyon sisteminin çıkış suyu (sırasıyla *I.Kaynak* ve *II.Kaynak*) özellikleri ^a

Parametre	I.Kaynak suyu (Test 1 reaktörleri için giriş suyu)	II.Kaynak suyu (Test 2 reaktörleri için giriş suyu)
çKOİ (mg/L)	10750±254	9000±312
TAN (mg/L)	8±0,2	14±0,8
Alkalinite (mg/L CaCO ₃)	2122± 68	2057±93
pH	6,2	6,3
Asetik asit (mM)	21	21
Propionik asit (mM)	4	2
Bütirik asit (mM)	17	8
İso-bütirik asit (mM)	1	2
Toplam UYA (mM HAc)	37	30

^a Test 1: AKR-karanlık fermentasyon reaktörünün 1., 2., 3. ve 4. İşletim süreçlerinin homojen çıkış suyu (I.kaynak suyu) kullanılmıştır, Test 2: AKR-karanlık fermentasyon reaktörünün 5. İşletim sürecinin homojen çıkış suyu (II.kaynak suyu) kullanılmıştır.

Tablo 4.5. Kesikli anaerobik reaktör deneylerinde kullanılan besiyer çözelti içeriği

Besiyer içeriği	Derişim (mg/L)	Besiyer içeriği	Derişim (mg/L)
NH ₄ Cl	300	NH ₄ VO ₃	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	400	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,5
KCl	400	ZnCl ₂	0,5
Na ₂ S.9H ₂ O	300	AlCl ₃ .6H ₂ O	0,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	50	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	80	H ₃ BO ₃	0,5
FeCl ₂ .4H ₂ O	40	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,5
CoCl ₂ .6H ₂ O	10	Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	0,5
KI	10	Na ₂ SeO ₃	0,5
(NaPO ₃) ₆	10	Cysteine	10
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,5		

4.1.3.3 İki-Aşamalı Sistemde; AKR-Karanlık Fermantasyon Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyleri

Bu çalışmada, bu iş paketinde yer almamasına rağmen, sukrozla işletilen AKR karanlık fermantasyon sisteminin çıkış suyu ile kesikli fotofermantasyon reaktörleri kurulmuştur. Literatür çalışmalarında sıkça karşılaşılan iki-aşamalı bu sistem (karanlık fermantasyon-fotofermantasyon) için elde edilecek verimler, ileride kurulacak üç-aşamalı sistem deneyi için ön bir bilgi ve karşılaştırma olanağı sağlamıştır. Bir başka deyişle, bu sayede, iki-aşamalı sistem (karanlık fermantasyon-fotofermantasyon) ile üç-aşamalı sistemin (karanlık fermantasyon-metanojenesis-fotofermantasyon) karşılaştırılması yapılarak, kesikli anaerobik reaktör (metanojenesis) aşamasının etkisi araştırılabilmektedir.

Bölüm 4.1.3.2'de belirtildiği üzere, kesikli anaerobik reaktör deneylerinde de aynı isimle besin olarak kullanılan beş farklı AKR-karanlık fermantasyon işletme sürecinin ilk dört sürecine ait çıkış suları karıştırılarak Test 1 giriş suyunu (I.Kaynak suyu, Tablo 4.4); 5. işletme sürecine ait toplam çıkış suları ise Test 2 giriş suyunu (II.Kaynak suyu, Tablo 4.4) oluşturmuş ve kesikli fotofermantasyon reaktör deneylerinde de besin olarak kullanılmıştır. Özellikleri Tablo 4.4'de verilen karanlık fermantasyon çıkış sularının yüksek derişimde asetik asit ve bütirik asit içerdiği ve toplam UYA derişiminin tamamına yakınının asetik ve bütirik asitten oluştuğu belirlenmiştir. *R.capsulatus* için önerilen optimum asetat derişiminin 30 mM (Özgür v.d, 2010), başka bir *Rhodobacter* kültürü için 21-42 mM (Asada vd., 2008) ve *Rhodopseudomonas* çeşitleri için 22 mM (Barbosa vd., 2001) olması sebebiyle 24 mM asetik asidin fotofermantasyon reaktörleri için uygun bir değer olduğu söylenebilir. Bunun yanı sıra

düşük derişimlerde de olsa diğer organik asitler de çıkış suyunda bulunmaktadır. TAN derişimi ise 8 mg/L (0,5 mM) olarak belirlenmiştir. Akköse vd. (2009) amonyum iyonu derişiminin 2 mM (36 mg/L)'in üzerinde olduğu durumlarda hidrojen üretilmediğini gözlemlenmiştir. Bu nedenle ölçülen değer fotofermantasyon bakterilerinde toksik etki yaratmamaktadır.

Özellikleri Tablo 4.4'de verilen AKR çıkış suları kullanılarak, 3 tekrarlı (aynı özellikte) kesikli fotofermantasyon reaktörleri kurulmuştur. Reaktörlerin toplam ve etkin hacmi sırasıyla 55 ve 50 mL'dir. Her bir reaktöre homojen olarak karıştırıldıktan sonra süzölmüş (0,7 µm) ve otoklavlanmış çıkış suyu %50 oranında seyreltilerek (yaklaşık 45 mL) eklenmiştir. Bu seyreltmenin amacı yüksek KOİ derişimini düşürmek; UYA harici organik madde ve(ya) yüksek KOİ derişimi kaynaklı olası inhibisyon etkilerini azaltmaktır. Reaktörlere, S/X_o oranı 9,4 g KOİ/g UAKM sağlanacak şekilde *R.capsulatus* kültürü aşılantmıştır. Bölüm 3.2.3.2 ve Bölüm 3.3'de belirtilen fotofermantasyon deneyi sonuçlarına göre, reaktörler, en yüksek hidrojen üretim hızını sağlayan 3955 lux ışık şiddetinde aydınlatılmış ve S/X_o 9,4 g KOİ/g UAKM (S/X_o 8,3 g KOİ_{asetat}/g UAKM) oranı sağlanmıştır.

4.1.3.4 Üç-Aşamalı Sistemde; Kesikli Anaerobik Reaktör Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyleri

İş paketi 3 kapsamında yapılan bu çalışmada amaç, AKR-Karanlık fermantasyon sistemi çıkış suları ile kurulan kesikli anaerobik reaktörlerin çıkış sularının, takip eden kesikli fotofermantasyon reaktörlerine etkisini araştırmaktır. Bu bağlamda, hidrojen verimi araştırılarak, üç-aşamalı sistemin (karanlık fermantasyon-metanojenesis-fotofermantasyon) iki-aşamalı sistem (karanlık fermantasyon-fotofermantasyon) ile karşılaştırılması sağlanabilecektir.

Daha önce belirtildiği üzere, AKR-karanlık fermantasyon 1.-4.işletme süreçlerine ait çıkış suları karışımı (I.kaynak suyu) ve 5.işletme sürecine ait çıkış suları karışımı (II.kaynak suyu) kesikli anaerobik reaktör deneylerinde besin olarak kullanılmıştır (Bölüm 4.1.3.2, Tablo 4.4). Bu kesikli anaerobik reaktör deney sonuçlarında (Bölüm 4.2.2), çıkış suyunda takip edecek fotofermantasyon reaktör deneyleri için sorun yaratabilecek amonyum iyonu derişimleri (221±4 mg/L NH₄-N ve 232±4 mg/L NH₄-N) tespit edilmiştir. Literatürde amonyum iyonu derişiminin 2 mM (36 mg/L) ve üzeri olduğu koşullarda fotofermantasyon reaktörlerinde hidrojen üretiminin durduğu belirtilmektedir (Akköse vd., 2009). Bu bağlamda, proje önerisinde fotofermantasyon öncesinde amonyum iyonu giderimi için sunulan B planları araştırılmıştır. B planları /yöntemleri bazında yapılan çalışmalar (havayla sıyırma yöntemi ile amonyum uçurumu ve zeolitle adsorpsiyon) EK-E'de ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Bu

yöntemler karşılaştırıldığında, kesikli anaerobik reaktör çıkış sularındaki yüksek amonyum iyonunun havayla sıyırma yöntemiyle daha iyi giderildiği belirlenmiştir. Bu yöntem sayesinde 284 ± 5 mg/L ve 298 ± 5 mg/L NH_4 derişimlerine sahip kesikli anaerobik reaktör çıkış sularındaki amonyum derişimi 36 mg/L olan (2 mM) limit değerine (ve altına) düşürülerek kesikli fotofermantasyon deneyleri kurulmuştur. Havayla sıyırma yöntemi sonrası kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde kullanılan giriş sularının (kesikli anaerobik reaktör çıkış suları) özellikleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

İki farklı kesikli anaerobik reaktör çıkış suyu ile (Test 1 tipi kesikli anaerobik reaktör çıkış suyu=Giriş suyu 1 ve Test 2 tipi kesikli anaerobik reaktör çıkış suyu=Giriş suyu 2) kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörleri 2 tekrarlıdır. Reaktörlerin toplam ve etkin hacmi sırasıyla 55 ve 50 mL'dir. Her bir reaktöre homojen olarak karıştırıldıktan sonra süzölmüş (0,7 μm) ve otoklavlanmış giriş suları (yaklaşık 38 mL) eklenmiştir (Tablo 4.6). Reaktörlere, S/ X_0 oranı 9,4 g KOİ/g UAKM sağlanacak şekilde *R.capsulatus* kültürü aşılantmıştır. Reaktörler, en yüksek hidrojen üretim hızını sağladığı belirlenen 3955 lux ışık şiddetinde aydınlatılmıştır.

Tablo 4.6. Üç-aşamalı sistemde, kesikli fotofermantasyon reaktörleri için kullanılan giriş sularının özellikleri

Parametreler ^a	Değerler ^b	
	Giriş suyu 1	Giriş suyu 2
çKOİ (g/L)	2,4 \pm 0,2	2,1 \pm 0,3
TAN (mg/L)	24 \pm 2	28 \pm 2
pH	7,4	7,3
Asetik asit (mM)	16,6	14
Propionik asit (mM)	0,3	2,5
Bütirik asit (mM)	10,4	4,6
Toplam UYA (mM HAc)	23,9	19,2

^a çKOİ: Çözönmüş KOİ; TAN: (NH_4^+ -N + NH_3 -N)

^b Üç-aşamalı sistemde, 2.aşama kesikli anaerobik reaktör çıkış sularının (Test 1 çıkış=Giriş suyu 1 ve Test 2 çıkış=Giriş suyu 2) amonyak sıyırma yöntemi sonrasında özellikleri

4.1.4 Analitik Yöntem

AKM, UAKM ve alkalinite ölçümleri Standart Metod'a göre gerçekleştirilmiştir (APHA, AWWA, WEF, 2005). çKOİ için, reaktörden alınan örnekler öncelikle Sartorius marka cam lifi filtrelerden (0,7 μm) süzölmüş; süzöntü örneklere EPA onaylı reaktör çürütme metodu uygulanarak çKOİ analizleri yapılmıştır (Hach Water Analysis Handbook, 1989).

Kesikli anaerobik reaktörlerde ve AKR'de üretilen tepe gazı hacmi su-yer değiştirme cihazı (water displacement device) ile ölçülmüştür (Johnson ve Young, 1983). AKR-Karanlık fermantasyon sisteminde tepe gazı kompozisyonu, TCD ile donatılı olan GC (Thermo Scientific Co.) ünitesinde analiz edilmiştir. Birbirine seri bağlı iki kolonda metan (CH_4), azot (N_2), karbondioksit (CO_2), oksijen (O_2) ve hidrojen (H_2) ayrıştırılabilmektedir. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmış; enjektör sıcaklığı $50^\circ C$, detektör sıcaklığı $80^\circ C$, fırın sıcaklığı ise $35^\circ C$ 'da sabit tutulmuştur. Gaz numunelerinin kompozisyonu standart gaz karışım tüplerinden alınan gaz kompozisyonu ile hazırlanan kalibrasyon grafiklerine göre hesaplanmıştır (Şekil EK-F1).

Fotofermantasyon deneylerinde üretilen toplam gaz hacmi ise her reaktör için ayrı yaptırılmış olan gaz toplama tüplerine deney süresi boyunca biriktirilerek hesaplanmıştır. Fotofermantasyon reaktörlerinde tepe gazı kompozisyonu, TCD ve Supelco Carboxen 1010 kolonu ile donatılı olan GC (Agilent Technologies 6890N) ünitesinde yapılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak Argon (26 mL/dakika akış) kullanılmıştır. Enjektör sıcaklığı $160^\circ C$, detektör sıcaklığı $170^\circ C$, fırın sıcaklığı ise $140^\circ C$ 'dir.

AKR-Karanlık fermantasyon çalışmasında hidrojen üretim verimi hesaplarında kullanılan (ve şekillerde sunulan) tepe gazı H_2 yüzdeleri, bir döngüde iki ardışık ölçüm arasındaki farkın %10'un altına düştüğü noktadan itibaren yapılan ölçümlerin ortalamasıdır. Karanlık fermentatif hidrojen üretim verimi ($mol H_2/mol$ heksoz), bir günde üretilen toplam gaz miktarı, ortalama H_2 yüzdesi ve ortam sıcaklığı kullanılarak $mol H_2$ hesaplanması ve bu değer günlük beslenen mol heksoz (mol sukroz/2) değerine bölünmesi ile hesaplanmıştır. Karanlık fermentatif hidrojen üretim hızını ($L H_2/L_{reaktör.gün}$; üretim prodüktivitesi) hesaplamak için, bir günde üretilen toplam gaz hacmi, ortalama H_2 yüzdesi ve standard sıcaklık-basınç koşulu ($0^\circ C$, 1 atm) dikkate alınarak günlük üretilen hidrojen hacmi bulunmakta; bu değer de AKR etkin hacmine (3,6 L) bölünmektedir.

Fotofermantasyon ve karanlık fermantasyon deneylerinde, UYA kompozisyonu ve derişimleri refractive index detektörü kullanan HPLC (SHIMADZU 20A) cihazı ile 10 μL numune kullanılarak ölçülmüştür. Buna göre, laktik, formik, asetik, propiyonik, izo-bütirik, bütirik ve izo-valerik asitleri analiz edilmiştir. HPLC çalışma protokolü şu şekildedir; fırın sıcaklığı $66^\circ C$; mobil faz HPLC kalitesinde 0,085 M'de sülfürik asit çözeltisi; akış hızı 0,4 mL/dakika. Numunelerdeki UYA derişimleri, standart asit karışım solüsyonu ile hazırlanan kalibrasyon grafiklerine göre hesaplanmıştır (Şekil EK-A3). Anaerobik reaktörlerin UYA analizleri için ise flame ionization detector (FID) ile donatılı GC ünitesi (Thermo Scientific Co., gaz analizleri

için TCD ile de donatılmıştır. 0,22 µm filtre kağıdından süzülen numuneler Nukol kolonda (Model 25326, 15 m-0,53 mm-0,5µm) analiz edilmiştir. Bu GC'de enjektör sıcaklığı 220°C, detektör sıcaklığı 230°C'de sabit tutulup, taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmıştır. Fırın sıcaklığı 100°C'den başlayarak 8°C/dakika'lık artışlarla 200°C'da 10 dakika sabit tutulmuştur. UYA için GC'de yapılan kalibrasyon grafiği, Şekil EK-F2'de verilmiştir (EK-F). Toplam UYA (tUYA) derişimi için, her bir asit derişimi moleküler ağırlığına bölünerek ve asetik asidin moleküler ağırlığıyla çarpılmaktadır. Tüm asitlerin, asetik asit (HAc) cinsinden eşdeğer derişimlerinin toplamı tUYA derişimini vermektedir (Yılmaz ve Demirer, 2008).

AKR-Karanlık fermantasyon sisteminde pH kontrolü pH-stat ünitesi (pH kontrol ünitesi, Eutech) ile yapılmıştır. Bu üniteye baz olarak 2 M NaOH ve 2 M HCl çözeltisi kullanılmıştır. Karanlık fermantasyon deneylerinde elde edilen tüm sonuç şekillerinde sunulan pH değeri, bir döngünün reaksiyon (anaerobik) periyodu sırasında alınan tüm ölçümlerin ortalamasıdır.

Fotofermantasyon reaktörlerinden alınan örneklerin optik yoğunluk ölçümleri 660 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu UV-1201) gerçekleştirilmiştir. Ölçülen her bir optik yoğunluk için kuru kütle ağırlığı hesaplanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve reaktörlerde zamana karşı UAKM derişimi izlenmiştir (Şekil EK-A1, EK-A).

Moleküler analizler, sürekli reaktörlerden alınan numuneler için gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, AKR-karanlık fermantasyon reaktöründen ve sürekli anaerobik (metanojenesis) reaktöründen, başlangıç aşısı çamuru ve işletim süresince belirli aralıklarla ya da sistemde belirgin bir derişim gözlemlendiği durumlarda çamur örnekleri alınmıştır; numuneler -20°C'de saklanmıştır. Moleküler analizler (DNA izolasyonu, PCR-DGGE analizleri) ve sonuçları İş Paketi 8 kapsamında yer almaktadır. Dolayısıyla, AKR-Karanlık fermantasyon çalışmasına ait moleküler analiz sonuçları Bölüm 9'da sunulmuştur.

4.2 Bulgular ve Tartışma

4.2.1 AKR-Karanlık Fermantasyon Deneyi Sonuçları

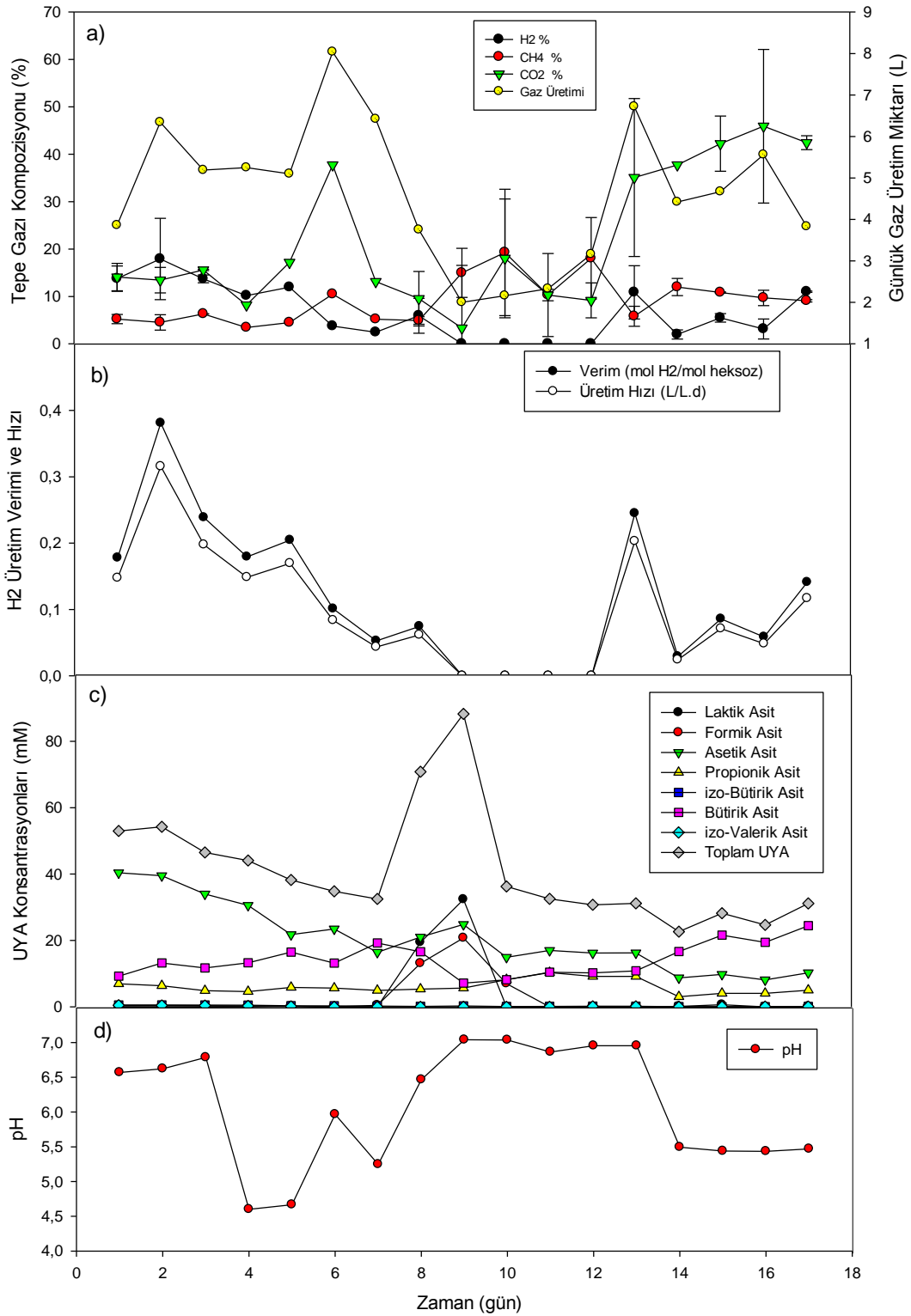
AKR çalışmaları 5 farklı işletim sürecinden oluşmaktadır. Diğer bir deyişle, AKR 5 defa yeni aşısı çamuru ile aşılansak, yeniden kurulmuş ve belirli bir süre işletilmiştir. Her işletim sürecinde, hidrojen üretiminin artırılması ve bu bağlamda, işletim koşullarının (pH, HBS gibi) hidrojen üretim verimini artıracak şekilde iyileştirilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca, ileriki bölümlerde anlatılacağı üzere, hidrojen üretimini olumsuz etkileyen homoasetojenesis aktivitesinin minimize edilmesine çalışılmıştır. Bu bölümde, 5 farklı işletim süreci ve elde

edilen sonuçlar sunulmuştur. Şekil 4.1’de gösterilen ve deneylerde kullanılan AKR düzeneğin fotoğrafları Şekil EK-G1’de gösterilmiştir (EK-G).

1. İŞLETİM SÜRECİ: Kesikli karanlık fermantasyon deney sonuçları uygulanarak başlatılan AKR çalışması- İşletim pH değerinin belirlenmesi

İlk AKR işletiminde, Bölüm 4.1.3.1’de belirtildiği gibi, kesikli karanlık fermantasyon deneyi sonuçları esas alınarak AKR başlangıç pH değeri 7, başlangıç UAKM derişimi 5000 mg/L olarak ayarlanmış; giriş (ve reaktör içi) KOİ derişimi 11,2 g/L olacak şekilde 10 g/L’lik sukroz çözeltisi besin olarak uygulanmıştır. Reaktör 36 saatlik HBS, 24 saatlik döngü süresi ve 7,5 g KOİ/L.gün organik yükleme hızında (OYH) 23 gün boyunca işletilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

Reaktör kurulumunun ilk 6 gününde, işletimde ve analizlerde çeşitli teknik aksaklıklarla karşılaşmıştır. Bu aksaklıklar başta pH değerinin sabitlenememesi ve gaz kompozisyonu ölçümlerinde tutarsızlıklar olmak üzere, işletim takibini zorlaştırmıştır. Şekil 4.2’de sunulan veriler, bu aksaklıkların giderildiği işletim gününden (sıfırıncı gün-başlangıç zamanı) itibaren sunulmuştur. pH-stat ünitesi sayesinde reaktör içi pH değerinin 6,9-7,1 aralığında sabit tutulması hedeflenmesine rağmen, yüksek hızda UYA üretimi sonucu pH’nın ilk günlerde 4,75 değerine kadar düştüğü tespit edilmiştir (Gün 4-5, Şekil 4.2). Hedeflenen pH değerini sağlamak için, pH ayarında kullanılan NaOH solüsyonunun derişimi (2 M’dan 5 M’a) ve baz pompasının hızı artırılarak UYA üretimi sonucu hızlı şekilde düşen pH değerinin dengelenebilmesine çalışılmıştır. Nitekim, pH’nın günlük beslemeyi takip eden ilk 3-4 saat içerisinde 5’e kadar düşmesi aynı şekilde gözlene de, pH’nın 1 döngü süresince daha kısa sürede sabitlenmesi sağlanabilmiştir. Reaktör çıkış numuneleri 17 günlük işletim süresince analiz edilmiş ve deneysel analiz sonuçları Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Birinci AKR işletim sürecinde, a) Tepe gazı kompozisyonu ve günlük toplam gaz üretimi, b) H₂ üretim verimi ve hızı, c) Çıkış suyu UYA derişimi, d) Ortalama pH, değerlerinin zamana göre değişimi (HBS: 36 saat; Döngü süresi: 24 saat; OYH: 7,5 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 11,2 g/L; ortalama KBS: 14,5 gün; T: 35°C, pH: 7'den 5,5'a düşürülmüştür)

Şekil 4.2d'de görüldüğü üzere, bir döngü süresince pH'nın daha kısa sürede sabitlenmesi sağlansa da 17 günlük işletim boyunca reaktör içi pH değerinde salınımlar gözlenmiştir. İşletim süresince reaktörde metan gazı üretimi de tespit edilmiştir (Şekil 4.2a). pH'nın 4,75'e kadar düştüğü günlerde tepe gazında metan %5 seviyesinde iken, pH'nın 7 olduğu günlerde (Gün 8-14) %20'ye varan bir metan yüzdesi gözlenmiştir. Buna paralel olarak hidrojen yüzdesi azalarak Gün 9-11'de sıfırda seyretmiştir (Şekil 4.2a). Otomatik pH ayarına rağmen, reaktör içi pH'nın 7'de sabitlenememesi ve 5,5'lara kadar düşmesi, ve düşük pH değerlerinde metan üretiminin azalması sebebiyle, AKR'de sürekli hidrojen üretimi koşulları için uygun olan pH'nın 7 yerine 5,5 olduğuna karar verilmiştir. Bu nedenle işletimin 12.gününde pH 5,5'a ayarlanmıştır. Bu değişiklikten bir HBS (36 saat) sonra tepe gazında yeniden hidrojen gözlenmiş, hidrojen üretiminin başladığı anlaşılmıştır. pH 5,5 ayarını takiben, metan yüzdesinde düşüş gözlenmiştir; fakat bu miktar da göz ardı edilemeyecek değerlerdedir. Tepe gazı metan yüzdesi %10-15 değerinde 3 HBS (4,5 gün) boyunca seyretmiştir (Şekil 4.2a). Metan üretimi engellenemediği için reaktör işletimi 17.günde sonlandırılmıştır.

Şekil 4.2b'de görüldüğü üzere, birinci AKR işletimi süresinde hidrojen üretim verimi 0-0,38 mol H₂/mol heksoz aralığındadır. Bu değer, karışık anaerobik kültürle çalışan AKR'ler için rapor edilen H₂ verim değer aralığının (0,5-2,8 mol H₂/mol heksoz) altındadır (Arooj vd., 2008; Van Ginkel ve Logan, 2005a). Üretim hızı ise 0-0,3 L H₂/L_{rxr}.gün aralığında değişmiştir. Bu değerler de literatürde sunulan 0,5-6,7 L/L_{rxr}.gün değerlerinden düşüktür (Wu vd., 2009; Badiei vd., 2011).

İşletim süresince en baskın şekilde üretilen UYA'lar asetik ve bütirik asitler olmuştur (Şekil 4.2c). Asetik asetik miktarı 10-40 mM arasında değişirken, bütirik asit miktarı 20-30 mM aralığında seyretmiştir. İşletimin 7. ve 10.günleri arasında laktik asit miktarında ani bir pik gözlenmiştir. Laktik asit üretiminin hidrojen tüketici bir reaksiyon olduğu bilinmektedir (Saady, 2013). Dolayısıyla, pik laktik asit üretimi, hidrojen üretiminin aynı günlerde sıfırlanmasını açıklamaktadır. Bu tartışmayla ilgili daha geniş açıklama 2.İşletim süreci sonuçları bölümünde verilmiştir. Hidrojen tüketimine yol açan bir diğer reaksiyon, metan üretimi için H₂ ve CO₂'nin kullanıldığı hidrojenetrofik metan üretimi reaksiyondur. Bu bağlamda, bu çalışmada elde edilen düşük H₂ verimi, üretilen hidrojenin metanojenler tarafından tüketilmesi kaynaklı da olabilir. Bilindiği üzere, anaerobik çürütme ile metan üretiminde optimum pH aralığı 6,8-8,3'dür (Speece, 1996). Fakat bu AKR işletim sürecinde, yukarıda bahsedildiği gibi, pH 5,5'te dahi metan üretimi gözlenmiştir. Bu durum uygulanan işletim koşullarına ve düşük pH-yüksek UYA derişimine dayanıklı bir metanojen türünün baskın hale

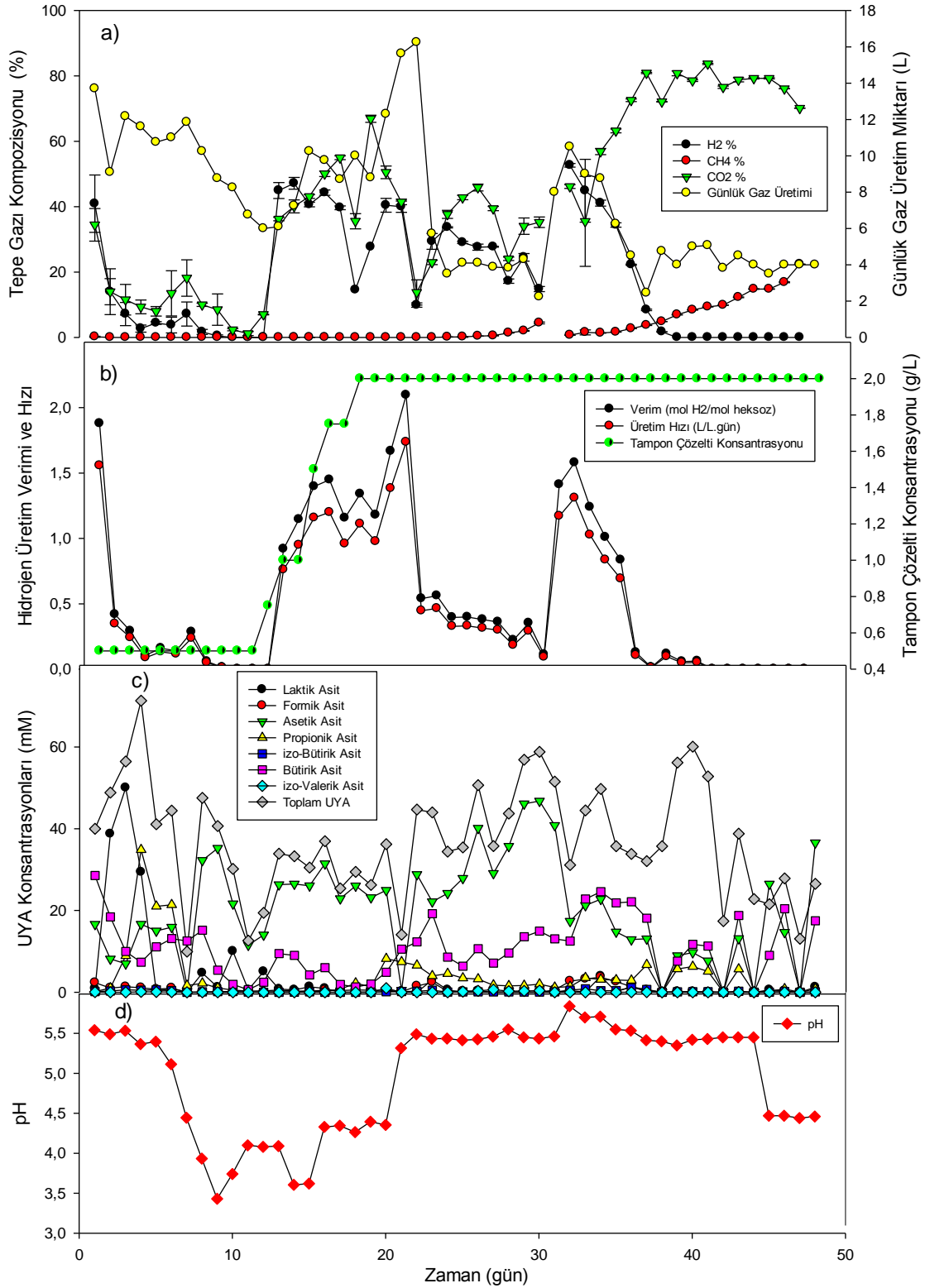
gelmesi ile ilişkilendirilebilir. İleriki kısımlarda bu konuyla ilgili açıklamalara yeniden yer verilecektir.

Birinci işletim süreci sonucunda, AKR'nin işletim pH'sının metanojenleri baskılamak, hidrojen yüzdesini artırmak ve daha kararlı bir işletim elde etmek amacıyla daha uygun olduğu belirlenen pH 5,5'a düşürülmesine karar verilmiştir.

2. İŞLETİM SÜRECİ: pH 5,5, HBS = 36 saat, OYH = 7,5 g KOİ/L.gün koşullarında işletilen AKR çalışması – Alkalinite / pH / KBS etkisi

Isıl işlem uygulanmış yeni aşu çamuru ile yeniden kurulan AKR'nin ikinci işletim sürecine ait tepe gazı kompozisyonu, H₂ üretimi verimi ve hızı, çıkış suyu UYA kompozisyonu, işletim pH değerleri Şekil 4.3'de sunulmuştur. Bu işletim sürecinin ilk gününde, hem tepe gazındaki hidrojen yüzdesi hem de hidrojen üretim veriminde (1. işletim sürecine kıyasla) en yüksek değerler (%41 H₂, 1,88 mol H₂/mol heksoz) gözlenmiştir. Fakat sistem, 1. işletme sürecinde olduğu gibi, bu yüksek H₂ veriminde kararlı halde seyretmemiştir. pH, 5.günden 20.güne kadar, 5,3 ile 3,4 değerleri arasında salınmış, üretilen gazdaki H₂ yüzdesi ve verim değerleri düzenli şekilde düşerek, 2. işletim sürecinin 9.gününde sıfırlanmıştır. İki HBS süresi içinde H₂ veriminin pik değerlerde gerçekleşmesi ve ardından verimin sistematik şekilde azalması, sadece bu çalışmaya özgü olmayıp, 1. işletme sürecinde de gözlenmiştir (Şekil 4.2b).

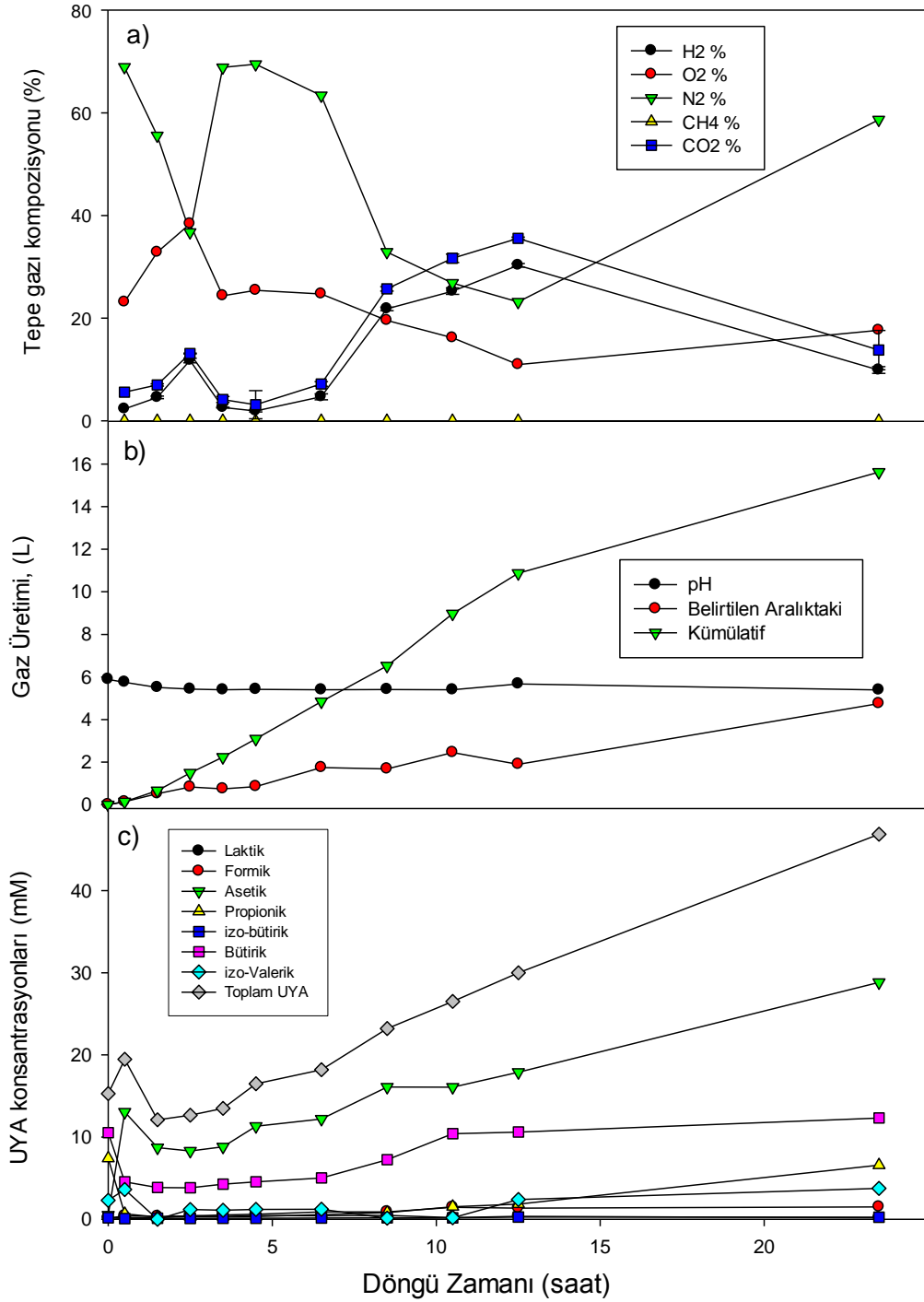
Şekil 4.3d'de görüldüğü üzere, işletimin 9.gününden itibaren pH değerini hedeflenen 5,5 değerine yükseltmek için yapılan müdahalelerin (reaktöre pH-stat ile otomatik olarak NaOH ekimi) yeterli olmadığı anlaşılmıştır. Bunun üzerine besin çözeltisindeki alkalinite (tampon çözelti) derişiminin kademeli olarak artırılmasına karar verilmiştir (Şekil 4.3b). İşletimin 12.gününden itibaren yapılan bu müdahale, sistemin hidrojen yüzdesini ve hidrojen üretim verimini belirgin bir şekilde iyileştirmiştir (H₂ yüzdesi: ~%40, verim 1,2 mol H₂/mol heksoz). Verim ve yüzdelerdeki iyileşme çok dikkat çekici olsa da (Şekil 4.3a ve 4.3b), reaktör içi pH değeri 5,5'ta sabitlenmemiştir. Reaktör içi sabit 5,5 pH değerine, besindeki alkalinite derişimi ancak 4 katına çıkarıldıktan (KH₂PO₄ ve K₂HPO₄ 2 g/L) ve 2 HBS (72 saat) süresince uygulandıktan sonra ulaşılabilmıştır (21.gün, Şekil 4.3d). pH'nın 3,6 ile 5,3 arasında salındığı bu 9 günlük süreçte (12.-21.günler) AKR işletiminde o ana kadar gözlenen en yüksek verim değerleri elde edilmiştir (1,4-2,1 mol H₂/mol heksoz arasında değişen verim). pH'nın 21.günde 5,5'te sabitlenmesi sonrasında, tepe gazı H₂ yüzdeleri 21-29. günler arasında %40-10 arasında salınım göstermiş (ortalama %30); H₂ üretim verimi ise radikal şekilde 0,54'ten 0,11 mol H₂/mol heksoza kadar düşmüştür.



Şekil 4.3. İkinci İşletim sürecinde, a) Tepe gazı kompozisyonu ve günlük toplam gaz üretimi, b) H₂ üretim verimi, hızı ve besin çözeltisindeki tampon çözelti konsantrasyonu, c) Çıkış suyu UYA derişimi, d) Ortalama pH, değerlerinin zamana göre değişimi (HBS: 36 saat; Döngü süresi: 24 saat; OYH: 7,5 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 11,2 g/L; ortalama KBS: 9,8 gün; T: 35°C, pH: 5,5'dan 4,5'a düşürülmüştür)

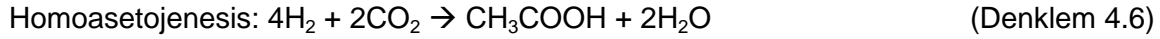
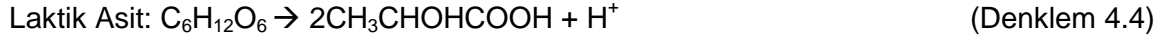
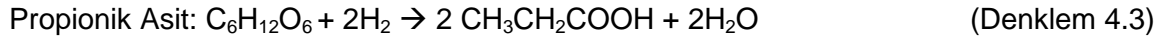
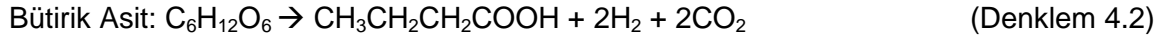
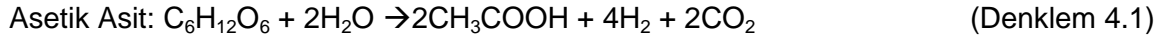
pH, %H₂ ve gaz üretim miktarı gibi değerlerin görece kararlı olduğu 18-23.günler arasında, proe önerisinde yapılacağı belirtilen, kinetik çalışması yapılmıştır. Bu amaçla, 22.günde (22.döngüde), (24 saatlik) reaksiyon periyodu boyunca reaktörden belirli aralıklarla numuneler alınarak analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonuçları Şekil 4.4'te verilmiştir. Şekil 4.4a'da görüldüğü üzere, reaktörde bir döngü süresince metan üretimi gözlenmemektedir. H₂ üretimi 7.saat sonrasında artmakta; UYA üretimi de buna paralel olarak 7.saat sonrasında ivme kazanmaktadır. H₂ yüzdesinin %30'a ulaştığı 12.saat sonrasında, H₂ ve CO₂ yüzdelerinin azalarak döngü sonunda %10-14'e kadar düştüğü belirlenmiştir. Döngünün 12.saatinden itibaren H₂ ve CO₂ yüzdelerinde gözlenen düşüş, ileriki bölümlerde bahsedileceği gibi, H₂ tüketim mekanizmalarıyla özellikle homoasetojenik aktiviteyle ilişkilendirilmiştir. Bu aktiviteye paralel olarak, beklenildiği şekilde, 12.saat sonrasında UYA üretiminin artmaya devam ettiği ve döngü sonunda toplam UYA derişiminin 47 mM'a kadar ulaştığı belirlenmiştir.

Bir asidojenik hidrojen reaktöründe hidrojen üretim ve tüketimi üzerinde etkili olan temel reaksiyonlar aşağıda Denklem 4.1-4.7'de listelenmiştir (Saady, 2013). Kinetik çalışmasında, beklenildiği üzere, üretilen belirgin UYA çeşitleri öncelikle asetik asit, ardından bütirik asittir (Şekil 4.4c, Denklem 4.1 ve 4.2). H₂ üretimini olumsuz etkileyebilecek (Arooj vd., 2008; Guo vd., 2010) laktik asit üretimi bu döngüde gözlenmemiş; propiyonik asit ise döngünün sonuna doğru düşük miktarlarda üretilmiştir (Denklem 4.3 ve 4.4). Sonuç olarak, kinetik çalışması sonucunda, 36 saatlik HBS, 24 saatlik döngü süresi, 7,5 g KOİ/L.gün OYH ve pH 5,5 işletme koşullarındaki AKR'de elde edilen H₂ üretim hızı 0,45 L/L.gün, H₂ üretim verimi 0,54 mol H₂/mol heksoz, toplam UYA üretim hızı 1,3 mM/saat ve üretilen toplam biyogaz ve H₂ hacmi sırasıyla 16,2 L ve 1,6 L'dir. Tepegazı H₂ ve CO₂ yüzdelerinde gözlenen düşüş ve benzer salınım, hidrojen üretim eğiliminin ardından (homoasetojenesis kaynaklı) hidrojen tüketim reaksiyonlarının baskın olması ile ilişkilendirilmiştir. Öte yandan tepegazındaki O₂ ortalama yüzdesi %23 olarak kaydedilmiştir. Tepegazında oksijenin gözlenmesi, ölçüm sırasında oluşabilecek bir hata ve homoasetojenesis kaynaklı tüketim sırasında gaz toplama haznesine dış havanın girmesi ile açıklanabilir. Nitekim, 12.saate kadar H₂-CO₂ üretimi sırasında seyreden tepegazındaki N₂ yüzdesi, 12.saatten sonra H₂-CO₂ tüketim eğrisine paralel şekilde artarak %57'e çıkmıştır. Bu sebeple, hava girişinin-kaçığının olmayacağı ikinci bir kinetik çalışmasının yapılmasına karar verilmiştir.

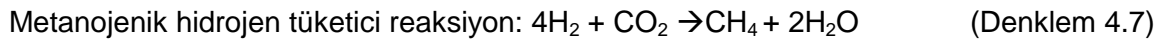


Şekil 4.4. İkinci işletim sürecinin 22.gününde yapılan kinetik çalışmasının sonuçları; a) Tepe gazı kompozisyonu, b) Gaz üretim ve pH, c) Reaktör içi UYA derişimi, değerlerinin zamana bağlı değişimi (HBS: 36 saat; Döngü süresi: 24 saat; OYH: 7,5 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 11,2 g/L; ortalama KBS: 9,8 gün; T: 35°C, pH: 5,5)

Asidojenik ve asetojenik biyoreaksiyonlar:



Metanojenik biyoreaksiyonlar:



İkinci işletme sürecinin 30.gününde reaktörün tabanında çıkan mekanik bir arıza nedeniyle reaktör açılıp boşaltılarak mekanik arıza giderilmiştir (taban kısmı yenilenmiştir); ek hiçbir değişiklik yapılmadan reaktör yeniden işleme hazır hale getirilerek kapatılmış ve tepegazı N₂ ile yıkanarak anaerobik koşulların sağlanmasının ardından işleme devam edilmiştir. Ayrıca, gaz toplama haznesindeki olası her türlü kaçak sorunu giderilmiştir. Reaktördeki mekanik arızanın giderimini takiben, tepe gazındaki H₂ yüzdesi %40-52 aralığına yükselmiş; verim değerleri ise ani bir şekilde artarak 32.günde 1,58 mol H₂/mol heksoza ulaşmıştır (Şekil 4.3a, 4.3b). 32.günü takiben, hidrojen verimi düşse de, 4 döngü (gün) boyunca 0,8-1,3 mol H₂/mol heksoz değerleri elde edilmiştir. Fakat verim 36.gün itibariyle oldukça azalmış; işletimin 41.gününde tamamen sıfırlanmıştır. 32.günden itibaren tepegazında eser miktarda gözlenen metan sürekli bir artışla 41.günde %12'ye yükselmiştir. pH 5,5'da dahi etkin hale gelerek hidrojen üretimini olumsuz etkilediği düşünülen olası hidrojenetrofik metan üretimini engellemek amacıyla, 45.günde pH 4,5'e düşürülmüştür (Şekil 4.3d). Fakat pH'da yapılan bu müdahale sonuç vermemiş, metan yüzdesi artmaya devam etmiştir (Şekil 4.3a). İşletimin 36.günü ve belirgin şekilde 41.günü sonrasında H₂ üretimi yerine sadece CO₂ ve CH₄ üretimi gözlenmesi sebebiyle, hidrojen üreticilerin reaktörden atılmış olabileceği veya inaktive edilerek üretim yollarının homoasetojenesisine (Denklem 4.6) sapsmış olabileceği düşünülmüştür. Homoasetojenesisine ek olarak, metan üreticilerin (Denklem 4.7 ve 4.8) ve %80 gibi yüksek CO₂ değerleri sonucu etanol üreticilerinin (Denklem 4.5) de reaktörde baskın hale gelmesi olasıdır. Değişen mikrobiyel kültürü yeniden hidrojen üreticilere dönüştürmek için, ikinci bir pH müdahalesinin sonuç vermeyeceği belirlenmiştir; çünkü daha düşük pH değerleri alkol üretimi için uygun ortamın oluşmasına yol açmaktadır (Jung vd., 2010). Hidrojen üretiminin başka parametrelerle kontrol altına alındığı ve mikrobiyel kültürün

bu kadar değişmediği koşullarda yeni bir AKR kurulmasına karar verilmiş ve reaktör 48.günde durdurularak 2.ışletim süreci sonlandırılmıştır.

Jung vd. (2010)'a göre hücre içi NADH ve NAD oranları göz önünde bulundurulduğunda pH 4,5 civarında gözlenen asetat-etanol tipi fermantasyon, pH 5-7 arasında gözlenen asetat-bütirat ya da asetat-propionat tipi fermantasyonlardan daha stabildir. Dolayısıyla, gerek birinci gerekse 2.ışletme sürecinde reaktör içi pH değerlerinin, hedeflenen değerlerden (sırasıyla 7 ve 5,5) daha düşük değerlere düşmesi eğilimi, mikrobiyel kültürün daha stabil olan fermantasyon tipine kaymaya çalışması ile açıklanabilir (Şekil 4.2d, 4.3d). Ayrıca, baskın olan fermantasyon tipine göre de, pH değişimi olmaktadır. Örneğin, laktik asit üretimi (Denklem 4.4) sırasında, üretilen H^+ ATP üretimi sırasında absorplanmasına rağmen, genel reaksiyonda H^+ miktarı artar ve bu durum ortam pH'sının düşmesine neden olmaktadır (Şekil 4.3c ve 4.3d). Laktik asit bakterilerinin düşük pH değerlerini ($pH < 5$) tolere edebildiği ve düşük pH'ya aklime olabildiği bilinmektedir (Adamberg vd., 2003).

Şekil 4.3c'den takip edilebileceği gibi spesifik UYA kompozisyonları ve derişimleri ışletim süresince dikkat çekici şekilde dalgalanmaktadır. ışletimin ilk günlerinde laktik ve propiyonik asitler oldukça yüksek (laktik asit maksimum 50 mM, propionik asit maksimum 35 mM) değerlere ulaşmış, ilerleyen günlerde azalarak sırasıyla 5. ve 7.günlerde sonlanmıştır. Bu iki asidin üretiminin karanlık fermantasyon sırasında H_2 verimi üzerindeki negatif etkisi bilinmektedir (Arooj vd., 2008; Guo vd., 2010). Nitekim, ışletimin 2.gününden itibaren hidrojen veriminde / üretiminde yaşanan ani düşüş, bu asitlerin 2-7.günler arasındaki üretimi ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 4.3b ve 4.3c). Daha önce belirtildiği üzere, H_2 üretimini artırmak amacıyla ışletimin 12.günü itibariyle alkalinitenin kademeli artırılmasını takiben hidrojen üretim hızı ve verimi de kademeli olarak artmıştır. Bu durum, laktik ve propiyonik asit üretiminin (ve üreticilerinin) ortamda baskın hale gelememesi ile açıklanmıştır (Şekil 4.3). Nitekim, bu süreçte (13-20.günler arasında) laktik ve propiyonik asit derişimleri neredeyse hiç üretilmezken; hidrojen verimi 0,9'dan 1,7 mol H_2 /mol heksoz'a kademeli olarak artmıştır. ışletimin 20.günü itibariyle propiyonik asit yeniden üretilmeye başlamış (yaklaşık 9 mM) ve geciken bir etki ile verim değerlerinin düşmesinde rol oynamıştır (Şekil 4.3b, 4.3c). Denklem 4.3'te görülebileceği gibi propiyonik asit üretilirken hidrojen tüketildiğinden bu asidin üretimi H_2 verimini negatif etkilemektedir. ışletimin 22.-30.günleri arasında hidrojen üretim veriminin kademeli olarak düşmesi, propiyonik asit üretimine ek olarak, homoasetojenesis (Denklem 4.6) kaynaklı da olabilir. ışletimin 20.-21.günlerinde tepegazı H_2 yüzdesi %40 civarındadır. Homoasetojenesis, karanlık fermantasyon sırasında sistemde herhangi bir stres koşulu olduğunda gözlenebilmektedir (Saady, 2013). Yüksek hidrojen kısmi basıncının (>500 Pa) homoasetojenik aktiviteyi (Denklem 4.6) arttırdığı da bilinmektedir (Demirel ve Scherer,

2008). Dolayısıyla, yüksek H_2 yüzdesi (ve kısmi basıncı) sistemde homoasetojenesisi tetiklemiş olabilir. Nitekim, 22.-30.günlerde hidrojen üretim verimi ve yüzdesi kademeli olarak düşerken, H_2 ve CO_2 paralel bir eğilim izlemeyerek CO_2 yüzdesi artmakta ve UYA derişimleri (özellikle asetik asit; 29 mM'den 47 mM'a) artmaktadır (Denklem 4.6).

Daha önce belirtildiği üzere, 30.günde reaktörde yapılan mekanik değişiklik nedeniyle reaktörün açılması sistemde ikinci üretim atağına (31. ve 32.günler) neden olmuştur. Hiçbir kimyasal ya da işletimsel değişiklik olmadan gelişen bu iyileşme durumuna, sistemdeki H_2 kısmi basıncının ve çözülmüş H_2 derişiminin düşmesi ile H_2 kaynaklı olası inhibisyon etkisinin azalmasının neden olduğu düşünölmektedir. Nitekim, reaktörde yeniden anaerobik koşulların elde edilmesi amacıyla reaktör içi N_2 gazı ile havalandırılarak çözünen hidrojenin uçurulması sağlanmıştır. Bilindiği üzere, reaktör içeriğinin / tepegazının belirli aralıklarla yıkanması, hidrojen kaynaklı inhibisyondan kurtulmak amacıyla başvurulmuş bir yöntemdir (Hussy vd., 2003; Kraemer ve Bagley, 2008). İşletimin 32.gününi takiben hidrojen üretim verimi / hızı ve yüzdeleri azalmaya başlamıştır. Özellikle 35.günden sonra H_2 üretim veriminin ciddi şekilde düşmesi ve sonrasında sistemin tamamen metan üreten bir sisteme dönüşmesinin öncelikle homoasetojenik aktivitenin yeniden baskın hale gelmesi sonucu olduğu düşünölmektedir. İşletimin 32.gününde elde edilen yüksek H_2 yüzdesi (ve kısmi basıncı) sistemde homoasetojenesisi aynı şekilde tetiklemiş olabilir. Bu günü takiben, hidrojen yüzdesi azalırken, CO_2 yüzdesi artmaktadır. Bu durum, Denklem 4.6'da belirtildiği üzere, H_2 ve CO_2 'nin eşit ağırlıkta tüketilmemesi sonucu olabilir. Buna ek olarak, hidrojenetrofik metan üretimi (Denklem 4.7) de H_2 ve CO_2 'nin eşit ağırlıkta tüketilmemesine yol açmaktadır. Hidrojenetrofik metan üretimi, tepegazında gözlenen CH_4 yüzdesini de açıklamaktadır. Homoasetojenesis gerçekleşirken asetik asit derişiminin (işletimin 22.-30.günleri arasında gözlenenin aksine) artmaması ise, asetik asit tüketen ve CH_4 ve CO_2 üreten metanojenesis varlığı (asetoklastik metanojenik reaksiyon, Denklem 4.8) ile açıklanabilir. Yüksek CO_2 yüzdeleri (%70-80) etanol reaksiyonunun da gerçekleşmesi ile ilişkilendirilebilir (Denklem 4.5). Etanol üretiminin daha düşük pH'larda ($pH \leq 4,5$) etkin olduğu dikkate alındığında (Van Ginkel ve Logan, 2005b), pH 5,5'ta da etkin olabilen etanol üreticilerin araştırılması ve etanol analizlerinin yapılması gerekmektedir.

Proje önerisinin iş-zaman çizelgesine göre daha önce gerçekleştirilen İş Paketi 6'da (Bölüm 7), orijinal atıkla (melasla) çalışılan kesikli karanlık fermantasyon deneyinde homoasetojenik aktivitesi olasılığından bahsedilmiştir. Homoasetojenik aktivitenin sürekli reaktörlerde de çok etkin bir reaksiyon olduğu daha önce pekçok çalışmada belirtilmiştir (Saady, 2013). Homoasetojenik aktivite, miktar olarak pekçok çalışmada küçümsense de, hidrojen üretim sistemlerinde simultane ve sürekli şekilde gerçekleşmektedir ve elde edilen toplam H_2

veriminde negatif bir rol oynamaktadır (Saady, 2013). Dinamarca vd. (2012) de homoasetojenik hidrojen tüketim hızının kesikli kültürlerde 4 ile 62 mmol H₂/L_{kültür}·gün arasında değişebileceğini ve asetik asit derişiminden, hidrojen kısmi basıncından, kültür tipinden ve yükleme hızından etkilenebileceğini belirtmiştir. Ayrıca, McInery ve Bryant (1981) de, metanojenik aktivitenin inhibe edilmesinin homoasetojenik ya da solventojenik aktiviteyi tetiklediğini belirtmiştir. Nitekim, karanlık fermantasyon çalışmalarında, metanojen aktiviteyi inhibe etmek amacıyla ısı işlem uygulanan aşu çamuru kullanılmıştır. Sonuç olarak, 2. İşletim sürecinin belirtilen dönemlerinde, ve olası gerekçelerle, homoasetojenik aktivitenin (görünür) kararlı koşulların sağlanmasında hidrojen üretimini negatif etkilediği ve görünür hidrojen verimi değerlerinde önemli bir etkisi olduğu düşünülmektedir.

Hidrojen verimini etkileyen ve karanlık fermantasyonun en önemli problemlerinden biri olan homoasetojenik aktivitenin etkinlik derecesini belirlemek için pekçok değişik yaklaşım denenmiştir. Arooj vd. (2008)'in kullandığı yaklaşım oldukça temel bir yaklaşımdır: burada homoasetojenesis sonucu üretilen asetik asit miktarı, homoasetojenesis ve asidojenesis sonucu üretilen toplam asetik asit miktarına oranlanmakta; homoasetojenik aktivitenin yüzde etkisi asetik asit bazında hesaplanmaktadır. Arooj vd. (2008)'in önerdiği bu yaklaşım, homoasetojenesis sonucu üretilen hidrojen miktarındaki etkinin birebir hesaplamasına olanak vermese de etkisi bazında görece fikir verebilecek niteliktedir. EK-H'de bu yaklaşımda kullanılan varsayımlar, oluşturulan denklemler ve örnek hesaplama verilmiştir. AKR 2. İşletim süreci için, bu yaklaşım kullanılarak gerçekleştirilen olası homoasetojenik aktivite hesapları Tablo EK-H1'den takip edilebilir (EK-H). Buna göre, 2. İşletim sürecinde, özellikle, en yüksek hidrojen veriminin gözlemlendiği günlerden (20.-21.gün; 31.-32.günler) hemen sonraki ilk 3-5 gün arasında homoasetojenesisin yüksek miktarda (>%40) olduğu takip edilebilir. Reaktörde ikinci etkin homoasetojenesis süreci olarak belirlenen 32.gün sonrasında ise, 36.-41.günler arasında bu etkinin %72'ye ulaştığı hesaplanmıştır (Tablo EK-H1).

Katı Bekleme Süresi (KBS) çamur yaşını belirten önemli bir işletim parametresidir (Denklem 4.9) ve reaktörde tutulan mikrobiyel grubun belirlenmesinde etkin bir parametre olacağı bilinmektedir. Örneğin, yüksek KBS'lerin (15-20 gün gibi) metanojenleri ve başka hidrojen tüketicileri desteklediği bilinmektedir (Saady, 2013). Fakat karanlık fermentatif hidrojen üretiminde, mezofilik ortamda ve AKR'de spesifik olarak KBS etkisinin araştırıldığı yalnızca bir araştırmaya rastlanmıştır (Kim vd., 2008). Kim vd. (2008) 5,25 gün gibi düşük KBS değerlerinin karanlık fermantasyonla hidrojen üretimi için uygun olduğunu belirtmektedir. Fakat bu düşük KBS'ler sübstrat kullanma verimi, aktif biyokütle korunumu gibi işletim parametrelerinin azalmasına sebep olabilmektedir. Arooj vd. (2007) ise, KBS'nin atılan çamur miktarından etkilenmesi durumunu ve baskınlaşan türlerin olası değişimini değerlendirerek,

çökebilirliği az olan mikroorganizmaların kolay çökenlere oranla daha yüksek spesifik H₂ üretimine ulaşabildikleri sonucuna ulaşmıştır. Yüksek KBS'lerin düşük verimlerle ilintilenmesi sonucunu da, bu farklılıkla ilişkilendirmiştir. Öte yandan, yüksek KBS'lere sahip immobilize kültürlerle yapılan termofilik karanlık fermentatif hidrojen çalışmasında, üretilen hidrojen miktarının, 8 kat daha büyük hacimdeki tam karışmalı tank reaktörden (CSTR) elde edilen hidrojen hacminden 5 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir (Keskin vd., 2012). Ayrıca, immobilize hidrojen kültürlerinin CSTR kültürlerine kıyasla yüksek OYH değerlerine çok daha dayanıklı olduğu ifade edilmiştir. KBS ve verim karşılaştırmasındaki bu iki farklı yorum, çalışılan ortam koşullarına (sıcaklık, KBS, OYH, besin özellikleri, reaktör tipi, vb.) göre, desteklenen ve reaktörde tutulan hidrojen üreticilerinin farklı özelliklere sahip olması ile açıklanabilir. Nitekim, peynir altı suyundan termofilik karanlık fermentatif hidrojen üretiminin - çamur döngüsünün olmadığı- CSTR çalışmasında, 40 g/L giriş KOİ değerinde HBS (KBS) değerinin 3,5 günden 1 güne düşürülmesinin hidrojen üretim verimini 22'den 5 mmol/g KOİ'ye düşürdüğü belirtilmiştir (Azbar vd., 2009a). KBS (HBS)'nin 1 günde sabit tutulduğu koşullarda, 47, 35 ve 21 g KOİ/L.gün OYH uygulamasında ise sırasıyla 3, 9 ve 6 mmol/g KOİ verimleri elde edilmiştir. Bunlara ek olarak, 1 gün gibi düşük bekletme süresinin hidrojen üretim hızını artırdığı da belirtilmiştir. Buğday nişastasından (10 g/L) hidrojen üretiminin (30°C) araştırıldığı bir diğer çalışmada, günlük besleme çıkarma yöntemi ile 6-60 saatlik HBS (KBS) değerlerinin etkisi çalışılmış; en yüksek hidrojen üretim hızının (280 mL/gün), hacimsel günlük hidrojen üretim hızının (verimliliğinin; 1857 mL/L.gün) ve UYA üretiminin en düşük HBS (KBS) olan 6 saatte (en yüksek OYH: 5,52 g/gün) elde edildiği belirtilmiştir (Ozmihci ve Kargi, 2011). En yüksek verim ise, 1,38 g/gün OYH'de edilmiştir.

Denklem (4.9)

$$KBS \text{ (gün)} = \frac{\text{(Etkin Hacim, } L * UAKM_{rxr \text{ içi}})}{\text{(Ver değiştiren hacim, } L * UAKM_{gikış} + \text{Reaktörden atılan numune hacmi, } l * UAKM_{rxr \text{ içi}})}$$

Daha önce belirtildiği üzere, AKR işletimlerinde tasarım parametresi olarak HBS alınmış ve bu sebeple ikinci işletim sürecinde de KBS'nin sabit kalması için özel bir çaba harcanmamıştır. Fakat reaktör içi UAKM ve reaktörden atılan UAKM derişimi analiz edilerek zamana karşı KBS değişimi takip edilmiştir (veriler sunulmamıştır). Buna göre, H₂ üretim veriminin yüksek olduğu (0,2-1,88 mol H₂ /mol heksoz) ilk 8 günde ortalama KBS değeri 6,8 gün olurken, düşük verimin gözleendiği (0,014-0,059 mol H₂/mol heksoz) 8-13.günler arasında ortalama KBS 17,8 gün olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla, yüksek KBS değerlerinde (>15

gün) hidrojen üreticilerden başka mikroorganizmaların da büyümesi için uygun ortam koşullarının oluştuğu ve hidrojen üretiminin negatif etkilendiği düşünülmüştür. Nitekim, metanojenlerin gelişmesi için 15 gün KBS değerinin optimum olduğu bilinmektedir (Speece, 1996). KBS değerinin, 8.-13.günlerde 15 gün civarında seyretmesinin metanojenleri aktive ettiği düşünülmektedir. Alkalinite (tampon çözelti) derişiminin artırılması ve pH düşüşünün kontrol edilebilir hale gelmesiyle, hidrojen üreticilerinin yeniden güçlenmesi sağlandığında; reaktörden döngü sonunda ciddi bir miktar çamurun (doğal olarak) atıldığı belirlenmiştir. Bu durumda reaktör KBS'si hemen 8-9 güne düşmüş ve hidrojen üretimi olan belirli günler boyunca (13.-30.günler) işletim bu KBS değerinde devam etmiştir. Bu nedenle, bu gözlemden sonra işletim KBS değerinin 8-9 gün değerinde kalması sağlanmaya çalışılmıştır. Bu KBS değerinin (8-9 gün) hidrojen üreticilerin performansını olumlu ve belirgin şekilde etkilediği düşünülmektedir. Öte yandan, 8-9 günlük KBS homoasetojenlerin ortamdaki atılması için yeterli olmamıştır. Nitekim, homoasetojenesis gözlenmeye devam etmiştir. Bu durum, stabil ve uzun süreli hidrojen üretim verimine engel oluşturmaktadır. Hidrojenle büyüyen homoasetojenler, asidojenler ve asetojenler ile aynı biyokütle üretim verimine (biomass yield) (0,07 kg KOİ/kg KOİ) sahiptir (Ni vd., 2011). Fakat homoasetojenlerin ölüm hızları (decay rate) (0,015 gün⁻¹), asidojen ve asetojenlerin ölüm hızlarından (0,02 gün⁻¹) daha düşüktür ve yüksek KBS'de hidrojen üreticilere (asidojenler gibi) kıyasla daha fazla avantaja sahiptirler (Ni vd., 2011). Homoasetojenlerle metanojenler arasında bir rekabet olmayışı, yüksek H₂ derişimi ve homoasetojenlerin hızlı büyüebilmesi (doubling time: 1,75-29 saat), homoasetojenlerin kesikli işletimlerin ileri aşamalarında ve yüksek HBS'li sürekli sistemlerde baskınlaşabilmesine olanak sağlamaktadır (Saady, 2013). Tüm bu veriler AKR sisteminde yukarıda tartışılan homoasetojenik aktivitenin baskınlaşması spekülasyonunu güçlendirir niteliktedir. Sonuç olarak, birçok AKR-H₂ üretimi çalışmasında KBS değerine özel bir önem atfedilmese de (Chen vd., 2009; Won ve Lau, 2011; Wu vd., 2013), KBS'nin baskın mikroorganizma türünü destekleyecek ve metanojen vb. mikroorganizmaların büyümesini engelleyecek şekilde değiştirilmesi gerekmektedir. Bu bilgiler ışığında çalışmanın ileriki aşamalarında, KBS'nin azaltılması ve operasyona etkisinin incelenmesi planlanmıştır.

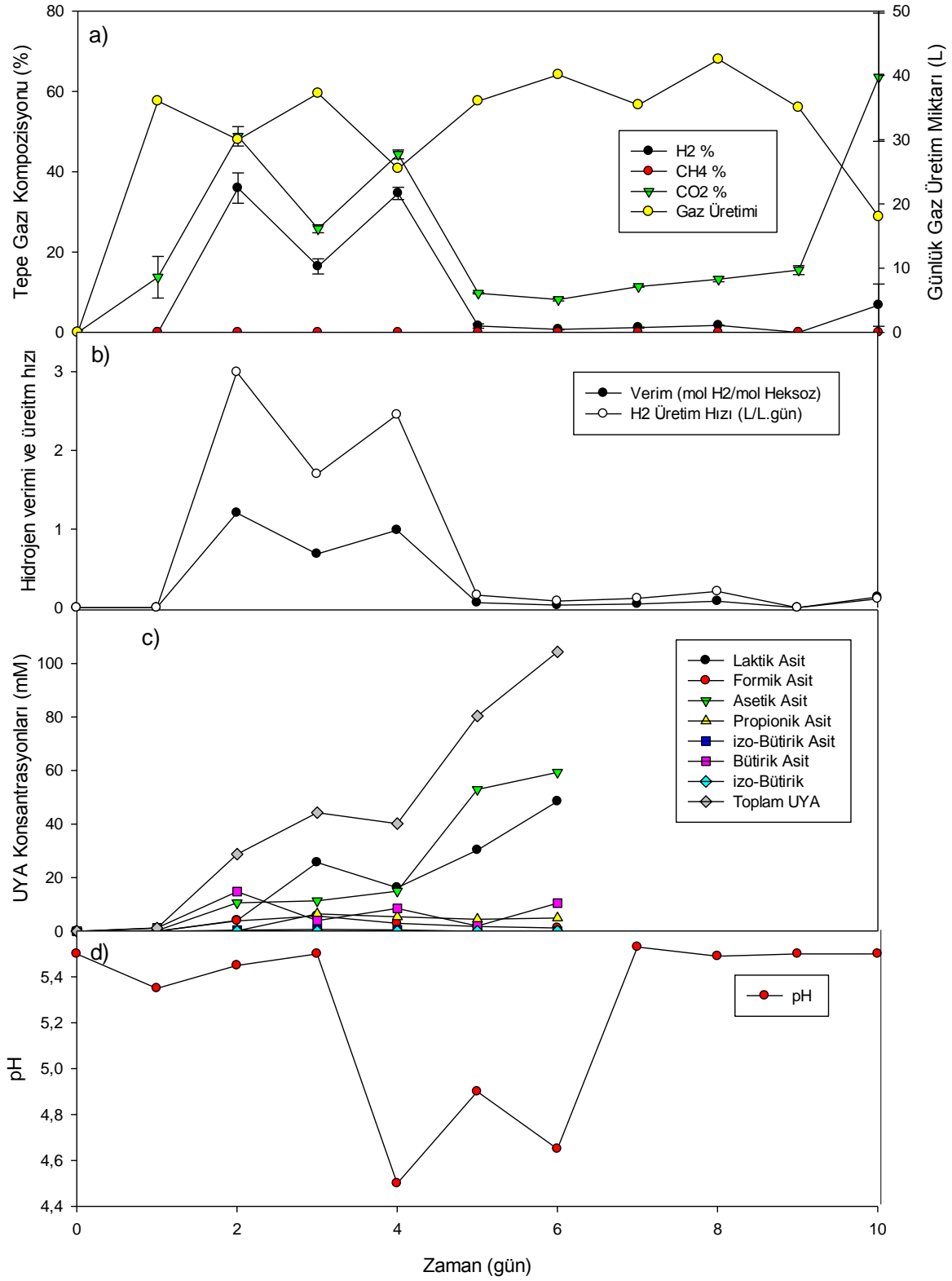
Tablo 4.2'de sunulan literatür taraması ve işletim sırasında edinilen gözlemlerin karşılaştırılması sonucu daha kararlı bir hidrojen üretimi için değişiklik yapılması gereken parametrelere karar verilmiştir. Yukarıda belirtildiği üzere, KBS değerinin de önemli bir parametre olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, Tablo 4.2'de görüldüğü gibi, optimum HBS değeri her çalışma ve dolayısıyla işletme koşulu için farklılık göstermektedir. Fakat elde edilen genel sonuç, 36 saatlik HBS'nin, çalışılan kültür ve sübstrat özelinde, karanlık fermentasyonla H₂ üretiminde uzun bir süre olabileceğidir. Ayrıca, yukarıda bahsedildiği üzere, homoasetojenler kesikli işletimlerin ileri aşamalarında ve yüksek HBS'li sürekli

sistemlerde baskınlaşabilmektedir (Saady, 2013). Bu nedenle, öncelikli araştırılması gereken parametre olarak HBS belirlenmiştir. HBS'nin literatür değerleri dikkate alınarak 12 saate düşürülmesine karar verilmiştir. Nitekim, HBS'nin kademeli olarak düşürülmesi ve hidrojen üretimine etkisinin belirlenmesi proje önerisinde sunulan bir araştırma başlığıdır. Daha düşük bir HBS değerinin metanojenleri baskılamak açısından da daha etkili olacağı düşünülmektedir. Çünkü düşük pH değerlerinin (pH 5,5) bunu sağlamakta tek başına başarılı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.3a ve 4.3d). Düşük pH ve yüksek UYA'ya dayanıklı bir metanojen türünün, reaktör homoasetojenesis etkisine girdikten sonra, baskın / etkin hale geldiği düşünülmektedir. Bu baskın / etkin türler arasındaki geçiş, çamur görünümünde de çok belirgin değişikliklere neden olmaktadır. KBS değerinin etkisi, uygun HBS değeri ve etkisi belirlendikten sonra araştırılacaktır.

3. İŞLETİM SÜRECİ: pH 5,5, HBS = 12 saat, OYH = 22,4 g KOİ/L.gün koşullarında işletilen AKR çalışması- İşletim KBS değerinin belirlenmesi

Önceki işletim süreçlerindeki gibi, ısıtma işlemi uygulanmış yeni çamurla başlatılan 3.İşletme sürecinde HBS süresi 12 saate düşürülmüş, buna bağlı olarak döngü süresi 8 saate azaltılmış, organik yükleme hızı (OYH) da 3 katına çıkartılarak 22,4 g KOİ/L_{rxr}.gün'de uygulanmıştır. Deneysel sonuçlar Şekil 4.5'de verilmiştir.

Bu işletim sürecinde, pH, 2.İşletim sürecindeki gibi 5,5'ta sabit tutulmaya çalışılmıştır (Şekil 4.5d). Bu şartlarda işletilmeye başlanan reaktörün döngü başına toplam biogaz üretimi dramatik şekilde artmıştır. On günlük işletim boyunca döngü başına üretilen biogaz miktarı 10-15 L arasında (günlük yaklaşık 30 L, Şekil 4.5a) değişmiştir. Fakat işletimin 4.gününde baz pompasında yaşanan arıza sonucu pH, 12 saat boyunca kontrol edilememiş ve ortam pH değeri 3,2'ye kadar düşmüştür. Baz pompasında yaşanan bu sorun öncesinde tepe gazı H₂ yüzdesi %35 civarında iken, pH düşüşü ile %1'e kadar gerilemiştir (Şekil 4.5a). pH yeniden kontrol edilip reaktör içi pH değeri 5,5'a yükseltirse de H₂ yüzdelerinde iyileşme olmamıştır. Bu durum hidrojen üreticilerin pH 4'ten düşük değerlerde inaktive olması ile ilişkilendirilmiştir (Saady, 2013). Buna ek olarak, yine birinci ve ikinci işletim süreçlerinde olduğu gibi sistemde düşük pH'a dayanıklı homoasetojenesis kaynaklı H₂ tüketici türlerin seçilmesi / etkin hale gelmesi de olasıdır. Bu nedenlerle, reaktör işletimin 10.gününde durdurulmuştur.



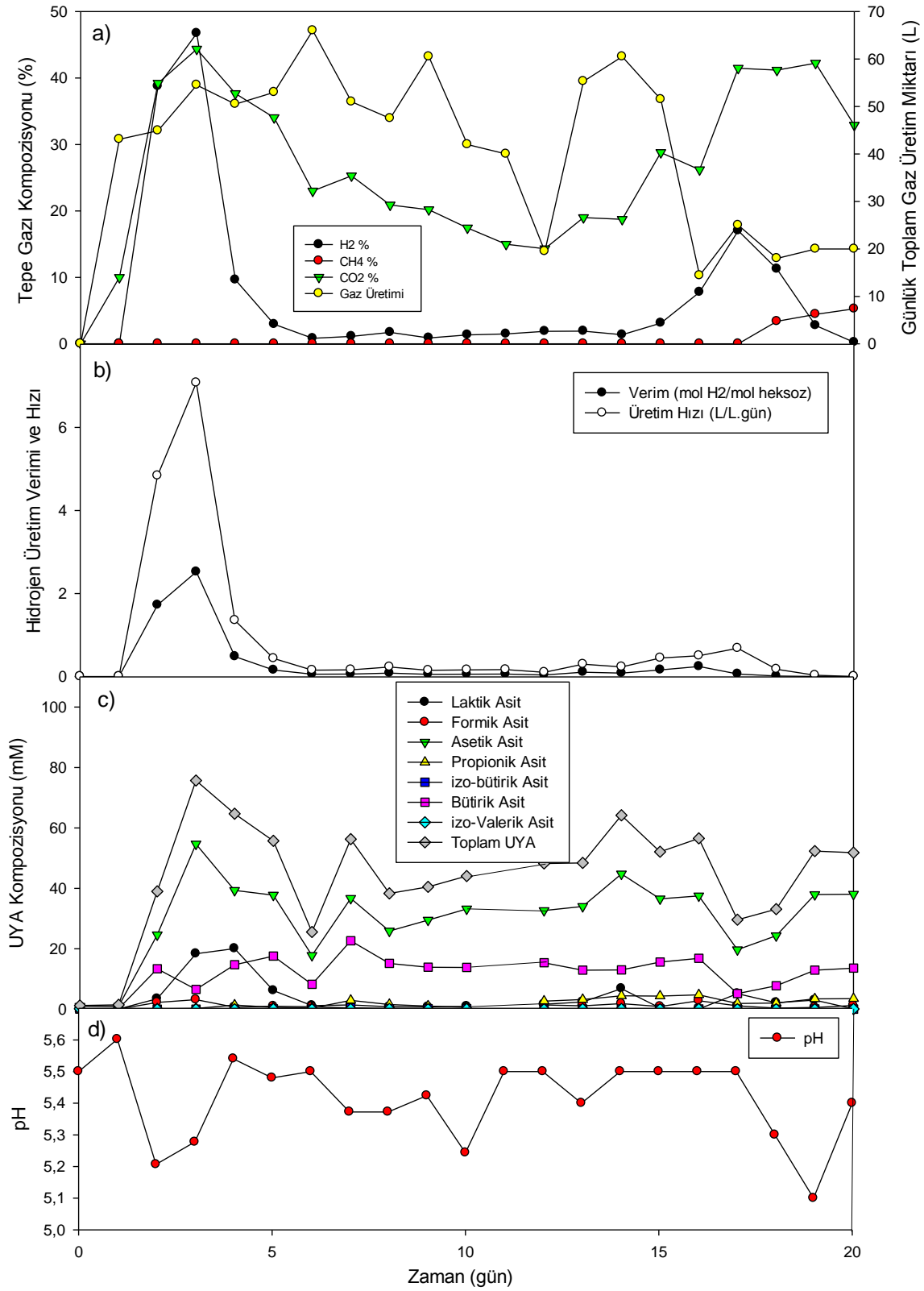
Şekil 4.5. Üçüncü İşletim sürecinde, a) Tepe gazı kompozisyonu ve günlük toplam gaz üretimi, b) H₂ üretim verimi ve hızı, c) Çıkış suyu UYA derişimi, d) Ortalama pH, değerlerinin zamana göre değişimi (HBS: 12 saat; Döngü süresi: 8 saat; OYH: 22,4 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 11,2 g/L; ortalama KBS: 10,3 gün; T: 35°C, pH: 5,5)

Üçüncü işletme süresince hiçbir ölçümde metana rastlanmamıştır. Bu işletim sonucunda, yaşanan mekanik sorun sebebiyle işletim süreci kısa bir sürede tamamlandığı için, HBS'nin sistemin kararlılığı üzerinde ne derece etkin olduğunu belirleyebilecek bir veri toplanamamıştır. Öte yandan, HBS'nin üretilen toplam gaz ve hidrojen üretim verimi üzerinde etkin olduğu belirlenmiştir. Veriler ve daha önceki deneysel süreçler, 36 saate göre 12 saatlik HBS'nin daha yüksek miktarda gaz üretimi ve hidrojen yüzdesi sebebiyle daha uygun olduğunu göstermiştir. Ayrıca 12 saat HBS'de çalışılmasının metanojenleri baskılama konusunda da pH 5,5 ile sağlanamayan şekilde etkili olduğu belirlenmiştir.

4. İŞLETİM SÜRECİ: pH 5,5, HBS = 12 saat, OYH = 22,4 g KOİ/L.gün koşullarında işletilen AKR çalışması – Homoasetojenesis artışının gözlenmesi ve KBS etkisinin değerlendirilmesi

Isıl işlem uygulanmış yeni çamurla başlatılan 4. İşletme sürecinde işletim koşulları (HBS, döngü süresi, OYH bazında) 3. İşletme sürecindeki gibi korunmuştur. Farklı olarak, reaktör içi çamuru belli aralıklarla atılarak, reaktör içi UAKM derişiminin korunumu ile KBS 8-9 günde sabit tutulmaya çalışılmıştır. Dördüncü işletme sürecinde elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da sunulmuştur.

Dördüncü işletme sürecinde, AKR çalışmalarında bu ana kadar gözlenen en yüksek gaz üretim miktarları (bir döngüde 22 L biyogaz, 8,5 L H₂; günlük 66 L biyogaz, 25,5 L H₂) elde edilmiştir (Şekil 4.6a). Bu işletimde de tepe gazındaki H₂ yüzdesi ve hidrojen üretim verimi 48 saat içinde en yüksek noktaya (%47 ve 2,52 mol H₂/mol heksoz verim) ulaşmış ve hemen ardından yine radikal şekilde düşmeye başlamıştır. Önceki işletim süreçlerinden edinilen bilgilerle KBS süresi 8-9 gün civarında sabitlenmeye çalışılmıştır. Bu işletimin 7.gününden itibaren (günlük 300 mL) çökelmiş çamurdan atılarak reaktör içi UAKM derişimi ve çamur yaşı düşük tutulmaya çalışılmıştır. Buna rağmen sistemin istenen KBS'de işletilebilmesi ancak 11.günden sonra gerçekleşebilmiştir. KBS değerini sabit tutmak için yapılan çamur atımı sayesinde, H₂ üretimi önceki işletimlerde gözlenenin aksine tamamen sonlanmamıştır. Hatta 14.günden sonra bir miktar artış göstererek verim 18.günde 0,24 mol H₂/mol heksoza, H₂ yüzdesi de %17'ye yükselmiştir (Şekil 4.6a ve 4.6b).



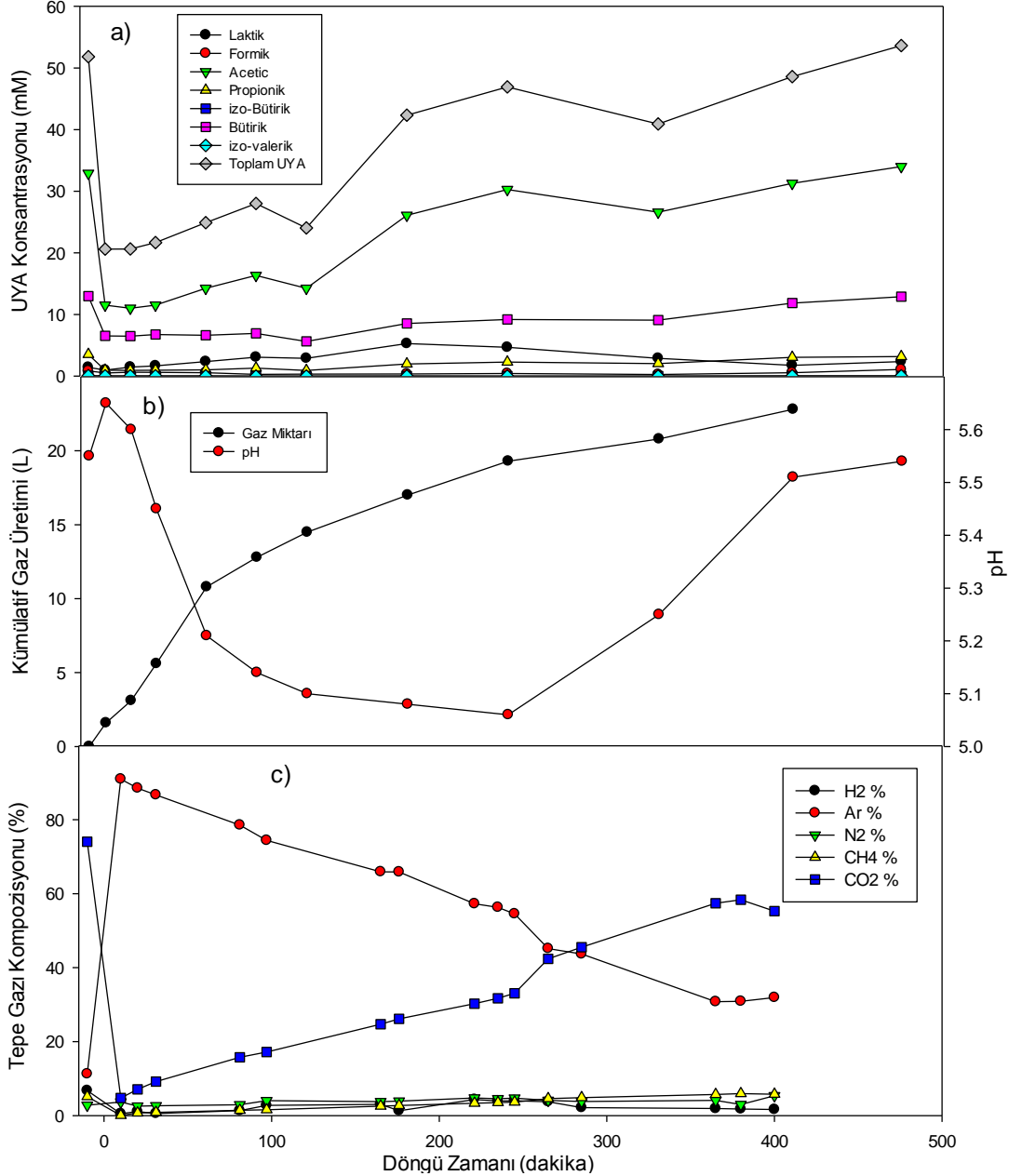
Şekil 4.6. Dördüncü İşletim sürecinde, a) Tepe gazı kompozisyonu ve günlük toplam gaz üretimi, b) H₂ üretim verimi ve hızı, c) Çıkış suyu UYA derişimi, d) ortalama pH, değeriinin zamana göre değışimi (HBS: 12 saat; Döngü süresi: 8 saat; OYH: 22,4 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 11,2 g/L; ortalama KBS: 9,5 gün; T: 35°C, pH: 5,5)

Şekil 4.6b, tüm işletim süreçleri için hidrojen üretim mekanizmasının ilerleyişini özetler niteliktedir: reaktör ısıl ön-işlemi uygulanmış taze kültür ile başlatıldığında sistem maksimum hidrojen üretim verimi göstermekte fakat hemen sonrasında, yüksek kısmi basınç olasılıklı hidrojen tüketiciler aktive olmakta ve hidrojen üretim verimi geri dönülmeyecek şekilde düşmektedir. Verim değerlerindeki bu değişim başka araştırmacılar tarafından da gözlenmiş ve sunulmuştur (Arooj vd., 2007; Dinarmarca ve Bakke, 2009; Badiei vd., 2011). Dördüncü işletim sürecinde, genelde elde edilenden farklı olarak, yukarıda bahsedildiği üzere, KBS'nin 8-9 gün arasında sabitlenmeye çalışılması sebebiyle reaktörden çamur atıldığı için, hidrojen üretimi tamamiyle sıfırlanmamıştır (Şekil 4.6a).

HBS değeri 12 saat olan 4.İşletme sürecinde de bir kinetik çalışması yapılmıştır. Bu sebeple, pH, H₂ yüzdesi, üretim miktarı gibi değerlerin görece kararlı olduğu günler esas alınarak (6-17.günler), 13.günde (37.döngüde) reaksiyon periyodu boyunca zamana karşı numuneler alınmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.7'de kinetik çalışmasının sonuçları sunulmuştur.

Şekil 4.7c'de tepegazında argon görünmektedir. Bunun sebebi, reaktörden bir sızıntı veya reaktöre herhangi bir hava girişinin olup olmadığını anlamak için, tepegazının inert bir gazla döngü öncesinde yıkanmış olmasıdır. Şekil 4.7c'de argon gazının reaktörde biyogaz üretildikçe seyreltiği ve dolayısıyla döngü süresince giderek azaldığı (%91'den 31'e) görülmektedir. N₂'de herhangi bir artış olmaması (%2,5-4 arasında sabit değerler) sistemde bir kaçak olmadığını da göstermektedir. CH₄ üretimi, döngü sonunda ancak %6'lık bir derişime ulaşmıştır. H₂ üretimi genelde düşük bir yüzdede seyretmiştir. Fakat tepegazı H₂ yüzdesinin 100.dakika ve sonrasında ivme kazandığı (%3,04 100.dakika; %4,4 220.dakika); yaklaşık 280.dakikadan sonra ise azalarak döngü sonunda %1,6'ya gerilediği gözlenmiştir. UYA üretimi, özellikle asetik asit ise, 3 aşamada ivmelenmiştir. Şekil 4.7a'da görüldüğü üzere, reaksiyon periyodunun başında asetik asit (toplam UYA) derişiminde gözlenen hafif artış, yaklaşık 100.dakidada H₂ üretimindeki artışa eş zamanda ivmelenmiştir. Asetik asit derişiminde, 300.dakika sonrasında gözlenen ikinci belirgin artış, H₂ tüketimine eş zamanlı olarak homoasetojenesis kaynaklı asetik asit üretimi olabilir. Döngü sonunda toplam UYA derişiminin 53 mM'a kadar ulaştığı belirlenmiştir (Şekil 4.7a). Şekil 4.7a ve 4.7b birlikte incelendiğinde toplam UYA derişimindeki artışın, pH'ı düşüren etkisi görülmektedir. pH, pH stat'ın otomatik müdahalesi ile yeniden yükselirken (200-400. dakikalar arası) homoasetojenik aktivitenin de artışıyla, CO₂ yüzdesi de hızlanarak artmıştır. Üretilen belirgin UYA çeşitleri, beklenildiği üzere, öncelikle asetik asit, ardından bütirik asittir. H₂ üretimini olumsuz etkileyebilecek laktik asit üretimi bu döngüde düşük seviyelerde (1-5 mM)

gözlenmiş; propiyonik asit üretimi ise döngünün sonunda maksimum 3 mM değerine ulaşabilmiştir. Sonuç olarak, kinetik çalışması sonucunda, 12 saatlik HBS, 8 saatlik döngü süresi, 22,4 g KOİ/L.gün OYH ve pH 5,5 işletme koşullarındaki AKR'de elde edilen H₂ üretim hızı 0,3 L/L.gün, H₂ üretim verimi 0,105 mol H₂/mol heksoz, toplam UYA üretim hızı 4,12 mM/saat ve üretilen toplam biyogaz ve H₂ hacmi sırasıyla 55 ve 1,1 L'dir.



Şekil 4.7. Dördüncü işletim sürecinin 13.gününde (pH 5,5, HBS 12 saat, döngü süresi 8 saat) yapılan kinetik çalışmasının sonuçları; a) Reaktör içi UYA derişimi, b) Gaz üretimi ve pH, c) Tepe gazı kompozisyonu, değerlerinin zamana bağlı değişimi (HBS: 12 saat; Döngü süresi: 8 saat; OYH: 22,4 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 11,2 g/L; ortalama KBS: 10,3 gün; T: 35°C; pH: 5,5)

5. İŞLETİM SÜRECİ: pH 5,5, HBS = 12 saat, OYH = 22,4 g KOİ/L.gün ve KBS = 4,2 gün koşullarında işletilen AKR çalışması

Isıl işlem uygulanmış yeni çamurla başlatılan 5. İşletme sürecinde işletim koşulları (HBS, döngü süresi, OYH bazında) 3 ve 4. İşletme süreçlerindeki gibi korunmuştur. Farklı olarak, reaktör içi çamuru belli aralıklarla atılarak, reaktör içi UAKM derişiminin korunumu ile KBS 3-4 günde sabit tutulmaya çalışılmıştır. Beşinci işletme sürecinde elde edilen sonuçlar Şekil 4.8'de sunulmuştur. Bu işletim sürecinin ana amacı, ortalama bir verim değerinde de olsa sistemin kararlılık süresini artırabilmektir.

Beşinci işletim süreci, bir döngüde elde edilen biogaz miktarı bakımından dördüncü işletme sürecinin gerisinde kalmıştır. Bu işletimde de tepe gazındaki H₂ yüzdesi ve hidrojen üretim verimi 48 saat içinde en yüksek noktaya (%50,2 ve 1,67 mol H₂/mol heksoz verim) ulaşmıştır. Fakat reaktör içi UAKM değerinin ve bağlantılı olarak KBS'nin düşük (3-4 gün aralığında) tutulması çabası sonucu radikal hızdaki verim düşüşü geciktirilmiştir (Şekil 4.8a ve 4.8b). Önceki işletim süreçlerinden edinilen bilgiler ışığında, KBS'nin önceki çalışmalara göre daha düşük (3-4 gün) değerinde sabitlenmesine karar verilmişti. Bu nedenle, işletimin ilk gününden itibaren günlük 0,25-0,45 L arasında değişen miktarlarda reaktör içeriği atılarak, reaktör içi UAKM derişimi ve çamur yaşı düşük tutulmaya çalışılmıştır. Bu sayede ilk 7 gün reaktör istenen 3 gün KBS'de işletilmiştir. Sonraki günlerde reaktör içi UAKM miktarında yine çok hızlı (3-4,5 g/L.gün) artış gözlenirse de, bu durum yakından takip edilerek 34 günlük işletme süresince KBS ortalama 4,2 gün değerinde tutulabilmiştir (Şekil 4.8d).

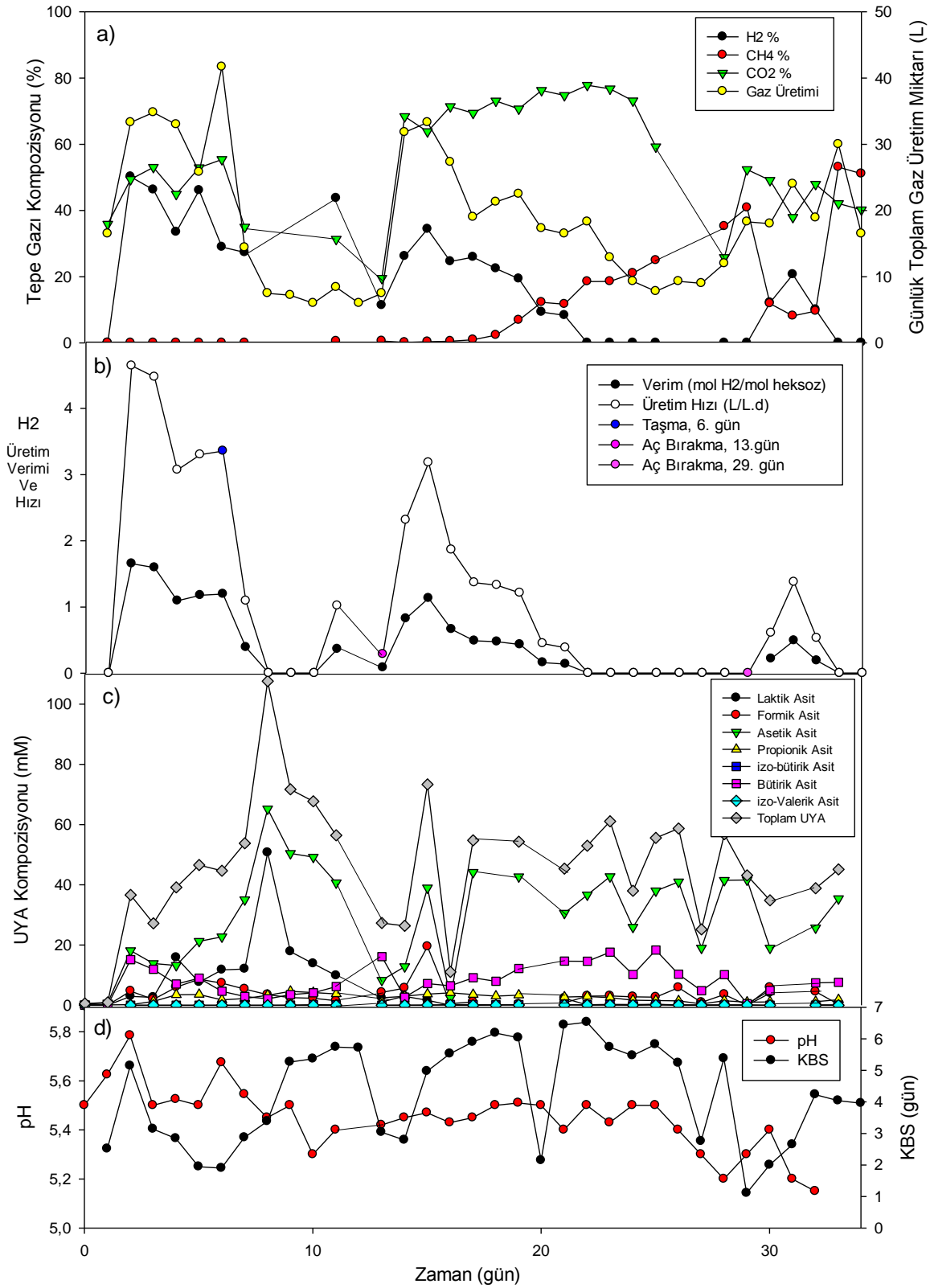
Bu işletim süresinde daha önceki çalışmalarda sıklıkla problem yaratan radikal pH düşmesi durumu da sıklıkla yapılan manuel müdahalelerle engellenmiştir. Bu sayede 34 günlük işletim süresince günlük ortalama pH değeri 5,2-5,7 aralığında salınmıştır (Şekil 4.8d).

Bu işletim süresinde yaşanan en önemli problem, işletimin 6.gününde yaşanan mekanik bir arıza sonucu reaktör içeriğinin boşaltılamaması ve taşması olmuştur. Bu durum sonucunda oluşan besin yüklemesi ve çamur kaybının Şekil 4.8'de takip edilebilecek verim düşüşünün nedeni olduğu düşünülmektedir. İşletimin 7, 8 ve 9.günlerinde yaşanan verim ve üretim hızı düşüşünden sonra, sistem 10.günden itibaren iyileşerek hidrojen verimi artmış ve 15.günde yeniden 1,14 mol H₂/mol heksoz değerine yükselmiştir (Şekil 4.8b). Bu yükselişte 13.günde reaktöre besleme yapılmamasının da (aç bırakma) önemli etkisinin olduğu düşünülmektedir. Daha önceki işletim süreçlerinde yaşanan mekanik aksaklıklar nedeniyle, reaktöre besleme yapılmadığı döngülerin hemen sonrasında üretim atakları (verim ve üretim hızında ani yükselişler) gözlenmiştir. Bu doğrultuda, reaktörde yüksek miktarda besin etkisini gidermek

(işletimin 9.günü sonrasında verimde yaşanan ani düşüğe müdahale edebilmek) için, reaktörün bir döngü (8 saat) boyunca beslenmemesi çözümüne başvurulmuştur.

İşletimin 15.günü sonrasında, hidrojen üretim verimi yavaş yavaş azalarak 23.gün itibari ile sıfırlanmıştır (Şekil 4.8b). Bu duruma KBS değerinde 15-20.günler arasında yaşanan ve kontrol edilemeyen artışın neden olduğu düşünülmektedir. Bu süreçte yapılan UAKM analizlerinden anlaşıldığı üzere, bir döngü (8 saat) içerisinde, UAKM derişim hızı 0,375-0,5 g/L.saat'e kadar çıkabilmektedir. Bu durum, mikroorganizmaların oldukça hızlı bir büyüme süreci geçirdiklerine işaret etmektedir. 25.günden itibaren AKR döngüsünün çökelme süresi kısaltılarak (40 dakikadan 20 dakikaya indirilerek), UAKM'nin büyük bir bölümünün reaktör içerisinde çökelemeden atılması, diğer bir deyişle, KBS'nin istenen aralığa (3-4 gün) düşürülmesine çalışılmıştır. 25-29.günler arasında uygulanan bu işlem KBS'yi düşürmüş, fakat H₂ üretimini arttırmada yeterli olmamıştır (Şekil 4.8b ve 4.8d). Bu nedenle, reaktörü bir döngü aç bırakma işlemi 29. İşletim gününde bir kez daha uygulanmıştır. İşlemi takip eden 3 günde daha önceki gözlemler yeniden tekrarlanmış; reaktör bir üretim (0'dan 0,5 mol H₂/mol heksoz değerine yükselen verim) atağından sonra yeniden hidrojen üretme sürecine girmiştir. Bu nedenle reaktörden veri toplama süreci 34.gün sonunda sonlandırılmıştır (Reaktör bundan sonra çeşitli işletimsel denemeler için 12 gün daha işletilmiş; H₂ üretiminde herhangi bir gelişme olmamıştır. Veriler burada sunulmamıştır).

Daha önceki işletimlerde önemine dikkat çekilen laktik asit inhibisyonu bu işletimde de belirlenmiştir. Reaktörde taşma sonrası oluşan stres koşulunda (7-9.günler) laktik asit üretimi gözlenmiştir (Şekil 4.8c). Bu durumun hidrojen üretimini olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Önceki işletim süreçlerinde bu duruma yol açan stres koşulu genellikle pH düşmesi olmuştu. Bu işletimde pH'ın belirlenen değer altına düşmesi engellenmiştir. Dolayısıyla aşırı çamur kaybı nedeniyle oluşan stres koşulunda uygun ortam bulan laktik asit bakterilerinin hidrojen üretiminin durmasında etkin olduğu düşünülmektedir. Hidrojen üretiminin sonlanmasında (8-10.günler), tUYA derişiminin de etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu işletimde, günlük maksimum UYA ve asetik asit miktarları sırasıyla 107 ve 65 mM değerlerine erişerek daha önceki işletimlerde gözlenen değerlerin üstünde seyretmiştir (Şekil 4.8c). Maksimum tUYA, reaktörün taşmasından 48 saat sonra gözlenmiştir. Aşırı yüklenen ve bir kısmı kaybedilen çamur kültürünün bu stres koşullarında homoasetojenik aktiviteye yönlendiği, bu nedenle asetik asit derişiminin ve bağlantılı olarak tUYA'nın çok yükseldiği düşünülmektedir.



Şekil 4.8. Beşinci İşletim sürecinde, a) Tepe gazı kompozisyonu ve günlük toplam gaz üretimi, b) H₂ üretim verim ve hızı, c) Çıkış suyu UYA derişimi, d) Günlük ortalama pH ve KBS, değerlerinin zamana göre değişimi (HBS: 12 saat; Döngü süresi: 8 saat; OYH: 22,4 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 11,2 g/L; ortalama KBS: 4,2 gün; T: 35°C, pH: 5,5)

Daha önce de tartışıldığı gibi, çalışılan ortam koşullarına (sıcaklık, OYH, besin özellikleri, reaktör tipi, vb.) göre, maksimum verimi destekleyecek KBS değeri farklı olabilir. Oh vd. (2003), üretim veriminde KBS'ye bağlı gözlenen bu değişimlerin bakterilerin fizyolojisinde yaşanan bir değişim ya da baskın türün değişmesi nedeniyle gerçekleşebileceğini ifade etmiştir. Beşinci işletim süreci 2. ve 4. İşletim süreçlerinde tartışılan KBS etkisini değerlendirmek amacıyla yararlı olmuştur. Diğer çalışmalarda da belirtilen yüksek KBS (>9 gün) ile ilintilenen H₂ verimindeki düşüş, bu işletimde belirgin şekilde gözlenmiştir. Fakat yüksek KBS değeri, farklı araştırmacılar tarafından farklı değerlerde tanımlanmıştır. Örneğin, Lee vd. (2010)'a göre 12,5-90 gün KBS değeri arasında bir metabolik değişim oluşurken; Kim vd. (2008)'e göre değişim 3-5 gün aralığında bile belirgin olabilir. 5. işletim sürecinde ise, gözlemlere dayanarak, KBS değerinin 5 gün ve üstünde seyretmesinin hidrojen veriminin düşmesine ve olası mikrobiolojik değişime neden olduğu söylenebilir.

Tawfik ve El-Quelish (2014), organik evsel katı atık ve mutfak atıksuyunundan biohidrojen üretimini araştırdıkları çalışmalarında KBS'nin ve atıkların seyreltilme oranlarının hidrojen verimini etkileyen en önemli faktörler olduklarını belirtmişlerdir. KBS bazında 3,6; 4 ve 5,6 gün değerlerini inceledikleri çalışmalarında, maksimum verimi 5,6 gün değerinde bulmuşlardır. Oh vd. (2003) ise membran biyoreaktör ile 5-48 saat KBS aralığının etkisini araştırdıkları çalışmalarında, 12 saat KBS'nin en yüksek verimi desteklediğini bulmuştur. Görüldüğü üzere, farklı reaktör türleri ve işletim koşullarında, maksimum verim ile ilişkilendirilen KBS değerleri farklıdır. KBS'nin, karanlık fermantasyon ile hidrojen üretimine etkileri ayrıntılı olarak araştırılması gerektiren bir konudur.

AKR-Karanlık fermantasyon deneylerinde elde edilen önemli sonuçlar

AKR çalışmaları, ardışık kesikli karanlık fermantasyon sisteminin yüksek hidrojen üretimi ve veriminde uzun süreli *kararlı durumda* (ardışık iki ölçümde biogaz üretim miktarı ve tepe gazındaki hidrojen yüzdesi farkının %10'un altında gözlemlendiği koşul; Badiei vd., 2011) işletilemediğini göstermiştir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde benzer çıkarım fark edilmiştir; ayrıca bu çalışmalarda sistem verimi olarak sunulan değerler, kararlı durumda elde edilen değerler değil maksimum değerlerdir.

Isıl ön işlemden geçirilmiş çamur kültürü ile başlatılan tüm AKR (mezofilik) işletim süreçlerinde, hidrojen üretimi sırasında 3 fazdan oluşan bir süreç saptanmıştır. Bu fazlar şu şekilde özetlenebilir;

- Birinci Faz: İşletimin ilk 2-3 gününde gözlenen yüksek hidrojen gazı üretimi ve verimi ile kendini gösteren H₂ üretim fazı
- İkinci Faz: Homoasetojenlerin güçlenerek baskınlaştığı ve elde edilen verimlerin düştüğü H₂ tüketim fazı. İşletimin 3.gününden itibaren güçlenerek devam etmektedir.
- Üçüncü Faz: İşletimin 15.gününden itibaren görülebilen, metanojenik aktivitenin artarak ilerlediği faz.

Sistemin bu faz süreçlerine girmesi engellenemese de, 4.İşletme sürecinde KBS kontrolüyle H₂ üretiminin tamamen durmasına engel olunmuştur. 5.İşletim sürecinde ise daha da düşük KBS süresinin H₂ verimini nasıl etkilediği araştırılmış ve düşük KBS'nin (ortalama 4,2 gün) sistem verimini arttırmaya da sistemin ortalama bir verim değerinde kararlılık süresini arttırdığı görülmüştür. KBS'nin sabitlenmesinde sıkıntı yaşandığı kaydedilmiştir. Tablo 4.7, beş farklı AKR-karanlık fermantasyon işletim sürecinde elde edilen sonuçların özetidir. Tablo 4.7'de görüldüğü üzere, bu projede karanlık fermantasyonla AKR'lerde elde edilen en yüksek H₂ üretim verimi 0,4-2,52 mol H₂/mol heksoz değeri, literatürdeki benzer çalışmalarda sunulan değer aralığının üst sınırına oldukça yakındır (0,5-2,8 mol H₂/mol heksoz; Arooj vd., 2008; Van Ginkel ve Logan, 2005a). İşletilen 5 AKR çalışmasında, öncelikle ortam pH'sı, ardından HBS değeri geliştirilerek elde edilen en yüksek hidrojen üretim verimi her aşamada geliştirilmiş ve 0,38'den 2,52 mol H₂/mol heksoz değerine ulaşılmıştır. En yüksek hidrojen üretim veriminin sağlandığı koşullar, pH: 5,5, HBS: 12 saat, döngü süresi 8 saat, OYH: 22,4 gKOİ/L.gün'dür. Çalışmanın son aşamasında KBS değeri düşürülerek sistemin kararlılığı arttırılmaya çalışılmış, maksimum verimde bir yükselme elde edilemese de, kararlı gün süresi artmış ve KBS'nin sistemin işletimi için önemli bir parametre olduğu gözlenmiştir. KBS'nin sabitlenebildiği işletim koşulları hidrojen verimini artırabilir.

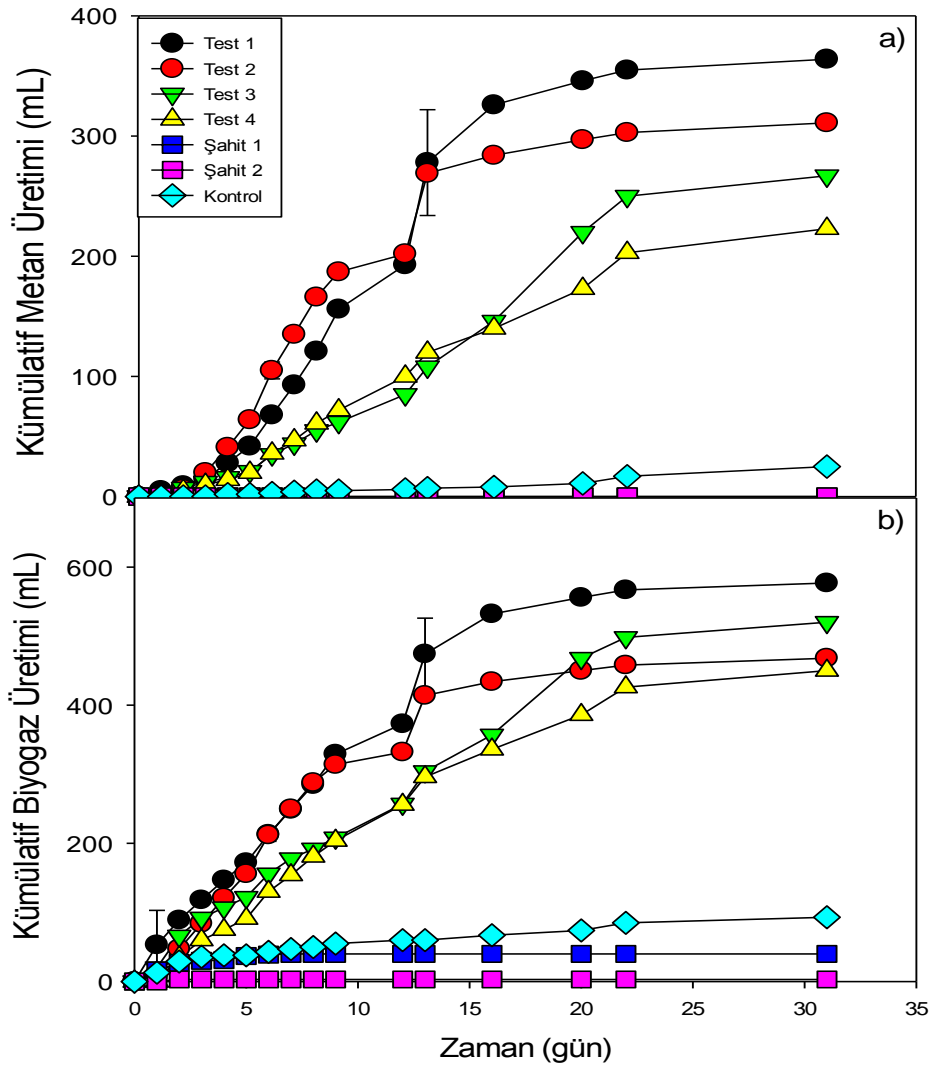
Tablo 4.7. Beş farklı AKR-Karanlık fermantasyon çalışmasında elde edilen sonuçların özeti

İşletim No	Hedef pH	HBS (saat)	Döngü süresi (saat)	OYH ^a	Maksimum H ₂ verimi ^b	Maksimum H ₂ (%)	İşletim süresi (gün)	Kararlılık süresi (döngü)	KBS _{ortalama} (gün)
1	7-5,5	36	24	7,5	0,38	17,9	17	5	14,5
2	5,5-4,5	36	24	7,5	2,10	52,7	48	5	9,8
3	5,5	12	8	22,4	2,30	36	10	3	10,3
4	5,5	12	8	22,4	2,52	46,7	20	3	9,5
5	5,5	12	8	22,4	1,66	50,2	34	6	4,2

^a OYH: organik yükleme hızı (g KOİ/L.gün), ^b Maksimum H₂ verimi, mol H₂/mol heksoz

4.2.2 Üç-Aşamalı Sistemde; AKR-Karanlık Fermantasyon Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Anaerobik Reaktör Deneyleri

Üç-aşamalı sistemin ikinci aşamasını oluşturan kesikli anaerobik (metanojenezis) reaktör deneyleri 31 gün sürmüştür. Bu süreçte üretilen toplam biyogaz ve metan gazı miktarları Şekil 4.9'da verilmiştir. Tablo 4.8'de gösterildiği üzere, en yüksek metan üretim verimi Test 2 reaktörlerinde (AKR-Karanlık fermantasyon, 5. İşletim süreci çıkış suyu) 344 mL CH₄/ g çKOİ olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 4.9. Üç-aşamalı sistemde, kesikli anaerobik reaktörlerde üretilen toplam a) metan ve b) biyogaz miktarı (35°C, S/X₀: 1, pH: 7,3, çKOİ: 4,8 g/L (Test 2, 4), çKOİ: 5,7 (Test 1, 3))

Tablo 4.3'de sunulan reaktörlerin giriş çKOİ değerleri karşılaştırıldığında, çKOİ derişiminin Test 1 reaktörlerinde (AKR-Karanlık fermantasyon 1.-4. İşletim süreçleri çıkış suyu) Test 2

reaktörlerine göre daha fazla olduğu görülmektedir. Fakat metan üretim verimi bazında karşılaştırıldığında, S/X_0 değerleri sabit alındığında Test 2 reaktörlerinden elde edilen verimin Test 1’de elde edilenle kıyaslanabilir olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, iki farklı giriş suyu benzer metan üretim verimleri sağlamıştır.

Tablo 4.8’de ve Şekil 4.9’da görüldüğü üzere, sukrozla beslenen karanlık fermantasyon çıkış suyu ile kurulan anaerobik reaktörlerde (Test 1 ve 2) elde edilen metan verimleri, direk sukroz ile kurulanlara (tek-aşamalı Test 3 ve 4) kıyasla %27-35 daha fazladır. Bu çalışma, ek olarak iki-aşamalı tek aşamalı sisteme kıyasla metan üretimi bazında çok daha avantajlı olduğunu da göstermiştir. İki-aşamalı anaerobik reaktör sistemleri (Test 1 ve 2) tek-aşamalı sistemlere (Test 3 ve 4) göre, asidojenesis ve metanojenesis mikroorganizmaları için pH dengesi gibi daha uygun çevresel şartlar sağlamaktadır; dolayısıyla metan üretim verimleri artmaktadır (Xie vd., 2008; Giordano vd., 2011).

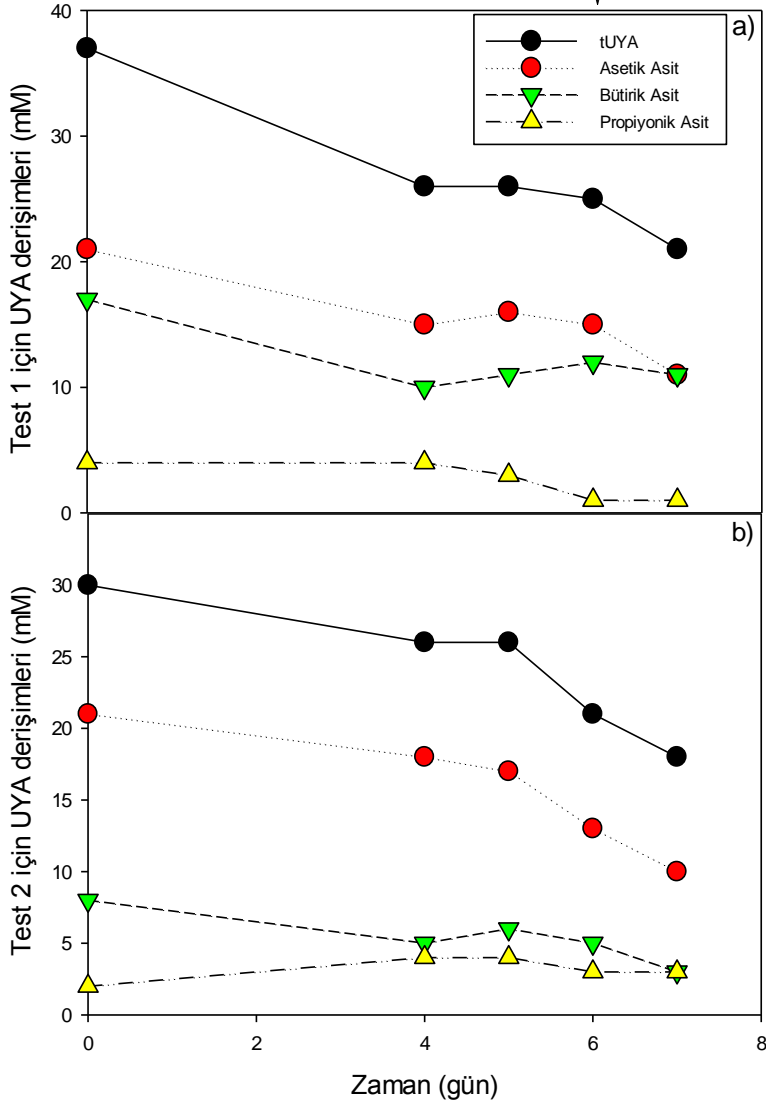
Tablo 4.8. Üç-aşamalı sistemin ikinci aşamasını oluşturan metanojenesis reaktörlerinde elde edilen metan yüzdesi ve verim değerleri

Reaktör Tipi	CH ₄ yüzdesi (%)	CH ₄ üretim verimi ^a (mL CH ₄ /g çKOİ _{eklenen})
Test (1)	82 ± 2	337 ± 17
Test (2)	83 ± 1	344 ± 20
Test (3)	78 ± 1	247 ± 25
Test (4)	77 ± 0	223 ± 6

^a Metan gaz hacimleri 35°C’deki değerleri göstermektedir.

Şekil 4.10’da Test 1 ve Test 2 reaktörlerinin inkübasyon sürecindeki UYA kompozisyonu ve derişimine bakıldığında, her iki reaktör tipinde de zamana bağlı olarak tUYA, asetik asit ve bütirik asit derişimlerinin 0-4. günler arasında biyogaz üretimine bağlı olarak düştüğü gözlemlenmektedir. 4-6. günler arasında ise substrat kaynaklarının içeriğinde üç-aşamalı sistemin ilk ayağı olan AKR-Karanlık fermantasyon reaktöründe fermente edilememiş olan şeker ve alkol gibi diğer çKOİ kaynaklarının fermente edilmesi ile beraber tUYA, asetik asit ve bütirik asit derişimlerinin biyogaz üretimi devam etmesine rağmen sabit kaldığı düşünülmektedir. Propiyonik asit derişimi ise KF çıkışlı substrat kaynağından düşük bir değerdedir ve bu durum metanojenik aktiviteyi arttırmaktadır (İnanç vd., 2005; Wang vd., 2006). Zira, propiyonik asit fermantasyonu diğer UYA türlerine kıyasla daha zor ve yavaş gerçekleşmektedir (Pipyn ve Verstraete, 1981).

6. inkübasyon günü sonunda
Test 1 ve 2 reaktörlerinden birer
replika foto-fermentasyon çalışması
için inkübasyondan çekilmiştir.



Şekil 4.10. Üç-aşamalı sistemin 2.aşamalı olan kesikli anaerobik reaktörlerde zamana karşı toplam UYA derişimi ve kompozisyonlarındaki değişim (35°C, S/X₀: 1, pH: 7,3, çKOİ: 4,8 g/L (Test 2), çKOİ: 5,7 (Test 1))

Şekil 4.10'da görüldüğü üzere, Test 1 ve Test 2 reaktörlerinden birer replika, üç-aşamalı sistemde fotofermantasyon çalışmasını gerçekleştirmek amacıyla 6. inkübasyon günü sonunda inkübasyondan çekilmiştir (inkübasyonları sonlandırılmıştır). Bunun sebebi, fotofermantasyon çalışmasında optimum düzeyde H₂ üretimi gözlemlenmesini sağlayacak bir tUYA derişimi (25-35 mM) elde etmek, ve metanojenezis süreci ile tUYA derişiminin daha da düşmesini engellemektir. Altıncı inkübasyon günü sonucunda inkübasyondan çekilen Test 1 ve Test 2 reaktörlerinin metan üretim verimleri, sırasıyla, 63 mL CH₄/g çKOİ ve 116 mL

CH₄/g çKOİ'dir. Dolayısıyla üçlü sistemin enerji verimi hesaplanırken bu değerler dikkate alınmıştır. Bu değerlere göre, daha fazla tUYA tüketimine rağmen, Test 1 reaktörlerindeki metan üretim veriminin Test 2'dekine kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9 ve 4.10). Diğer bir deyişle, AKR-Karanlık fermantasyon 5.ışletim süreci çıkış suları, daha kısa sürede daha yüksek metan üretim verimine yol açmakta; metan üretim hızını arttırmaktadır. Dolayısıyla, AKR-Karanlık fermantasyon 5.ışletim süreci koşulları, takip eden anaerobik reaktör (metanojenesis) aşaması için, daha elverişli UYA kompozisyonu oluşturmaktadır.

4.2.3 Üç-Aşamalı Sistemde; Kesikli Anaerobik (Metanojenesis) Reaktörlerin Çıkış Suları ile Kurulan Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyi Sonuçları

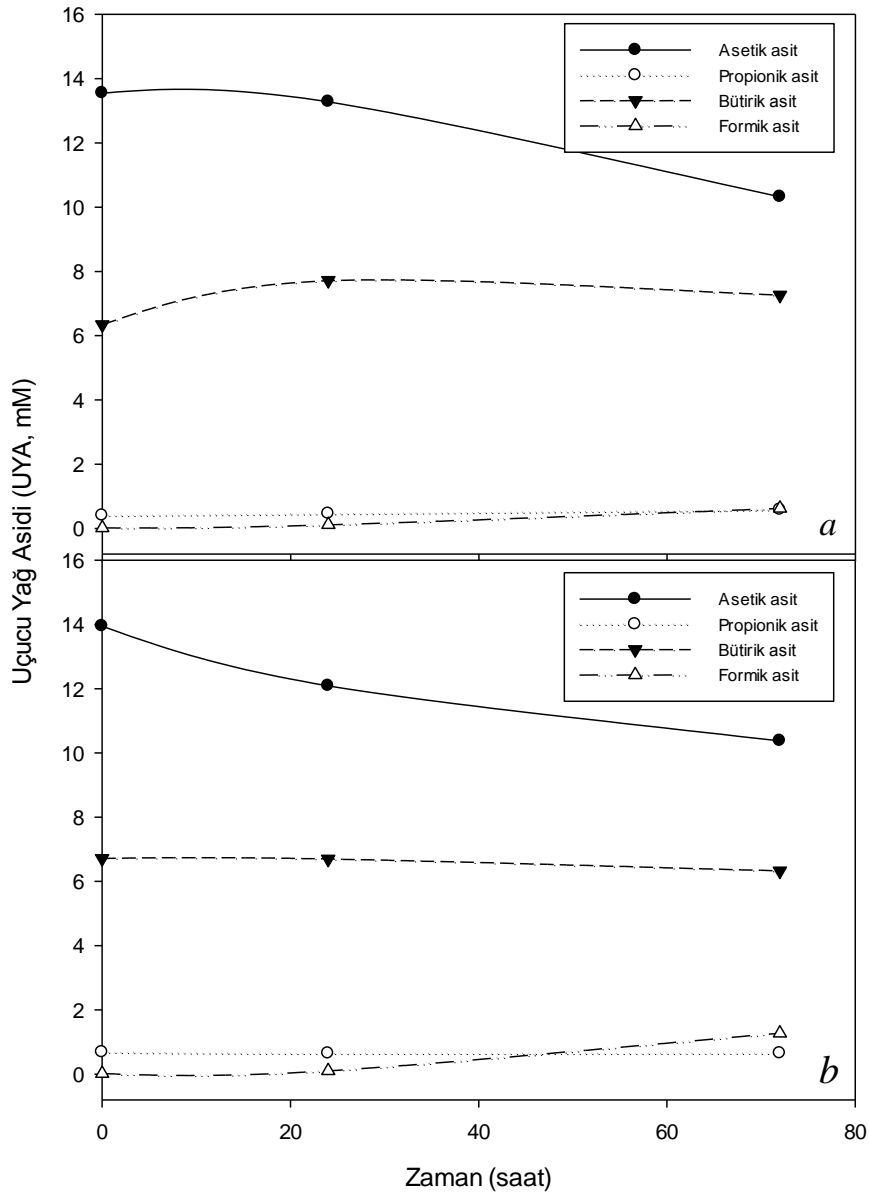
Bölüm 4.1.3.4'de verildiği üzere, kesikli fotofermantasyon deneyleri, iki farklı AKR-Karanlık fermantasyon çıkış suyu ile kurulan 2 farklı kesikli anaerobik reaktörlerin çıkış suları (Giriş suyu 1 ve Giriş suyu 2, Tablo 4.6) ile kurulmuştur.

Giriş suyu 1 ile kurulan 3.aşama kesikli fotofermantasyon deneyleri:

Bu fotofermantasyon reaktörleri 8 gün (192 saat) boyunca işletilmiştir. Çalıştırılan 2 eş (tekrarlı) reaktörde de inkübasyon süresince gaz üretimi gözlemlenmemiştir. Tüketilen UYA miktarlarının çok az olması da hidrojen üretiminin olmadığını destekler niteliktedir (Şekil 4.11). Bununla birlikte, bakteriyel büyümenin de yetersiz kaldığı gözlemlenmiştir. İnkübasyon süresince gözlemlenen bakteriyel büyüme Şekil 4.12'de verilmiştir.

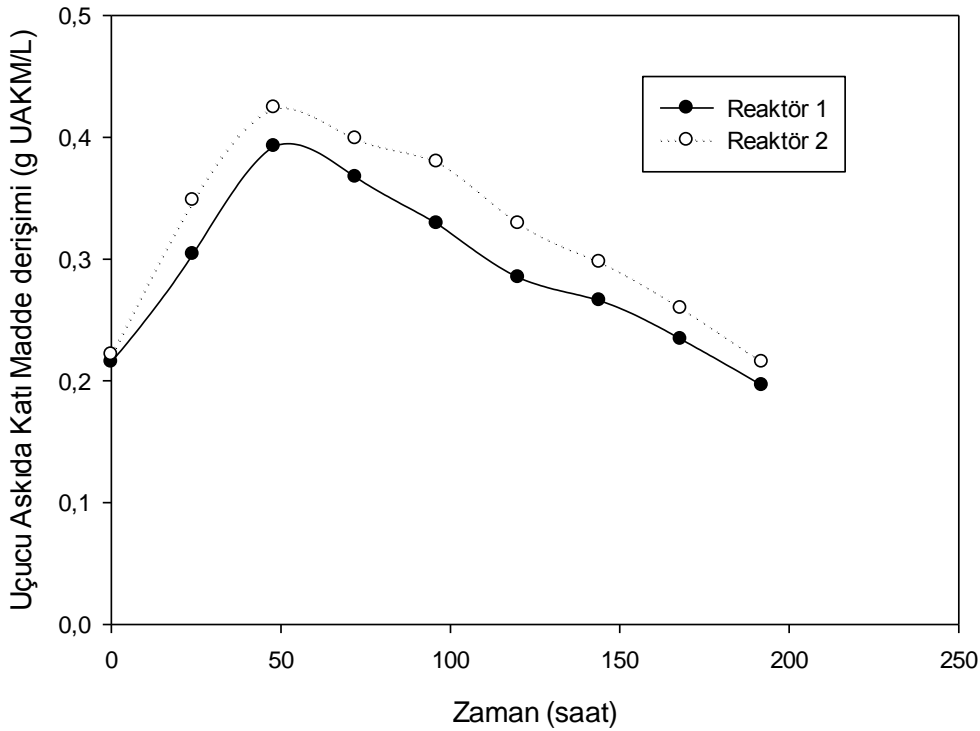
Gaz üretiminin gözlemlenmemesi sebebini belirlemek için, ilk olarak mor-kükürtsüz bakterilerde hidrojen üretimini etkileyen ana faktörler gözden geçirilmiştir. İnkübasyon süresince sıcaklık inkübatör içerisine yerleştirilen ilave bir termometre ile izlenmiş ve 30°C sıcaklığın deney süresince sabit tutulduğundan emin olunmuştur. Hidrojen üretimini etkileyebilecek bir diğer faktör olan pH değişimi günlük takip edilmiştir (veriler sunulmamıştır). Deney süresince her iki eş reaktördeki pH değeri 6,8'den kademeli olarak 7,2'ye kadar artmış, 125.saat sonunda 7,0 değerine düşmüştür. İnkübasyon fotofermantasyon için uygun pH aralığında gerçekleştiği için pH kaynaklı bir sorun olmadığı gözlemlenmiştir. Bir diğer etken olan ışık şiddeti deney süresince 3955 lux olarak ayarlanmıştır; bu ışık şiddetinde herhangi bir problemin yaşanmayacağı daha önceki deneylerden (İş Paketi 2) bilinmektedir. Bakterilerden kaynaklı bir kontaminasyon olabileceğinden şüphelenilmiş ve aşılama yapılan bakteri kültüründen örnek alınarak petri kaplarına çizgi plaka yöntemiyle ekim yapılmıştır. Oluşan koloniler gözlemlenmiş ancak bakteriyel kaynaklı bir kontaminasyon olmadığı görülmüştür. Amonyum iyonu (1,7 mM, Tablo 4.6) ise hidrojen üretimine engel olacak inhibisyon değerinin (2 mM) altına düşürüldüğü için

amonyum kaynaklı bir inhibisyon olmayacağı bilinmektedir. Efektif entegre (karanlık fermantasyon ve fotofermantasyon) hidrojen üretimi için karanlık fermantasyon atıksuyunun UYA derişiminin 2500 mg/L'den (≈ 42 mM) düşük olması gerektiği ve bütirik asidin 25 mM'nin üstünde olduğu koşullarda fotofermantatif hidrojen üretiminin inhibe olduğu belirtilmiştir (Argun vd., 2008; Su vd., 2009). Tablo 4.6 incelendiğinde, tUYA derişiminin 24 mM, bütirik asidin ise 10,4 mM olduğu, ve asit kaynaklı bir inhibisyonun olmadığı anlaşılmaktadır. Dolayısıyla, giriş suyu 1 ile kurulan reaktörlerde hidrojen üretilmemesi, araştırılan faktörler kaynaklı değildir.



Şekil 4.11. Giriş suyu 1 ile (2 tekrarlı) kurulan üçüncü aşama fotofermantasyon reaktörlerinde (a. Reaktör 1; b. Reaktör 2) ortalama UYA derişimlerinin zamana karşı değişimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)

Çalıştırılan 2 eş (tekrarlı) reaktörde de 2. günden (48 saat) itibaren reaktörlerde granüle benzer bir oluşum gözlemlenmiştir. Anaerobik ve aerobik granülasyon, mikroorganizmaların strese maruz kaldıklarında, savunma mekanizması olarak başvurdukları bir durumdur. Dolayısıyla, *R. Capsulatus*'un granül oluşturmaya sebep olabilecek bir inhibisyona / strese maruz kaldığı düşünülmüştür. Bu granüler oluşum, 5. günden sonra azalmaya başlamış ve deney bitiminde tamamen kaybolmuştur. Bu durum, strese yol açan faktörün etkisinin azalması veya mikroorganizmanın ortama adaptasyonu ile ilişkilendirilebilir. İnhibisyona/strese yol açan madde/kimyasal, kesikli anaerobik reaktörlerin inkübasyonu sırasında oluşan bir ürün olabilir. Bu çıkarımdan emin olabilmek için, sonraki bölümde (Bölüm 4.2.4) anlatılacağı üzere, arada 2.aşamının (kesikli anaerobik reaktörlerin) olmadığı, direk AKR-karanlık fermentasyon çıkış sularıyla kurulan fotofermantasyon reaktörlerinde hidrojen üretiminin araştırılması planlanmıştır. İnhibisyona neden olabilecek olası kimyasallar, mevcut GC ve işletim koşullarında belirlenememektedir. Bu proje, metanojenesis takiben kurulan fotofermantatif sistemler bazında bir ilk olduğu için, literatürde inhibisyona yol açabilecek olası kimyasallar hakkında bir bilgi bulunmamaktadır. Proje kapsamında yer almaması ve gerekli ödenek bulunmaması sebebiyle, olası kimyasalın LC-MS-MS ile analizi yaptırılmamıştır.



Şekil 4.12. Giriş suyu 1 ile (2 tekrarlı) kurulan üçüncü aşama fotofermantasyon reaktörlerinde *R. Capsulatus* derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)

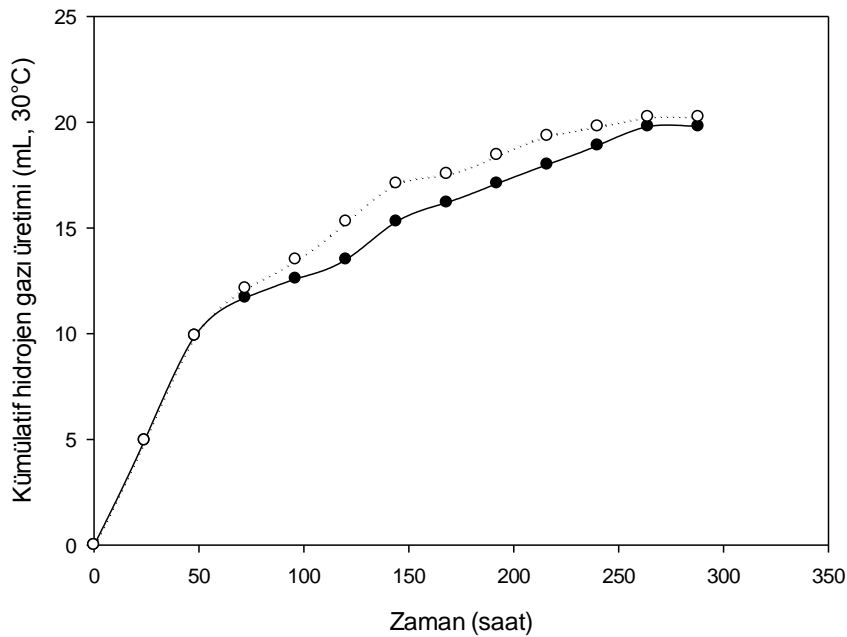
Giriş suyu 2 ile kurulan 3.aşama kesikli fotofermantasyon deneyleri:

Üç-aşamalı sistemde, kesikli anaerobik reaktör çıkış suyu (Giriş suyu 2, Tablo 4.6) ile kurulan fotofermantasyon reaktörleri 12 gün (288 saat) boyunca işletilmiştir. Giriş suyu 2 ile kurulan reaktörlerde hidrojen üretimi gözlenmiştir. Çalıştırılan 2 eş (tekrarlı) reaktörde elde edilen verimler Tablo 4.9'da sunulmuştur. Deney süresince gözlenen kümülatif hidrojen gazı miktarı Şekil 4.13'de, reaktör içerisindeki UYA derişimlerinin zamana karşı değişimi ise Şekil 4.14'de verilmiştir.

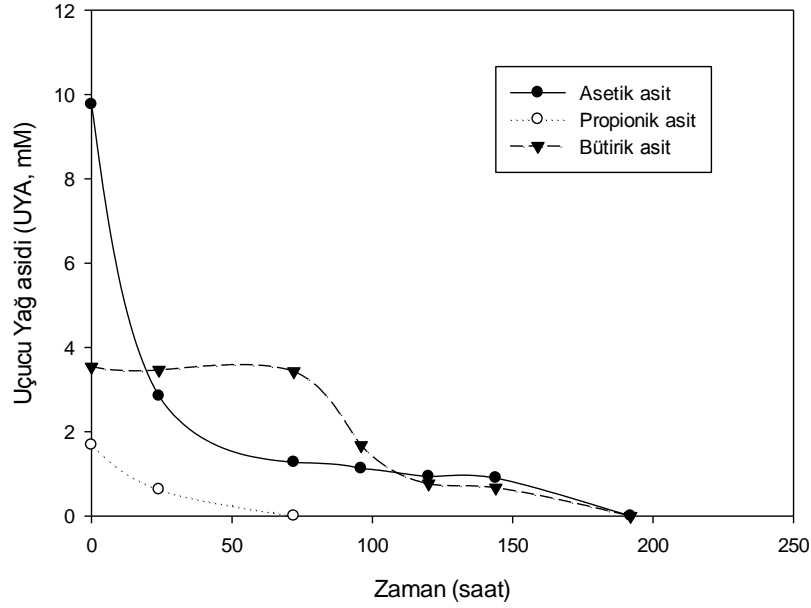
Tablo 4.9. Giriş suyu 2 ile kurulan üçüncü aşama fotofermantasyon reaktör deneyinde elde edilen verim değerleri

İki tekrarlı reaktörler	H ₂ üretim verimi (g H ₂ /g çKOİ) ^a	H ₂ üretim hızı (mg H ₂ /L.saat)	H ₂ üretim hızı (mmol H ₂ /L.saat)	Besin dönüştürme verimi (%)	Işık dönüştürme verimi (%)	Toplam üretilen H ₂ (mmol)
Reaktör 1	0,048	0,34	0,17	21,1	0,11	0,81
Reaktör 2	0,049	0,34	0,17	21,6	0,11	0,83
Ortalama	0,049	0,34	0,17	21,4	0,11	0,82

^a çKOİ bazında eklenen HAc esas alınmıştır (Tüm HAc tüketilmiştir). 1 g asetik asidin KOİ eşleniği 1,066 g KOİ'dir.



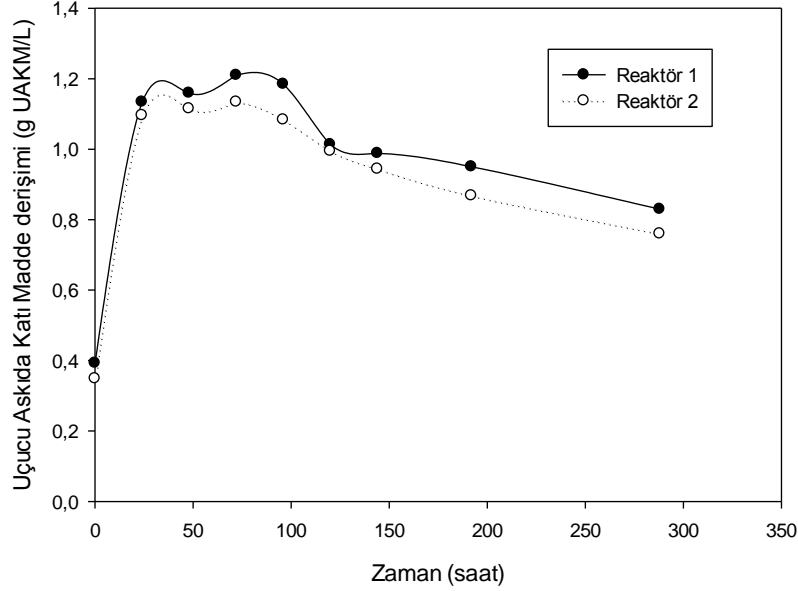
Şekil 4.13. Giriş suyu 2 ile (2 tekrarlı) kurulan üçüncü aşama fotofermantasyon reaktör deneyinde toplam hidrojen gazı üretimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)



Şekil 4.14. Giriş suyu 2 ile kurulan üçüncü aşama fotofermantasyon reaktörlerinde ortalama UYA derişimlerinin zamana karşı değişimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)

Tablo 4.9 ve Şekil 4.13’de görüldüğü üzere, giriş suyu 2 ile kurulan reaktörlerde fotofermantatif hidrojen gazı üretimi (0,049 g H₂/g çKOİ; 0,052 g H₂/g HAc) gerçekleşmiştir. Fakat bu üretim, İş Paketi 2 kapsamında belirlenen optimum koşullarda işletilen kesikli fotofermantasyon reaktörlerinin üretim verimine (0,10 g H₂/g KOİ; 0,11 g H₂/g HAc) kıyasla çok düşüktür. Aynı şekilde, gözlemlenen hidrojen üretim hızı (prodüktivite, 0,17 mmol H₂/L.saat), daha önce İş Paketi 2 kapsamında belirlenen optimum koşulda elde edilebilecek üretim hızı değerine (1,04 mmol H₂/L.saat) göre oldukça düşüktür. Düşük verim ve hız değerlerine rağmen, giriş suyu 2 ile kurulan reaktörlerde hidrojen üretilmiştir. Öte yandan, karakterizasyonu bakımından çok da farklı olmayan giriş suyu 1 (Tablo 4.6) ile kurulan reaktörlerde hidrojen üretimi gözlenmemiştir. Dolayısıyla, giriş suyu 2’nin içeriğinde daha az miktarda olan olası inhibisyon kaynağı, giriş suyu 1’de daha fazla miktarda bulunabilir. Nitekim, giriş suyu 1 ile işletilen reaktörlerde bu madde sebebiyle oluştuğu speküle edilen granüler yapı, giriş suyu 2 ile işletilen reaktörlerde de görülmüştür; ancak yoğunluğu daha az gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, giriş suyu 2 ile işletilen reaktörlerde, inhibisyona yol açan olası kimyasalın daha düşük derişimde olması sonucu, tamamiyle bir inhibisyonun gerçekleşmediği speküle edilebilir. Nitekim, daha düşük giriş UYA derişimine rağmen, bakteriyel büyümenin bu çalışmada giriş suyu 1 ile yapılan çalışmaya göre daha fazla gerçekleştiği Şekil 4.15’de görülmektedir. İnhibisyon kaynağı olan bu madde, AKR-karanlık fermantasyon sisteminde üretilmiş olabileceği gibi, 2.aşama olan kesikli anaerobik reaktörlerde de üretilmiş olabilir. AKR-karanlık fermantasyon çıkış suları ile kurulan kesikli

fotofermantasyonun araştırıldığı bir sonraki bölümde (Bölüm 4.2.4), olası inhibisyon kaynağı olan sistem belirlenebilecektir. Bahsi geçen bu çalışmada herhangi bir inhibisyon gerçekleşmezse, inhibisyon maddesinin üretildiği sistemin kesikli anaerobik reaktör; yani üç-aşamalı sistemin 2.aşaması olduğu anlaşılacaktır.



Şekil 4.15. Giriş suyu 2 ile kurulan üçüncü aşama fotofermantasyon reaktörlerindeki *R.Capsulatus* derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)

Giriş suyu 2 ile kurulan reaktörlerde gözlenen düşük hidrojen üretim verim ve hızının bir diğer sebebi olarak, inhibisyon kaynağı maddenin yanısıra, giriş suyu içerisindeki UYA derişimlerinin belirlenen optimum UYA derişiminden (35,35 mM asetat) daha düşük olması gösterilebilir.

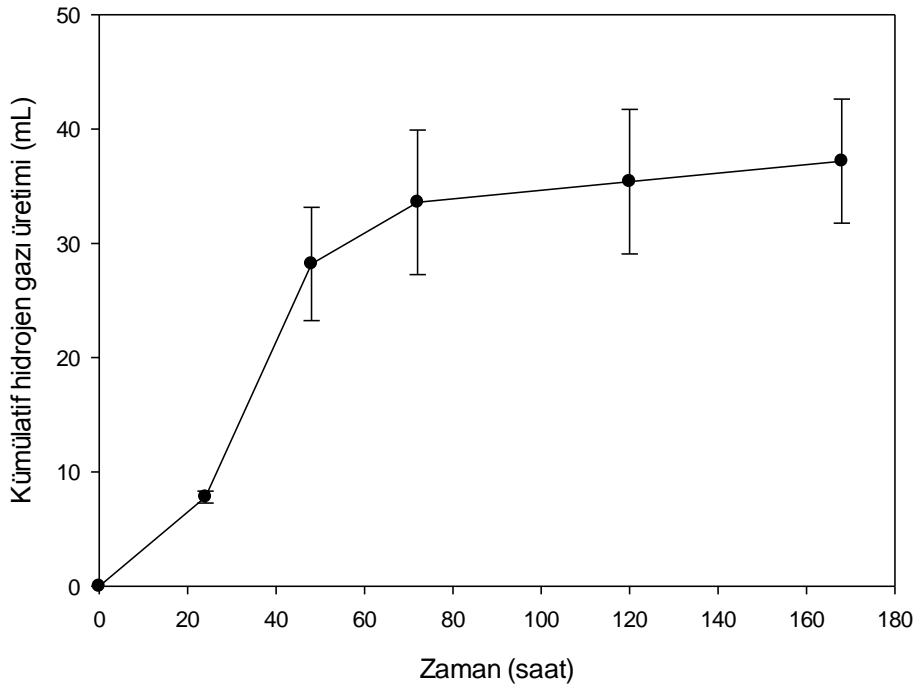
4.2.4. İki-Aşamalı Sistemde; 2.Aşama olan Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyi Sonuçları

Bu çalışma, proje önerisinde yer almamasına rağmen, üç-aşamalı sistemin (sırasıyla, AKR-Karanlık fermantasyon, kesikli anaerobik, kesikli fotofermantasyon), iki-aşamalı (sırasıyla, AKR-Karanlık fermantasyon, kesikli fotofermantasyon) sistem ile karşılaştırılması için kurulmuştur. Diğer bir değişle, bu çalışmanın sonuçları, üç-aşamalı sistemde 2.aşama olan kesikli anaerobik reaktörlerin verime etkisini netleştirmek amacıyla kullanılmıştır.

İki-aşamalı sistemde sukrozla işletilen AKR-karanlık fermantasyon sisteminin 1., 2., 3. ve 4.işletim sürecine ait çıkış suları karışımı (I.Kaynak suyu, Tablo 4.4), 5.işletim sürecine ait

olanlar ise (II.Kaynak suyu, Tablo 4.4) kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde besin olarak kullanılmıştır. Kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörleri 8 gün (192 saat) boyunca işletilmiştir. I.Kaynak suyu ile kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde hidrojen üretimi gözlenmemiştir. II.Kaynak suyu ile kurulan reaktörlerde ise deney süresince gözlenen kümülatif hidrojen gazı miktarı Şekil 4.16'da verilmiştir. II.Kaynak suyu ile çalıştırılan 3 eş (tekrarlı) reaktörde elde edilen verimler Tablo 4.10 ve 4.11'de sunulmuştur.

Tablo 4.10'da görüldüğü üzere, aynı özelliklere sahip 3 eş reaktörde de benzer dönüştürme verimi ve hidrojen üretim miktarları elde edilmiştir. Hidrojen üretim hızı (prodüktivite) ortalama $0,48 \pm 0,08$ mmol H_2 /L.saat olarak ölçülmüştür. Toplam üretilen hidrojen gazı miktarı ise ortalama $1,52 \pm 0,22$ mmol'dür. Reaktörlere karanlık fermantasyon çıkış suyu ile eklenen giriş asetik asit derişimi (21 mM HAC) bazında elde edilen verim ise $1,61 \pm 0,24$ mol H_2 /mol HAC ($0,054 \pm 0,008$ g H_2 /g asetat, $0,050 \pm 0,008$ g H_2 /g çKOİ) olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.11). Hidrojen üretim verimi, reaktörlerde tüketildiği belirlenen asetik asit, bütirik asit ve propionik asit bazında da hesaplanmıştır. Buna göre, bu üç asidin giriş derişimleri HAC eşdeğerinde hesaplanarak verim $1,13 \pm 0,16$ mol H_2 /mol (HAC+HBU+HPr; HAC eşdeğeri bazında) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.16. İki-aşamalı sistemde, AKR-karanlık fermantasyon çıkış suyuyla (II.Kaynak suyu, 5.İşletme süreci) kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde üretilen ortalama toplam hidrojen gazı üretimi (30°C , S/X_0 : 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)

Tablo 4.10. İki-aşamalı sistemde, AKR-karanlık fermantasyon çıkış suyuyla (II.Kaynak suyu, 5.işletme süreci) kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörlerin dönüştürme verimleri ve üretim hızları

Üç tekrarlı reaktörler	H ₂ üretim hızı (mg H ₂ /L.saatt)	H ₂ üretim hızı (mmol H ₂ /L.saatt)	Besin dönüştürme verimi (%)	Işık dönüştürme verimi (%)	Toplam üretilen H ₂ (mmol)
Reaktör 1	0,80	0,40	23,9	0,30	1,29
Reaktör 2	0,95	0,48	28,7	0,36	1,55
Reaktör 3	1,14	0,57	32,1	0,40	1,73
Ortalama	0,96±0,17	0,48±0,08	28,2±4,1	0,36±0,05	1,52±0,22

Tablo 4.11. İki-aşamalı sistemde, AKR-karanlık fermantasyon çıkış suyuyla (II.Kaynak suyu, 5.işletme süreci) kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörlerin üretim verim değerleri ^a

	Verim (g H ₂ /g KOİ _{HAc})	Verim (mol H ₂ /mol HAc)	Verim (mol H ₂ /mol HAc+HBu+HPr)
Reaktör 1	0,043	1,37	0,96
Reaktör 2	0,051	1,64	1,15
Reaktör 3	0,057	1,84	1,28
Ortalama ^b	0,050±0,008	1,61±0,24	1,13±0,16

^a Verimler hesaplanırken belirtilen asitler, HAc (asetik asit) eşdeğer derişimine çevrilmiştir; tüm verim değerlerinin birimi mol H₂/mol HAc_{eklenen} bazındadır.

^b çKOİ bazında verimler, eklenen HAc ve diğer asitlerin tümünün tüketildiği esas alınarak hesaplanmıştır. 1 g asetik asidin KOİ eşleniği 1,066 g KOİ'dir.

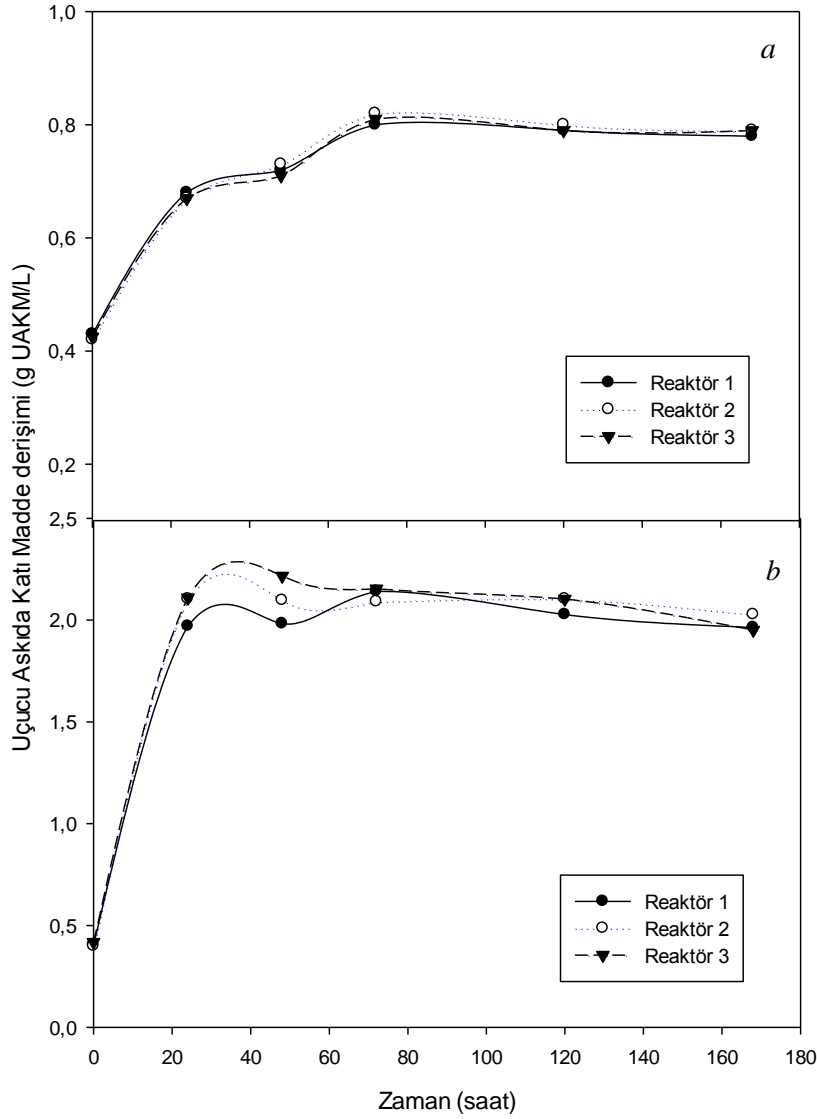
R.capsulatus kullanılan bir fotofermantasyon çalışmasında, melas ile kurulmuş karanlık fermantasyonun 86 mM asetat derişimine sahip çıkış suyu 4 farklı şekilde seyreltilerek (1/2, 1/3, 1/5, 1/10) fotofermantasyon deneylerinde kullanılmıştır (Mars vd., 2010). Mars vd. (2010) tarafından bulunan hidrojen üretim hızları 0,08-1,10 mmol/L.saatt arasında değişmekte ve en yüksek hidrojen üretim hızının (1,10 mmol/L.saatt), asetat derişiminin 29 mM olduğu koşulda (1/3 seyreltme) elde edildiği belirtilmektedir. Bununla beraber ışık dönüştürme verimleri %0,09-%0,66 arasında değişmektedir. Bu çalışmada ise AKR-karanlık fermantasyon 5.işletim süreci çıkış suyu ile (21 mM asetat), herhangi bir seyreltme işlemi uygulanmadan kurulan fotofermantasyon reaktörlerinde 0,48±0,08 mmol H₂/L.saatt hidrojen üretim hızı ve %0,36 ışık dönüştürme verimi gözlenmiştir. *R.capsulatus* kullanılan bir diğer fotofermantasyon çalışmasında, arpa samanının hidrolizi sonucu oluşan atıksu ile kurulan

karanlık fermantasyonun 135 mM asetat derişimine sahip çıkış suyu, 1/4 oranında seyreltilerek fotofermantasyon reaktörleri için kullanılmıştır (Özgür ve Peksel, 2013). Özgür ve Peksel (2013) tarafından bulunan hidrojen üretim hızı $0,22 \pm 0,02$ mmol H_2 /L.saat ve ışık dönüştürme verimi $\%0,4 \pm 0,0$ olarak belirtilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada, literatür verileri ile kıyaslanabilir hidrojen üretim hızları ve ışık dönüştürme verimleri elde edilmiştir.

İş Paketi 2’de, Tepki Yüzeyi Metodu kullanılarak, en yüksek H_2 üretim hızının elde edileceği optimum değerler $S = 35,35$ mM Asetat; $X_0 = 0,27$ g UAKM/L; $I = 3955$ lux ($263,6$ W/m²) olarak belirlenmiş; en yüksek hidrojen üretim hızının elde edileceği optimum S/X_0 oranı 9,4 g KOİ/g UAKM (asetat-KOİ eşdeğeri baz alındığında, 8,3 g KOİ/g UAKM; 7,7 g asetat /g UAKM) olarak hesaplanmıştır. İş Paketi 2’de, karbon kaynağı olarak sadece asetatın kullanıldığı çalışmada elde edilen deneysel üretim hızına ($0,91$ mmol H_2 /L.saat; 20 mM asetat) kıyasla bu çalışmada daha düşük bir hız ($0,48 \pm 0,08$ mmol H_2 /L.saat, 21 mM asetat) elde edilmiştir. Uyar vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada farklı besin karışımlarında bakterilerin büyümelerinde herhangi bir sıkıntı olmadığı ancak karbon kaynağındaki değişimlerin uzun lag periyoduna neden olabileceği belirtilmektedir. Karanlık fermantasyon çıkış suyu (Tablo 4.10) ile kurulan bu çalışmadaki daha düşük üretim hızının (karanlık fermantasyon sonucunda oluşan) farklı karbon kaynakları ve bunların bakteriler üzerindeki etkisi kaynaklı olduğu söylenebilir.

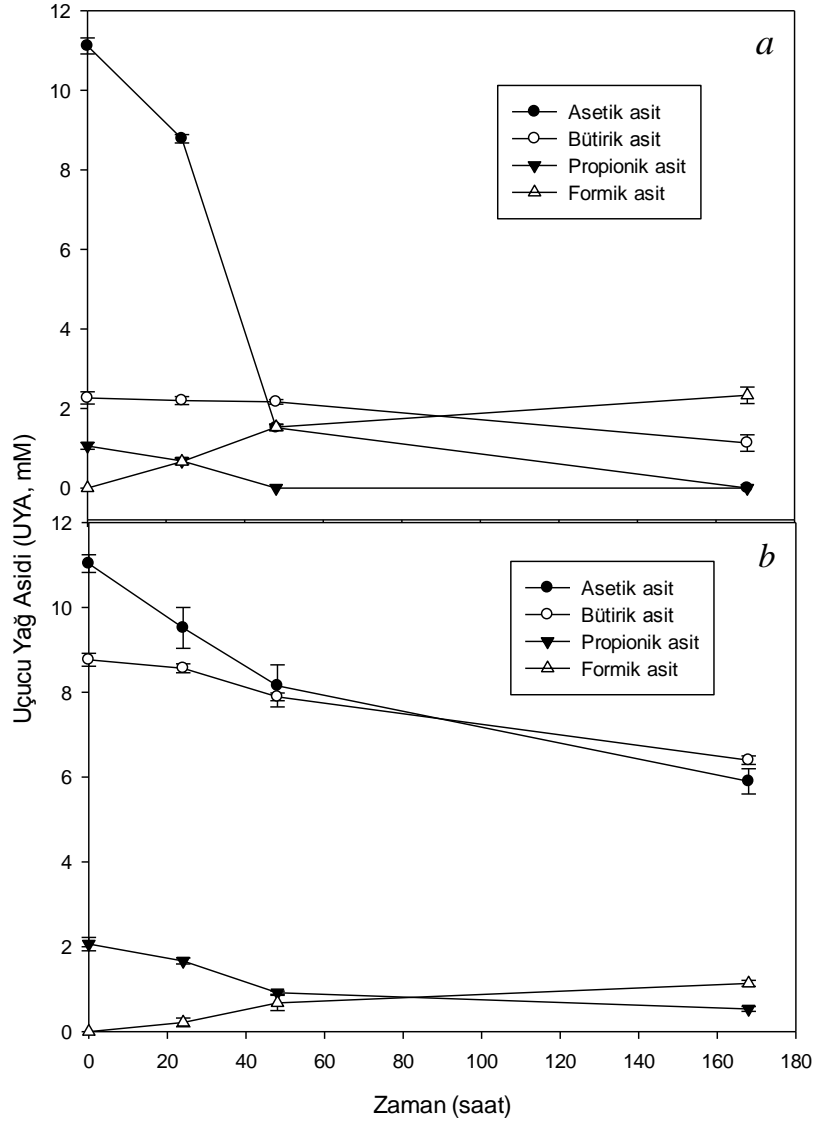
Hidrojen üretim verimleri incelendiğinde $1,61 \pm 0,24$ mol H_2 /mol asetat ($0,054$ g H_2 /g HAC; $0,050$ g H_2 /g KOİ) elde edilen bu çalışma, İş Paketi 2’de asetatla kurulan çalışmada elde edilen en yüksek verime ($3,3$ mol H_2 /mol asetat) kıyasla düşüktür. Öte yandan, elde edilen verim, melasın karanlık fermantasyonu sonucu elde edilen atıksudan üretilen fotofermantatif hidrojen verimi değerleri ile ($0,72$ - $1,56$ mmol H_2 /mmol HAC, Özgür vd. (2010)) kıyaslanabilir düzeydedir. Sonuç olarak, bu çalışmada karanlık fermantasyonu takip eden 2. aşama olması sebebiyle, en uygun koşullarda elde edilen tek aşamalı fotofermantatif verimlere kıyasla, daha düşük bir verim gözlenmiştir.

Bakteriyel derişimin zamanla değişimi Şekil 4.17’de verilmiştir. II.Kaynak suyu ile kurulan reaktörlerde deney süresince ulaşılan en yüksek bakteri derişimi $2,15$ g UAKM/L olarak ölçülmüştür. Hidrojen üretiminin gözlenmediği I.Kaynak suyu ile kurulan fotofermantasyon reaktörlerinde biyokütle üretimi de göreceli çok daha azdır.



Şekil 4.17. İki-aşamalı sistemde, a) I.Kaynak suyu, ve b) II.Kaynak suyu ile kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde *R.Capsulatus* derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)

Çalışma süresince düzenli olarak alınan numunelerle UYA analizi yapılmıştır. Reaktörlere ait UYA derişimleri Şekil 4.18'de verilmiştir. Şekil 4.18a'da görüldüğü üzere, II.Kaynak suyu ile kurulan reaktörlerde asetik asit ilk 168 dakika içinde (11,1±0,2 mM HAc/saat) tüketilmektedir. Bütirik asidin ise yarıya yakın kısmı, asetik aside eş zamanlı olarak düşük bir hızda (2,3±0,2 mM HBU/saat) giderilmektedir. Asetik asit, tüm reaktörlerde tamamiyle tüketilirken, bütirik asit yaklaşık 1,1±0,2 mM'a kadar giderilmiştir. Eser miktardaki propiyonik asidin de (1,1±0,1 mM) deneyin ilk 48 saatlik kısmında tüketildiği görülmektedir. Bununla beraber 2,3±0,2 mM derişime kadar çıkan formik asit üretimi gözlenmiştir.



Şekil 4.18. İki-aşamalı sistemde, a) II.Kaynak suyu, ve b) I.Kaynak suyu ile kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde UYA derişimlerinin zamana karşı değişimleri (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)

Şekil 4.18b'de görüldüğü üzere, I.Kaynak suyu ile kurulan reaktörlerde ise asetik asit ilk 168 dakika içinde (5,1±0,2 mM HAc/saat), II.Kaynak suyu ile kurulanlara kıyasla az miktarda tüketilmektedir. Yüksek derişime sahip bütirik asit de asetik aside eş zamanlı olarak düşük bir hızla (2,3±0,1 mM HBU/saat) giderilmektedir. I.Kaynak suyu ile kurulan bu reaktörlerde, farklı olarak, asetik asit de bütirik asit gibi tamamiyle tüketilememiştir. Asetik asit 168 saat sonunda yaklaşık 5,9±0,3 mM'a kadar, bütirik asit ise 6,4±0,1 mM'a kadar giderilmiştir. Az miktardaki propiyonik asidin de (2,1±0,2 mM) deneyin ilk 48 saatlik kısmında tüketildiği

görülmektedir. Bununla beraber $1,2 \pm 0,1$ mM derişime kadar çıkan formik asit üretimi gözlenmiştir.

Sonuç olarak,

- İki-aşamalı sistemde (AKR-Karanlık Fermantasyon-Fotofermantasyon), AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin 1.-4.işletim sürecinin çıkış sularını temsil eden I.Kaynak suyu ile kurulan reaktörlerde hidrojen üretimi olmamış; biyokütle üretimi ve UYA tüketimi az miktarda gerçekleşmiştir. AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin 5.işletim süreci çıkış suları (II.Kaynak suyu) ile kurulan reaktörlerde ise etkili bir hidrojen üretimi ($0,054$ g H_2 /g HAc, $1,61$ mmol H_2 /mmol HAc, $0,48$ mmol H_2 /L.saat) olmuştur.
- Üç-aşamalı sistemde (AKR-Karanlık Fermantasyon-Metanojenesis-Fotofermantasyon), AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin 1.-4.işletim sürecinin çıkış suları (I.Kaynak suyu) ile kurulan metanojenesis sistemi çıkış suları, besin olarak kullanıldığı fotofermantasyon reaktörlerinde hidrojen üretimine yol açmamıştır. Fakat, AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin 5.işletim sürecinin çıkış suları (II.Kaynak suyu) ile kurulan metanojenesis sistemi çıkış suları, besin olarak kullanıldığı fotofermantasyon reaktörlerinde etkin bir hidrojen üretimi ($0,052$ g H_2 /g HAc, $1,56$ mmol H_2 /mmol HAc, $0,17$ mmol H_2 /L.saat) sağlamıştır.
- Hem iki-aşamalı hem de arada metanojenesis sisteminin yer aldığı üç-aşamalı sistemler benzer fotofermantatif tepkiler (ve H_2 verimi) göstermiştir. 2.aşama olarak Metanojen sistemi yer alsa da almasa da, AKR-Karanlık fermantasyon sistemi 1.-4.işletim süreci çıkış sularından (I.Kaynak suyu) fotofermantatif H_2 üretilememekte; fakat II.Kaynak suyu ile H_2 üretilebilmektedir. Dolayısıyla, olası inhibisyon kaynağı, AKR-karanlık fermantasyon sisteminde üretilen bir maddedir.
 - Benzer özellikteki I.Kaynak ve II.Kaynak sularından sadece I.Kaynakta inhibisyon gözlenmesi; olası inhibisyon etkisi yaratan maddenin AKR.Karanlık fermantasyon 1.-4.işletim süreci ile ilişkilendirilmiştir.
 - AKR-Karanlık fermantasyon sistemi 5.işletim süreci çıkış suyu (II.Kaynak suyu) kullanıldığında, fotofermantatif H_2 üretimini inhibe eden olası madde az miktarda üretiliyor ya da hiç üretilmiyor olabilir.
 - AKR-karanlık fermantasyon 1.-4.işletim süreçlerinde, Katı Bekletme Süresi (KBS) olarak 10-15 gün; 5.işletim sürecinde ise 3-5 gün uygulanmıştır (Tablo 4.7). Dolayısıyla, 3-5 günden yüksek KBS değerleri uygulandığında olası inhibe eden madde üretiliyor olabilir.

- Üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olarak metanojenesis sisteminin varlığı, fotofermentatif H₂ üretim hızını üçte bir düşürmektedir. Bu durum, çözünmüş haldeki UYA derişiminin büyük oranda metanojenesiste tüketilmesi ile ilişkilendirilmiştir.

4.3 Sonuç

AKR-karanlık fermantasyon sistemi için optimum işletim koşullarının incelendiği ve üç-aşamalı sistemin (sırasıyla AKR-Karanlık fermantasyon, kesikli anaerobik ve kesikli fotofermantasyon dizini) enerji veriminin araştırıldığı / karşılaştırıldığı İş Paketi 3 kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özet olarak sunulmuştur.

Üç-aşamalı sistemde, ilk aşama olan AKR-Karanlık fermantasyon sistemi deneyleri;

- Sürekli reaktörlerde karanlık fermentatif hidrojen üretiminde optimum pH değerinin, sukrozla çalışılan kesikli reaktör işletimindeki gibi 7 değil; 5,5 olduğu belirlenmiştir.
- AKR'de karanlık fermentatif hidrojen üretimi, kararlı koşullarda uzun süreli gerçekleşmemektedir.
 - Reaktör işletiminin N₂ ile havalandırılması vb. fiziksel değişiklikler, hidrojen üretimini artırmaktadır.
- %40 gibi H₂ tepegazı yüzdelerinin ardından, yüksek kısmi basınç kaynaklı inhibisyon gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu durum, homoasetojenlerin ve ilerleyen süreçte pH 5,5'da aktif hale gelebilen metanojenlerin etkinleşmesine; dolayısıyla, H₂ üretim veriminin düşük değerlerde seyretmesine yol açmaktadır.
 - Paralel şekilde H₂ üretim hızı da düşmektedir. Fakat karanlık fermantasyonda sınırlayıcı faktör hızdan ziyade verim olduğu için, sonuçların değerlendirilmesinde verim esas alınmıştır.
- Ortam pH'sı ve ardından HBS değeri optimize edilerek elde edilen en yüksek H₂ verimi 2,52 mol H₂/mol heksoz'dur. Bu değer, AKR çalışmaları bazında literatürde bugüne kadar tanımlanan en yüksek değer olan 2,8 mol H₂/mol heksoz'a çok yakındır.
 - En yüksek verimin elde edildiği koşullar; pH=5,5; HBS=12 saat, döngü süresi=8 saat, OYH=22,4 gKOİ/L.gün ve KBS_{ortalama} =9,5 gün olarak belirlenmiştir.
 - Bu işletim koşullarında hesaplanan üretim hızı **7,07 L H₂/L_{reaktör}-gün**'dür.
- Karanlık fermantasyon çok itinali kontrol gerektiren, işletiminde olumlu ve olumsuz yönde çok hızlı tepki veren bir sistemdir.
- KBS parametresi, reaktörde hidrojen üreticilerinin baskınlaşması ve metanojenlerin atılması için etkin rol oynayan önemli bir parametredir.

- KBS'nin, sistemin üretim kapasitesini ve kararlılığını etkilediği belirlenmiştir. Görece kısa (3-5 gün aralığındaki) KBS değerleri, 9-15 günlük KBS değerlerine göre sistemi daha kararlı kılmaktadır.
 - Düşük KBS'nin (ortalama 4,2 gün) sistem verimini arttıramasa da sistemin ortalama bir verim değerinde kararlılık süresini arttırdığı belirlenmiştir.
- AKR çalışmalarında, sistematik bir UAKM atımına ihtiyaç vardır. Karanlık fermantatif bakterilerin büyüme hızının oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. KBS'yi HBS'ye eşitleyen kemostat sistemleri karanlık fermantasyon ile hidrojen üretimi için değerlendirilebilir.
- AKR-karanlık fermantasyon çalışmasının melasla gerçekleştirileceği çalışmada (İş Paketi 7), düşük ve sabitlenen KBS değerlerinde işletim, kararlılığı ve hidrojen üretim verimini artırabilir.

Üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan kesikli anaerobik reaktör deneyleri;

- AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin 2 farklı çıkış suyu (Test 1: 1.-4.İşletim süreçleri ve Test 2: 5.İşletim süreci) ile kurulan kesikli anaerobik (metanojenesis) reaktörleri, yüksek metan üretim verimi elde etmiştir (sırasıyla 337 ve **344 mL CH₄/g çKOİ_{eklenen}**, 35°C'da).
 - Farklı AKR-işletim koşullarına rağmen, atıksu özellikleri benzerdir. Bu durum benzer verim (337 ve 344 mL CH₄/g çKOİ_{eklenen}) ve arıtım yüzdesi (%85,3 ve %87,1) değerlerini açıklamaktadır.
- Reaktörler gaz üretimi sonlanana kadar işletildiğinde, 3.aşama olan fotofermantasyon için UYA kalmaması sebebiyle, işletimin 6-7.gününde (eşlenik reaktörler için) inkübasyon sonlandırılmıştır. Kısa süreli inkübasyonda, farklı atıksu tipinin etkisi gözlenmiştir:
 - AKR-Karanlık fermantasyon 5.işletim süreci çıkış suları, daha kısa sürede daha yüksek metan üretim verimi sağlamış, metan üretim hızını arttırmıştır.
 - AKR-Karanlık fermantasyon 5.işletim süreci koşulları, takip eden anaerobik reaktör (metanojenesis) aşaması için, daha elverişli UYA kompozisyonu sağlamaktadır.
 - Üç-aşamalı sistemin enerji verimi hesaplanırken, kısa inkübasyon sürecinde daha yüksek verim elde edilen (Test 2; AKR-5.işletim çıkış suyu kullanılan) kesikli anaerobik reaktörler baz alınmıştır. Bu reaktörlerin metan üretim verimi **116 mL CH₄/g çKOİ**dir (35°C). Metan üretim hızı ise 0,6 mmol CH₄/L_{reaktör}·gün'dür.

- Sukrozla işletilen AKR-karanlık fermantasyon çıkış suyu ile kurulan anaerobik reaktörlerde (Test 1 ve 2) elde edilen metan verimleri, direk sukroz ile kurulanlara (tek-aşamalı Test 3 ve 4; 247 mL CH₄/ g çKOİ_{eklenen}) kıyasla %27-35 daha fazladır.
 - İki-aşamalı sistem (karanlık fermantasyon-metanojenesis), tek aşamalı sisteme (metanojenesis) kıyasla metan üretimi bazında çok daha avantajlıdır.

İki-aşamalı sistemde, 2.aşama olan kesikli fotofermantasyon reaktör deneyleri;

- AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin, sadece, II.Kaynak suyu (AKR-Karanlık fermantasyon sistemi 5.işletim süreci) ile kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde, hidrojen üretilmiştir.
 - Bu atıksu ile elde edilen hidrojen üretim hızı **0,48±0,08 mmol H₂/L.saat** tir.
 - Hidrojen üretim hızının optimum koşullarda elde edilecek değere (1,04 mmol H₂/L.saat) kıyasla düşük olması, AKR-karanlık fermantasyonunda oluşan farklı karbon kaynağı karışımları ve bunların bakteriler üzerindeki etkisi ile ilişkilendirilebilir.
 - Hidrojen üretim verimi, **1,61±0,24 mol H₂/mol asetat** veya 0,054 g H₂/g asetat (**0,050 g H₂/g KOİ-HAc**)'tir.
 - Bu verim, İş Paketi 2'de direk asetik asitle kurulan en yüksek verim değerine (0,11 g H₂/g asetat; 0,10 g H₂/g KOİ-HAc; 3,3 mol H₂/mol asetat) göre düşük olsa da, bazı iki-aşamalı sistemlerle kıyaslanabilir düzeydedir.
 - Bu verim, S=21 mM HAc (30 mM tUYA), I= 3955 lux ve S/X₀= 8,3 g KOİ_{Asetat}/g UAKM (9,4 g KOİ/g UAKM) koşullarında elde edilmiştir.
- AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin, I.Kaynak suyu (AKR-Karanlık fermantasyon sistemi 1.-4.işletim süreci çıkış suları karışımı) ile kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde hidrojen üretilmemiştir.
 - Herhangi bir amonyum iyonu, pH, bakteriyel kontaminasyon, ışık şiddeti, tUYA veya bütirik asit derişimi kaynaklı bir inhibisyon bulunmamaktadır.
 - Benzer (TAN, UYA tipi ve derişimleri, pH) özelliklerine sahip (Tablo 4.4) I.Kaynak ve II.Kaynak sularından sadece I.Kaynaktan hidrojen üretilmemesi, I.Kaynak suyunda bakterilere inhibisyon etkisi yaratabilecek bir maddenin veya maddelerin varlığını göstermektedir. Bu durum, I.Kaynak suyunun üretildiği AKR-Karanlık fermantasyon 1.-4.işletim süreçleri ile ilişkilendirilmiştir.
 - AKR-karanlık fermantasyon 1.-4.işletim süreçlerinde, KBS olarak 10-15 gün; 5.işletim sürecinde ise 3-5 gün uygulanmıştır (Tablo 4.7). Dolayısıyla, 3-5 günden yüksek KBS değerleri uygulandığında olası inhibisyon maddesi üretiliyor olabilir.

- Öte yandan, yüksek miktarda karanlık fermantatif hidrojen üretiminin gözleendiği günlerde alınan çıkış suları (AKR-2.işletim süreci, 31.-35.günler) ile kurulan fotofermantasyon çalışmasında, yüksek verim değerleri (0,078 g H₂/g KOİ-HAc veya 2,5±0,03 mol H₂/mol asetat; benzer 0,49±0,01 mmol H₂/L.saat üretim hızı) elde edilmiştir (EK-I).
- Dolayısıyla, tek başına KBS parametresi, inhibisyon maddesi üretiminden sorumlu olmayabilir. Stabil ve efektif bir karanlık fermantasyon, daha yüksek UYA / HAC üretimi ve takip eden fotofermantasyonda da daha yüksek hidrojen üretimi demektir. Dolayısıyla, KBS gibi parametreler dikkate alınarak, stabil bir karanlık fermantasyon sağlanmalıdır.
- AKR-Karanlık fermantasyon sistemi 5.işletim süreci çıkış suyu (II.Kaynak suyu) kullanıldığında, fotofermantatif H₂ üretimini inhibe eden olası madde az miktarda üretiliyor ya da hiç üretilmiyor olabilir.
- Karanlık fermantasyon çıkış suyu amonyum iyonu bazında yüksek derişime sahip olmadığı için, takip eden fotofermantasyon reaktörleri için ön arıtıma ihtiyaç duyulmamıştır.

Üç-aşamalı sistemde, 3.aşama olan kesikli fotofermantasyon reaktör deneyleri;

- Üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan kesikli anaerobik reaktörlerin 2 farklı çıkış suyu ile kurulan fotofermantasyon reaktörlerinden, sadece, II.Kaynak suyunun (AKR-Karanlık fermantasyon sistemi 5.işletim süreci) kullanıldığı dizindeki fotofermantasyon reaktörlerinde hidrojen üretilmiştir.
 - Elde edilen hidrojen üretim hızı (prodüktivite) **0,17 mmol H₂/L.saat**, verimi ise **0,049 g H₂/g çKOİ**'dir (0,052 g H₂/g asetat; **1,56 mmol H₂/mmol HAC**). (1 g HAC'ın KOİ eşleniği 1,066 g KOİ'dir).
- Kesikli anaerobik reaktörlerin çıkış suyu yüksek amonyum derişimi içerdiği için, ön arıtıma tabi tutulmalıdır.
- Üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan kesikli anaerobik reaktörlerin 2 farklı çıkış suyu ile kurulan fotofermantasyon reaktörlerinden, I.Kaynak suyunun (AKR-Karanlık fermantasyon sistemi 5.işletim süreci) kullanıldığı dizindeki fotofermantasyon reaktörlerinde ise hidrojen üretilmemiştir.
- I.Kaynak ve II.kaynak suları ile gözlenen bu durum, iki-aşamalı sistem fotofermantatif hidrojen üretiminde gözlenen duruma benzerdir. Hem iki-aşamalı, hem de üç-aşamalı sistemde benzer hidrojen üretim verimleri (II.Kaynak suyu kapsamında) elde edilmiştir.

- Dolayısıyla, üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan metanojenesis sistemi fotofermantasyonu olumsuz etkilememektedir.
 - Fakat metanojenesis sisteminin varlığı, fotofermentatif H₂ üretim hızını üçte bir düşürmektedir. Bu durum, çözünmüş haldeki UYA derişiminin büyük oranda metanojenestte tüketilmesi ile ilişkilendirilmiştir.
- Fotofermantatif hidrojen üretimindeki olası inhibisyon, I.Kaynak suyu; dolayısıyla, AKR-Karanlık fermantasyon sistemi 1.-4.işletim süreci / koşulları ile ilişkilidir.

Üç-aşamalı ve İki-aşamalı sistemlerden elde edilen toplam enerji verimleri

İş Paketi 3 kapsamında yapılan çalışmalarda, 3 farklı reaktör entegrasyonu oluşturulabilmektedir. Bu sayede üç farklı entegrasyondan elde edilen toplam enerji verimleri karşılaştırılabilmiştir. Entegrasyonu yapılan sistem kombinasyonları şu şekildedir;

1. İki-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli metanojenesis (anaerobik) sistemi
2. İki-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli fotofermantasyon sistemi
3. Üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli metanojenesis (anaerobik) + Kesikli fotofermantasyon sistemi

Bu üç farklı reaktör entegrasyonundan elde edilen toplam enerji miktarını belirlemek ve karşılaştırabilmek için her bir reaktör aşamasına ait verim aynı birime dönüştürülmüştür; verimler g KOİ başına üretilen g H₂ veya g CH₄ bazında tanımlanmış ve toplam enerji g çKOİ bazında (kJ/g çKOİ) hesaplanmıştır.

Üç farklı reaktör entegrasyonunda ilk aşama olan AKR-karanlık fermantasyon sistemi, 5 farklı işletim koşulunda çalıştırılmıştır. Fakat, uzun süreli stabil hidrojen üretimi elde edilemediği için, 1.-4.işletim koşullarına ait olan çıkış suları biriktirilerek (I.Kaynak suyu), takip eden reaktörlere uygulanmıştır. AKR-karanlık fermantasyon sisteminde, optimum işletim parametrelerinin uygulandığı 5.işletim süreci çıkış suları ise, ayrı olarak toplanmış, ve II.Kaynak suyu olarak takip eden reaktörlerde besin olarak kullanılmıştır. Dolayısıyla, bu iş paketinin ilk aşamalarında, iki farklı AKR çıkış suyunun (işletim koşullarının) iki- ve üç-aşamalı sistemlerde toplam enerji üretimine etkisinin araştırılması planlanmıştır. Fakat I.kaynak suyunun kullanıldığı entegre sistemin fotofermantasyon reaktörlerinde (hem iki-hem üç-aşamalı sistemlerde) hidrojen üretilmemiştir. Ayrıca, iki-aşamalı sistemde, I.kaynak suyu ile kurulan metanojenesis sisteminde üretim hızı, II.kaynak suyu ile kurulana kıyasla daha düşüktür. Ek olarak, üç-aşamalı sistemde, 3.aşama olan fotofermantasyon dikkate alınarak

metanojenezis inkübasyon süreci kısa tutulduğunda, I.kaynak suyundan metanojenezis sonucu elde edilen verim II.kaynak suyundan elde edilen verime kıyasla düşüktür.

Sonuç olarak, iki-aşamalı ve üç-aşamalı entegre sistemlerin enerji verimleri karşılaştırılırken, takip eden reaktörlerde her koşulda daha yüksek verimin elde edildiği AKR çıkış suyu esas alınmıştır. Diğer bir deyişle, entegre sistemlerin enerji verimleri karşılaştırılırken, AKR-karanlık fermantasyon 5.işletim sürecinden elde edilen enerji ve bu sürece ait çıkış suyunun (II.Kaynak suyu) kullanıldığı ardışık reaktörlerin (ve dizininin) enerji verimleri esas alınmıştır. Entegre sistemlerden elde edilebilecek en yüksek verim belirlenmek istendiği için, hesaplarda her reaktör aşamasında elde edilen en yüksek verim kullanılmıştır. Üç farklı sistem entegrasyonu ve herbirinden elde edilen enerji miktarları Tablo 4.13’de sunulmuştur.

Tablo 4.13. İki-aşamalı ve üç-aşamalı entegre sistemlerden elde edilen maksimum H₂ veya CH₄ üretim verimleri ve enerji değeri

Entegre reaktör sistemi	Her bir reaktörün verim (g H ₂ veya g CH ₄ /g çKOİ _{eklenen}) ve brüt ısı enerjisi (kJ/g çKOİ _{eklenen}) değerleri ^{a, b, c}						Entegre sistemde üretilen ısı enerjisi ^b (kJ/g çKOİ _{eklenen})	
	AKR-KF ^c		Kesikli M ^d		Kesikli FF ^e		Brüt ısı	Net ısı
	Verim	Enerji	Verim	Enerji	Verim	Enerji		
İki-aşama: (AKR-KF + Kesikli M)	0,017	2,41	0,22	12,23	-	-	14,64	13,03
İki-aşama: (AKR-KF + Kesikli FF)	0,017	2,41	-	-	0,050	7,09	9,50	8,00
Üç-Aşama: (AKR-KF + Kesikli M + Kesikli FF)	0,017	2,41	0,074	4,11	0,049	6,95	13,47	11,58

^a AKR-Karanlık fermantasyon reaktörü= AKR-KF; Kesikli M= Kesikli Metanojenezis (anaerobik) reaktör; Kesikli F= Kesikli Fotofermantasyon reaktörü

^b Brüt ısı enerjisi hesabında, H₂ için 141.8 kJ/g, CH₄ için 55.58 kJ/g; Net ısı enerjisi değerleri = H₂ için 119.47 kJ/g, CH₄ için 49.98 kJ/g değerleri kullanılmıştır (Lewandowski, 1999).

^c AKR-KF 5.işletim sürecine ait en yüksek verim: 1,66 mol H₂/mol heksoz esas alınmıştır. 1 g heksoz= 1,07 g KOİ; 1 g sukroz= 1,12 g KOİ.

^d İki-aşamalı sistemde, 344 mL CH₄/g çKOİ, üç-aşamalı sistemde 116 mL CH₄/g çKOİ’dir. Substrat olarak AKR-KF 5.işletim süreci çıkış suyu kullanılmıştır.

^e AKR-KF 5.işletim süreci çıkış suyu ile kurulan kesikli metanojenezis sistemi çıkış suyundan elde edilen fotofermantatif verim 0,052 g H₂/g HAC’dır. (1 g HAC= 1,066 g KOİ)

Tablo 4.13'de görüldüğü üzere, karşılaştırılan 3 farklı reaktör entegrasyonundan, birim karbon kaynağı (KOİ) başına en yüksek toplam ısı enerjisi, iki-aşamalı karanlık fermantasyon-metanojenesis sisteminde (14,64 KJ/g çKOİ) elde edilmiştir. Bu proje ile ilk defa araştırılan üç-aşamalı karanlık fermantasyon-metanojenesis-fotofermantasyon entegre sistemi, iki-aşamalı karanlık fermantasyon-metanojenesis sistemine yakın bir toplam enerji verimi (13,47 KJ/g çKOİ) elde etmiştir. Öte yandan, en düşük toplam ısı enerjisi verimi (9,50 KJ/g çKOİ) iki-aşamalı karanlık fermantasyon-fotofermantasyon sisteminde gözlemlenmiştir.

İki-aşamalı karanlık fermantasyon-metanojenesis sistemine kıyasla, üç-aşamalı karanlık fermantasyon-metanojenesis-fotofermantasyon entegre sistemi kurmak, yakın değerlerde enerji elde etse de, reaktör kurulum ve işletimi açısından maliyeti artıracaktır. Fakat, iki-aşamalı karanlık fermantasyon-fotofermantasyon sistemlerinde, toplam enerji üretimini artırmak için, ara aşama olarak bir metanojenesis sistemi eklenmesi toplam (brüt) ısı enerjisi verimini %42 artırmaktadır. Literatür verileri incelendiğinde, iki-aşamalı karanlık fermantasyon-fotofermantasyon sistemlerinde bugüne kadar elde edilen en yüksek hidrojen üretim verimi 7,2 mol H₂/mol heksoz'dur. Bu değer, 0,08 g H₂/g heksoz veya 0,075 g H₂/g KOİ'ye, enerji bazında da 10,6 kJ/g KOİ'ye denk gelmektedir. Dolayısıyla, bu projede önerilen üç-aşamalı sistem ile bugüne kadar literatürde iki-aşamalı hidrojen sistemlerinden elde edilen en yüksek verimden daha yüksek bir verim elde etmiştir. Bu değer (13,47 kJ/g çKOİ), H₂/heksoz birimine dönüştürülecek olursa; üç-aşamalı sistemden 0,095 g H₂/g KOİ; 0,102 g H₂/g heksoz veya 9,18 mol H₂/mol heksoz elde edilmiştir. Diğer bir deyişle, üç-aşamalı sistem sayesinde, mol H₂/mol heksoz birimi bazında, verim %28 artırılmıştır. Önerilen üç-aşamalı sistemde hidrojen bazında elde edilen toplam verim değeri (9,18 mol H₂/mol heksoz), ekonomik değer olarak tanımlanan 8 mol H₂/mol heksoz veriminden (Yokoi vd., 2002) fazladır.

İki-aşamalı karanlık fermantasyon-fotofermantasyon sistemi ile üç-aşamalı karanlık fermantasyon-metanojenesis-fotofermantasyon entegre sisteminin bir diğer karşılaştırma noktası entegre sistemin çıkış suyu karakteristiğidir. Bu projede, entegre sistemlerin, sadece enerji üretim verimleri bazında karşılaştırılması planlanmıştır. Tam bir enerji fizibilitesi yapılacak olursa, reaktörlerin kurulum ve işletim giderlerinin yanısıra, entegre sistem çıkış atıksuyunun alıcı ortama deşarjı öncesinde arıtım gereksinimi ve harcanacak enerji de dikkate alınmalıdır. Sadece çıkış KOİ derişimleri bazında basit bir karşılaştırma yapılmış, oluşan atıksuyun deşarjı öncesinde, çıkış suyunun aerobik arıtımı için gereken enerji ihtiyacı hesaplanmıştır (Tablo 4.14). Çıkış KOİ derişimlerinden de anlaşılacağı üzere, en düşük çıkış KOİ derişime sahip olan iki-aşamalı karanlık fermantasyon-metanojenesis sistemi en az

enerjinin tüketileceği sistem olarak belirlenmiştir. Üç-aşamalı sistem, iki-aşamalı karanlık fermantasyon-fotofermantasyon sistemine kıyasla daha düşük çıkış KOİ derişimine sahip olduğu için, havalandırma için gerekli enerji daha azdır. Üç-aşamalı sistem, iki-aşamalı karanlık fermantasyon-fotofermantasyon sistemine kıyasla aerobik arıtım için duyulan enerji ihtiyacı bazında da (yaklaşık 6 kat) avantajlı görünmektedir.

Tablo 4.14. Entegre sistemlerin çıkış suyunun aerobik arıtımı için gerekecek enerji ihtiyacı

Entegre reaktör sistemi	Çıkış çKOİ (mg/L)	Kabuller		O ₂ ihtiyacı (kg O ₂ /gün) ^a	Havalandırma için gereken (kJ/gün) ^c	Üç-aşamalı sistemle karşılaştırma
		Atıksu debisi (m ³)	Aerobik arıtım verimi (%)			
İki-aşama:						
(AKR-KF + Kesikli M)	280±12	10	100	2,24	5305	0,41
İki-aşama:						
(AKR-KF + Kesikli FF)	3960±150	10	100	31,7	75079	5,827
Üç-Aşama:						
(AKR-KF + Kesikli M + Kesikli FF)	680±60	10	100	5,44	12884	1

^a AKR-Karanlık fermantasyon reaktörü= AKR-KF; Kesikli M= Kesikli Metanojenesis (anaerobik) reaktör; Kesikli F= Kesikli Fotofermantasyon reaktörü

^b O₂ ihtiyacı = Çıkış çKOİ x Atıksu debisi x arıtım yüzdesi x 0,8 kg O₂ / kg çKOİ_{tüketilen}

^c 1,52 kg O₂ / kWh, 1 kWh = 3600 kJ

Tablo 4.13'de görüldüğü üzere, üç-aşamalı sistemde, metanojenesisden sonra fotofermantasyona UYA derişimi aktarılabilmesi için, metanojenesis yarıda kesilmiştir. Diğer bir deyişle, metanojenesisden fotofermantasyona enerji aktarılmış, metanın neredeyse 3 katı enerjiye sahip hidrojenin 3.aşamada üretimi sağlanmıştır. Burada dikkat edilmesi gereken bir nokta, AKR-karanlık fermantasyon sisteminde uygulanan giriş KOİ derişiminin 11 g/L olmasıdır. Bu değer, karanlık fermantasyon sonrası az bir miktarda giderilmekte (en düşük çıkış KOİ 9 g/L), uygun derişim sayesinde UYA anaerobik reaktörlerde etkin şekilde tüketilmektedir. Dolayısıyla, daha yüksek KOİ derişimine sahip karanlık fermantasyon sistemleri, metanojenesis sisteminin yarıda kesilmesine gerek kalmadan, 3.aşama olan fotofermantasyona besin kalmasını sağlayabilirler. Yüksek giriş KOİ derişimlerinde (>15 g/L) çalışılan üç-aşamalı sistemler, daha yüksek enerji eldesini sağlayabilir. Fakat öncelikle, fotofermantasyon sisteminde, anaerobik (metanojenesis) reaktörleri sonrasında olası

inhibisyon kaynağının belirlenmesi ve giderilmesi gerekmektedir. Ayrıca, yüksek giriş KOİ derişiminin ($> 30-40$ g/L çKOİ) karanlık fermantatif H_2 üretimini de inhibe edebileceği dikkate alınmalıdır.

AKR-karanlık fermantasyon için en uygun işletim koşulu olarak, yukarıda da belirtildiği üzere, üç-aşamalı sistemde en yüksek toplam ısı enerjisi elde edilmesine yol açan koşulların tanımlanması planlanmıştır. Bu amaçla, AKR-karanlık fermantasyon sisteminden alınan iki farklı çıkış suyu (AKR-1.-4. işletim süreci çıkış suları karışımı ve AKR-5. işletim sürecine ait çıkış suları), üç-aşamalı sistemde ardışık anaerobik reaktöre, anaerobik reaktör çıkış suları da takip eden fotofermantasyon reaktörlerine uygulanmıştır. Çalışma sonuçları, AKR-5. işletim sürecinden elde edilen çıkış sularının (II. Kaynak suyu) takip eden metanojenesis ve fotofermantasyon reaktörlerinde sırasıyla daha fazla metan ve hidrojen üretim verimine yol açtığını göstermiştir. Daha yüksek hidrojen ve metan üretim verimi, daha yüksek ısı enerjisi verimini sağlayacaktır. Dolayısıyla üç-aşamalı sistemin enerji hesaplarında da (Tablo 4.13) AKR-5. işletim sürecine ait atıksu ile işletilen sistemlerin verim değerleri kullanılmıştır. Sonuç olarak, AKR-5. işletim sürecinde uygulanan işletim koşulları AKR-karanlık fermantasyonu için en uygun işletme koşulu olarak belirlenmiştir. Bu koşullar; $\text{pH}=5,5$; $\text{HBS}=12$ saat, döngü süresi= 8 saat, $\text{OYH}=22,4$ g KOİ/L.gün ve $\text{KBS}_{\text{ortalama}}=4,2$ gün'dür.

5. ÜÇ-AŞAMALI SİSTEMDE METANOJENESİSİN OPTİMİZASYONU

Projenin 4.İş Paketi (İP 4) kapsamında yapılması hedeflenen çalışmalar aşağıda sunulmuştur:

- Bir ardışık kesikli reaktör (AKR) kurularak metanojenesis optimizasyon çalışmasının gerçekleştirilmesi
 - Besin olarak, İş Paketi 3 kapsamında kurulan ve en yüksek H₂ üretiminin elde edildiği koşullarda işletilen AKR-karanlık fermantasyon çalışması çıkış suyunun kullanılması
 - AKR-Metanojenesis sistemi için optimum koşulların ve metan üretim veriminin belirlenmesi için HBS'nin kademeli olarak azaltılması (veya OYH'nin kademeli olarak artırılması)
 - Her HBS değerinde kararlı koşullar oluştuğunda çıkış sularının toplanması ve takip eden diğer reaktör aşaması (fotofermantasyon) için -20°C'de saklanması
- AKR-Metanojenesis sisteminde her farklı HBS değerinde kararlı koşullar oluştuğunda ayrılan çıkış suyu ile kesikli fotofermantasyon reaktörlerin kurulması
 - Fotofermantatif H₂ üretim verimi ve hızının araştırılması

Bu iş paketi sayesinde, metanojenesiste denenilen her işletim koşulu (farklı OYH veya HBS) için, üç-aşamalı reaktör konfigürasyonundan elde edilen toplam H₂ verimi ve miktarı, CH₄ üretimi ve toplam enerji üretimi araştırılmıştır. Maksimum enerji üretiminin (veya sonuçlara göre H₂/CH₄ veriminin) sağlandığı koşul, metanojenesis için optimum işletim koşulu olarak belirlenmiştir. Proje önerisinde yer almamakla birlikte, anaerobik reaktörde baskın mikrobiyel türü etkileyeceği ön bilgisi ile KBS parametresi de AKR-Metanojenesis sisteminde araştırılması gereken bir işletim parametresi olarak belirlenmiş ve araştırılmıştır.

5.1 Literatür Bilgisi

Bu iş paketinde, AKR-Metanojenesis sisteminin işletim koşullarını belirlemek için, öncelikle literatür araştırması yapılmıştır. Literatür araştırmasına göre, tek aşamalı metanojenesis ve iki-aşamalı asidojenesis-metanojenesis sistemlerinde, metanojenesis aşaması açısından

hedef, genellikle metan üretiminin ve KOİ arıtım veriminin artırılması yönündedir. Ancak, yukarıda belirtilen proje hedefleri ve özgün değer kapsamında, üç-aşamalı reaktör konfigürasyonundan elde edilecek toplam H₂ ve CH₄ verimi, sadece metanojenesis aşamasından elde edilecek CH₄ verimine kıyasla daha önemlidir. H₂'nin kalorifik enerji değerinin metanın enerjisinin neredeyse 3 katı olduğu dikkate alınır, üç-aşamalı sistemin toplam enerji verimine odaklanması önem kazanmaktadır. Dolayısıyla, metanojenesis reaktörünün optimizasyonu sırasında temel kriter, sadece bu reaktörden yüksek enerji (metan) verimi eldesinden ziyade;

- Metanojenesis reaktör çıkış suyunda, fotofermentatif H₂ üretimi için önemli olan UYA (özellikle asetik asit) derişimlerini de sağlayabilmektir. Bu sayede, takip eden fotofermantasyon reaktöründen kalorifik değeri daha yüksek olan H₂ üretilebilir.
- Ayrıca, karanlık fermantasyona kıyasla, metanojenesis reaktöründe ciddi miktarda KOİ giderimi olması, metanojenesis takip eden fotofermantasyon sisteminin seyreltme ihtiyacını da ortadan kaldıracak veya azaltacaktır. Bu sayede, hem fotofermantasyon reaktör hacminin küçültülmesi sağlanıp hem de karanlık fermantasyon çıkışındaki çeşitli karbon kaynağı türlerinin fotofermantasyon üzerindeki olası inhibisyon etkisi engellenebilir.

Yukarıda belirtilenler doğrultusunda, AKR-metanojenesis sistemi, çıkış suyunda UYA harici organik maddelerin mümkün olduğunca az olmasını sağlayacak ve takip eden fotofermantasyon reaktörü için uygun UYA (özellikle asetik asit) derişimlerinin / kompozisyonlarının eldesini sağlayacak şekilde işletilmelidir. Bu bağlamda yapılan literatür çalışması (Tablo 5.1), AKR-metanojenesis işletiminde dikkate alınacak önemli parametreler, değerleri ve ilgili yorumlar aşağıda sunulmuştur.

Besleme oranı (B/D): AKR işletiminde besleme oranı (B/D), besleme periyodu süresinin döngünün toplam süresine ya da sadece reaksiyon periyodu süresine oranıdır. B/D arttıkça, reaktör içerisindeki UYA derişimi düşmektedir. Kısacası, etkin KOİ arıtımı ve metan üretim verimi açısından AKR işletimi için tavsiye edilen, besleme süresinin zamana yayılarak uzun tutulmasıdır (Angenent ve Dague, 1995). Tersine durumda ise, besleme oranı kıaldıkça reaktörün içerisindeki UYA derişimi artmaktadır. Tablo 5.1'de verilen değerler incelendiğinde, B/D oranı kıaldıkça çıkış suyundaki UYA derişiminin arttığı anlaşılmaktadır. Bu proje kapsamında öncelik, arıtım ve metan üretim veriminden ziyade, (takip eden fotofermantasyon reaktöründeki) hidrojen üretiminin artırılması bazında UYA üretimini artırmak olduğu için, B/D oranı olabildiğince kısa tutulacaktır (Kennedy vd., 1991; Angenent ve Dague, 1995; Shizas ve Bagley, 2002; Shimada vd., 2007; Cheong vd., 2008). Bu kapsamda verilen ve uygulanması hedeflenen değer aralığı 0,05-0,02 B/D'dir (Tablo 5.1).

Tablo 5.1. Çeşitli tasarım parametrelerine göre işletilen anaerobik reaktör çalışmaları ve ilgili değerler

Reaktör Tipi ^a	Karbon kaynağı	Başlangıç KOİ derişimi (g/L)	OYH (g/L.gün)	HBS (gün)	KBS (gün) ^b	KOİ artımı (%)	B/D oranı ^{b, c}	Çıkış UYA derişimi (HAc g/L)	Referans
AAKR	Glikoz	6	3,2	1-2	t.e.	t.e.	0,25-0,75	0,4-0,5	Shizas ve Bagley (2002)
AAKR	Glikoz	10	20	0,5	6	94	t.e.	0,36	Angenent ve Dague (1995)
AAKR	Glikoz	3,75-30	3 – 12	1,25-5	20-70	50-60	0,02-0,08	7,7 -21,2	Cheong vd. (2008)
AAKR	Glikoz	5,85	3,5	1,7	t.e.	94,3	0,007	1,7 – 3,0	Shimada vd. (2007)
AAKR	Glikoz ve UYA	1	4-5	4-5	t.e.	60-70	0,05 - 0,06		Brito vd. (1997)
AAKR	Sukroz ve HAc	7	4,6-18,4	2,62-0,65	t.e.	40-97	0,2 - 0,5	3- 3,5	Kennedy vd. (1991)
YAÇYR	Şurup endüstrisi atıksuyu	63,5 -126,7	20,4	3,1-6,2	t.e.	t.e.	t.e.	3-7	Nakasaki vd. (2013)
AAKR	Zeytin endüstrisi atıksuyu	2 – 32	5,3	0,5-3	45	83	t.e.	1,3	Ammary vd. (2005)
AAKR	Peyniraltı suyu	1 – 6	2 - 12	0,5	t.e.	73	0,25	0,75	Damasceno vd. (2007)
AAKR	Mandıra atıksuyu	t.e.	12,8	40-5	t.e.	68	t.e.	0,5-0,6	Göblös vd. (2007)
TKTR	Karışık çamur	t.e.	2-16	t.e.	4-20	40-80	t.e.	0,08-0,45	Lee vd. (2011)
YAÇYR	Sentetik atıksu	3,21-7,49	3,5-45	0,2-1	t.e.	96-98	t.e.	0-5	Kalyuzhnyi vd. (1996)

^a: AAKR: Anaerobik ardışık kesikli reaktör, TKTR: Tam karıştırmalı tank reaktör, YAÇYR: Yukarı akışlı çamur yataklı reaktör,

^b t.e.: Tespit edilmemiştir.

^c B/D: AKR işletiminde besleme oranı, besleme periyodu süresinin döngünün toplam süresine ya da sadece reaksiyon periyodu süresine oranıdır.

F/M oranı: F/M oranı, birim zamanda birim mikroorganizma (g UAKM) başına yüklenen organik yük (g KOİ) demektir. F/M oranı (g KOİ/g UAKM.gün) sürekli anaerobik reaktörlerin önemli kontrol parametrelerinden biridir. Literatüre göre birim zamanda birim mikroorganizma başına yüklenecek organik yük miktarı (F/M) fazla oldukça çıkış suyu UYA derişimi artmaktadır (Angenent ve Dague, 1995). Kesikli reaktörler için kullanılan S/X₀ oranı ile ardışık kesikli işletilen AKR için kullanılan F/M oranı birebir şekilde karşılaştırılabilecek

parametreler olmasa da, biyokimyasal anlamda benzer değerleri ifade etmek için kullanılabilir. Dolayısıyla, takip eden fotofermantasyon çalışmasına uygun miktarda UYA temini için bu çalışmada daha önce S/X_0 oranı “0,5” ile çalıştırılan anaerobik kesikli reaktörlerden farklı olarak, F/M oranı “1” kullanılması planlanmıştır. Bu sayede, 0,5 S/X_0 'de metana dönüşümü desteklenen UYA'nın, $S/X_0=1$ 'de hem tamamiyle tüketilmesinin hem de daha yüksek miktarda UYA'nın üretilmesinin (karanlık fermentasyona sapmanın) engellenmesi esas alınmıştır.

OYH: Literatürdeki ilgili çalışmalar incelendiğinde, OYH değeri 10 g KOİ/L.gün ve üzeri olan çalışmalarda reaktör çıkış suyundaki UYA derişiminin arttığı gözlemlenmiştir (Kennedy vd., 1991; Kalyuzhnyi vd., 1996; Damasceno vd., 2007; Cheong vd., 2008; Lee vd., 2011; Kwon ve Nagasaki 2013). Ayrıca, Kalyuzhnyi vd. (1996), OYH değeri arttıkça, reaktör içerisinde, *Methanosarcina* türünün *Methanosaeta* türüne göre baskın olduğunu belirtmiştir. *Methanosarcina* türünün asetoklastik metan üreticiler arasından baskın tür haline getirilmesinin hedeflenmesindeki amaç, *Methanosaeta* türüne göre daha yüksek substrata duyarlılık ($K_s= 49\pm 19 - 280\pm 77$ mg çKOİ/L) değerine sahip olmasıdır (Fukuzaki vd., 1990). Bu sayede, anaerobik reaktör çıkış suyunda takip eden fotofermantasyon reaktörü için daha yüksek UYA derişimi elde edilebilir. Dolayısıyla, AKR'nin 10 g çKOİ/L.gün OYH değerinde işletilmesine karar verilmiştir.

HBS: AKR-karanlık fermentasyon sistemi çıkış suyu ortalama 10 g çKOİ/L derişimine sahiptir (Bölüm 5.2.2.1). AKR-metanojenesis sisteminde besin olarak kullanılacak bu atıksu ile AKR'nin 10 g çKOİ/L.gün'lük OYH'de işletilebilmesi için HBS süresi 24 saat seçilmiştir. Literatür bilgilerine göre, HBS değeri 4 gün ve altında olduğunda reaktör çıkış suyundaki UYA derişimi artmaktadır (Tablo 5.1). Ek olarak, Ma vd. (2013)'nin çalışmasına göre düşük HBS sürelerinin *Methanosarcina* türünün ve homoasetojenlerin baskın olmasına neden olduğu gözlemlenmiştir.

KBS: Katı bekletme süresi (KBS) mikroorganizma büyüme hızı ile ters orantılıdır. Bu nedenle, büyüme hızı metanojenlere göre büyük olan hidroliz, asidojenesis ve asetojenesis türlerinin reaktör içerisindeki baskın seçilimi düşük KBS değerlerinde sağlanabilecektir. Ayrıca, KBS değeri 15 gün ve daha düşük değerlere indirildikçe *Methanosarcina* türünün baskın olduğu belirtilmiştir (Lee vd., 2011). Bu bilgiler ışığında, AKR-metanojenesisin işletimine 20 gün KBS değeri ile başlanması planlanmıştır. İzlenen parametre olarak KBS'nin, işletimin ilerleyen süreçlerinde kademeli olarak düşürülmesine ve KBS'nin metanojenesise etkisinin araştırılmasına karar verilmiştir.

Yukarıda belirtildiği üzere, AKR-metanojenesis çalışmasında, değişken parametrenin, proje önerisinde sunulan HBS'nin (veya OYH'nin) yanısıra KBS olmasına da karar verilmiştir. Belirtilen OYH, HBS ve KBS değerleri ile reaktör içerisinde hidroliz, asidojenesis, asetojenesis yapan mikroorganizmalar ve metan üretimi açısından *Methanosarcina* türü baskın tutulmaya çalışılacaktır. Bu sayede, çıkış suyunda takip eden fotofermantasyon için daha yüksek miktarda asetat derişimi eldesi sağlanacağı öngörülmektedir.

5.2 Gereç ve Yöntem

5.2.1 Mikrobiyel Kültür

5.2.1.1 Anaerobik Kültür-Metanojenesis

AKR-Metanojenesis sisteminde, Ankara Tatlar Atıksu Arıtma Tesisi anaerobik çürütme tankından alınan karışık kültür kullanılmıştır. Kültüre herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. Üç-aşamalı sistem deneylerinde, kullanılan karışık anaerobik kültürün AKM ve UAKM derişimleri sırasıyla 36600 ± 1052 ve 16650 ± 560 mg/L; pH değeri ise 8,6'dır.

5.2.1.2 Fotofermantasyon Kültürü

Fotofermantasyon deneylerinde ODTÜ Hidrojen Araştırma Laboratuvarı stoklarında bulunan mor-kükürtsüz bakteri türü olan *Rhodobacter capsulatus* (DSM 1710) kullanılmıştır. Bu bakteri, İş Paketi 2'de de belirtildiği gibi (Bölüm 3.1.1.3), Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu-Leibniz DSMZ Enstitüsü'nden temin edilmiş olup, ODTÜ-Hidrojen Araştırma Laboratuvarı stoklarında -80°C 'de saklanmaktadır. Fotofermantasyon deneylerinde aşı kültürü olarak kullanılan *Rhodobacter capsulatus* (DSM 1710), Bölüm 3.1.1.3'de belirtilen protokole göre steril ortamda çoğaltılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

5.2.2 Deneysel Yöntem

5.2.2.1 AKR-Metanojenesis Sistem Deneyleri

İş Paketi 3'te (Bölüm 4) belirtildiği üzere, hidrojen üretiminde olası inhibisyon ve homoasetojenesis sebebiyle, uzun süren kararlı işletim süreçleri elde edilememiştir. Dolayısıyla, İş Paketi 4'ün gerçekleştirilebilmesi için, AKR-karanlık fermantasyon sisteminin çıkış suyu, kararlı durumlar oluşmasa da, farklı işletim koşulları süresince veya kararlı durumda hidrojen üretiminin gözlenmediği günlerde de ayrılarak -20°C 'de saklanmıştır.

Bölüm 4'de de belirtildiği gibi, AKR-Karanlık fermantasyon sistemi çıkış suları iki ayrı grupta toplanmıştır: AKR-1., 2., 3. ve 4. işletim süreçlerinin çıkış suyunun homojen karışımı (**I.Kaynak**) ve AKR-5. İşletim süreci çıkış sularının karışımı (**II.Kaynak**). AKR-metanojenesis sistemine öncelikle I.kaynak, daha sonra da II.Kaynak suyu uygulanmıştır. Besin kaynağının iki farklı grup halinde depolanması ve kullanılmasının sebebi, AKR-karanlık fermantasyon sisteminde 5. işletim süreci koşullarının karanlık fermantasyon için en uygun koşullar olması ve üç-aşamalı sistemde en yüksek toplam ısı enerjisi verimini sağlamasıdır (Bölüm 4.3). Daha önce Tablo 4.4'de de (Bölüm 4) sunulan AKR-karanlık fermantasyon çıkış suyu özellikleri Tablo 5.2'de, rahat izlenebilmesi için, yeniden gösterilmektedir.

Tablo 5.2. AKR-Metanojenesis sisteminde substrat olarak kullanılan AKR karanlık fermantasyon sisteminin çıkış suyu özellikleri (süzüntü suyu)

Parametre	I.Kaynak	II.Kaynak
çKOİ (mg/L)	10750±254	9000±312
TAN (mg/L NH ₄ -N)	8±0,2	14±0,8
Alkalinite (mg/L CaCO ₃)	2122± 68	2057±93
pH	6,2	6,3
Asetik asit (mM)	21	21
Propionik asit (mM)	4	2
Bütirik asit (mM)	17	8
İso-bütirik asit (mM)	1	2
Toplam UYA (mM HAc)	35±1	30±2

Karanlık fermantasyon çıkış suyu öncelikle 8000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve ardından filtre kağıtlarından (0,7 µm) süzümüştür (Tablo 5.2). Karanlık fermantasyon çıkış suyuna ek olarak çeşitli mikro-makro nutrijent içeren besiyer çözeltiliden, reaktörde Tablo 5.3'de belirtilen derişimleri sağlayacak miktarda, eklenmiştir (Speece, 1996). Karanlık fermantasyon çıkış suyu içerisinde mevcut bulunan KH₂PO₄ ve K₂HPO₄ kaynaklı alkalinite, metanojenesis için yeterli (2000-2100 mg/L CaCO₃, Tablo 5.2) bulunmuş ve besiyer çözeltiliye literatür kaynağında belirtildiğinden farklı olarak NaHCO₃ eklenmemiştir (Tablo 5.3). Kullanılan besinin pH değeri, 1 N NaOH çözeltisi ile 7-7,5 aralığına getirilmiştir.

AKR-Metanojenesis reaktörü olarak, Bölüm 4.1.2'de anlatılan AKR düzeneğinin benzeri (Şekil 4.1), aynı AKR işletim yaklaşımıyla kullanılmıştır. Reaktör tepe gazı öncelikle, N₂ gazı ile 4 dakika uçurularak oksijenin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Reaktör 1250 mL etkin sıvı hacmine sahiptir. Reaktör 200 rpm'de çalıştırılan manyetik karıştırıcı üzerinde ve 35±2°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir.

Tablo 5.3. AKR-Metanojenesis sistemi için kullanılan besiyer çözelti içeriği (Speece, 1996)

Besiyer çözelti içeriği	Derişim (mg/L)	Besiyer çözelti içeriği	Derişim (mg/L)
NH ₄ Cl	300	NH ₄ VO ₃	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	400	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,5
KCl	400	ZnCl ₂	0,5
Na ₂ S.9H ₂ O	300	AlCl ₃ .6H ₂ O	0,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	50	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	80	H ₃ BO ₃	0,5
FeCl ₂ .4H ₂ O	40	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,5
CoCl ₂ .6H ₂ O	10	Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	0,5
KI	10	Na ₂ SeO ₃	0,5
(NaPO ₃) ₆	10	Cysteine	10
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,5		

Daha önce belirtildiği üzere, proje hedefleri doğrultusunda, AKR-Metanojenesis sisteminin, çıkış suyunda UYA harici organik maddelerin mümkün olduğunca az olmasını sağlayacak ve takip eden fotofermantasyon reaktörü için uygun UYA (özellikle asetik asit) derişimlerinin / kompozisyonlarının eldesini sağlayacak şekilde işletilmesi planlanmıştır. Bu bağlamda, reaktörün başlangıç dönemindeki işletim parametreleri F/M oranı 1 g çKOİ/g UAKM.gün, HBS 1 gün, OYH 10 g KOİ/L.gün ve üzeri, ve KBS 20 gün ve altı olarak belirlenmiştir. Ancak işletim sürecinin ilk günlerinde biyogaz üretimi gözlenmemiştir. Üç-aşamalı sistemin öncelikli koşulu, sağlıklı işleyen bir 2.aşama; yani anaerobik reaktördür. Dolayısıyla, öncelikle sağlıklı işleyen bir metanojen kültürü elde etmek için, öngörülen olası sorunlar doğrultusunda, HBS ve F/M oranı değerlerinde değişiklikler yapılmıştır:

- İşletimin başında, kararlaştırıldığı gibi, HBS değeri 1 gün olarak uygulandığında biyogaz üretimi gözlemlenmemiştir. Dolayısıyla, yine Tablo 5.1'deki literatür değerleri aralığında kalacak şekilde (Göblös vd., 2007; Cheong vd., 2008; Nakasaki vd., 2013) reaktör 3 günlük HBS değerinde işletilmeye başlanmıştır. Bu değişiklik reaktör işletiminin başlangıç zamanı olarak kabul edilmiş ve sonuç bölümünde paylaşılan veriler buna göre yorumlanmıştır. HBS 3 gün artışına paralel olarak, sistem OYH değeri düşmüştür.
- Olası bir aklimasyon sürecinde, sistemin dengesini olumsuz yönde etkileyecek bir biyokütle kaybı (anaerobik mikroorganizma) yaşanmaması için, başlangıç F/M oranı 0,5 g çKOİ/g UAKM.gün olarak yeniden belirlenmiştir. Aklimasyon sürecini takiben, HBS ve KBS'nin sabitlenmesine odaklanılmış, F/M oranı baz alınmamıştır.

AKR işletim süreci temel olarak 1.-80. ve 81.-157. inkübasyon günleri olarak iki farklı dönem şeklinde kurgulanmıştır. İlk 80 günlük işletim sürecinde diğer bir işletim parametresi olarak tanımlanan KBS değeri kontrol edilmemiş; bu parametreyi sabitlemek adına reaktöre müdahale edilmemiştir. Bu süreçte, metan üretim veriminin maksimize edilmesi, AKR işletim koşullarına ve atıksuya aklime olan etkin bir metanojen kültürü eldesi amaçlanmıştır. Bu süreç (1.-80.günler), aklimasyon süreci olarak da tanımlanabilir. Bu sürecin bitimini takiben (81.-157.günler), AKR-Metanojenesis sistemi farklı HBS ve KBS kombinasyonları içeren altı farklı periyotta işletilmiştir. Her periyoda özgü işletim parametreleri ve AKR döngü ve evre süreleri Tablo 5.4'de sunulmuştur.

Tablo 5.4. AKR-Metanojenesis sisteminde 81.-157.günler arasında uygulanan altı farklı periyot ve ilgili işletim parametreleri değerleri

Özellikler	I. Periyot	II. Periyot	III. Periyot	IV. Periyot	V. Periyot	VI. Periyot
İnkübasyon süreci (günler arası)	81-96	97-108	109-121	122-135	136-147	148-157
HBS (gün)	6	3	1,5	0,7	0,7	1,5
OYH (g çKOİ/L.gün)	1,1	2,2	4,5	8,9	8,9	4,5
KBS (gün)	20	20	20	20	10	10
F/M (g çKOİ/g UAKM.gün) ^a	0,27	0,54	0,88	2,14	1,82	0,97
İşletilen döngü sayısı	4	6	13	29	23	10
Döngü süresi (saat)	96	48	24	12	12	24
Besleme süresi (dakika)	2	2	2	2	2	2
Reaksiyon süresi (saat)	92	44	20	5-6-7-8	8-9	20
Çökeltme süresi (saat)	4	4	4	4-5-6-7	3-4	4
Boşaltma süresi (dakika)	2	2	2	2	2	2

^a F/M değeri 1-80.günler arasında 0,5 değerinde tutulurken, KBS ve HBS'nin sabitlendiği 81.-157.günlerde kontrol edilmemiştir. Değerler, deneysel verilere göre periyot bazındaki ortalamalardır.

İşletimin 81.-157.günleri arasında gerçekleştirilen altı farklı periyot uygulanmasının başlıca amaçları şu şekildedir;

- AKR-Metanojenesis sistemini takip eden fotofermantasyon reaktörü için H₂ üretimi açısından optimum değerlere yakın bir çıkış suyu elde etmek
- Metanojenesis reaktörü için mikrobiyal kompozisyonun değişimini araştırmak
- Metanojenesis reaktörü için maksimum metan üretim verimini gözlemlemek

- Üç-aşamalı sistem için enerji verimliliği açısından en uygun işletim parametrelerini belirlemek.

Her periyoda, diğer bir deyişle, çalışılan her KBS/HBS kombinasyonuna denk gelen CH₄ üretim verimini belirlemek için, sistemin kararlı durumda (*pseudo steady-state*) olması hedeflenmiştir. Kararlı durum, ardışık üç HBS değerinin tamamlanması ve bu süreç zarfında biogaz üretim miktarı ve tepe gazındaki metan yüzdesinin zaman içinde yakın değerlere ulaşması (ardışık ölçümlerin farkı <%10) olarak tanımlanmıştır. Döngü sonunda çıkış numunelerine ve besin çözeltisine belirli aralıklara çKOİ ve UYA analizleri yapılmıştır. Moleküler analizler için, reaktör numuneleri, döngünün reaksiyon evresi sırasında alınarak -20°C'de saklanmıştır.

5.2.2.2 Üç-aşamalı Sistemde, AKR-Metanojenesis Sistemi Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyleri

İş Paketi 4 kapsamında yapılan bu çalışmanın amacı, AKR-Metanojenesis sisteminde her farklı işletim koşulunda (farklı HBS-KBS kombinasyonu) toplanan çıkış suyundan kesikli fotofermantasyon reaktörleri kurulması, H₂ üretim verimi ve hızının araştırılmasıdır. Ayrıca bu çalışma İş Paketi 5 için yapılacak olan ardışık-kesikli fotofermantasyon deneyi için bir ön araştırma niteliği taşımaktadır.

HBS ve KBS'nin değiştirilerek altı farklı periyotta işletilen AKR-Metanojenesis sistemi çıkış suları, kesikli fotofermantasyon reaktörleri için altı farklı giriş suyu oluşturmuştur. Her bir periyot için homojen karışımın elde edildiği altı farklı kesikli fotofermantasyon reaktörü giriş suyu özellikleri Tablo 5.5'de verilmiştir. Tablo 5.5'de görüldüğü üzere, giriş sularının TAN derişimi 90-162 mg/L NH₄-N (amonyum iyonu 116-208 mg/L NH₄) arasındadır. Daha önce İş Paketi 3 kapsamında kesikli anaerobik reaktör çıkış suyunda gözlemlenen yüksek amonyum derişimi, AKR-Metanojenesis çıkış suyunda da gözlemlenmiştir. Literatürde amonyum iyonu derişiminin 2 mM (36 mg/L NH₄ veya 28 mg/L NH₄-N) ve üzeri olduğu koşullarda fotofermantasyon reaktörlerinde hidrojen üretiminin durduğu belirtilmiştir (Akköse vd., 2009). Bu durumda, fotofermantasyon öncesinde, AKR-Metanojenesis sistemi çıkış sularından ön arıtım olarak amonyum giderilmesine karar verilmiştir. Daha önce yüksek giderim verimi elde edilen, pH artırılarak havayla sıyırma yöntemiyle amonyak uçurumu metodu (EK-E), AKR-Metanojenesis sistemi çıkış sularına uygulanmıştır. Bu yöntem sonrasında AKR-Metanojenesis sistemi çıkış sularındaki amonyum iyonu derişimleri ve başlangıç amonyum iyonu derişimleri Tablo 5.5'de sunulmuştur.

Özellikleri Tablo 5.5’de verilen, altı farklı AKR-Metanojenesis sistemi çıkış suyundan sadece iki periyottaki (IV. ve V. periyot) karışım sularının UYA içerikleri fotofermantasyon reaktörleri için yeterli miktarda (sırasıyla yaklaşık 22 ve 16 mM) görünmektedir. Bu iki periyottaki çıkış suları ile 3 tekrarlı (aynı özellikte) kesikli fotofermantasyon reaktörleri kurulmuştur. Kalan diğer dört periyot için ise gözlem amaçlı birer reaktör kurulmuştur. Ayrıca, sadece periyot çıkış suyu içeren şahit ve sadece bakteri içeren kontrol reaktörleri de kurulmuştur. Kesikli fotofermantasyon reaktörlerinin toplam ve etkin hacmi sırasıyla 55 ve 50 mL’dir. Her bir reaktöre homojen olarak karıştırıldıktan sonra süzölmüş (0,7 µm) ve otoklavlanmış çıkış suyu eklenmiştir. Reaktörlere, S/X₀ oranı 9,4 g KOİ/g UAKM (veya 8,3 g KOİ-HAc/g UAKM) sağlanacak şekilde *R.capsulatus* kültürü aşılmalıdır. İş Paketi 2’de (Bölüm 3.2.3.2) elde edilen fotofermantasyon deneyi sonuçlarına göre, reaktörler, en yüksek hidrojen üretim hızını sağlayan 3955 lux ışık şiddetinde aydınlatılmış ve S/X₀ oranı olarak 9,4 g KOİ/g UAKM uygulanmıştır.

Tablo 5.5. Fotofermantasyon reaktörleri için kullanılan giriş sularının özellikleri (AKR-Metanojenesis sistemi çıkış suları)

Parametreler	AKR-Metanojenesis sistemi çıkış suları					
	I.Periyot	II.Periyot	III.Periyot	IV.Periyot ^c	V.Periyot ^c	VI.Periyot
tUYA (mM HAc)	3,9±2,4	2,7±1,1	2,6±0,8	21,7±4,1	16,4±1,7	2,6±0,8
çKOİ (mg/L)	1345±65	1220±55	1100±40	2625±45	1605±40	1215±75
TAN (mg/L NH ₄ -N) ^a	100,8	89,6	89,6	106,4	112	162,4
TAN (mg/L NH ₄ -N) ^b	12,5	14	12,3	13,8	11,6	18,2
pH	7,4	7,5	7,8	7,6	7,6	7,5

^a AKR-Metanojenesis çıkış suyundaki amonyum iyonu derişimleri

^b Havayla sıyırma yöntemi sonrasında elde edilen TAN derişimleri

^c AKR-Metanojenesis IV.periyottan alınan çıkış suları 125-132.ışletme günleri, V.periyottan alınan çıkış suları ise 137-138.ışletme günlerine ait çıkış sularıdır.

5.2.3 Analitik Yöntem

AKM, UAKM ve alkalinite ölçümleri Standart Metod’a göre gerçekleştirilmiştir (APHA, AWWA, WEF, 2005). çKOİ için, reaktörden alınan örnekler öncelikle Sartorius marka cam lifi filtrelerden (0,7 µm) süzölmüş; süzöntü örneklere EPA onaylı reaktör çürütme metodu uygulanarak çKOİ analizleri yapılmıştır (Hach Water Analysis Handbook, 1989). Alkol (etanol, metanol) ve şeker (glikoz, sukroz) derişimleri ODTÜ Merkez Laboratuvarı bünyesinde bulunan Kromatografi ve Fermantasyon Laboratuvarı’nda hizmet alımı ile analiz ettirilmiştir.

AKR-Metanojenesis sisteminde üretilen tepe gazı hacmi su-yer değiştirme cihazı (water displacement device) ile ölçülmüştür (Johnson ve Young, 1983). Sisteminin tepe gazı kompozisyonu, TCD ile donatılı olan GC (Thermo Scientific Co.) ünitesinde analiz edilmiştir. Birbirine seri bağlı iki kolonda CH₄, azot N₂, CO₂, O₂ ve H₂ gazları ayrıştırılabilmektedir. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmış; enjektör sıcaklığı 50°C, detektör sıcaklığı 80°C, fırın sıcaklığı ise 35°C'da sabit tutulmuştur. Gaz numunelerindeki kompozisyon standart gaz karışım tüplerinden alınan gaz kompozisyonu ile hazırlanan kalibrasyon grafiklerine göre hesaplanmıştır (Şekil EK-F1).

Fotofermantasyon deneylerinde üretilen toplam gaz hacmi ise her reaktör için ayrı yaptırılmış olan gaz toplama tüplerine deney süresi boyunca biriktirilerek hesaplanmıştır. Fotofermantasyon reaktörlerinde tepe gazı kompozisyonu, TCD ve Supelco Carboxen 1010 kolonu ile donatılı olan GC (Agilent Technologies 6890N) ünitesinde yapılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak Argon (26 mL/dakika akış) kullanılmıştır. Enjektör sıcaklığı 160°C, detektör sıcaklığı 170°C, fırın sıcaklığı ise 140°C'dir.

Fotofermantasyon reaktörlerinin UYA kompozisyonu ve derişimleri refractive index detektörü kullanan HPLC (SHIMADZU 20A) cihazı ile 10 µL numune kullanılarak ölçülmüştür. Buna göre, laktik, formik, asetik, propiyonik, izo-bütirik, bütirik ve izo-valerik asitleri analiz edilmiştir. HPLC çalışma protokolü şu şekildedir; fırın sıcaklığı 66°C; mobil faz HPLC kalitesinde 0,085 M'de sülfürik asit çözeltisi; akış hızı 0,4 mL/dakika. Numunelerdeki UYA derişimleri, standart asit karışım solüsyonu ile hazırlanan kalibrasyon grafiklerine göre hesaplanmıştır (Şekil EK-A3). Toplam UYA (tUYA) derişimi için, her bir asit derişimi moleküler ağırlığına bölünerek ve asetik asidin moleküler ağırlığıyla çarpılmaktadır. Tüm asitlerin, asetik asit (HAc) cinsinden eşdeğer derişimlerinin toplamı tUYA derişimini vermektedir (Yılmaz ve Demirer, 2008).

Fotofermantasyon reaktörlerinden alınan örneklerin optik yoğunluk ölçümleri 660 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu UV-1201) gerçekleştirilmiştir. Ölçülen her bir optik yoğunluk için kuru kütle ağırlığı hesaplanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve reaktörlerde zamana karşı UAKM derişimi izlenmiştir (Şekil EK-A1, EK-A).

Moleküler analizler, sürekli reaktörlerden alınan numuneler için gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, AKR-Metanojenesis sisteminden, başlangıç aşısı çamuru ve işletim süresince belirli aralıklarla ya da sistemde belirgin bir değişim gözlemlendiği durumlarda çamur örnekleri alınmıştır; numuneler -20°C'de saklanmıştır. Moleküler analizler (DNA izolasyonu, PCR-

DGGE analizleri) ve sonuçları İş Paketi 8 kapsamında yer almaktadır. Dolayısıyla, AKR-Metanojenesis çalışmasına ait moleküler analiz sonuçları Bölüm 9'da sunulmuştur.

5.3 Bulgular ve Tartışma

5.3.1 AKR-Metanojenesis Sistem Deneyleri Sonuçları

AKR-Metanojenesis sistemi 157 gün boyunca işletilmiştir. İlk 80 gün boyunca, karanlık fermantasyon çıkış suyuna ve AKR işletim koşullarına aklime olan mikroorganizmaların zenginleştirilmesi için, sistemin KBS'si kontrol edilmemiş; AKR sistemine ortama aklime olmayan kültürün çıkış suyu ile atılması hedeflenmiştir. Bu sayede, sistemin metan üretim veriminin maksimize edilmesi, etkin bir metanojen kültürü eldesi amaçlanmıştır. Bu süreçte (Gün 1-80), AKR sistemi, 0,5 g çKOİ/g UAKM.gün F/M oranında, 3 gün'lük HBS'de (OYH: 1,5 g çKOİ/L.gün) ve 20 günden yüksek bir KBS'de çalıştırılmıştır. İşletim sürecinin 81.gününden itibaren, KBS 20 güne ve ardından 10 güne sabitlenerek, AKR-Metanojenesis sistemi farklı HBS değerlerinde (toplam altı farklı HBS-KBS kombinasyonu; 6 periyotta) işletilmiştir. İşletim süresince, reaktörden giriş (besin), çıkış (boşaltım evresinde alınan çıkış suyu) ve reaksiyon evresinde alınan numunelerin analiz sonuçları ve periyodlara özgü işletim parametreleri Şekil 5.1, 5.2 ve Tablo 5.6'da sunulmuştur.

Bölüm 5.2'de bahsedildiği üzere, AKR-metanojenesis sisteminde kullanılan besin (I. ve II.kaynak, Tablo 5.2), üç-aşamalı sistemde ilk aşama olan AKR-karanlık fermantasyon sistemi çıkış suyudur ve 35 mM derişiminde tUYA içermektedir. AKR-metanojenesis sistemi için alınan çamur aşısı, kentsel atıksu arıtma tesisinin anaerobik çürütücülerinden alınan ve aktif çamura aklime olmuş bir anaerobik kültürdür. Dolayısıyla, anaerobik aşı çamuru, yüksek çKOİ ve UYA derişimlerinin bulunduğu biyokimyasal şartlarda zenginleştirilmemiştir. Nitekim, Şekil 5.1e ve 5.2d'de görüleceği üzere, işletimin ilk 45 günlük süresinde (1.-9. döngüler arası) biyogaz üretimi ve metan üretim verimleri ($<208 \text{ mL CH}_4/\text{g çKOİ}_{\text{eklenen}}$) oldukça düşüktür. Daha önce, İş Paketi 3'te kesikli metanojenesis çalışmasında (Bölüm 4.1.3.2) kullanılan anaerobik çamur kaynağının, karanlık fermantasyon çıkış suyu ile metanojenesis için yeterince uygun olmadığı ve aklimasyon gerektiği belirtilmişti (İş Paketi 3'te benzer zamanlarda alınan aynı çamur kaynağı ve KF çıkış suyu ile metan üretim verimi $112 \text{ mL CH}_4/\text{g çKOİ}_{\text{eklenen}}$, aynı çamur kaynağı ve asetik asit ile kurulan reaktörlerde ise $72 \text{ mL CH}_4/\text{g çKOİ}_{\text{eklenen}}$ olarak ölçülmüştür). Dolayısıyla, AKR-Metanojenesis çalışmasında da benzer bir sorunun yaşanmış olması muhtemeldir. Ayrıca, işletim esnasında organik yükleme (yüksek UYA derişimi) ve bilhassa hidrolik şok (düşük HBS değerleri) olması durumunda sistemde stabilitenin bozulması ve çamur kaybı meydana gelebilmektedir (Koutroli vd., 2009; Salomoni

vd., 2011). Sonuç olarak, anaerobik aşı çamurunun karanlık fermantasyon çıkış suyuna ve AKR işletim koşullarına aklimasyonu için bir süre gerektiği anlaşılmaktadır. Aklimasyonu desteklemek için, 3 günlük HBS ve düşük verimde çalışan AKR'nin, HBS (ve dolayısıyla döngü) süreleri artırılmıştır (Şekil 5.1a-b ve 5.2a). Literatür çalışmaları dikkate alınarak (Göblös vd., 2007; Cheong vd., 2008; Nakasaki vd, 2013; Tablo 5.1), HBS değeri öncelikle 16 güne çıkarılmış; metan veriminin artması ile birlikte 6 güne kadar düşürülmüştür. Toplamda 17 döngüye denk gelen 80 günlük aklimasyon sürecinin 12.döngüsü itibariyle, metan üretim veriminin 378 mL CH₄/g çKOİ_{eklenen}'e ulaştığı gözlenmiştir (Şekil 5.1d ve 5.2c). Bu verim değeri, teorik olarak hesaplanan maksimum üretim verimine (395 mL CH₄/g çKOİ) oldukça yakındır (Mayburg ve Britz, 1993). Bu süreçte tepegazı metan yüzdesi de %85'e ulaşmıştır. AKR, bir süre daha (81. işletim günü ya da 17. döngüye kadar) aynı aklimasyon koşullarında (HBS 6 gün, OYH 1,1 g/L/gün ve F/M ~0,5 g çKOİ/g UAKM.gün) çalıştırılmıştır. Sistemde, kararlı metan üretim verimi (Şekil 5.1d ve 5.2c), çıkış suyu çKOİ (Şekil 5.1c) derişimlerine ulaşılmasıyla birlikte, periyot (farklı KBS/HBS kombinasyonu) uygulamasına geçilmiştir.

Tablo 5.6. Altı farklı işletim periyoduna ait işletim parametreleri, elde edilen metan üretim verimleri, çıkış çKOİ ve tUYA değerleri

Parametreler ^{a, b, c}	I. Periyot	II. Periyot	III. Periyot	IV. Periyot	V. Periyot	VI. Periyot
İnkübasyon süreci (Gün arası)	81-96	97-108	109-121	122-135	136-147	148-157
HBS (gün)	6	3	1,5	0,7	0,7	1,5
OYH (g çKOİ/L.gün)	1,1	2,2	4,5	8,9	8,9	4,5
KBS (gün)	20	20	20	20	10	10
F/M _{ortalama} (g çKOİ/gUAKM.gün)	0,27	0,54	0,88	2,14	1,82	0,97
Döngü süresi (saat)	96	48	24	12	12	24
Maksimum CH ₄ üretim verimi	395	348	367	211	0,032	347
Ortalama CH ₄ üretim verimi	343±17	338±19	307±31	172±24	188±22	297±14
Ortalama CH ₄ üretim hızı	924±194	1599±56	1487±302	1617±251	1794±279	1437±300
Maksimum metan üretim hızı	1231	1664	1805	1891	2362	1696
Çıkış çKOİ _{ortalama} (mg/L)	735	495	631	1666	1662	591
Çıkış tUYA _{ortalama} (mM HAc)	3,9	2,7	2,6	16,6	12,1	2,7

^a Metan üretim verim ve hız değerleri gazlar için 35 °C ve 1 atm koşulları baz alınarak hesaplanmıştır.

^b CH₄ üretim verimi: mL CH₄/g çKOİ_{eklenen}; CH₄ üretim hızı: mL CH₄/L_{reaktör}.gün. Ortalama ve maksimum verimler, ilgili periyotta gözlenen/hesaplanan değerleri göstermektedir.

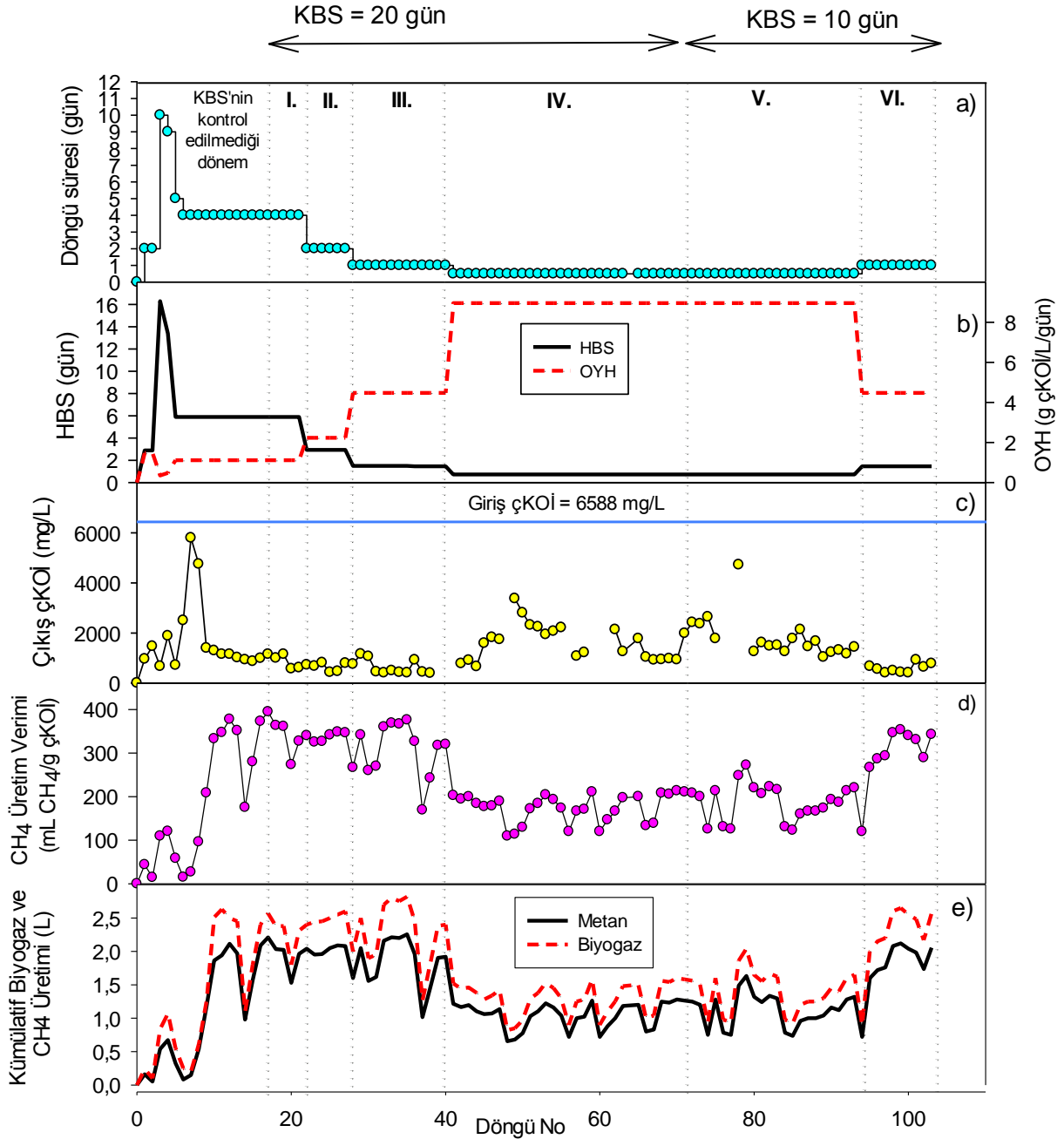
^c F/M değeri 1-80.günler arasında 0,5 değerinde tutulurken, KBS ve HBS'nin sabitlendiği 81.-

157.günlerde kontrol edilmemiştir. Değerler, deneysel verilere göre periyot bazındaki ortalamalardır.

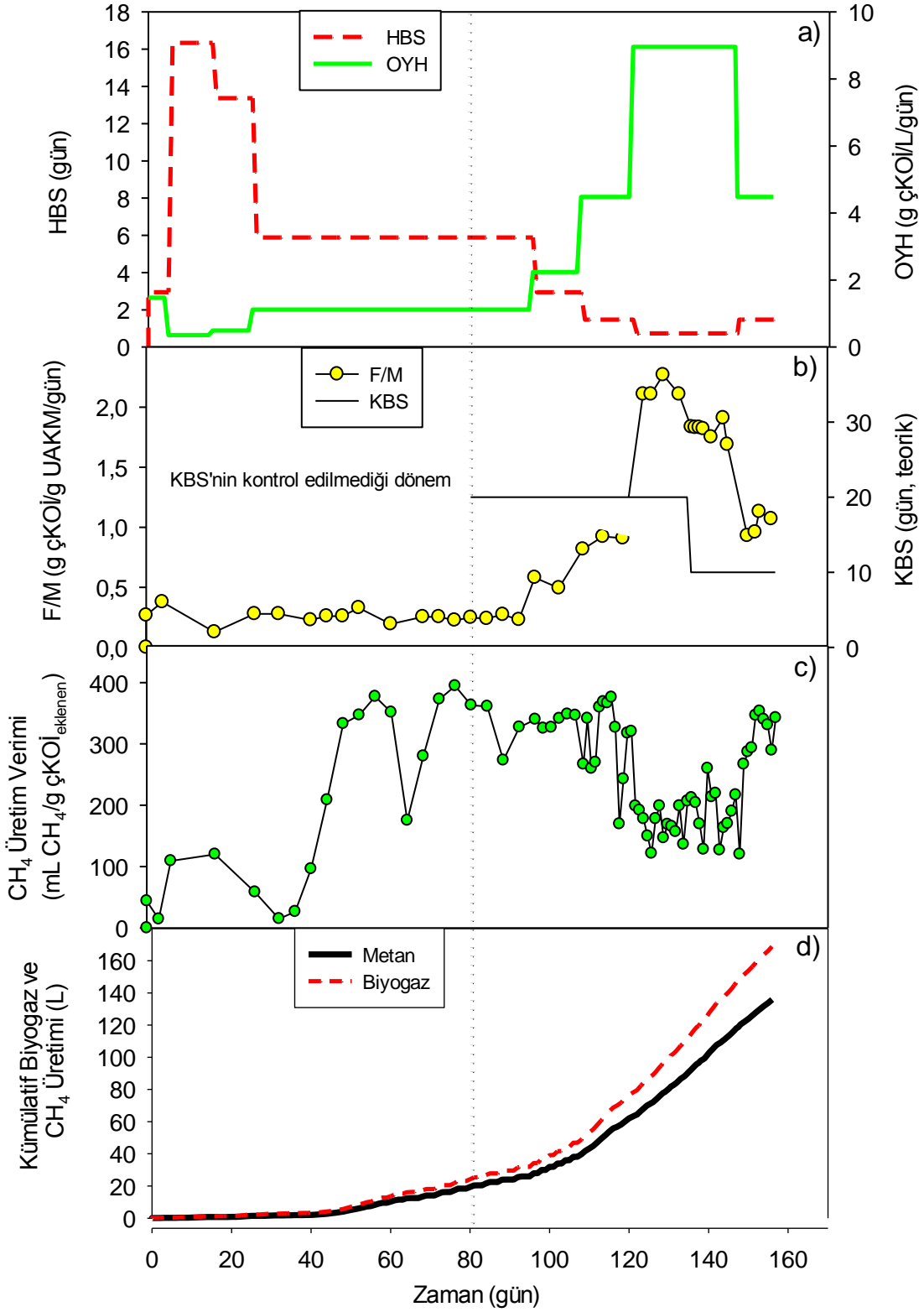
Tablo 5.4 ve 5.6'da görüldüğü üzere, I. periyot 15 gün (17-21. döngüler arası) devam etmiş ve belirli günlerde reaktörden çamur atımı gerçekleştirilerek KBS değeri 20 günde sabit tutulmuştur. Bu periyot süresince metan üretim verimi $395 \text{ mL CH}_4/\text{g } \text{çKOİ}_{\text{eklenen}}$ gibi maksimum teorik değere kadar çıkmıştır. Maksimum metan üretim hızı $1231 \text{ mL CH}_4/\text{L}_{\text{reaktör}} \cdot \text{gün}$ olarak kaydedilmiştir. Çıkış suyu çKOİ değeri ortalama 735 mg/L olarak ölçülmüş ve içeriğinde ortalama $3,9 \text{ mM HAc}$ aralığında tUYA tespit edilmiştir (Tablo 5.6). Bu döneme ait ortalama çıkış çKOİ ve tUYA derişimlerinin çKOİ eşleniği farkı alındığında, geriye kalan (UYA harici) çKOİ kaynağının (ortalama 501 mg/L) kaynağını belirlemek için analizler yaptırılmıştır. Literatür bilgilerine dayanılarak beklenen butanol, etanol ya da metanol gibi alkol türevlerine rastlanmamıştır.

II. Periyot sürecinde, HBS değeri yarıya düşürülerek (3 gün) çıkış suyundaki UYA derişimi arttırılmaya çalışılmıştır. Ancak Tablo 5.6'daki metan üretim verimi ve Şekil 5.1c'den anlaşılacağı üzere, yeni işletim parametreleri ve ortam şartlarına uyum sağlayan anaerobik mikroorganizmalar çıkış çKOİ derişimini bir önceki HBS değeri ile çalışılan günlerdeki değerlerin de altında tutmuştur. Oniki inkübasyon günü devam eden bu süreçte (22.-27. döngüler arası) maksimum metan üretim verimi $348 \text{ mL CH}_4/\text{g } \text{çKOİ}$, maksimum metan üretim hızı $1664 \text{ mL CH}_4/\text{L}_{\text{reaktör}} \cdot \text{gün}$, ortalama çıkış çKOİ 495 mg/L ve tUYA $2,7 \text{ mM HAc}$ olarak ölçülmüştür (Şekil 5.1c, 5.2c ve Tablo 5.6). Sonraki adımda HBS değeri düşürülerek devam edilmiştir.

III. Periyot (109.-121. işletim günleri veya 27.-41. döngüler arası) süresince, $1,5 \text{ gün HBS}$, $4,5 \text{ g } \text{çKOİ}/\text{L} \cdot \text{gün OYH}$ ve 20 gün KBS uygulanmıştır. HBS değerini $1,5 \text{ güne}$ ayarlamak için, reaksiyon süresi 44 saatten 20 saate düşürülmüştür. Çökeltme süresi, I. ve II: periyottakine eş değerde (4 saat) tutulmuştur. III. Periyotta, maksimum $367 \text{ mL CH}_4/\text{g } \text{çKOİ}_{\text{eklenen}}$ verimi, $1805 \text{ mL CH}_4/\text{L}_{\text{reaktör}} \cdot \text{gün}$ maksimum metan üretim hızı ve ortalama 631 mg/L çıkış çKOİ elde edilmiştir. Bu periyotta çıkış suyunda bulunan ortalama tUYA değeri $2,6 \text{ mM HAc}$ olarak ölçülmüştür (Tablo 5.6). Dolayısıyla üç-aşamalı sistemde, metanojenesis takiben kurulacak fotofermantasyon reaktörü için uygun UYA derişimi ($25\text{-}30 \text{ mM}$) elde edilememiştir. Daha yüksek UYA derişimi eldesi amacıyla, döngü süresinin 12 saat olarak (HBS: $0,7 \text{ gün}$) kurgulandığı IV. Periyoda geçilmiştir.



Şekil 5.1. Döngü başına, a) Bir döngü süresi, b) HBS ve OYH, c) Çıkış suyu çKOİ derişimi, d) Metan üretim verimi, e) Kümülatif biyogaz ve metan üretimi değerleri. (81. işletim gününden veya 17. döngüden itibaren kurgulanan altı farklı periyottan her birinin hangi döngüleri kapsadığı dikey kesikli çizgilerle gösterilmiştir.) (35 °C, pH: 7-7,5)

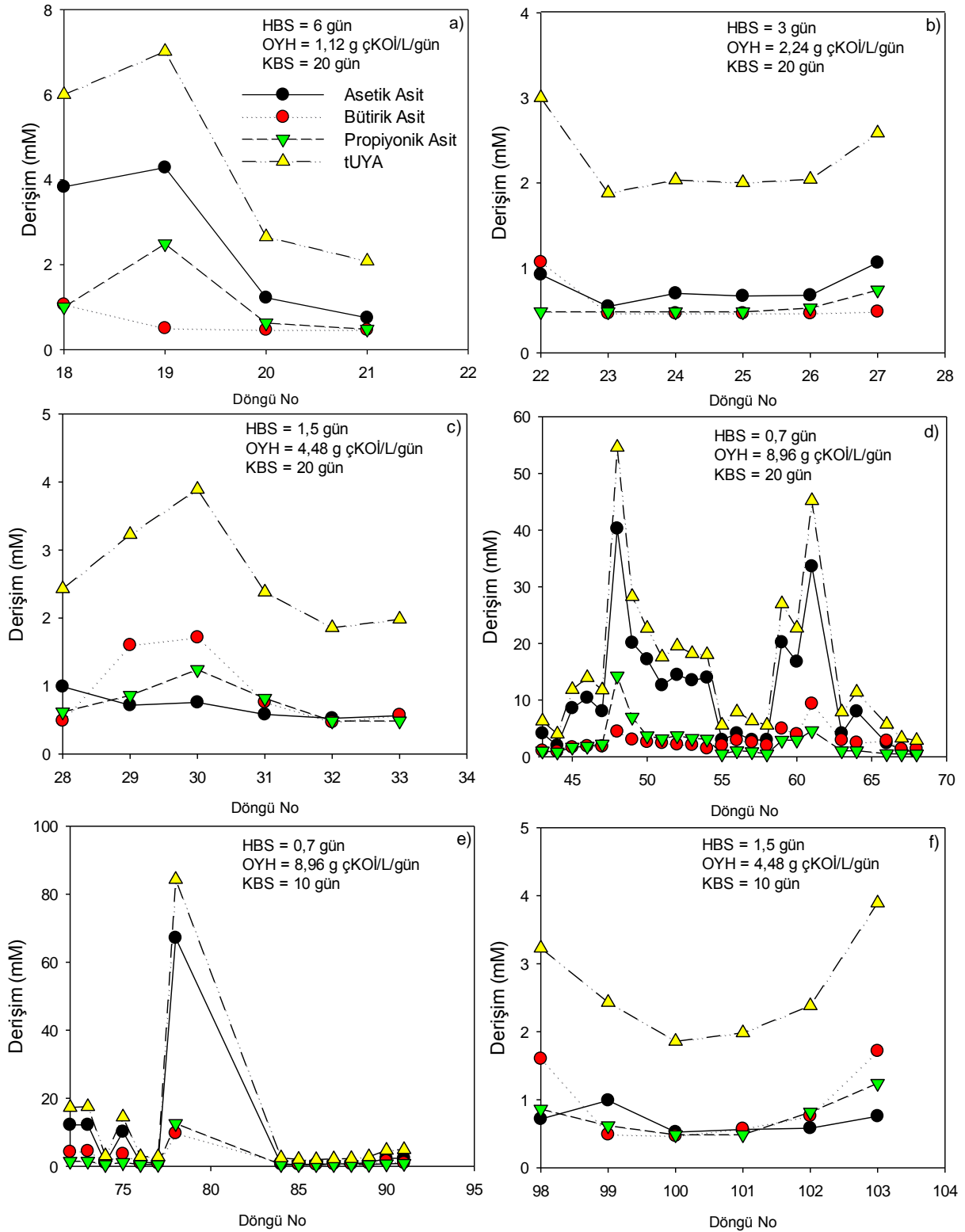


Şekil 5.2. a) HBS ve OYH, b) F/M ve KBS, c) CH₄ üretim verimi, d) Kümülatif biyogaz ve metan üretimi, değerlerinin zamana karşı değişimi (81. işletim gününü takiben, KBS değerinin kontrol edildiği dönem, kesikli çizgi ile ifade edilmiştir.) (35 °C, pH: 7-7,5)

IV. periyotta (121.-135. işletim günleri veya 41.-70. döngüler arası) reaktör içi mikroorganizma kültürünün karbon kaynağını kullanabileceği süre, literatüre göre de bir AKR-Metanojenesis reaktörü için hidrolik stabilite sınırları zorlayacak değerlerdedir (Koutroli vd., 2009; Salomoni vd., 2011). Bu süreçte, KBS değerini 4 saatlik çökeltme süresi ile 20 günde tutmak mümkün olmamıştır; dolayısıyla, 12 saatlik periyot dahilindeki çökeltme süresi sırasıyla 5, 6 ve hatta 7 saate kadar çıkartılmıştır. Sonuç olarak, metan üretim verimleri neredeyse yarı yarıya düşmüş (ortalama $172 \text{ mL CH}_4/\text{g } \text{çKOI}_{\text{eklenen}}$) ve çKOI değerleri ortalama 1666 mg/L değerine yükselmiştir. Maksimum metan üretim hızı ise III. periyottaki değer üstüne çıkarak $1891 \text{ mL CH}_4/\text{L}_{\text{reaktör}} \cdot \text{gün}$ 'e ulaşmıştır (Tablo 5.6). Çıkış suyundaki tUYA değerleri ise ortalama $16,6 \text{ mM HAc}$ 'a ulaşmıştır (Şekil 5.3, Tablo 5.6). Bu değer, fotofermantasyon reaktörünün optimum H_2 üretiminde kullanabileceği değerlere ($25\text{-}30 \text{ mM}$), önceki periyotların çıkış suyu tUYA derişimleri ile karşılaştırıldığında daha yakındır.

V. Periyotta (136.-147. işletim günleri veya 71.-94. döngüler arası) ise döngü süresi değiştirilmeden (12 saat) KBS değeri 20 günden 10 güne düşürülmüştür; çökeltme süresi ise tekrar 4 saate çıkarılmıştır. On inkübasyon günü ve 20 döngü süresi boyunca devam eden bu periyotta, elde edilen ortalama metan üretim verimi, çıkış çKOI derişimi ve tUYA derişimleri sırasıyla $188 \text{ mL CH}_4/\text{g } \text{çKOI}_{\text{eklenen}}$, 1662 mg/L ve $12,1 \text{ mM HAc}$ 'tır. Bu periyotta, maksimum metan üretim hızı $2362 \text{ mL CH}_4/\text{L}_{\text{reaktör}} \cdot \text{gün}$ ile 157 günlük reaktör işletim sürecinin en yüksek değerine ulaşmıştır (Tablo 5.6). V. işletim periyodunda da fotofermantasyon çalışmasında kullanılacak çıkış suyu tUYA eldesi ($12,1 \text{ mM}$) sağlanmıştır. Bu periyotta, sabit HBS ve OYH değerlerinde, azalan KBS süresinin reaktör içi mikrobiyal kompozisyon üzerine yapacağı etkinin araştırılması hedeflenmiştir. İlgili açıklama-sonuçlar Bölüm 9'da sunulmaktadır.

VI. Periyot (148.-157. işletim günleri veya 94.-103. döngüler arası) reaktör işletim sürecinin son periyodu olmuştur. Bu periyot içerisinde KBS değeri 10 günde tutulmuş, HBS ise $0,7$ günden $1,5$ güne artırılmıştır (dolayısıyla döngü süresi ve OYH de değiştirilmiştir). VI. Periyotta, ortalama metan üretim verimi $297 \text{ mL CH}_4/\text{g } \text{çKOI}_{\text{eklenen}}$, maksimum metan üretim hızı $1696 \text{ mL CH}_4/\text{L}_{\text{reaktör}} \cdot \text{gün}$, çıkış çKOI derişimi 591 mg/L ve çıkış suyu tUYA derişimi $2,7 \text{ mM HAc}$ olarak kaydedilmiştir (Tablo 5.6). Bu veriler III. Periyottaki değerlere oldukça yakındır. Karşılaştırılan metan üretim verimi ve çıkış suyu karakterizasyonu açısından temel etken parametrenin HBS değeri olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 5.3. İşletim sürecinin farklı periyotlarında döngü bazında gözlemlenen asetik, propiyonik, bütirik ve tUYA derişimleri, a) I. Periyot, b) II. Periyot, c) III. Periyot, d) IV. Periyot, e) V. Periyot, f) VI. Periyot (35 °C, pH: 7-7,5)

Çalışma sonuçlarının, metan üretim verimi ve hızı açısından geniş bir literatür çerçevesinde kıyaslanması Tablo 5.7’de görülebilir. Kullanılan karbon kaynağının aynı olması nedeniyle, öncelikle, Kyazze (2007)’nin çalışmasına bakıldığında inkübasyon süresince gözlemlenen maksimum metan üretim hızının (1,80 L CH₄/L.gün), bu çalışmanın (2,4 L CH₄/L.gün) uzağında kaldığı farkedilmektedir. Biyokimyasal yapısı bakımından benzer nitelikte karbon kaynağı kullanılan Michael (2007) ve Park (2010)’un çalışmalarında da sırasıyla elde edilen 0,13 L CH₄/L.gün ve 1,94 L CH₄/L.gün değerlerindeki metan üretim hızları bu çalışmada elde edilen değerlerin altındadır. Ancak Liang (2009)’un çalışmasında not edilen 3,38 L CH₄/L.gün değeri dikkate değerdir. Metan üretim verimlerine bakıldığında ise, Nasr (2012) (0,36 L CH₄/g KOİ_{eklenen}) ve Bull (1983)’ün (356 mL CH₄/g çKOİ_{eklenen}) çalışmalarında elde edilen değerler haricince, bu çalışmada Tablo 5.7’de paylaşılan diğer çalışmaların üzerinde bir sonuca ulaşıldığı anlaşılmaktadır.

Tablo 5.7. İki-aşamalı anaerobik sistemlerin metan üretim verimi ve hızı açısından karşılaştırması

Reaktör Tipi	Karbon kaynağı	Metan üretim verimi	Metan üretim hızı	Referans
Kesikli	Glikoz	248 mL CH ₄ /g çKOİ _{eklenen}	-	Xie vd. (2008)
Kesikli	Glikoz	267 ±13 mL CH ₄ /g çKOİ _{eklenen}	-	Giardino vd. (2010)
AYTR	Glikoz	356 mL CH ₄ /g çKOİ _{eklenen}	-	Bull vd. (983)
TKTR	Glikoz	-	0,13 L CH ₄ /L.gün	Michael vd. (2007)
TKTR	Sukroz	-	1,80 L CH ₄ /L.gün	Kyazze vd. (2007)
PYR	Melas	-	1,94 L CH ₄ /L.gün	Park vd. (2010)
YAÇYR	Melas	-	3,38 L CH ₄ /L.gün	Liang vd. (2009)
-	Melas ve alkol endüstrisi dip suyu karışımı	190 mL CH ₄ /g çKOİ _{eklenen}	-	Yeoh (1997)
TKTR	Zeytin endüstrisi atık suyu, peynir altı suyu ve sıvı inek gübresi	316 mL CH ₄ /g KOİ _{tüketlenen}	0.50 L CH ₄ /L.gün	Dareioti vd. (2014)
TKTR	Şeker endüstrisi atık suyu	230 mL CH ₄ /g çKOİ _{eklenen}	-	Weiland (1993)
Kesikli	Alkol endüstrisi dip suyu	0,36 L CH ₄ /g KOİ _{eklenen}	3,78 mL CH ₄ /saat	Nasr vd. (2012)
TKTR	Alkol endüstrisi dip suyu, gliserol ve kolza yağı keki karışımı	-	1,3 L CH ₄ /L.gün	Luo vd. (2011)

Reaktör Tipi	Karbon kaynağı	Metan üretim verimi	Metan üretim hızı	Referans
-	Gıda endüstrisi atık suyu	-	1.75 L CH ₄ /L/gün	Han ve Shin (2004)
YAÇYR	Gıda endüstrisi atık suyu	-	1,83 L CH ₄ /L/gün	Han vd. (2005)
TKTR	Patates endüstrisi atıksuyu	-	-	Zhu vd. (2008)
TKTR	Peynir altı suyu	310 ml CH ₄ /g KOİ	-	Antonopoulou vd. (2008)
YAÇYR	Peynir altı suyu	-	5 L CH ₄ /L/gün	Georgia vd. (2008)
TKTR	Zeytin endüstrisi atıksuyu	-	0,16 L CH ₄ /L/gün	Gavala vd. (2005)
Kesikli	-	227 ml CH ₄ /g KOİ	0,44 L CH ₄ /L/gün	Guo vd. (2014)
TKTR	-	0.14 L/kg KOİ _{eklenen}	1,13 ± 0.08 L CH ₄ /L/gün	Koutrouli vd. (2009)
AAKR	Sukroz	343 mL CH ₄ /g çKOİ _{eklenen}	2,4 L CH ₄ /L/gün	Bu çalışma (İş Paketi 4)
Kesikli	Melas	461 mL CH ₄ /g çKOİ _{eklenen}	-	Bu proje (İş paketi 6)

AYTR: Akışkan yatak tepkimeli reaktör, AAKR: Anaerobik ardışık kesikli reaktör, TKTR: Tam karıştırmalı tank reaktör, YAÇYR: Yukarı akışlı çamur yatak reaktör, PYR: Paketli yatak reaktör

AKR-karanlık fermantasyon sisteminin farklı işletim koşullarında elde edilen ve AKR-Metanojenesis sisteminde kullanılan çıkış sularının (I.Kaynak ve II.Kaynak suyu) etkisini karşılaştırmak için Tablo 5.8 sunulmuştur. Tablo 5.8'de görüldüğü üzere, I.Kaynak suyu AKR-Metanojenesis sisteminin I.peryodunun ilk gününden itibaren (81.gün) 128 gün boyunca (IV.peryot, 128.gün sonuna kadar) uygulanmıştır. II.Kaynak suyu ise IV.peryodunun 129.gününden itibaren işletimin sonuna kadar (IV.peryot, 157.gün sonuna kadar) uygulanmıştır. İki farklı atıksu kaynağının, AKR-Metanojenesise etkisini belirlemek için aynı işletim koşullarındaki verim ve hızların karşılaştırılması gerekmektedir. Nitekim, iki farklı kaynak suyu, IV.peryot sırasında aynı HBS (0,7 gün) ve KBS (20 gün) değerlerinde uygulanmıştır. IV.peryotta, iki farklı atıksuyun kullanımından elde edilen metan üretim verimi değerleri karşılaştırıldığında, hemen hemen yakın değerlerin üretildiği gözlenmektedir. En yüksek verim değerleri, I.kaynak suyu için 204 mL CH₄/g çKOİ_{eklenen} iken, II.kaynak suyu için ise 211 mL CH₄/g çKOİ_{eklenen}'dir. Aynı gözlem, üretim hızı için de geçerlidir; I.kaynak suyu için 1890 mL CH₄/ L_{reaktör.gün}, II.kaynak suyu için 1830 mL CH₄/ L_{reaktör.gün} değerleri elde edilmiştir. Dolayısıyla, farklı işletim koşullarında işletilen AKR-karanlık fermantasyon sistemi çıkış suları, karakterizasyondan da gözlemlendiği üzere (Tablo 5.2), benzer özelliklere sahiptir

ve takip eden AKR-Metanojenesis sisteminde benzer metan üretim verim ve hızlarını sağlamışlardır.

Tablo 5.8. AKR-karanlık fermantasyon sisteminin farklı işletim koşullarında elde edilen çıkış suyunun AKR-Metanojenesis sisteminin metan üretim verimi ve hızına etkisi

Kullanılan besin ^a	Periyot No	İlgili işletim koşulları (Gün)	CH ₄ üretim verim aralığı (mL CH ₄ /g çKOİ _{eklenen})	CH ₄ üretim hızı aralığı (mL CH ₄ /L _{reaktör} -gün)
I. Kaynak suyu	I. periyot	HBS: 6 KBS: 20	273-395	734-1231
	II. periyot	HBS: 3 KBS: 20	325-348	1536-1664
	III. periyot	HBS: 1,5 KBS: 20	169-367	812-1805
	IV. periyot (122-128.günler)	HBS: 0,7 KBS: 20	109-204	1069-1890
II. Kaynak suyu	IV. periyot (129-135.günler)	HBS: 0,7 KBS: 20	120-211	1280-1830
	V. periyot	HBS: 0,7 KBS: 10	123-272	1356-2362
	VI. periyot	HBS: 1,5 KBS: 10	267-347	1280-1696

^a I. Kaynak çıkış suyu: AKR-karanlık fermantasyon sisteminin 1.-4. işletim süreçlerine ait çıkış sularının karışımı; II. Kaynak çıkış suyu: AKR-karanlık fermantasyon sisteminin 5. işletim sürecine ait çıkış suları karışımı

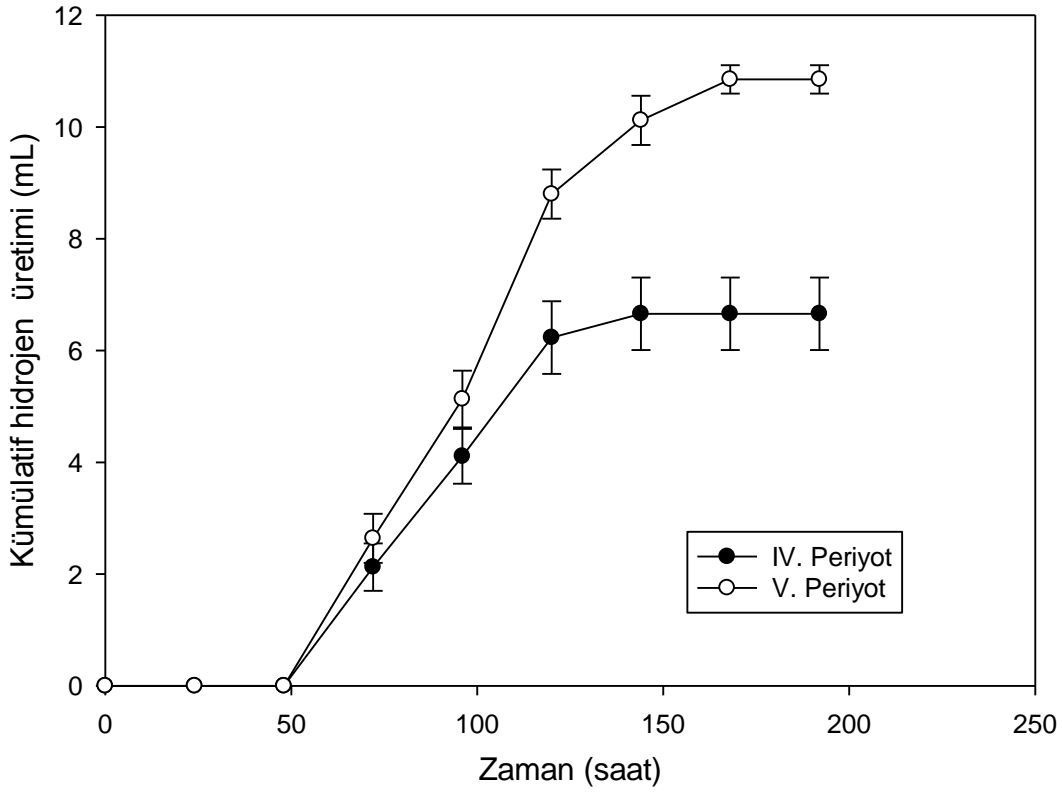
Bu iş paketinde, AKR-metanojenesis sistemindeki mikrobiyel popülasyonun zamana karşı (farklı işletim koşullarında) değişiminin araştırılması da hedeflenmiştir. Literatür araştırması, reaktör içi mikrobiyal kompozisyon dinamiğinin (*Methanosaeta* ve *Methanosarcina* türlerinin seçiliminin), KBS ve HBS değerlerinin yanısıra K_s değerleri ve giriş suyu HAc derişimlerine bağlı olabileceğini de göstermiştir (giriş suyu asetat derişimi > 7mM) (Shigematsu vd., 2003). KBS ve HBS değerlerindeki değişimin reaktör içi mikrobiyal kompozisyona etkisi üzerine yapılan çalışmalar genellikle çamur stabilizasyonu üzerinedir. Mikrobiyal kompozisyon ve moleküler analizlere yönelik sonuçlar İş Paketi 8'de (Bölüm 9) paylaşılmıştır.

5.3.2 Üç-aşamalı Sistemde, AKR-Metanojenesis Sistemi Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyi Sonuçları

Üç-aşamalı sistemde AKR-Metanojenesis çıkış suları ile kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörleri 8 gün (192 saat) boyunca işletilmiştir. AKR-Metanojenesis sistemi IV. Periyot ve V. Periyot çıkış suları ile 3 tekrarlı (eş) kurulan reaktörlerde inkübasyon süresinin ilk 48 saatinde gaz üretimi gözlemlenmemiştir. Deneme amaçlı kurulan diğer reaktörlerde (I-II-III-

VI. Periyot çıkış suları ile kurulmuştur) ise inkübasyon süresince gaz üretimi gözlenmemiştir; bu durum yeterli UYA derişimi olmaması ile ilişkilendirilmiştir (2,5-4 mM, Tablo 5.5). Yeterli UYA derişimine sahip olan AKR-Metanojenesis sistemi IV. Periyot ve V. Periyot çıkış suları ile kurulan reaktörlerde gaz üretimi 48 saatin sonunda başlamıştır. Deney süresince gözlenen kümülatif hidrojen gazı miktarları Şekil 5.4'de sunulmuştur. Şekil 5.4'de görüldüğü üzere, 48 saat sonrasında başlayan hidrojen üretimi oldukça az miktardadır. İş Paketi 3'te (Bölüm 4.2.3), üç-aşamalı sistemde kesikli anaerobik reaktör çıkış suları ile kurulan fotofermantasyon reaktörlerinde gözlenen durum, bu çalışmada da gözlemlenmiştir; İşletilen tüm tekrarlı (3 eş) reaktörlerde ilk günden itibaren reaktörlerin tabanında granüle benzer bir oluşum gözlemlenmiştir. Ancak İş Paketi 3, Bölüm 4.2.3'deki fotofermantasyon çalışmasından farklı olarak bu çalışmada hidrojen gazı üretimi 2. günden (48 saat) sonra başlamış ve granüler oluşumu 3. günden (72 saat) itibaren yarı yarıya azalarak 4. gün (96 saat) itibariyle kaybolmuştur. İş Paketi 3, Bölüm 4.2.3'deki fotofermantasyon çalışmasında da yapıldığı gibi, sıcaklık, pH, bakteriyel kontaminasyon, vb. parametreler gözden geçirilmiş ancak gözlemlenen granüler oluşumunun ve az miktarda hidrojen üretiminin bu parametrelerden kaynaklanmayacağı doğrulanmıştır. Dolayısıyla, yeterli UYA derişimine rağmen (16 ve 22 mM), bir aklimasyon süreci ve ardından az miktardaki gaz üretiminin gözlenmesi, İş Paketi 3'de belirtildiği gibi, besin kaynağındaki olası inhibisyon yaratan bir madde kaynaklı olabilir.

İş Paketi 3'de, inhibisyon kaynağının AKR-Karanlık fermantasyon çıkış suyu olduğu ifade edilmişti. İş Paketi 3'de üç-aşamalı sistemin 2.aşaması olan kesikli metanojenesis reaktörleri çıkış suyu ile kurulan kesikli fotofermantatif reaktörlerin verim ve hızları, sırasıyla, 0,052 g H₂/g HAc ve 0,17 mmol H₂/L.saat olarak belirlenmişti (Bölüm 4.2.3). Bu çalışmada ise üç-aşamalı sistemin AKR-Metanojenesis sistemi çıkış suyu ile kurulan fotofermantasyon reaktörlerinin verim ve hızları, sırasıyla, 0,012-0,032 g H₂/g HAc ve 0,07-0,10 mmol H₂/L.saat olarak belirlenmiştir (Tablo 5.9). Bu çalışmada elde edilen değerler, kesikli metanojenesis çıkış suları ile kurulan sistemin verim ve/ hızından daha düşüktür. Bahsi geçen bu iki çalışma arasındaki fark, üç-aşamalı sistemin 2.aşaması olan metanojenesis sistemi reaktör tipidir; yüksek verim / hız, 6-7 gün işletilen kesikli metanojenesis sistemi çıkış suyu ile elde edilmiştir. Metanojenesis reaktör tipi, kesikliden uzun süreli işletilen ardışık-kesikli reaktör tipine değiştirildiğinde, olası inhibisyon etkisinin daha da arttığı anlaşılmıştır. Dolayısıyla, İş Paketi 3'te belirlenen AKR-Karanlık fermantasyon reaktörü inhibisyonuna ek olarak, AKR-Metanojenesis sisteminden de kaynaklanan ek bir inhibisyon söz konusu olabilir.



Şekil 5.4. AKR-Metanojenesis sisteminin IV. ve V.periyodu çıkış sularıyla kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde toplam hidrojen gazı üretimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)

Aynı HBS fakat farklı KBS değerlerindeki AKR-Metanojenesis sistemi periyotları çıkış sularının H₂ üretim hızına etkisinin çok belirgin olmadığı gözlenmektedir (Tablo 5.9). Diğer bir deyişle, AKR-Metanojenesis sistemi HBS 0,7 günde iken KBS'nin 20 günden 10 güne indirilmesi, çıkış tUYA derişimini 22 mM'dan 16 mM'a düşürmüştür; fakat takip eden fotofermantasyon sisteminde üretim hızını etkilememiştir. H₂ üretim verimi bazında bakıldığında ise, V.periyot çıkış sularından (16 mM tUYA, HBS:0,7 gün, KBS:10 gün) elde edilen verimin, IV.periyot çıkış sularından (22 mM tUYA, HBS:0,7 gün, KBS:20 gün) elde edilen verimin 2 katından fazla olduğu gözlenmektedir. Düşük KBS'de işletilen ön aşamalarda arıtılan besin kaynaklarının, fotofermantasyon için daha yüksek verime yol açtığı ifade edilebilir. Nitekim, İş Paketi 3'te de, benzer şekilde, yüksek KBS'de işletilen AKR-Karanlık fermentasyon çıkış sularının, düşük KBS'li dönemlere kıyasla, takip eden fotofermantasyon sisteminde daha düşük H₂ verimine yol açtığı saptanmıştır (Bölüm 4.2.4). Bu durum, yüksek KBS değerlerinde işletilen ön aşamalarda, ardışık fotofermantasyon için inhibisyona yol açan yan ürünlerin oluşması ile açıklanabilir. Öte yandan, düşük KBS'li ön

aşamalarda, mevcut bakteriyel/arkeal tür değişebileceği için, ardışık fotofermantasyon için inhibisyon etkisine yol açan ürün üretilmemiş veya daha az etkili ürünler oluşmuş olabilir.

Tablo 5.9. AKR-Metanojenesis sistemi çıkış suları ile kurulan kesikli fotofermantasyon deneyinde elde edilen verim değerleri ^a

AKR-Metanojenesis sistemi çıkış suyu	H ₂ üretim hızı (mg H ₂ /L.saate)	H ₂ üretim hızı (mmol H ₂ /L.saate)	Besin dönüştürme verimi (%)	Işık dönüştürme verimi (%)	H ₂ üretim verimi (g H ₂ /g asetat)
IV. Periyot	0,14±0,02	0,07±0,01	8±0,8	0,11±0,01	0,012±0,001
V. Periyot	0,19±0,01	0,10±0,005	17,1±0,4	0,15±0,003	0,032±0,001

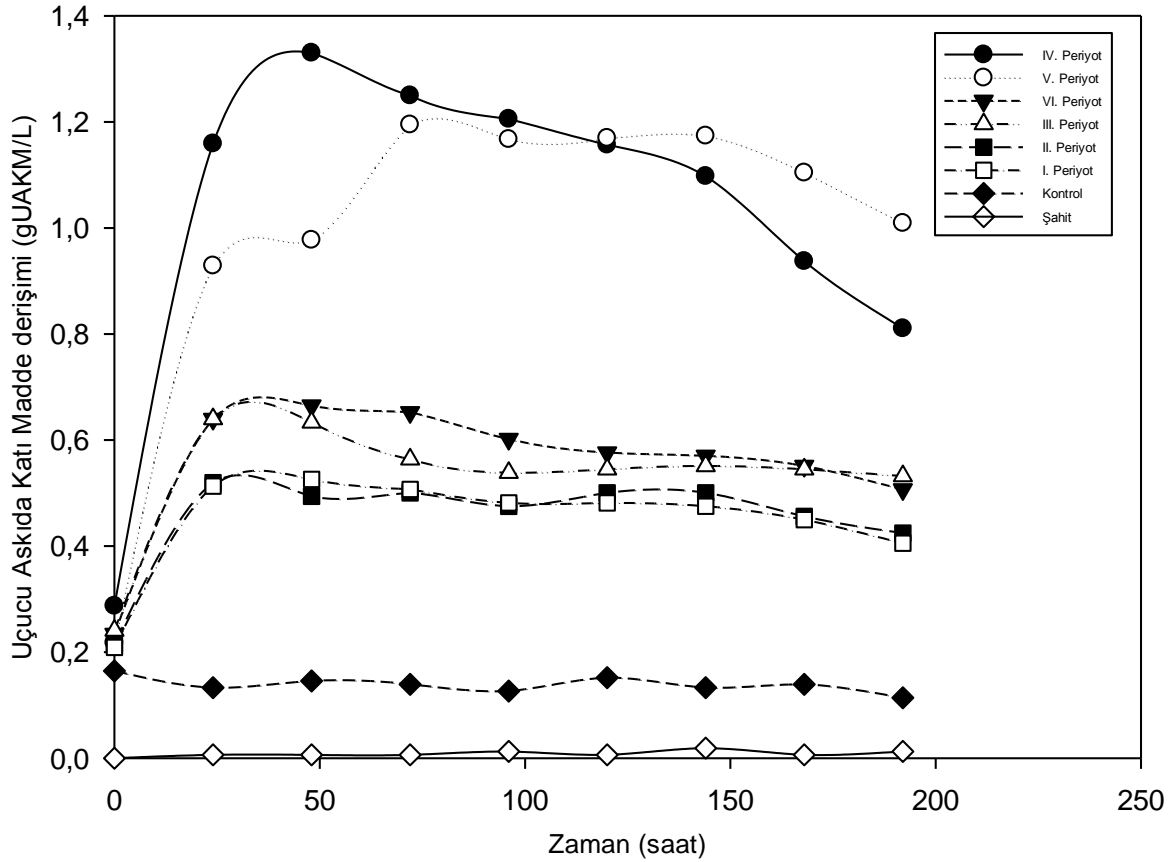
^a IV. periyot: KBS=20 gün; HBS=0,7 gün; V. periyot: KBS=10 gün; HBS=0,7 gün

Burada dikkat edilmesi gereken bir diğer husus, fotofermantasyonda besin olarak kullanılan atıksuyun, üç-aşamalı sistemin ilk aşaması olan AKR-Karanlık fermantasyon sistemi ile ilişkili olmasıdır. Üç-aşamalı sistemde sukrozla 5 farklı işletim koşulunda işletilen AKR-karanlık fermantasyon sistemi çıkış suları, I.kaynak (1.-4. işletim süreci) ve II.kaynak (5. işletim süreci) çıkış suları olarak toplanmıştır (Tablo 5.10). I.kaynak ve II.kaynak çıkış suları, AKR-metanojenesis sisteminde IV.periyotta uygulanmış; IV.periyot çıkış suyunu oluşturmuştur. AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin II.kaynak (5. işletim süreci) çıkış suyu ise, AKR-metanojenesis sisteminde V.periyotta uygulanmıştır ve V.periyot çıkış suyunu oluşturmuştur. Dolayısıyla, düşük KBS (4,2 gün) koşullarında işletilen AKR-Karanlık fermantasyon sistemi çıkış suları (II.kaynak), yine daha düşük KBS'de (10 gün) işletilen AKR-metanojenesis sisteminde (V.periyot) kullanılmıştır. Düşük KBS'de çalıştırılan bu iki ön aşamanın çıkış suyu da (V.periyot çıkış suyu), fotofermantasyonda (yüksek KBS'li ön aşamalara kıyasla) daha yüksek H₂ verim eldesine yol açmıştır. Dolayısıyla, bu durum, yüksek KBS ve olası inhibisyon kaynağı maddenin oluşumu fikrini desteklemektedir.

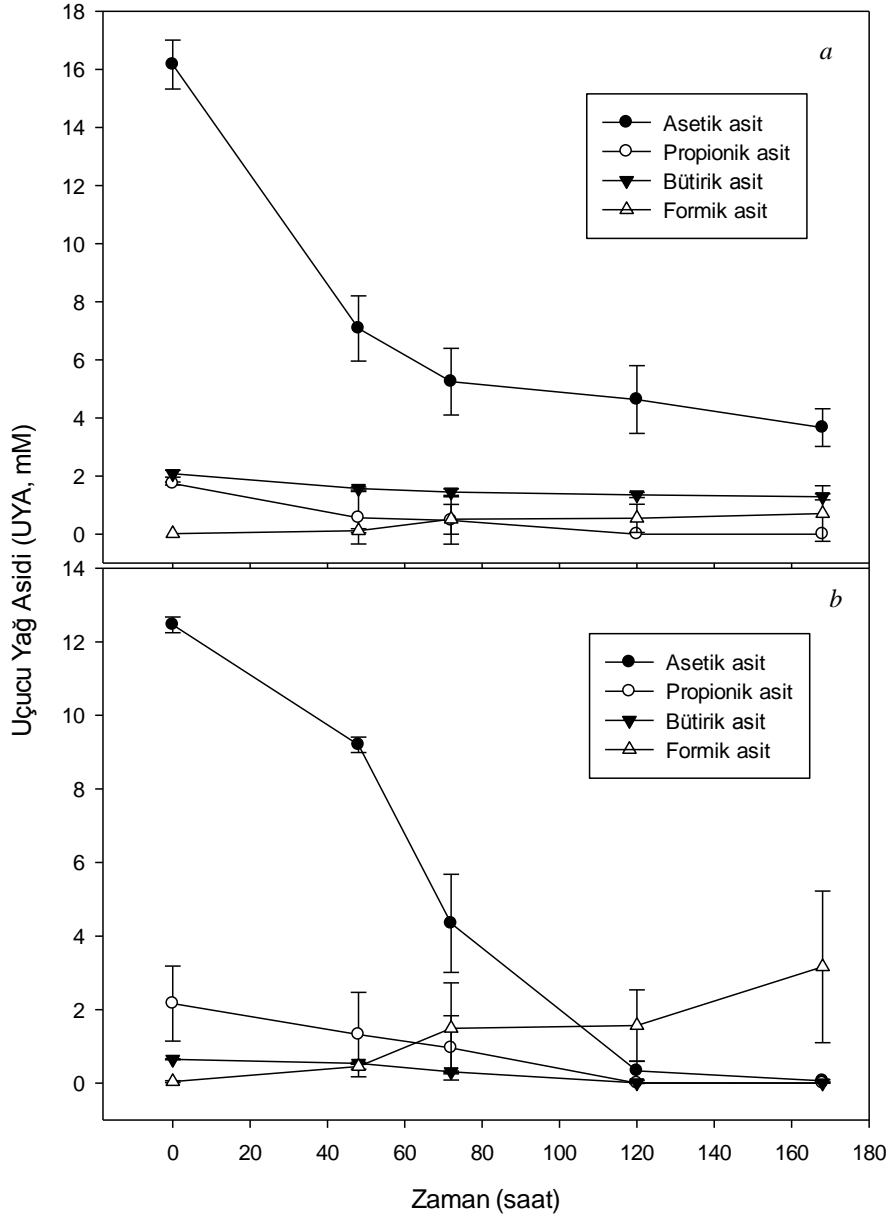
İnkübasyon süresince gözlemlenen bakteriyel büyüme ise Şekil 5.5'de verilmiştir. Şekil 5.5'de görüldüğü üzere, düşük miktarda UYA derişimi (2,5-4 mM) içeren diğer AKR-Metanojenesis periyot çıkış suları ile beslenen reaktörlerde de bakteriyel büyüme gerçekleşmiştir. Ama en yüksek büyüme, beklenildiği gibi, yüksek UYA içerikli IV. ve V.periyot çıkış suları ile işletilen reaktörlerde. Reaktördeki UYA derişimlerinin zamana göre değişimi Şekil 5.6'da sunulmuştur.

Tablo 5.10. Üç-aşamalı sistemde her aşamada kullanılan giriş suları ve çıkış suları bilgisi

AKR-Karanlık fermantasyon			AKR-Metanojenesis		Kesikli F
Giriş besini	İşletim süreçleri	Çıkış suyu adı (AKR-M giriş)	İşletim periyotları	Çıkış suyu adı (Kesikli F giriş suyu)	Gaz üretimi / verimi
Sukroz	1. işletim süreci	I.Kaynak suyu (1.-4. işletim süreci çıkış suları karışımı)	I. periyot	I. periyot çıkış suyu	Yok
	2. işletim süreci		II. periyot	II. periyot çıkış suyu	Yok
	3. işletim süreci		III. periyot	III. periyot çıkış suyu	Yok
	4. işletim süreci		IV. periyot	IV. periyot çıkış suyu	0,012 g H ₂ /g HAc
	5. işletim süreci	II. Kaynak suyu (5. işletim süreci çıkış suyu)	V. periyot		
			VI. periyot	VI. periyot çıkış suyu	Yok



Şekil 5.5. AKR-Metanojenesis sistemi çıkış suları ile kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörlerindeki *R. Capsulatus* derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)



Şekil 5.6. AKR-Metanojenesis sisteminin a) IV. Periyot suyu, ve, b) V. Periyot suyu ile kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörlerindeki ortalama UYA derişimlerinin zamana karşı değişimleri (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)

Şekil 5.6a'da görüldüğü üzere, IV. Periyot çıkış suyu ile kurulan reaktörlerde hidrojen üretiminin başladığı süreye kadar (48 saat) asetik asitin yarısı tüketilmiş ve kalan süreçte tüketilen miktar düşük hidrojen üretimine neden olmuştur. V. Periyot çıkış suyu ile kurulan reaktörlerde ise hidrojen üretiminin başladığı süreye kadar (48 saat) asetik asit tüketiminin diğerlerine kıyasla daha az olduğu görülmektedir. Bununla birlikte hidrojen üretiminin olduğu süreçte V. Periyot suyu ile kurulan reaktörlerdeki asetik asit tüketiminin daha fazla olduğu

görülmektedir. Bu durum V. Periyot suyu ile kurulan reaktörlerde üretilen toplam hidrojen miktarının (0,44 mmol) IV. Periyot suyu ile kurulan reaktörlerdekine (0,27 mmol) kıyasla daha yüksek olmasını desteklemektedir. Dolayısıyla, düşük KBS'de işletilen ön aşamalardan (AKR-Karanlık fermantasyon ve AKR-Metanojenesis) gelen V. Periyot suyunda, fotofermantasyon için olası inhibisyona yol açan madde daha az miktarda olabilir. Bu durum, asetatın, büyümenin yanısıra, özellikle fotofermantatif H_2 üretimine aktarıldığını göstermektedir. Nitekim, Şekil 5.5'de görüldüğü üzere, ilk 50 saatte, V.periyot çıkış suyu ile beslenen reaktördeki bakteriyel büyüme, diğer reaktör türüne göre daha azdır.

5.4 Sonuç

Üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan AKR-Metanojenesis için optimum işletim koşullarının incelendiği ve üç-aşamalı (sırasıyla AKR-Karanlık fermantasyon, AKR-Metanojenesis ve kesikli fotofermantasyon dizini) sisteminin enerji veriminin araştırıldığı İş Paketi 4 kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özet halinde sunulmuştur.

Üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan AKR-Metanojenesis sistemi deneyleri;

- AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin 2 farklı çıkış suyu ile (I.kaynak çıkış suyu, AKR-Karanlık fermantasyon 1.-4.işletim süreçleri; II.kaynak çıkış suyu ise AKR-5.işletim süreci çıkış sularıdır) kurulan AKR-Metanojenesis sistemi, 6 farklı periyotta (HBS-KBS kombinasyonunda) işletilmiştir.
 - 20 gün KBS değerinde 0,7, 1,5, 3 ve 6 günlük HBS değerleri; 10 gün KBS değerinde de 0,7 ve 1,5 günlük HBS değerleri araştırılmıştır.
 - Her periyodun süresi belirlenirken, kararlı duruma ulaşılmasının yanısıra, mevcut atıksu miktarı da dikkate alınmıştır.
- En yüksek ortalama metan üretim verimi $343 \pm 17 \text{ mL CH}_4/\text{g } \dot{C}KO_{\text{eklenen}}$ değeri ile KBS:20 gün, HBS: 6 gün'de (I.periyot) elde edilmiştir. En yüksek maksimum metan üretim verimi (**$395 \text{ mL CH}_4/\text{g } \dot{C}KO_{\text{eklenen}}$**) yine aynı işletim koşullarında elde edilmiştir.
- En yüksek ortalama metan üretim hızı $1794 \pm 279 \text{ mL CH}_4/L_{\text{reaktör.gün}}$ değeri ile KBS:10 gün, HBS: 0,7 gün'de (V.periyot) elde edilmiştir. En yüksek maksimum metan üretim hızı (**$2362 \text{ mL CH}_4/L_{\text{reaktör.gün}}$**) yine aynı işletim koşullarında elde edilmiştir.
- HBS değeri, verim ve üretim hızını etkileyen ana parametredir.
- HBS değeri azaltıldıkça, çalışılan KBS değerinden (10 ve 20 gün) bağımsız olarak, ortalama metan üretim verimi düşmektedir.
 - HBS 3 ve 6 gün iken (OYH: 2,2-4,5 g $\dot{C}KO_{\text{eklenen}}/L.gün$), birbirine yakın verim elde edilmiştir. HBS 1,5 güne düşürüldüğünde, verim göreceli olarak düşmektedir.

- HBS 0,7 gün (OYH: 8,9 g çKOİ/L.gün) iken, verim ciddi şekilde azalmaktadır.
- HBS değeri azaltıldıkça, çalışılan KBS değerinden (10 ve 20 gün) bağımsız olarak, (verimin aksine) metan üretim hızı artmaktadır.
- Aynı HBS fakat farklı KBS koşullarında çalışıldığında, birbirlerine yakın verim ve hız değerleri elde edilmiştir. Çalışılan 0,7 ve 1,5 gün HBS, ve 10 ve 20 gün KBS uygulamalarına göre;
 - Aynı ve düşük HBS değerinde (0,7 gün), düşük KBS (10 gün) uygulaması daha yüksek verim ve hız eldesine yol açmaktadır.
 - Aynı ve göreceli yüksek HBS değerinde (1,5 gün), göreceli yüksek KBS (20 gün) uygulaması daha yüksek verim ve hız eldesine yol açmaktadır.
- Aktif çamura aklime olan anaerobik aşı çamurunun, özellikle yüksek UYA içeren (35 mM; 2011 mg/L HAc) karanlık fermantasyon çıkış suyuna ve AKR işletim koşullarına aklimasyonu gerekmektedir.
- Üç-aşamalı sistemde, 3.aşama olan fotofermantasyon sistemine yeterli miktarda (>15 mM) UYA aktarmak için AKR-Metanojenesis sisteminde HBS'nin 0,7 gün gibi düşük değerlerde tutulması gerekmektedir.
 - KBS'nin 10 veya 20 gün olması çıkış tUYA derişimini belirgin şekilde değiştirmemektedir.
 - Her iki koşulda da en baskın asit tipi, asetik asittir.

Üç-aşamalı sistemde, 3.aşama olan kesikli fotofermantasyon reaktör deneyleri;

- Üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan AKR-Metanojenesis sisteminin çıkış sularından, sadece yeterli derişimde UYA eldesi olan IV. ve V.peryot çıkış suları ile kurulan reaktörlerde hidrojen üretilmiştir.
 - AKR-Metanojenesis sisteminin IV.peryodunda alınan fotofermantasyon giriş suları (IV.peryot çıkış suyu), AKR-metanojenesis sisteminde I. ve II.kaynak suyu uygulamasına denk gelmektedir (Tablo 5.5, Tablo 5.10).
 - AKR-Metanojenesis sisteminin V.peryodunda alınan fotofermantasyon giriş suları (V.peryot çıkış suyu), AKR-metanojenesis sisteminde sadece II.kaynak suyu uygulamasına denk gelmektedir (Tablo 5.5, Tablo 5.10).
- En yüksek H₂ üretim verim ve hızı (**0,032±0,001 g H₂/g asetat** ve **0,10±0,005 mmol H₂/L.saatt**), V.peryot çıkış suyundan elde edilmiştir.
 - Bu değerler, optimum kesikli fotofermantasyon koşullarında elde edilen teorik üretim hızı (1,04 mmol H₂/L.saatt), deneysel üretim hızı (0,91 mmol H₂/L.saatt)

ve deneysel üretim verimi (0,11 g H₂/g asetat) değerlerinin neredeyse onda biridir.

- Bu değerler, İş Paketi 3'de üç-aşamalı sistemin 2.aşaması olan kesikli metanojenesis reaktörleri çıkış suyu ile kurulan kesikli fotofermantatif reaktörlerin verim ve hızlarından da (0,052 g H₂/g HAc ve 0,17 mmol H₂/L.saate) daha düşüktür (Bölüm 4.2.3).
- Bu durumun, giriş suyunda bulunan ve amonyum iyonu, pH, sıcaklık, bakteriyel kontaminasyon ve tUYA derişimi gibi faktörlerden farklı olarak, fotofermantasyonu inhibe eden başka bir madde kaynaklı olduğu düşünülmektedir.
- Benzeri durum, İş Paketi 3 kapsamında da gözlenmiş; inhibisyon kaynağının AKR-Karanlık fermantasyon ünitesi olduğu gözlenmiştir. Fakat, bahsi geçen çalışmadan (Bölüm 4.2.3) daha düşük verim/hız elde edilmiş olması, AKR-Karanlık fermantasyon sistemine ek olarak, AKR-Metanojenesis sistemi kaynaklı da bir inhibisyonun olduğunu gösterebilir.
- Üç-aşamalı sistemde, ön aşamaların (AKR-Karanlık fermantasyon, AKR-Metanojenesis) KBS değeri arttıkça, inhibisyon etkisi artmaktadır.
- Üç-aşamalı sistemin toplam enerji veriminin hesabında, daha yüksek H₂ üretiminin / veriminin olduğu (ve giriş suyu kaynağı bir karışım olmayan) V.periyot çıkış suyu ile beslenen fotofermantasyon reaktörünün değerleri kullanılmıştır.
- AKR-Metanojenesis sistemi çıkış suları ile kurulan fotofermantasyon sistemleri için, yüksek TAN derişimi sebebiyle, ön arıtımla amonyumun giderilmesi gerekmektedir.

Üç-aşamalı sistemde AKR-Metanojenesisin optimizasyonu;

Proje önerisinde belirtildiği üzere, **üç-aşamalı sistemde** maksimum enerji üretiminin (veya sonuçlara göre H₂/CH₄ veriminin) sağlandığı koşul, metanojenesis için optimum işletim koşulu olarak belirlenmiştir. Üç-aşamalı sistemin ilk aşaması olan AKR-Karanlık fermantasyonun optimizasyonunda da, takip eden sistemler dikkate alınmış ve en uygun AKR-Karanlık fermantasyon işletimi olarak V.işletim süreci koşulları (pH=5,5; HBS=12 saat, döngü süresi=8 saat, OYH=22,4 g KOİ/L.gün ve KBS_{ortalama} =4,2 gün) belirlenmişti. Bu bağlamda, optimum AKR-Karanlık fermantasyon işletim koşulları çıkış suyu (5.işletim süreci suyu, II.kaynak suyu) ile işletilen AKR-Metanojenesis koşullarını ve bu süreçte üretilen çıkış suyunu (fotofermantasyon giriş suyu) baz almak mantıklı olacaktır. Tablo 5.10'a bakıldığında, optimum AKR-Karanlık fermantasyon işletim çıkış suyunun (5.işletim süreci suyu, II.kaynak suyu), AKR-Metanojenesis sistemine iki farklı periyotta (IV. ve V.Periyotlar) uygulandığı görülmektedir. IV. ve V.Periyot çıkış suvarı, takip eden fotofermantasyona uygulandığında,

daha yüksek verimin elde edildiği fotofermantasyon giriş suyu, AKR-Metanojenesis V.periyoduna denk gelmektedir (Tablo 5.10). Daha yüksek hidrojen üretim verimi, üç-aşamalı sistemde daha yüksek ısı enerjisi verimini sağlayacaktır. Sonuç olarak, AKR-metanojenesis sisteminin V.periyodu sırasında uygulanan işletim koşulları AKR-metanojenesis sistemi için en uygun işletme koşulu olarak belirlenmiştir. Bu koşullar; HBS=0,7 gün, KBS=10 gün, OYH=8,9 g KOİ/L.gün, F/M=1,82 g çKOİ/g UAKM.gün) ve döngü süresi=12 saat (reaksiyon süresi 8-9 saat, çökeltme süresi 3-4 saat)'tir.

Üç-aşamalı sistemde elde edilen toplam enerji verimi

Üç-aşamalı sistemden elde edilebilecek maksimum enerji verimi hesaplanırken, optimum işletme koşullarının belirlendiği AKR-karanlık fermantasyon ve AKR-Metanojenesis sistemleri işletim süreçleri esas alınmıştır; bu süreçlere ait maksimum verim değerleri kullanılmıştır. 3.aşama olan fotofermantasyon sistemi için de en yüksek verimin elde edildiği giriş suyu esas alınmıştır. Buna göre, yukarıda da ayrıntılı verildiği üzere, AKR-Karanlık fermantasyon 5.işletim sürecine ait maksimum H_2 üretim verimi; AKR-Karanlık fermantasyon 5.işletim süreci çıkış suyuyla işletilen AKR-Metanojenesis V.periyot maksimum metan üretim verimi, ve AKR-Metanojenesis V.periyot çıkış suyu ile kurulan fotofermantasyon H_2 üretim verimi kullanılmıştır (Tablo 5.10). Bahsedilen her bir reaktör aşamasına ait verim aynı birime dönüştürülmüş, verimler g KOİ başına üretilen g H_2 veya g CH_4 bazında tanımlanmış ve toplam enerji g çKOİ bazında (kJ/g çKOİ) hesaplanmıştır. Üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon entegrasyonu ve her bir aşamadan elde edilen enerji miktarları Tablo 5.11'de sunulmuştur.

Tablo 5.11'de görüldüğü üzere, üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon entegre sisteminde, birim karbon kaynağından (g KOİ) elde edilen toplam brüt ısı enerjisi 16,11 kJ/g KOİ'dir. İş Paketi 3'te, aynı atıksu kaynağı (AKR-KF için sukroz; Kesikli metanojenesis için AKR-KF 5.işletim süreci çıkış suyu, ve bu metanojenesis sistemi çıkış suyu ile işletilen kesikli fotofermantasyon) ile işletilen üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon sisteminden 13,47 kJ/g çKOİ (veya 13,47 kJ/g KOİ) enerji elde edilmiştir. Bu iki entegre sistemin farkı, 2.aşama olan metanojenesis sistemindeki reaktör tipidir. Metanojenesis sisteminin kesikliden AKR tipine dönüştürülmesi, verimi 13,47'den 16,11 kJ/g KOİ'ye artırmıştır. Elde edilen 16,11 kJ/g çKOİ), H_2 / heksoz birimine dönüştürülecek olursa; üç-aşamalı sistemden 0,11 g H_2 /g KOİ; 0,12 g H_2 /g heksoz veya 10,8 mol H_2 /mol heksoz elde edilmiştir. Dolayısıyla, bu projede önerilen üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon sistemi bugüne kadar literatürde iki-aşamalı hidrojen sistemlerinden elde edilen en yüksek verimden (7,2 mol H_2 /mol heksoz) daha yüksek bir verim eldesi sağlamıştır.

Diğer bir deyişle, üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon entegre sistemi sayesinde, mol H₂/mol heksoz birimi bazında, verim %50 artırılmıştır. Önerilen üç-aşamalı sistemde hidrojen bazında elde edilen toplam verim değeri (10,8 mol H₂/mol heksoz), ekonomik değer olarak tanımlanan 8 mol H₂/mol heksoz veriminden (Yokoi vd., 2002; Argun ve Kargı, 2011) fazladır. Hatta bu değer (ve dolayısıyla elde edildiği üçlü konfigürasyon), teorik değer olan 12 mol H₂/mol heksoz değerine (Özgür vd., 2010; Argun ve Kargı, 2011) de yaklaşması sebebiyle oldukça önemlidir.

Tablo 5.11. Üç-aşamalı sistemde elde edilen maksimum H₂ veya CH₄ üretim verimleri ve enerji değeri ^a

Üç-aşamalı sistemin aşamaları	Verim	Verim (g H ₂ /g çKOİ _{eklenen} veya g CH ₄ /g çKOİ _{eklenen})	Üretilen ısı enerjisi (kJ/g çKOİ _{eklenen})	
			Brüt	Net
1.Aşama (AKR-Karanlık fermantasyon)	1,66 mol H ₂ /mol heksoz	0,017	2,41	2,03
2.Aşama (AKR-Metanojenesis)	272 mL CH ₄ /g çKOİ _{eklenen}	0,17	9,45	8,50
3.Aşama (Kesikli fotofermantasyon)	0,96 mol H ₂ /mol HAc (0,032 g H ₂ /g HAc)	0,03	4,25	3,58
Toplam brüt ısı enerjisi (kJ/g çKOİ _{eklenen})	-	-	16,11	-
Toplam net ısı enerjisi (kJ/g çKOİ _{eklenen})	-	-	-	14,11

^a Brüt ısı enerjisi hesabında, H₂ için 141.8 kJ/g, CH₄ için 55.58 kJ/g; Net ısı enerjisi değerleri = H₂ için 119.47 kJ/g, CH₄ için 49.98 kJ/g değerleri kullanılmıştır (Lewandowski, 1999).

Önerilen üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon sistemi, iki-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis entegre sistemi ile de karşılaştırılabilir. Bu bağlamda, aynı atıksuların kullanıldığı işletme koşullarında, sadece iki-aşamanın olduğu ve bu süreçlerdeki maksimum verimler kullanılmalıdır. Tablo 5.8'e bakıldığında, AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin 5. işletim süreci ile işletilen ve maksimum verimin elde edildiği AKR-Metanojenesis periyodu VI. periyottur. Bu periyotta, 347 mL CH₄/g çKOİ verim elde edilmiştir. Bu verim, 0,014 mol CH₄/g çKOİ; 0,224 g CH₄/g çKOİ veya brüt enerji bazında 12,45 kJ/g çKOİ'ye denktir (Tablo

5.12). AKR-Karanlık fermantasyon sistemi veriminin (1,66 mol H₂/mol heksoz) 2,41 kJ/g çKOİ enerji sağladığı daha önce hesaplanmıştır. Bu bağlamda, iki-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis entegre sisteminden elde edilen toplam brüt enerji 14,86 kJ/g çKOİ'dir. Bu sonuç, üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon sisteminin, iki-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis sistemine kıyasla, enerji üretimi bazında daha avantajlı olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla, 2.aşama olan metanojenisten, 3.aşama olan fotofermantasyona enerji aktarmanın etkisi, ardışık kesikli sistemlerde daha belirgin hissedilmiş; daha yüksek toplam enerji eldesi sağlanmıştır.

Tablo 5.12. İki-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis sisteminde elde edilen maksimum H₂ veya CH₄ üretim verimleri ve enerji değeri ^a

İki-aşamalı sistemin aşamaları	Verim	Verim (g H ₂ /g çKOİ _{eklenen} veya g CH ₄ /g çKOİ _{eklenen})	Üretilen ısı enerjisi (kJ/g çKOİ _{eklenen})	
			Brüt	Net
1.Aşama (AKR-Karanlık fermantasyon)	1,66 mol H ₂ /mol heksoz	0,017	2,41	2,03
2.Aşama (AKR-Metanojenesis)	347 mL CH ₄ /g çKOİ _{eklenen}	0,224	12,45	11,20
Toplam brüt ısı enerjisi (kJ/g çKOİ _{eklenen})	-	-	14,86	-
Toplam net ısı enerjisi (kJ/g çKOİ _{eklenen})	-	-	-	13,23

^a Brüt ısı enerjisi hesabında, H₂ için 141.8 kJ/g, CH₄ için 55.58 kJ/g; Net ısı enerjisi değerleri = H₂ için 119.47 kJ/g, CH₄ için 49.98 kJ/g değerleri kullanılmıştır (Lewandowski, 1999).

6. ÜÇ-AŞAMALI SİSTEMDE FOTOFERMANTASYONUN OPTİMİZASYONU

Projenin 5.İş Paketi (İP 5) kapsamında yapılması hedeflenen çalışmalar aşağıda sunulmuştur:

- Üç-aşamalı sistemin son aşaması olarak, ardışık-kesikli modda işletilen fotofermantasyon reaktörlerinin kurulması,
- Ardışık-kesikli olarak sürekli çalıştırılan fotofermantasyon aşaması için, optimum işletme koşullarının (HBS değerinin) belirlenmesi
 - Besin olarak, İş Paketi 4 kapsamında kurulan ve H₂ üretiminin elde edildiği koşullarda işletilen AKR-metanojenesis sistemi çıkış suyunun kullanılması
- Optimum koşullarda işletilen ardışık-kesikli fotofermantasyon sistemi ve önceki iki aşama da dahil edilerek, üç-aşamalı sistemin (AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Yarı-kesikli fotofermantasyon konfigürasyonunun) toplam enerji veriminin araştırılması

Bu iş paketi sayesinde, birbirinin ardışığı olarak işletilen üç sürekli reaktörden (sırasıyla AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Yarı-kesikli fotofermantasyon konfigürasyonundan) elde edilen toplam H₂ verimi ve miktarı, CH₄ üretimi ve toplam enerji üretimi araştırılmıştır. Diğer bir deyişle, üç-aşamalı sistemde, optimum koşullarda sürekli olarak işletilen 3 farklı reaktör tipinin kombinasyonundan, birim karbon kaynağı başına (g KOİ) elde edilen toplam enerji verimi araştırılmıştır. Maksimum enerji üretiminin (veya sonuçlara göre H₂/CH₄ veriminin) sağlandığı koşul, glikoz ile işletilen üç-aşamalı reaktör konfigürasyonu için optimum işletim koşulu olarak belirlenmiştir.

6.1 Gereç ve Yöntem

6.1.1 Mikrobiyel Kültür; Fotofermantasyon Kültürü

Fotofermantasyon deneylerinde ODTÜ Hidrojen Araştırma Laboratuvarı stoklarında bulunan mor-kükürtsüz bakteri türü olan *Rhodobacter capsulatus* (DSM 1710) kullanılmıştır. Bu bakteri, İş paketi 2'de de belirtildiği gibi (Bölüm 3.1.1.3), Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu-Leibniz DSMZ Enstitüsü'nden temin edilmiş olup, ODTÜ-Hidrojen

Araştırma Laboratuvarı stoklarında -80°C 'de saklanmaktadır. Fotofermantasyon deneylerinde aşı kültürü olarak kullanılan *Rhodobacter capsulatus* (DSM 1710), Bölüm 3.1.1.3'de belirtilen protokole göre steril ortamda çoğaltılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

6.1.2 Deneysel Yöntem

6.1.2.1 Üç-Aşamalı Sistemde, AKR-Metanojenesis Sistemi Çıkış Suları ile Kurulan Ardışık-Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyleri

Bu çalışmanın amacı, AKR-Karanlık fermentasyon çıkış suyu ile işletilen AKR-Metanojenesis sisteminin farklı işletim koşullarında elde edilen çıkış sularıyla ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerinin kurulmasıdır. Bu bağlamda, sürekli işletilen üç-aşamalı konfigürasyonun son aşaması da kurularak, optimum fotofermantasyon işletim koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, ardışık-kesikli modda işletilen fotofermantasyon reaktörlerinde araştırmak için 2, 4 ve 6 gün olmak üzere üç farklı HBS belirlenmiştir. Böylelikle üç farklı HBS değeri için ardışık-kesikli modda işletilen fotofermantasyon reaktörlerinin H_2 üretim verimi ve hızının araştırılması planlanmıştır.

Daha önce İş Paketi 4 kapsamında kurulan deneyler (Bölüm 5.3.2), İş Paketi 5 için bir ön bilgi sağlamıştır. İş Paketi 4 kapsamında yapılan çalışmada, AKR-Metanojenesis sisteminde HBS ve KBS değiştirilerek altı farklı periyotta işletim gerçekleştirilmiş; her farklı periyodun çıkış suları kesikli fotofermantasyon reaktörleri için altı farklı giriş suyu oluşturmuştur. Ancak bu periyotlardan sadece iki tanesinin (IV. ve V. periyotlar) çıkış UYA derişimlerinin fotofermantasyon reaktörleri için uygun olduğu ve sadece bu çıkış sularından H_2 üretildiği saptanmıştır (Bölüm 5.3.2). Dolayısıyla, İş Paketi 4'de gerçekleştirilen bilgiler ışığında, bu çalışmada giriş suyu olarak AKR-Metanojenesis IV. ve V. periyot çıkış suları (yüksek UYA derişimine sahip olan işletim günlerinde toplanmıştır) kullanılmıştır. İki farklı periyoda ait çıkış suyu özellikleri Tablo 6.1'de verilmiştir. Her bir periyoda ait çıkış suları (kendi içinde) homojen hale getirildikten sonra 500 mL'lik parçalar halinde -20°C 'de depolanmıştır. Besleme günü öncesinde, birer 500 mL'lik periyot çıkış suyu çıkarılarak başlangıç amonyum derişimlerinin düşürülmesi amacıyla havayla sıyırma yöntemine tabi tutulmuştur (EK-E). Her 500 mL'lik çıkış suyu bittiğinde bu işlem tekrarlanmıştır.

Özellikleri Tablo 6.1'de verilen, iki farklı AKR-Metanojenesis çıkış suyu ile, her bir HBS değeri için 2 tekrarlı (aynı özellikte) yarı-kesikli fotofermantasyon reaktörleri kurulmuştur. Diğer bir deyişle, 3 farklı HBS değeri için toplamda 12 reaktör kurulmuştur. Kurulan reaktörlerin özellikleri Tablo 6.2'de verilmiştir.

Tablo 6.1. Üç-aşamalı sistemde, ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörleri için kullanılan giriş sularının özellikleri (AKR-Metanojenesis periyotlarına ait çıkış suları)

Parametreler	AKR-Metanojenesis sistemi çıkış suları ^c	
	IV.periyot suyu	V.periyot suyu
Toplam UYA (mM HAc)	21,7±4,1	16,4±1,7
çKOİ (g/L)	2625±45	1605±40
TAN (mg/L NH ₄ -N) ^a	106,4	112
TAN (mg/L NH ₄ -N) ^b	6,8-15,4	5,6-14,9
pH	7,6	7,6

^a AKR-metanojenesis sistemi çıkış suyundaki amonyum iyonu derişimleri

^b -20°C'de depolanan 500 mL'lik AKR-Metanojenesis ardışık-kesikli anaerobik reaktör çıkış suyunun çözdürülüp havayla sıyırma yöntemine tabi tutulması sonrası giriş sularındaki amonyum iyonu derişimlerinin aralığı

^c IV.periyottan alınan çıkış suları 125-132.işletme günleri, V.periyottan alınan çıkış suları ise 137-138.işletme günlerine ait çıkış sularıdır.

Tablo 6.2. Üç-aşamalı sistemde, 3.aşama olan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörleri kurulum özellikleri

Reaktör No	Giriş suyu tipi	HBS (gün)	Reaktör No	Giriş suyu tipi	HBS (gün)
1	IV.periyot suyu	2	7	V.periyot suyu	2
2	IV.periyot suyu	2	8	V.periyot suyu	2
3	IV.periyot suyu	4	9	V.periyot suyu	4
4	IV.periyot suyu	4	10	V.periyot suyu	4
5	IV.periyot suyu	6	11	V.periyot suyu	6
6	IV.periyot suyu	6	12	V.periyot suyu	6

Kesikli fotofermantasyon reaktörlerinin toplam ve etkin hacmi sırasıyla 55 ve 50 mL'dir. Her bir reaktöre HBS değerlerine göre günlük olarak homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra süzölmüş (0,7 µm) ve otoklavlanmış çıkış suyu eklenmiştir. Reaktörlere verilen günlük giriş suyu miktarları etkin hacimlerinin HBS değerine bölünmesiyle elde edilmiştir. Reaktörlere başlangıçta, S/X₀ oranı 9,4 g KOİ/g UAKM (veya 8,3 g KOİ-HAc/g UAKM) sağlanacak şekilde *R.capsulatus* kültürü aşılantmıştır. İş Paketi 2'de (Bölüm 3.2.3.2) elde edilen

fotofermantasyon deneyi sonuçlarına göre, reaktörler, en yüksek hidrojen üretim hızını sağlayan 3955 lux ışık şiddetinde aydınlatılmış ve S/X_o 9,4 g KOİ/g UAKM oranı sağlanmıştır.

6.1.3 Analitik Yöntem

AKM, UAKM ve alkalinite ölçümleri Standart Metod'a göre gerçekleştirilmiştir (APHA, AWWA, WEF, 2005). çKOİ için, reaktörden alınan örnekler öncelikle Sartorius marka cam lifi filtrelerden (0,7 µm) süzölmüş; süzöntü örneklere EPA onaylı reaktör çürütme metodu uygulanarak çKOİ analizleri yapılmıştır (Hach Water Analysis Handbook, 1989).

Fotofermantasyon deneylerinde üretilen toplam gaz hacmi her reaktör için ayrı yaptırılmış olan gaz toplama tüplerine deney süresi boyunca biriktirilerek hesaplanmıştır. Fotofermantasyon reaktörlerinde tepe gazı kompozisyonu, TCD ve Supelco Carboxen 1010 kolonu ile donatılı olan GC (Agilent Technologies 6890N) ünitesinde yapılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak Argon (26 mL/dakika akış) kullanılmıştır. Enjektör sıcaklığı 160°C, detektör sıcaklığı 170°C, fırın sıcaklığı ise 140°C'dir. Fotofermantasyon reaktörlerinin UYA kompozisyonu ve derişimleri ise refractive index detektörü kullanan HPLC (SHIMADZU 20A) cihazı ile 10 µL numune kullanılarak ölçölmüştür. Buna göre, laktik, formik, asetik, propiyonik, izo-bütirik, bütirik ve izo-valerik asitleri analiz edilmiştir. HPLC çalışma protokolü şu şekildedir; fırın sıcaklığı 66°C; mobil faz HPLC kalitesinde 0,085 M'de sülfürik asit çözeltisi; akış hızı 0,4 mL/dakika. Numunelerdeki UYA derişimleri, standart asit karışım solüsyonu ile hazırlanan kalibrasyon grafiklerine göre hesaplanmıştır (Şekil EK-A3). Toplam UYA (tUYA) derişimi için, her bir asit derişimi moleküler ağırlığına bölünerek ve asetik asidin moleküler ağırlığıyla çarpılmaktadır. Tüm asitlerin, asetik asit (HAc) cinsinden eşdeğer derişimlerinin toplamı tUYA derişimini vermektedir (Yılmaz ve Demirer, 2008).

Fotofermantasyon reaktörlerinden alınan örneklerin optik yoğunluk ölçümleri 660 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu UV-1201) gerçekleştirilmiştir. Ölçölen her bir optik yoğunluk için kuru kütle ağırlığı hesaplanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve reaktörlerde zamana karşı UAKM derişimi izlenmiştir (Şekil EK-A1, EK-A).

6.2 Bulgular ve Tartışma

6.2.1. Üç-Aşamalı Sistemde, AKR-Metanojenesis Sistemi Çıkış Suları ile Kurulan Ardışık-Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyleri Sonuçları

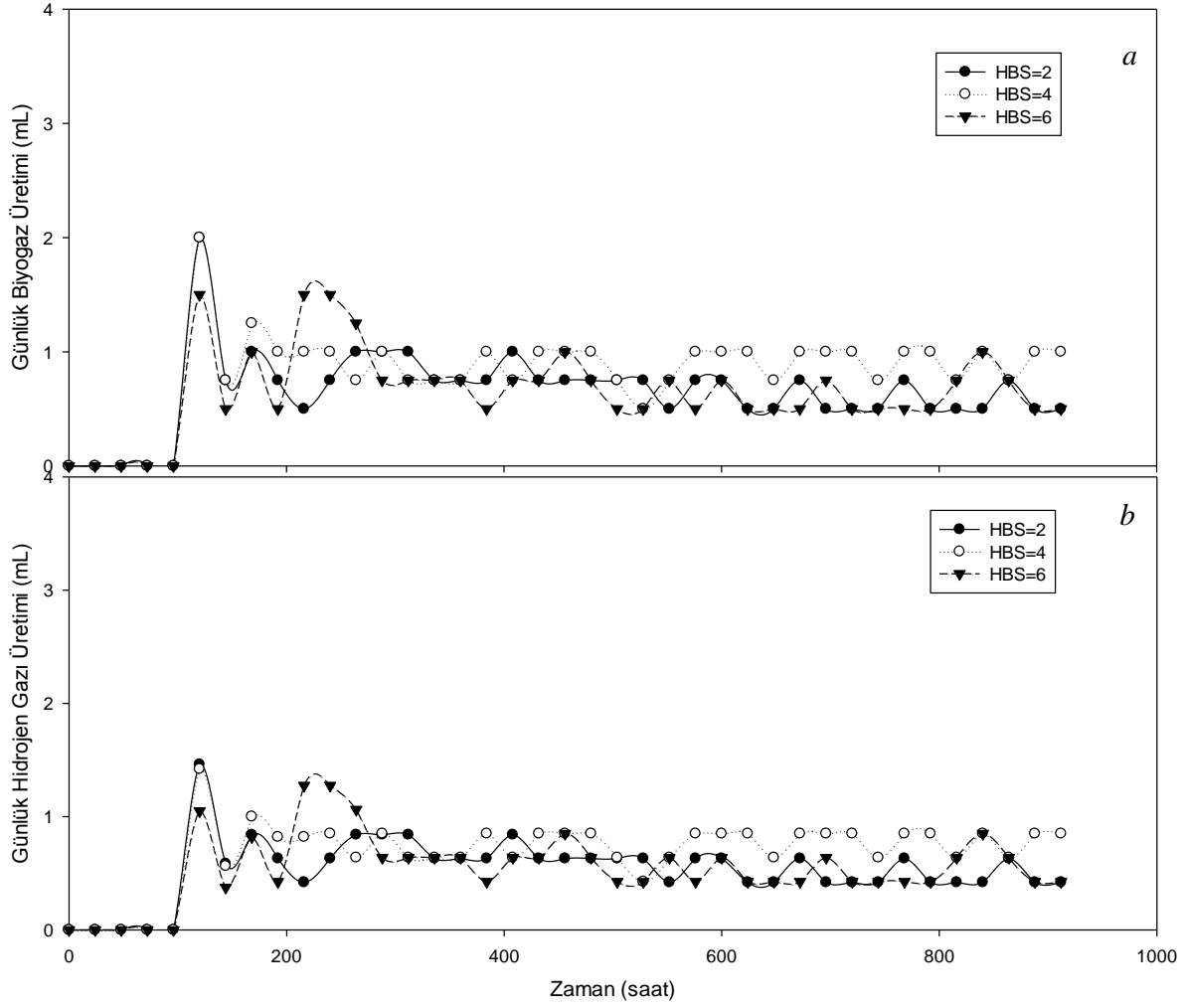
Üç aşamalı sistemde AKR-Metanojenesis Sistemi IV. ve V.periyot çıkış suları ile kurulan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerinden IV.periyot suyu ile kurulanlar 38 gün (912

saat), V. periyot suyu ile kurulanlar 20 gün (480 saat) boyunca işletilmiştir. Çalıştırılan 2 eş (tekrarlı) reaktörlerde (IV. Periyot ve V. Periyot çıkış suyu ile kurulmuş) inkübasyon süresinin ilk 120 saatlik süresinde gaz üretimi gözlemlenmemiştir. İş Paketi 4 kapsamında yapılan çalışmada (Bölüm 5.3.2) gözlemlenen granülasyon oluşumu, bu çalışmanın ilk 120 saatlik sürecinde de gözlemlenmiştir. İş Paketi 4'den elde edilen ön bilgiler ışığında, ilk 120 saatlik süreçte kurulan reaktörler kesikli reaktör gibi işletilmiş ve herhangi bir besleme yapılmamıştır. Gaz üretiminin başlaması ve granülasyonun azalması beklenmiştir. Reaktörlerin 120 saat sonunda gaz üretimine başlamışını takiben, reaktörler 120.saat itibariyle ardışık-kesikli işletilmeye başlanmıştır. 120. saatten sonra reaktörlerde granülasyon oluşumu azalmış ancak tamamiyle kaybolmamıştır. Deney süresince de granülasyon oluşumu deney başlangıcına göre daha düşük seviyede gözlemlenmiştir. Deney süresince üretilen toplam hidrojen gazı miktarları Tablo 6.3'te verilmiştir. Deney süresince gözlemlenen günlük biyogaz / hidrojen gazı miktarları, IV. Periyot ve V.periyot suları ile kurulan reaktör tipleri için, sırasıyla, Şekil 6.1 ve Şekil 6.2'de verilmiştir. İnkübasyon süresince reaktörlerde gözlemlenen bakteriyel büyüme Şekil 6.3'te sunulmuştur.

Tablo 6.3. Ardışık-kesikli işletilen fotofermantasyon reaktörlerinde üretilen toplam hidrojen gazı miktarı

Reaktör No	Giriş suyu tipi	HBS değeri (gün)	Üretilen hidrojen gazı (mmol)
1-2	IV.periyot suyu	2	0,85
3-4	IV.periyot suyu	4	1,13
5-6	IV.periyot suyu	6	0,97
7-8	V.periyot suyu	2	0,71
9-10	V.periyot suyu	4	0,88
11-12	V.periyot suyu	6	0,79

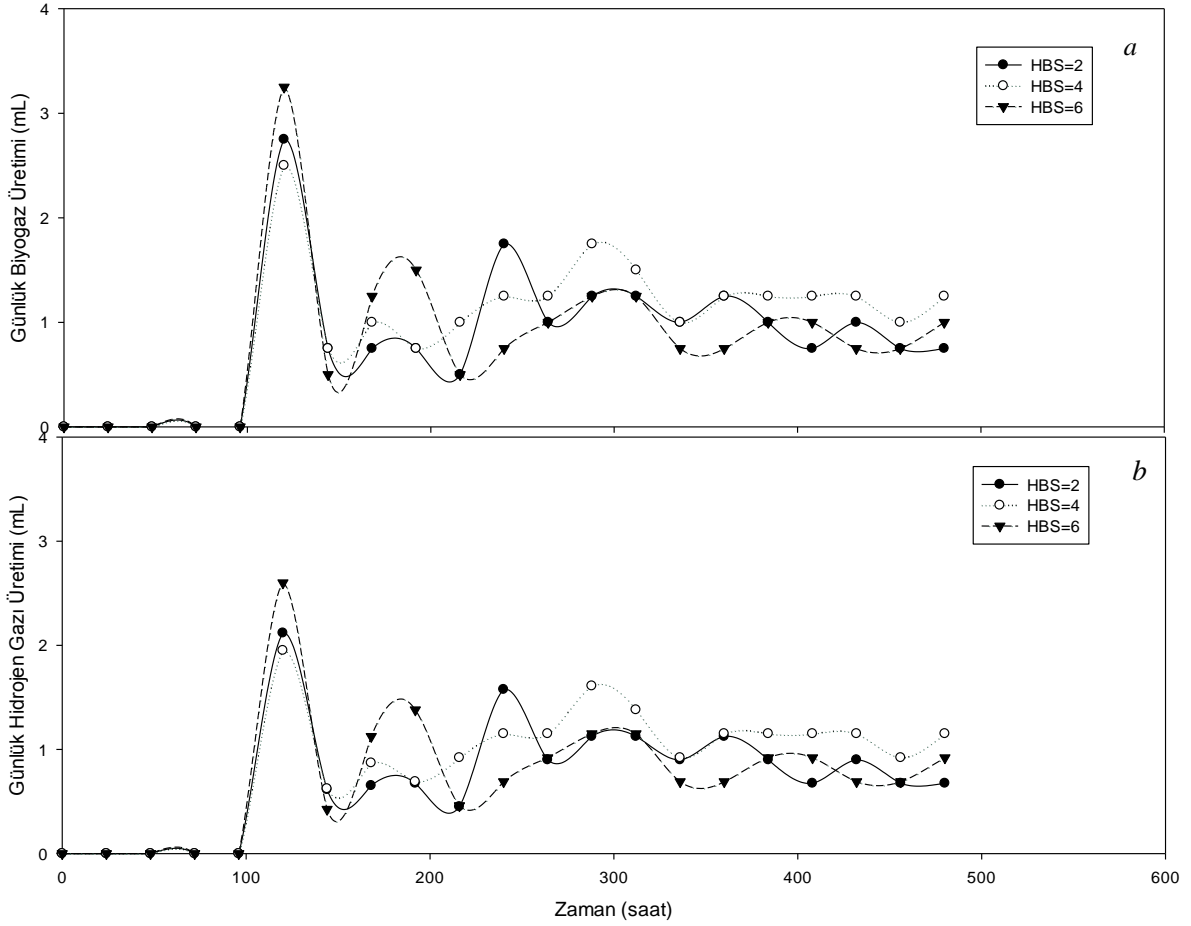
Tablo 6.3'de görüldüğü üzere üretilen toplam hidrojen gazı miktarları oldukça düşük gözlemlenmiştir. Her iki periyot (IV. ve V.) çıkış suyu ile çalıştırılan reaktörlerde de HBS değeri 4 olan reaktörlerde diğerlerine kıyasla daha yüksek hidrojen üretimi gözlemlenmiştir. IV.periyot çıkış suyunun hacim bazında az olması sebebiyle IV. periyot suyu ile işletilen reaktörler 20 gün, V.periyot çıkış suyu ile işletilen reaktörler 38 gün boyunca işletilmiştir. Buna rağmen, IV.periyot suyu ile işletilen reaktörlerde üretilen hidrojen üretimi, V.periyot çıkış suyu ile işletilen reaktörlere yakın değerlerdedir.



Şekil 6.1. IV. periyot çıkış suyu ile kurulan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde üretilen günlük a) biyogaz b) hidrojen gazı miktarları (30°C , S/X_0 : $9,4 \text{ g KOI/g UAKM}$, 3955 lux)

Şekil 6.1 ve 6.2'de görüldüğü üzere, farklı periyot sularıyla kurulan tüm reaktörlerde, günlük gaz üretimi oldukça düşüktür; $1 \text{ mL H}_2/\text{gün}$ bazında seyretmiştir. Her iki atıksu tipi için de, daha yüksek hidrojen gazı üretimini sağlayan HBS değeri 4 gün olarak belirlenmiştir.

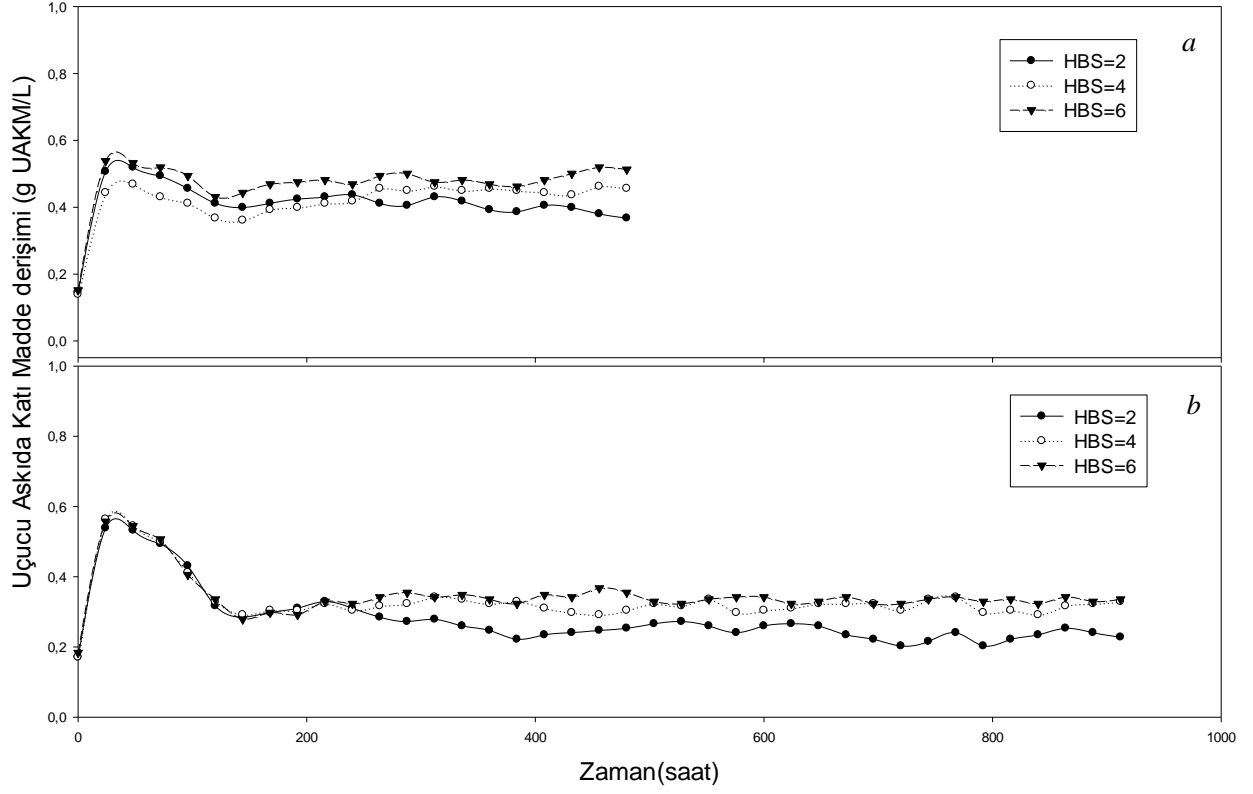
Şekil 6.3'de görüldüğü üzere IV. periyot çıkış suyu ile kurulan reaktörlerde bakteriyel derişim inkübasyon süresince daha yüksek seviyelerde kalmıştır. Bununla beraber her iki çıkış suyu ile kurulmuş reaktörlerde de HBS değerinin 2 olduğu reaktörlerde bakteriyel derişimin düşük kaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum, reaktör içeriğinden günlük atılan sıvı hacminin diğerlerine göre (düşük HBS olması sebebiyle) fazla olması ve bakterilerin 1 günlük süreçte yeterli büyümeyi gösterememesi ile ilişkilendirilebilir.



Şekil 6.2. V.periyot çıkış suyu ile kurulan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde üretilen günlük a) biyogaz b) hidrojen gazı miktarları (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)

Reaktörlere ait günlük hidrojen üretim verimi aralık değerleri Tablo 6.4'te sunulmuştur. İnkübasyon süresince elde edilen günlük hidrojen verimleri ise Şekil 6.4'de gösterilmiştir. İnkübasyon süresince reaktörlerde gözlemlenen hidrojen üretim hızları Tablo 6.5'te verilmiştir.

Tablo 6.4'te görüldüğü üzere, ulaşılan en yüksek verim değerleri V.periyot çıkış suyu ile işletilen ve HBS değerinin 6 gün olduğu reaktörlerde gözlenmiştir. Bu reaktörleri ise yine V.çıkış suyu ile kurulmuş ve HBS değeri 4 gün olan reaktörler izlemiştir. Hidrojen üretim hızına bakıldığında (Tablo 6.5), her iki periyottaki çıkış suyu için de HBS değeri 4 gün olan reaktörler yüksek üretim hızına sahipken, hidrojen verimlerine bakıldığında (Tablo 6.4) HBS değeri 6 gün olan reaktörlerin yüksek hidrojen verimine sahip olduğu gözlenmiştir.

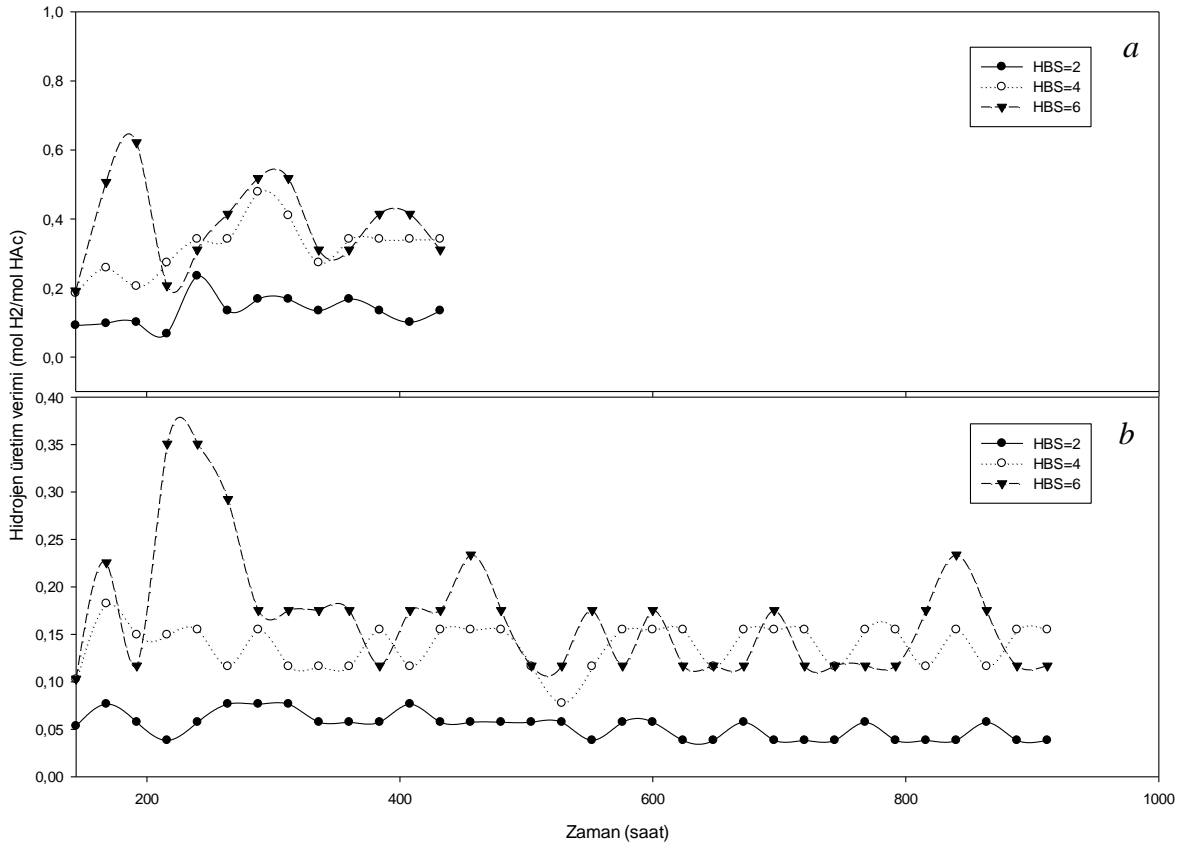


Şekil 6.3. a) IV.periyot, b) V.periyot çıkış suyu ile 2 tekrarlı kurulan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerindeki *R.Capsulatus* ortalama derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)

Tablo 6.4. Ardışık-kesikli işletilen fotofermantasyon reaktörlerinde gözlemlenen günlük hidrojen verimlerinin değişim aralıkları

Reaktör No	HBS (gün)	Hidrojen üretim verimi (mol H ₂ /mol HAc)	Hidrojen üretim verimi (g H ₂ /g çKOİ)	Besin dönüştürme verimi (%)
1-2	2	0,038-0,077	0,0012-0,0024	1-1,9
3-4	4	0,077-0,182	0,0024-0,0048	2,6-4,6
5-6	6	0,103-0,351	0,0032-0,0109	2,6-8,8
7-8	2	0,067-0,235	0,0029-0,0073	1,7-5,9
9-10	4	0,185-0,478	0,0058-0,0150	5,1-12
11-12	6	0,207-0,622	0,0060-0,0163	4,8-15,5

Tablo 6.5'te görüldüğü üzere, IV. ve V.periyot çıkış suyu ile kurulan reaktörlerden HBS değerinin 4 gün olduğu reaktörler, hidrojen üretim hızı açısından daha iyi sonuç elde etmiştir. HBS değerinin 2 ve 6 gün olduğu reaktörlerde ise her iki çıkış suyu ile kurulan reaktörlerde de aynı hidrojen üretim hızları gözlemlenmiştir. Bununla beraber V.periyot çıkış suyu ile kurulan reaktörlerde gözlemlenen hidrojen üretim hızları, IV.periyot çıkış suyu ile kurulan reaktörlerde gözlemlenen hidrojen üretim hızlarına kıyasla daha yüksektir. Aynı zamanda Tablo 6.3'te de görüldüğü gibi V.periyot çıkış suyu ile işletilen reaktörler IV.periyot çıkış suyu ile işletilenlere göre, daha az süre inkübasyonda kalmasına rağmen, yakın değerlerde hidrojen gazı üretmişlerdir.

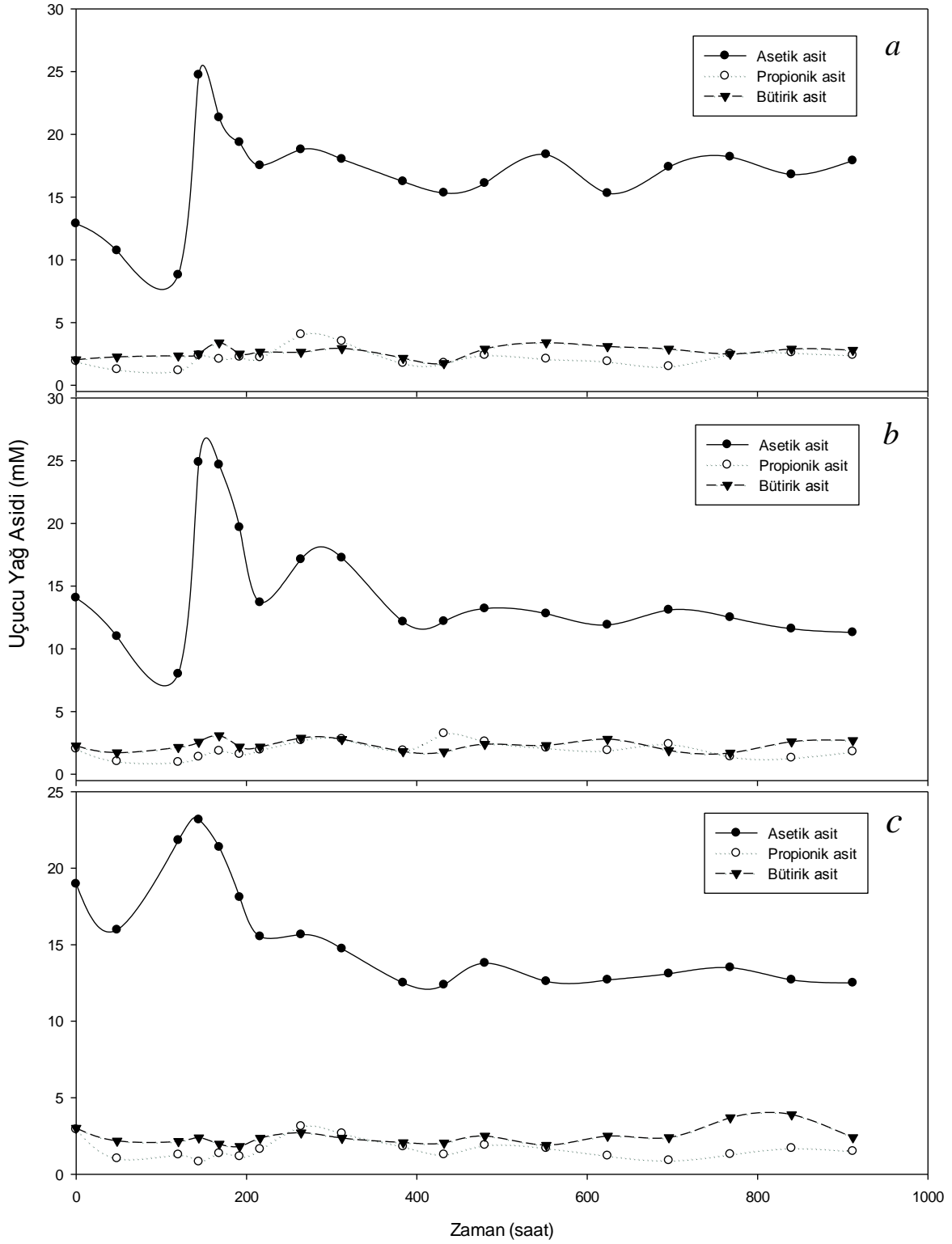


Şekil 6.4. a) IV.periyot, b) V.periyot çıkış suyu ile 2 tekrarlı kurulan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde elde edilen hidrojen üretim verimleri (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)

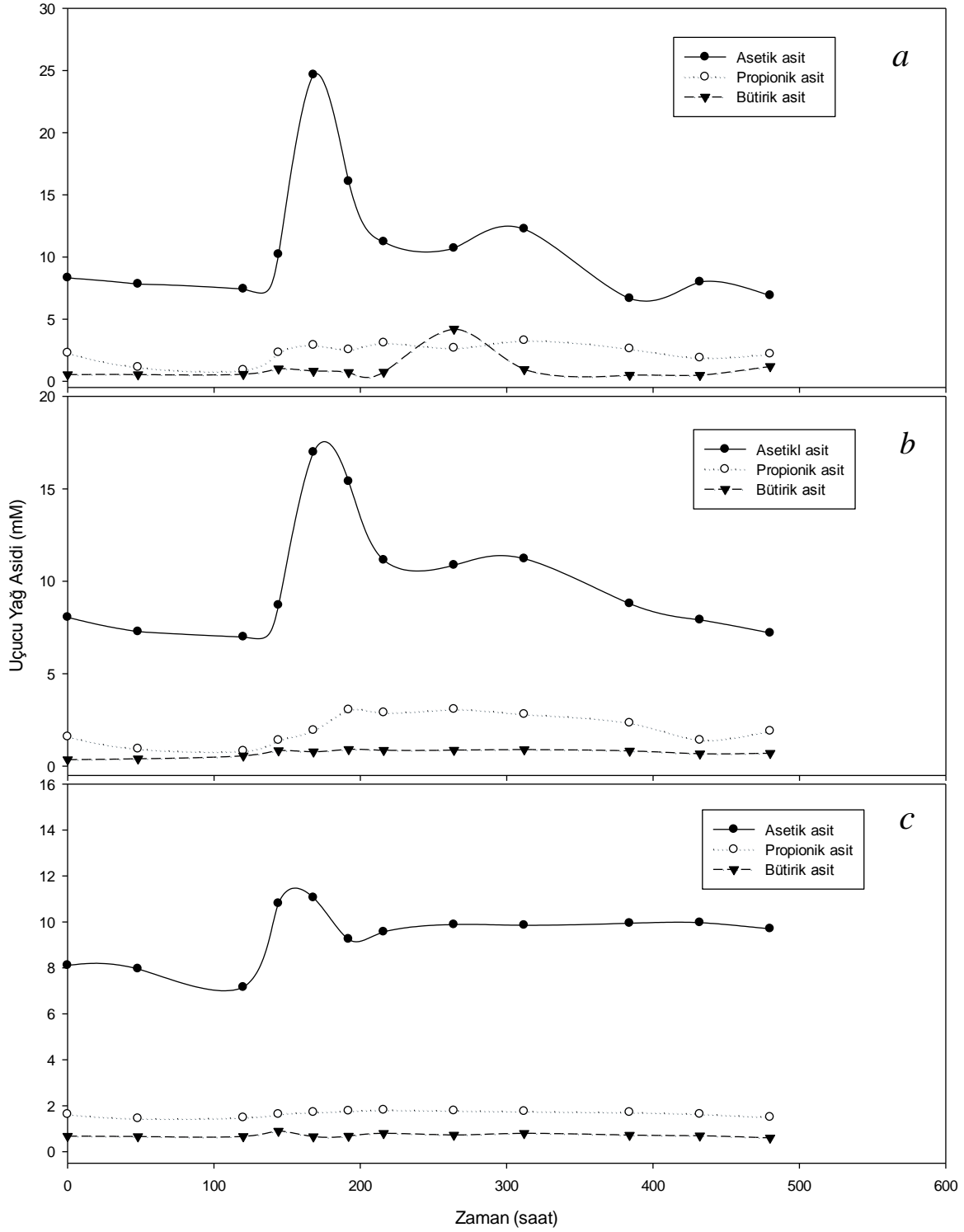
Tablo 6.5. Ardışık-kesikli işletilen fotofermantasyon reaktörlerinde gözlemlenen hidrojen üretim hızları

Reaktör No	HBS (gün)	Üretilen hidrojen gazı (mmol)	Hidrojen üretim hızı (mg H ₂ /L.saatt)	Hidrojen üretim hızı (mmol H ₂ /L.saatt)
1-2	2	0,85	0,041	0,021
3-4	4	1,13	0,049	0,025
5-6	6	0,97	0,041	0,021
7-8	2	0,71	0,066	0,033
9-10	4	0,88	0,082	0,041
11-12	6	0,79	0,066	0,033

İnkübasyon süresince düzenli olarak takip edilen UYA derişimleri Şekil 6.5 ve Şekil 6.6'da verilmiştir. Şekil 6.5 ve Şekil 6.6'da görüldüğü üzere, inkübasyonun ilk 120 saatlik kesikli işletilen kısmında, asetik asit bir miktar tüketildikten sonra düzenli beslemeye başlanması ile birlikte artış göstermiş, 216. saatten sonra ise düzenli bir şekilde inkübasyon süresince hafif dalgalanmalarla birlikte sabit derişimlerde kalmıştır. Oldukça düşük miktarda bulunan propiyonik asit ve bütirik asit derişimleri ise inkübasyon süresince ciddi bir değişim göstermemiştir.



Şekil 6.5. IV. periyot çıkış suyu ile kurulan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerindeki UYA derişimlerinin zamana karşı değişimi, a) HBS=2; b) HBS=4; c) HBS=6 (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)



Şekil 6.6. V.periyot çıkış suyu ile kurulan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerindeki UYA derişimlerinin zamana karşı değişimi, a) HBS=2; b) HBS=4; c) HBS=6 (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)

6.3 Sonuç

Üç-aşamalı sistemin (AKR-Karanlık fermantasyon+ AKR-Metanojenesis + Ardışık-kesikli fotofermantasyon konfigürasyonunun) son aşaması olarak, ardışık-kesikli fotofermantasyon sisteminin optimum HBS değerinin belirlendiği ve üç-aşamalı sistemin toplam enerji veriminin araştırıldığı İş Paketi 5 kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özet halinde sunulmuştur.

- Üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan AKR-Metanojenesis sisteminin 2 farklı çıkış suyu (IV. periyot ve V. periyot) ile kurulan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde düşük hidrojen üretimi gözlemlenmiştir.
- Reaktörler 3 farklı HBS'de (2, 4 ve 6 gün) işletilmiş; en yüksek hidrojen üretim hızının sağlandığı HBS değeri 4 gün olarak belirlenmiştir.
 - Bu değer, V.periyot çıkış suyu ile **0,041 mmol H₂/L.saattir**, IV.periyot çıkış suyu ile 0,025 mmol H₂/L.saattir.
- Hidrojen üretim verimlerine bakıldığında ise, çalışılan HBS değerleri arasında, 6 günlük HBS en yüksek hidrojen üretim verimi sağlamıştır.
 - Bu değer, V.periyot çıkış suyu ile maksimum **0,622 mol H₂/mol HAc (0,0194 g H₂/g ÇKOİ-HAc)**; IV.periyot çıkış suyu ile 0,351 mol H₂/mol HAc'tir.
- V.periyot çıkış suyu ile işletilen reaktörlerde, IV.periyot suyu ile işletilen reaktörlere kıyasla, daha yüksek hidrojen üretim hızı ve verimleri elde edilmiştir.
- Her iki giriş suyu ile işletilen ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde, zayıf bir büyüme ve granüler yapı gözlenmiştir. Bunun nedeninin, İş Paketi 4'te belirtildiği gibi, AKR-Karanlık fermantasyon ve AKR-Metanojenesis sistemlerinde inkübasyon sürecinde üretilen bir madde/kimyasal sebebiyle inhibisyon kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bu durum, optimum koşullarda veya kesikli sistemlerde elde edilen değerlere kıyasla, gözlenen düşük hidrojen üretim ve verim değerlerini de açıklamaktadır.

Üç-aşamalı sistemde ardışık-kesikli fotofermantasyon sisteminin optimizasyonu;

Proje önerisinde belirtildiği üzere, **üç-aşamalı sistemde** maksimum enerji üretiminin (veya sonuçlara göre H₂/CH₄ veriminin) sağlandığı koşul, fotofermantasyon için optimum işletim koşulu olarak belirlenmiştir. İş Paketi 3 ve İş Paketi 4'de, sırasıyla AKR-Karanlık Fermantasyon ve AKR-Metanojenesis sistemleri için (tanımlanan işletim parametreleri bazında) optimum işletim koşulları belirlenmişti. Bu optimum koşullarda çalıştırılan üç-

aşamalı konfigürasyonun son aşamasında, optimum koşullarda işletilen AKR-Metanojenesis sisteminin çıkış suları ile kurulan fotofermantasyon sistemlerinde farklı HBS'nin etkileri araştırılmıştır. AKR-Metanojenesis sisteminin optimum koşulları V.periyot çıkış suyu ile elde edilmiş olsa da, deneme amaçlı, IV.periyot suyu ile de ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörleri işletilmiştir. Beklenildiği ve yukarıda da bahsedildiği üzere, en yüksek fotofermantatif H₂ üretim verimi, V.periyot suyu ile HBS 6 günde işletilen ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde gözlemlenmiştir. Daha yüksek hidrojen üretim verimi, üç-aşamalı sistemde daha yüksek toplam ısı enerjisi sağlayacaktır. Dolayısıyla, ardışık-kesikli işletilen fotofermantasyon sistemi için en uygun (optimum) HBS değeri 6 gün olarak belirlenmiştir.

Üç-aşamalı sistemde elde edilen toplam enerji verimi

Üç-aşamalı sistemden elde edilebilecek maksimum enerji verimi hesaplanırken, optimum işletme koşullarının belirlendiği AKR-karanlık fermantasyon ve AKR-Metanojenesis sistemleri işletim süreçleri esas alınmıştır; bu süreçlere ait maksimum verim değerleri kullanılmıştır. 3.aşama olan fotofermantasyon sistemi için de en yüksek verimin elde edildiği giriş suyu esas alınmıştır. Buna göre, AKR-Karanlık fermantasyon 5.işletim sürecine ait maksimum H₂ üretim verimi (Bölüm 4.3), AKR-Karanlık fermantasyon 5.işletim süreci çıkış suyuyla işletilen AKR-Metanojenesis V.periyot maksimum metan üretim verimi (Bölüm 5.4), ve AKR-Metanojenesis V.periyot çıkış suyu ile kurulan ardışık-kesikli işletilen fotofermantasyon reaktörlerinden elde edilen maksimum H₂ üretim verimi (V.periyot suyu, HBS=6 gün) kullanılmıştır (Tablo 6.6). Bahsedilen her bir reaktör aşamasına ait verim aynı birime dönüştürülmüş, verimler g KOİ başına üretilen g H₂ veya g CH₄ bazında tanımlanmış ve toplam enerji g çKOİ bazında (kJ/g çKOİ) hesaplanmıştır. Üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Ardışık-kesikli fotofermantasyon entegrasyonu ve her bir aşamadan elde edilen enerji miktarları Tablo 6.6'da sunulmuştur.

Tablo 6.6'da görüldüğü üzere, üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Ardışık-kesikli fotofermantasyon entegre sisteminde, birim karbon kaynağından (g KOİ) elde edilen toplam brüt ısı enerjisi 14,55 kJ/g çKOİ'dir. İş Paketi 4'te, her aşama için İş Paketi 5'te kullanılan aynı atıksu kaynakları ile işletilen üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon entegre sisteminden toplam 16,11 kJ/g çKOİ brüt enerji elde edilmiştir (Tablo 6.7). İş Paketi 3'te ise, her aşama için İş Paketi 5'te kullanılan aynı atıksu kaynakları ile işletilen üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon sisteminden 13,47 kJ/g çKOİ enerji elde edilmiştir. Bu üç entegre sistemin farkı, 2.aşama ve 3.aşamadaki metanojenesis ve fotofermantasyon

sistemlerinin reaktör tipidir (Tablo 6.7). Tablo 6.7’de görüldüğü üzere, 1.aşama AKR-KF, 3.aşama Kesikli F iken, metanojenesis sisteminin kesikliden AKR tipine dönüştürülmesi, toplam enerji eldesini 13,47’den 16,11 kJ/g KOİ’ye artırmıştır. Öte yandan, 1.aşama AKR-KF, 2.aşama AKR-M iken, fotofermantasyon sisteminin kesikliden ardışık-kesikli işleme dönüştürülmesi (IP 5), toplam enerjiyi eldesini 16,11 kJ/g’den 14,55 kJ/g KOİ’e düşürmüştür. Bu durum, daha önce de belirtildiği üzere, AKR-işletimde karanlık fermentasyon sırasında olduğu speküle edilen ve KBS süresi arttıkça (takip eden metanojenesis sisteminin de etkisi ile) inhibisyon etkisinin arttığı madde/kimyasal ile ilişkilendirilebilir. Üç-aşamalı sistemin, 3.aşaması olan fotofermantasyon reaktörü, kesikli işlemden ardışık-kesikli işleme dönüştürüldüğünde, üç-aşamaya giren suyun bekleme süresi daha da artmıştır. Dolayısıyla, inhibisyon etkisi daha da artmış olabilir.

Tablo 6.6. Üç-aşamalı (ardışık kesikli) sistemde elde edilen maksimum H₂ veya CH₄ üretim verimleri ve enerji değeri ^a

Üç-aşamalı sistemin aşamaları	Verim	Verim (g H ₂ /g çKOİ _{eklenen} veya g CH ₄ /g çKOİ _{eklenen})	Üretilen ısı enerjisi (kJ/g çKOİ _{eklenen})	
			Brüt	Net
1.Aşama (AKR-Karanlık fermentasyon)	1,66 mol H ₂ /mol heksoz	0,017	2,41	2,03
2.Aşama (AKR-Metanojenesis)	272 mL CH ₄ /g çKOİ _{eklenen}	0,17	9,45	8,50
3.Aşama (Ardışık-kesikli fotofermantasyon)	0,622 mol H ₂ /mol HAc (0,0207 g H ₂ /g HAc)	0,019	2,69	2,27
Toplam brüt ısı enerjisi (kJ/g çKOİ _{eklenen})	-	-	14,55	-
Toplam net ısı enerjisi (kJ/g çKOİ _{eklenen})	-	-	-	12,80

^a Brüt ısı enerjisi hesabında, H₂ için 141.8 kJ/g, CH₄ için 55.58 kJ/g; Net ısı enerjisi değerleri = H₂ için 119.47 kJ/g, CH₄ için 49.98 kJ/g değerleri kullanılmıştır (Lewandowski, 1999).

Bu üç farklı üç-aşamalı entegre sistemden elde edilen brüt ısı enerjisi g H₂/g heksoz ve mol H₂/mol heksoz verim eşleniklerine dönüştürülmüştür (Tablo 6.7). Enerjinin g H₂/g heksoz (veya mol H₂/mol heksoz) birimine çevrimi için brüt enerjinin esas alınmasının sebebi, değerleri stokiometrik olarak tanımlanan teorik değerlerle karşılaştırılabilmektir. Tablo 6.7’de

görüldüğü üzere, İş Paketi 5 kapsamında araştırılan üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Ardışık-kesikli fotofermantasyon entegre sisteminde (14,55 kJ/g çKOİ), 0,103 g H₂/g KOİ, 0,110 g H₂/g heksoz veya 9,9 mol H₂/mol heksoz elde edilmiştir. Dolayısıyla, İş Paketi 5'de önerilen üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Ardışık-kesikli fotofermantasyon sistemi de bugüne kadar literatürde iki-aşamalı hidrojen sistemlerinden elde edilen en yüksek verimden (7,2 mol H₂/mol heksoz) daha yüksek bir verim eldesi sağlamıştır. Diğer bir deyişle, üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Ardışık-kesikli fotofermantasyon entegre sistemi sayesinde, mol H₂/mol heksoz birimi bazında, verim %37 artırılmıştır. Önerilen bu ardışık kesikli üç-aşamalı sistemde hidrojen bazında elde edilen toplam verim değeri (9,9 mol H₂/mol heksoz), ekonomik değer olarak tanımlanan 8 mol H₂/mol heksoz veriminden de yüksektir (Argun ve Kargı, 2011).

Tablo 6.7. İlk karbon kaynağının sukroz olduğu üç-aşamalı 3 farklı entegre sistemin karşılaştırması

Üç-aşamalı entegre sistem aşamaları ^a (araştırıldığı İP No)	Entegre sistemde üretilen ısı enerjisi ^b (kJ/g çKOİ _{eklenen})		Verim eşlenikleri (Birim H ₂ / birim karbon kaynağı) ^c		
	Brüt	Net	g H ₂ /g çKOİ	g H ₂ /g heksoz	mol H ₂ /mol heksoz
AKR-KF + Kesikli M + Kesikli F (IP 3)	13,47	11,58	0,095	0,102	9,18
AKR-KF + AKR-M + Kesikli F (IP 4)	16,11	14,11	0,110	0,120	10,80
AKR-KF + AKR-M + AK-F (IP 5)	14,55	12,80	0,103	0,110	9,9
Bugüne kadar H ₂ bazında elde edilen maksimum değer	10,60	8,93	0,075	0,080	7,20
Ekonomik değer	11,78	9,92	0,083	0,089	8,0
Teorik değer	17,67	14,89	0,124	0,133	12

^a AKR-Karanlık fermantasyon reaktörü= AKR-KF; Kesikli M= Kesikli Metanojenesis (anaerobik) reaktör; Kesikli F= Kesikli Fotofermantasyon reaktörü, AKR-Metanojenesis= AKR-M, Ardışık-kesikli Fotofermantasyon = AK-F

^b Brüt ısı enerjisi hesabında, H₂ için 141.8 kJ/g, CH₄ için 55.58 kJ/g; Net ısı enerjisi değerleri = H₂ için 119.47 kJ/g, CH₄ için 49.98 kJ/g değerleri kullanılmıştır (Lewandowski, 1999).

^c kJ/g çKOİ biriminden g H₂/g heksoz birimine çevrim için, brüt enerji baz alınmıştır. 1 g heksoz= 1,07 g KOİ.

Sonuç olarak, bu projede önerilen (ilk karbon kaynağı olarak sukrozun kullanıldığı) tüm üç-aşamalı entegre sistemler, bugüne kadar literatürde iki-aşamalı hidrojen sistemlerinden elde edilen en yüksek verimden (7,2 mol H₂/mol heksoz) ve ekonomik değer olarak tanımlanan 8 mol H₂/mol heksoz veriminden daha yüksek bir verim eldesi sağlamıştır (Tablo 6.7). Önerilen tüm üç-aşamalı sistemler, ekonomik değer olarak tanımlanan 8 mol H₂/mol heksoz veriminden %14-37 arasında daha yüksek bir verim sağlamıştır.

İlk karbon kaynağının sukroz olduğu üç-aşamalı (karanlık fermantasyon + metanojenesis + fotofermantasyon) sistemin 3 farklı entegrasyonu kendi içinde karşılaştırıldığında, en yüksek toplam enerji, AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon entegre sisteminde elde edilmiştir (Tablo 6.7). Bu entegre sistemde, birim karbondan elde edilen 10,80 mol H₂/mol heksoz eşlenik değeri, iki-aşamalı karanlık fermantasyon-fotofermantasyon sisteminin teorik verim değerine (12 mol H₂/mol heksoz) oldukça yakındır. Ek olarak, daha önce belirtildiği gibi, bu entegre sistemden elde edilen 10,80 mol H₂/mol heksoz eşlenik değeri, bugüne kadar iki-aşamalı (karanlık fermantasyon + fotofermantasyon) sistemlerinde elde edilen maksimum değerden (7,2 mol H₂/mol heksoz) %52; ekonomik değerden %37 daha fazladır. Önerilen bu üç-aşamalı sistem (16,11 kJ/g çKOİ_{eklenen}), iki-aşamalı AKR-KF + AKR-M sisteminden (14,86 kJ/g çKOİ_{eklenen}) de daha yüksek verim ve enerji eldesi sağlamıştır (Tablo 5.12).

7. MELASLA GERÇEKLEŞTİRİLEN ÜÇ-AŞAMALI KESİKLİ REAKTÖR DENEYLERİ

Projenin 6.İş Paketi (İP 6) kapsamında yapılması hedeflenen çalışmalar aşağıda sunulmuştur:

- Melas kullanılarak kesikli karanlık fermantasyon deneyleri kurulması; başlangıç pH, KOİ ve X_0 (mikroorganizma derişimi) üçlüsünün karanlık fermantasyona etkisinin araştırılması
- Karanlık fermantasyon reaktörlerinde araştırılan her pH, KOİ ve X_0 üçlü kombinasyonu için inkübasyon sonrası çıkış numuneleri alınarak, kesikli anaerobik reaktörlerin (metanojenesis) kurulması ve metan üretim veriminin araştırılması
- Anaerobik reaktörlerinin inkübasyonu tamamlandıktan sonra, reaktör çıkış sularının kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde besin olarak kullanılması ve hidrojen üretim veriminin araştırılması

Bu iş paketi sayesinde, her pH, KOİ ve X_0 üçlüsü için, melasın ilk karbon kaynağı olarak kullanıldığı üç-aşamalı reaktör konfigürasyonundan elde edilen toplam H_2 verimi ve miktarı, CH_4 üretimi ve toplam enerji üretiminin araştırılması planlanmıştır. Toplam enerji üretiminin maksimizasyonunun sağlandığı koşullar, melas ile işletilen karanlık fermantasyonun optimum başlangıç koşulları olarak belirlenmiştir.

Proje önerisinde yer almamakla birlikte, melasla iki-aşamalı anaerobik çürütme (metanojenesis) ve fotofermantasyon çalışması da planlanmış ve İş Paketi 6 kapsamında sunulmuştur. Bu ek çalışmanın amacı, melasın karanlık fermantasyona tabi olmadan direk anaerobik olarak çürütülmesini araştırmak, böylece İş Paketi 6 kapsamında planlanan çalışma sonuçları ile karşılaştırarak, karanlık fermantasyon ön aşamasının etkisini belirlemektir.

Bu İş Paketi, Proje önerisinin 7-15. aylarını kapsamaktadır; İş Paketi 3 ile eş zamanlı yapılması (revize öneride süre kısaltması sebebiyle) planlanmıştır. Deneyler kesikli reaktörlerde gerçekleştirildiği için, İş Paketi 3'e kıyasla daha önce tamamlanabilmiştir. Dolayısıyla, metanojenesis sistemini takiben fotofermantasyon sistemi uygulaması ilk olarak

bu iş paketinde (İş Paketi 6'da) araştırılmış; buradan elde edilen bilgiler ışığında İş Paketi 3 ve 4 uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

7.1 Gereç ve Yöntem

7.1.1 Mikrobiyel Kültür

7.1.1.1 Karanlık Fermantasyon Kültürü

Karanlık fermantasyon deneyleri için Ankara Atıksu Arıtma Tesisi anaerobik çürütme tankı çıkışından karışık anaerobik çamur (karışık mikroorganizma kültürü) alınmıştır. Bu çamurun AKM ve UAKM derişimleri sırasıyla 42888 ± 702 ve 20288 ± 218 mg/L'dir. Anaerobik çamur (karışık anaerobik kültür) 1 saat 105°C 'de ısı ön işleme tabi tutulmuştur (Ozkan vd., 2010). Bu sayede, hidrojen üreten asidojenik bakterilerin seçilmesi ve üretilecek hidrojeni tüketebilecek hidrojenetrofik metanojenesis mikroorganizmalarının elimine edilmesi amaçlanmıştır (Ueno vd., 1996). Ön işlem sonunda reaktörlere aşılana karışık kültürün AKM ve UAKM derişimleri ise sırasıyla 40700 ± 967 ve 19400 ± 540 mg/L; pH değeri ise 8,6'dır.

7.1.1.2 Anaerobik Kültür – Metanojenesis Kültürü

Kesikli anaerobik reaktörlerde, Ankara Tatlar Atıksu Arıtma Tesisi anaerobik çürütme tankından alınan karışık kültür kullanılmıştır. Kültüre herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. Üç-aşamalı sistem deneylerinde kullanılan karışık anaerobik kültürün AKM ve UAKM derişimleri sırasıyla 42290 ± 127 ve 18510 ± 240 mg/L; pH değeri ise 8,6'dır. İki-aşamalı-sistem deneylerinde ise AKM ve UAKM derişimleri sırasıyla 22383 ± 1305 ve 7467 ± 506 mg/L; pH değeri ise 8,6'dır.

7.1.1.3. Fotofermantasyon Kültürü

Fotofermantasyon deneylerinde ODTÜ Hidrojen Araştırma Laboratuvarı stoklarında bulunan mor-kükürtsüz bakteri türü olan *Rhodobacter capsulatus* (DSM 1710) kullanılmıştır. Bu bakteri, İş Paketi 2'de de belirtildiği gibi (Bölüm 3.1.1.3), Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu-Leibniz DSMZ Enstitüsü'nden temin edilmiş olup, ODTÜ-Hidrojen Araştırma Laboratuvarı stoklarında -80°C 'de saklanmaktadır. Fotofermantasyon deneylerinde aşı kültürü olarak kullanılan *Rhodobacter capsulatus* (DSM 1710), Bölüm 3.1.1.3'de belirtilen protokole göre steril ortamda çoğaltılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

7.1.2. Orijinal Organik Karbon Kaynağı; Melas

Melas Ankara Etimesgut Şeker Fabrikası'ndan temin edilmiş olup, -20°C'da saklanmıştır. Deneylerde kullanılan melasın özellikleri Tablo 7.1 ve 7.2'de gösterilmiştir. Bu sonuçlar, üç tekrarlı ve belirli aralıklarda gerçekleştirilen melas analizlerinin ortalama değerleridir. Çok konsantre bir melas ile çalışıldığı için (AKM, UAKM, KOİ, gibi) birçok parametrenin derişimi oldukça yüksektir (Tablo 7.1). Melas içeriğindeki glikoz, sukroz ve fruktoz derişimleri de Tablo 7.1'de sunulmuştur.

Tablo 7.1. Melasın karakterizasyonu

Parametre ^a (birim)	Değerler
Glikoz (mg/L)	1560 ± 160
Fruktoz (mg/L)	1840 ± 280
Sukroz (g/L)	846 ± 2,4
AKM (g/L)	139,8 ± 24,7
UAKM (g/L)	121,4 ± 23,9
KOİ (g/L)	1330,6 ± 130,2
çKOİ (g/L)	1153,0 ± 22,7
TKN (g/L)	15,7 ± 0,4
TAN (mg/L)	700 ± 40
SO ₄ (g/L)	2,2
PO ₄ (mg/L)	370
NO ₃ (mg/L)	5750
Alkalinite (g/L)	27,2 ± 1,5
F (mg/L)	4100
Cl (mg/L)	12,00
Co (mg/L)	0,00
Zn (mg/L)	1,01
Ni (mg/)	0,11
Fe (mg/L)	6,88
Cu (mg/L)	0,01
Al (mg/L)	0,00
Mo (mg/L)	0,00
W (mg/L)	0,00
Se (mg/L)	0,00
K (mg/L)	7300

^a çKOİ: Çözünmüş KOİ; TAN: (NH₄⁺-N + NH₃-N)

Tablo 7.2. Melastaki UYA içeriği ve derişimleri

UYA çeşidi	Derişim (mM)
Laktik Asit	56 ±101
Formik Asit	^a
Asetik Asit	294±15
Propionik Asit	387±17
İso-Bütirik Asit	5±2
Bütirik Asit	28±3
İso-Valerik Asit	^a
Toplam UYA (tUYA, HAc bazında)	1313 ± 367

^a İlgili asitler gözlenmemiştir.

7.1.3. Deneysel Yöntem

7.1.3.1. Melasla Üç-Aşamalı Kesikli Sistem Deneyleri

Bu çalışma, karanlık fermantasyon, metanojenesis ve fotofermantasyon kesikli reaktör deneyleri olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır.

7.1.3.1.1 Üç-aşamalı sistemde; melasla kesikli karanlık fermantasyon reaktör deneyleri

Üç-aşamalı sistemin ilk aşamasını oluşturan bu çalışmada, başlangıç pH, orijinal karbon kaynağı melas ile sağlanan KOİ ve mikroorganizma (X_0) derişimlerinin karanlık fermantasyona etkisi Tepki Yüzeyi Metodu (TYM) ile araştırılmıştır. Proje önerisinde, sadece başlangıç pH-KOİ ikilisinin etkisinin araştırılması planlanmıştı. Fakat sukroz ile yapılan çalışmadaki yaklaşımla (İş Paketi 2, Bölüm 3.2.1.3), X_0 'in, dolaylı olarak da S/ X_0 etkisinin, dikkate değer olduğu belirlenmiş ve TYM ile bu üç parametrenin etkileşiminin araştırılmasına karar verilmiştir.

Deneyler 250 mL toplam ve 150 mL etkin hacme sahip kesikli modda işletilen cam reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Bu set orijinal karbon kaynağı olan melas ile kurulan ilk kesikli karanlık fermantasyon setidir. Önceki kesikli setlerdekinden daha büyük hacimde reaktörlerde çalışılmasının sebebi, reaktör çıkış sularının daha sonra anaerobik reaktörlerde besin olarak kullanılması ve bu nedenle daha fazla miktarda numuneye ihtiyaç duyulmasıdır. Reaktörler, UAKM derişimleri gerekli X_0 derişimlerini verecek şekilde, ön ısıl işleme tabi tutulmuş karışık anaerobik kültür ile aşılanmıştır. Başlangıç KOİ derişimini sağlamak için

dörtte bir seyreltilmiş melas ve etkin hacme ulaşmak için deiyonize su eklenmiştir. Reaktörlerin başlangıç pH değerleri 2 M'lik NaOH ve HCl derişik çözeltileri ile ayarlanmıştır.

Reaktörler, plastik kapaklarla kapatılarak tepe gazları 5 dakika boyunca azot gazıyla uçurulduktan sonra, 125 rpm'lik karıştırıcıda ve $35\pm 2^\circ\text{C}$ 'lik sabit sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Reaktörlerin gaz üretimleri her 24 saatte su-yer değiştirme cihazı (water displacement device) ile ölçülmüş (Johnson ve Young, 1983) ve tepe gazı kompozisyonları her gün analiz edilmiştir. Sonlanan reaktörlerden örnekler alınarak UYA, KOİ, AKM ve UAKM analizleri için 20°C 'de saklanmıştır.

TYM ile kurulan reaktör setinde incelenecek parametreler (bağımsız değişkenler) Tablo 7.3'de, kurulan reaktörlerin içerikleri ise Tablo 7.4'de görülebilir. Tablo 7.4'de görüleceği üzere, TYM'ye göre 13 farklı reaktör çeşidi olacak şekilde toplam 30 reaktör kurulmuştur. Araştırılan parametreler ve değerleri; 10, 30 ve 50 g/L KOİ; 2500, 5000 ve 7500 mg/L UAKM (X_o) ve 4, 5.5 ve 7 değerlerinde pH'dır.

Tablo 7.3. Melasla çalışılan karanlık fermantasyon setinin Box-Behnken'e göre tasarımında kullanılan faktörler ve seviyeler

Bağımsız değişken	Sembol	Aralık ve seviyeler		
		-1	0	1
KOİ	0	0	30	50
pH	X1	4	5,5	7
X_o	X2	2500	5000	7500

Bu çalışmada, sukroz kullanılan ve TYM uygulanan kesikli karanlık fermantasyon setinden (İş Paketi 2, Bölüm 3.2.1.3) farklı şekilde bağımsız değişkenlerden biri olarak S/X_o yerine X_o değişkeni kullanılmıştır. Bahsedilen karanlık fermantasyon çalışması sonuçlarında (İş Paketi 2, Bölüm 3.2.1.3) S/X_o parametresinin tepki (hidrojen üretim hızı ve verimi) üzerindeki etkisi çok güçlü çıkmamıştır. Bu nedenle bu parametreyi başka bir yaklaşımla yeniden inceleme gereği duyulmuş; bağımsız değişken olarak X_o 'in daha uygun bir parametre olduğuna karar verilmiştir.

Tablo 7.4. Tepki Yüzeyi Metoduna göre melasla kurulan reaktör çeşitleri ve içerikleri

Başlangıç KOİ (g/L)	UAKM (X_0) (mg/L)	Başlangıç pH	Kod
30	5000	5,5	M1
30	7500	4	M2
30	5000	5,5	M3
50	2500	5,5	M4
30	7500	7	M5
30	7500	4	M6
30	2500	7	M7
10	5000	5,5	M8
50	5000	7	M9
10	000	7	M10
50	2500	5,5	M11
30	2500	7	M12
10	5000	4	M13
50	7500	5,5	M14
10	2500	5,5	M 5
30	2500	4	M16
30	2500	4	M17
10	2500	5,5	M18
30	5000	5,5	M19
30	7500	7	M20
10	7500	5,5	M21
30	5000	5,5	M22
50	7500	5,5	M23
50	5000	4	M24
10	7500	5,5	M25
50	5000	7	M26
10	5000	4	M27
10	5000	7	M28
30	5000	5,5	M29
50	5000	4	M30

7.1.3.1.2 Üç-aşamalı sistemde; kesikli anaerobik (metanojenesis) reaktör deneyleri

Üç-aşamalı sistemin, ikinci aşaması olarak kesikli anaerobik reaktörlerden oluşan bir set kurulmuştur. Karbon kaynağı olarak, melasla işletilen kesikli karanlık fermantasyon reaktörlerinin (Bölüm 7.1.3.1.1) çıkış suyu kullanılmıştır. Diğer bir deyişle, kesikli karanlık fermantasyon çalışmasında üçlü kombinasyonda (farklı başlangıç $KOİ$, X_o ve pH'da) kurulan 13 farklı çeşitteki toplam 30 adet reaktörün çıkış suları, 30 adet kesikli anaerobik reaktörün giriş suyu olarak kullanılmıştır. Her bir $KOİ$, X_o ve pH kombinasyonunun ardışık reaktörü olarak işletilen kesikli anaerobik reaktörlerde metan üretim verimi ve hızı araştırılmıştır.

Deneyler, 250 mL toplam ve 192 mL etkin hacme sahip kesikli modda işletilen cam reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Tüm reaktörlere, ilgili karanlık fermantasyon reaktörünün çıkış suları (40 mL) eklenmiştir. Atıksu öncelikle 5000 rpm'de $+4^{\circ}C$ 'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve ardından filtre kağıtlarından ($0,7 \mu m$) süzülmüştür. Melasla işletilen kesikli karanlık fermantasyon çalışmasında reaktörlerde farklı çıkış $\text{ç}KOİ$ değerleri elde edildiği bilinmektedir. Dolayısıyla, eklenen atıksuyun $\text{ç}KOİ$ derişimine göre, tüm reaktörlerde S/X_o değeri 0,5'de sabit tutulacak şekilde, reaktörlere gerekli miktarda karışık anaerobik kültür aşılantılmıştır. S/X_o değerinin 0,5'de sabit tutulmasının sebebi, bir sonraki çalışmada anlatılacağı üzere (Bölüm 7.1.3.2.1), melasla kurulan (tek-aşamalı) kesikli anaerobik deneylerinde en yüksek metan veriminin 0,5 g $KOİ/g$ UAKM S/X_o 'de elde edilmesidir.

Reaktörlerin kurulum aşamasında herhangi bir ek besiyer çözelti eklenmemiştir. Tüm ekimler yapıldıktan ve reaktör içi pH değerleri 1 N NaOH çözeltisi ile 7-7,5'e ayarlandıktan sonra, reaktörler plastik kapaklarla kapatılmıştır. Reaktörlerin tepe gazları, N_2 gazı ile 4 dakika uçurularak oksijenin ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır. Reaktörler 125 rpm'lik sallayıcıda ve $35 \pm 2^{\circ}C$ 'lik sıcaklıkta 49 gün inkübe edilmiştir. Reaktörlerin gaz üretimi ve gaz içeriği günlük olarak ölçülmüş, inkübasyon sırasında UYA analizleri için reaktörlerden belirli aralıklarla sıvı numune alınmıştır. Böylelikle, üç-aşamalı sistemin üçüncü aşaması için, diğer bir deyişle, metanojenesis reaktörlerinin ardışık reaktörlerini oluşturacak fotofermantasyon deneyleri için, anaerobik reaktörlerin çıkış suyu UYA içeriği ve zamana karşı değişimi araştırılmıştır.

Tablo 7.5'de, bu çalışmada kurulan anaerobik reaktör çeşitleri, içerikleri ve ardışık olarak takip ettikleri karanlık fermantasyon reaktörlerinin özelliği verilmiştir. Daha önce belirtildiği üzere, üç-aşamalı çalışılacak sistemde, üç-aşamalı reaktör konfigürasyonundan elde edilen toplam H_2 verimi ve miktarı, CH_4 üretimi ve toplam enerji üretiminin araştırılması planlanmıştır. Toplam enerji üretiminin maksimizasyonunun sağlandığı koşullar, melas ile işletilen karanlık fermantasyonun optimum başlangıç koşulları olarak belirlenmiştir.

Dolayısıyla, kurulan kesikli anaerobik reaktörler, ardışık olarak çalıştıkları karanlık fermantasyon reaktörlerinin adları ile tanımlanmıştır (Tablo 7.5). Tekrarlı kurulan her reaktör çeşidinin veri sonuçları ortalamaları alınarak sunulmuş; ikiden fazla tekrarlı (replikalı) kurulan reaktör çeşitleri için standart sapmaları da hesaplanmıştır.

Tablo 7.5’de fark edileceği üzere, kesikli karanlık fermantasyon reaktörlerinin başlangıç çKOİ , UAKM ve pH değerleri baz alındığında 13 farklı reaktör olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, 30 adet reaktörden oluşan bu çalışmada bir adet 6 tekrarlı reaktör çeşidi ve 12 adet 2 tekrarlı reaktör çeşidi mevcuttur. Kesikli karanlık fermantasyon başlangıç değerlerine göre, tekrarlı çalışılan M24 ve M30 kodlu reaktörlerden M24 reaktörünün (çıkış) çKOİ değeri teorik beklentinin uzağındadır. Bu nedenle, M24 çıkış suyu ile anaerobik reaktör (AR24) kurulsa da, anaerobik reaktör çalışmaları için yapılan analizlerde sadece AR30 numaralı reaktörün verileri baz alınmış; AR24 numaralı reaktörün analizleri değerlendirmeye katılmamıştır.

Tablo 7.5. Kesikli anaerobik reaktör deneylerinde kullanılan reaktör çeşitleri ve özellikleri

Kesikli karanlık fermantasyon reaktörlerinin özellikleri				Ardışık olarak takip eden anaerobik reaktörlerin özellikleri ^a			
Reaktör Kodu	KOİ (g/L)	X_o (mg/L UAKM)	pH	Giriş çKOİ (mg/L)	UAKM (mg/L)	S/ X_o	Anaerobik reaktör (AR) No
M1	30	5000	5,5	3755	7510	0,5	AR1
M2	30	7500	4	4215	8429	0,5	AR2
M3	30	5000	5,5	3792	7583	0,5	AR3
M4	50	2500	5,5	6621	13242	0,5	AR4
M5	30	7500	7	4061	8123	0,5	AR5
M6	30	7500	4	4681	9363	0,5	AR 6
M7	30	2500	7	3985	7970	0,5	AR7
M8	30	5000	5,5	4007	8014	0,5	AR8
M9	50	5000	7	7339	14678	0,5	AR9
M10	10	5000	7	1309	2618	0,5	AR10
M11	50	2500	5,5	5086	10172	0,5	AR11
M12	30	2500	7	3201	6402	0,5	AR12
M13	10	5000	4	1305	2610	0,5	AR13
M14	50	7500	5,5	7044	14088	0,5	AR14
M15	10	2500	5,5	820	1641	0,5	AR15

Kesikli karanlık fermantasyon reaktörlerinin özellikleri				Ardışık olarak takip eden anaerobik reaktörlerin özellikleri ^a			
Reaktör Kodu	KOİ (g/L)	X _o (mg/L UAKM)	pH	Giriş çKOİ (mg/L)	UAKM (mg/L)	S/X _o	Anaerobik reaktör (AR) No
M16	30	2500	4	4360	8721	0,5	AR16
M17	30	2500	4	4102	8203	0,5	AR17
M18	10	2500	5,5	988	1976	0,5	AR18
M19	30	5000	5,5	4058	8116	0,5	AR19
M20	30	7500	7	3956	7911	0,5	AR20
M21	10	7500	5,5	1349	2698	0,5	AR21
M22	30	5000	5,5	4065	8130	0,5	AR22
M23	50	7500	5,5	6887	13774	0,5	AR23
M24	50	5000	4	1520	3041	0,5	AR24
M25	10	7500	5,5	1192	2384	0,5	AR25
M26	50	5000	7	7233	14467	0,5	AR26
M27	10	5000	4	1225	2450	0,5	AR27
M28	10	5000	7	1090	2180	0,5	AR28
M29	30	5000	5,5	4069	8138	0,5	AR29
M30	50	5000	4	7324	14649	0,5	AR30

^a Giriş çKOİ değerleri, ilgili karanlık fermantasyon reaktörünün çıkış çKOİ derişimidir.

7.1.3.1.3 Üç-aşamalı sistemde; kesikli fotofermantasyon reaktör deneyleri

Bu deney kapsamında, orijinal atıkla kesikli ardışık çalışılan üç-aşamalı sistem deneylerinin son aşaması gerçekleştirilmiştir. Melas kullanılarak kurulan karanlık fermantasyon reaktörlerinin çıkış suları anaerobik reaktörlere beslenmiş; anaerobik reaktörlerin çıkış suları ise kesikli fotofermantasyon reaktörlerinin giriş suyu olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada fotofermantasyon reaktörlerinin giriş suyu (besini) olarak kullanılan kesikli anaerobik reaktör çıkış sularının özellikleri Tablo 7.6'da verilmiştir.

Tablo 7.6. Üç-aşamalı sistemde kesikli anaerobik reaktörlerin çıkış suyu özellikleri ve kesikli fotofermantasyon reaktörlerinin özellikleri

Anaerobik reaktör çeşidi	Anaerobik reaktör çıkış suyu çKOİ derişimi (mg/L)	Karşılık gelen fotofermantasyon reaktörlerinin özellikleri		
		Kodu	X_o (mg/L)	S/ X_o
AR1	4 1	Reaktör 1	42,7	9,4
AR2	582	Reaktör 2	61,9	9,4
AR3	409	Reaktör 3	43,5	9,4
AR4	762	Reaktör 4	81,1	9,4
AR5	509	Reaktör 5	54,2	9,4
AR6	583	Reaktör 6	62,0	9,4
AR7	505	Reaktör 7	53,7	9,4
AR8	463	Reaktör 8	49,3	9,4
AR9	977	Reaktör 9	104,0	9,4
AR10	115	Reaktör 10	12,2	9,4
AR11	536	Reaktör 11	57,0	9,4
AR12	361	Reaktör 12	38,4	9,4
AR13	156	Reaktör 13	16,6	9,4
AR14	1082	Reaktör 14	115,1	9,4
AR15	163	Reaktör 15	17,4	9,4
AR16	625	Reaktör 16	66,5	9,4
AR17	494	Reaktör 17	52,5	9,4
AR18	204	Reaktör 18	21,7	9,4
AR19	605	Reaktör 19	64,3	9,4
AR20	551	Reaktör 20	58,6	9,4
AR21	300	Reaktör 21	31,9	9,4
AR22	446	Reaktör 22	47,5	9,4
AR23	1382	Reaktör 23	147,0	9,4
AR24	133	Reaktör 24	14,2	9,4
AR25	306	Reaktör 25	32,5	9,4
AR26	927	Reaktör 26	98,6	9,4
AR27	348	Reaktör 27	37,0	9,4
AR28	171	Reaktör 28	18,2	9,4
AR29	674	Reaktör 29	71,6	9,4
AR30	1191	Reaktör 30	126,7	9,4

Tablo 7.6'da görüldüğü üzere, anaerobik çıkış suyu (işletimin sonu, 49.gün) çKOİ derişimleri 115-1382 mg/L düzeyindedir. Elde edilen anaerobik reaktör çıkış suları fotofermantasyon reaktörlerinde hidrojen üretimi için yeterli düzeyde KOİ ve UYA derişimlerine sahip olmayabilir. Ancak, İş Paketi 6 kapsamında (ek olarak) yapılan iki-aşamalı kesikli anaerobik-fotofermantasyon çalışmasında olduğu gibi, hidrojen üretiminin araştırılmasının yanında "polyhydroxy butyrate" (PHB) üretiminin araştırılması da amaçlanmıştır. Bu sebeple, olası PHB üretimini ve mikrobiyel büyümeyi araştırmak amacıyla, kesikli fotofermantasyon deney seti kurulmuştur. Bu bağlamda, her bir kesikli anaerobik reaktör için, takip eden bir kesikli fotofermantasyon reaktörü (30 adet) kurulmuştur (Tablo 7.6).

Deneyler toplam hacmi 55 mL olan kesikli reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Her bir reaktöre, ilgili anaerobik reaktörün süzölmüş (0,7 µm) çıkış suları (40 mL) eklenmiştir. Tüm reaktörlere, İş Paketi 2'de gerçekleştirilen fotofermantasyon deneyi sonuçlarına göre (Bölüm 3.2.3.2), en yüksek hidrojen üretim hızını sağlayan S/X₀ ve ışık şiddeti uygulanmıştır. Bu bağlamda, her bir reaktöre, mevcut çKOİ içeriğine göre, S/X₀ oranı 9,4 g KOİ/g UAKM değeri sağlanacak şekilde *R.capsulatus* kültürü aşılanmıştır. Bunun sonucunda reaktörler içerisindeki etkin hacimler 41 mL ile 54 mL arasında değişmektedir. Tüm reaktörlere ışık şiddeti 3955 lux olacak şekilde aydınlatma sağlanmıştır. Aşılanacak bakteri kültür miktarı ve reaktör içi UAKM derişimi belirlenirken, UAKM-OD kalibrasyon eğrisi (Şekil EK-A1) kullanılmıştır (EK-A). Deneyler sabit sıcaklıktaki (30°C) inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

7.1.3.2. Melasla İki-Aşamalı Kesikli Sistem Deneyleri

Bu çalışma, ardışık işletilen kesikli anaerobik ve fotofermantasyon reaktör deneyleri olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Bu çalışma, proje önerisinde sunulmamakla birlikte, melasla çalışılan üç-aşamalı kesikli sistem deneyleri ile karşılaştırma yoluyla, karanlık fermantasyonun etkisinin araştırılması için gerçekleştirilmiştir.

7.1.3.2.1 İki-aşamalı sistemde, melasla kesikli anaerobik reaktör deneyleri

İki-aşamalı sistemin ilk aşamasını oluşturan bu çalışmada, orijinal karbon kaynağı olarak melas kullanılmıştır. Bu çalışmada, İş Paketi 2'de glikozla gerçekleştirilen kesikli anaerobik reaktör deneylerinde önemli bir işletim parametresi olduğu belirlenen S/X₀ (g KOİ/ g UAKM) oranının, melas bazında metan üretimine ve yüzdesine etkisi araştırılmıştır.

Yapılan literatür araştırmaları, melasın genellikle iki-aşamalı karanlık fermantasyon ve anaerobik çürütme sistemlerinde doğrudan karbon kaynağı olarak kullanıldığını veya iki-aşamalı ya da tek aşamalı sistemlerde birleşik-çürütme yöntemiyle başka bir karbon kaynağı

ile beraber kullanıldığını göstermiştir (Misi ve Forster, 2001; El-Mashad ve Zhang., 2010; Shen vd., 2013). Özetle, literatürde kesikli anaerobik reaktör deneylerinde karbon kaynağı olarak melasın kullanıldığı ve enerji verimliliğinin amaçlandığı bir çalışma tespit edilmemiştir. Dolayısıyla, bu çalışmanın farklı S/X_0 değerlerini belirlerken, karbon içeriği bakımından melasa benzerlik gösteren şeker üretim prosesinin şeker kamışı ve şeker pancarı kaynaklı atıkları ile yapılan literatür çalışmaları göz önünde bulundurulmuştur (Alkaya ve Demirer, 2011). Bu bağlamda, 0,5-3 aralığında S/X_0 oranları ile çalışılmıştır (Tablo 7.7). Aslında S/X_0 oranı 2 ve 2'den büyük olan reaktörlerde metan üretiminin verimli olmayacağı tahmin edilse de, 2; 2,5 ve 3 oranları da sonuçlar arasında anlamlı bir eğilimi net olarak görmek amacıyla seçilmiştir. Bu amaçla, farklı S/X_0 oranına sahip ve her biri üçer tekrarlı çalışılan altı farklı test reaktör çeşidi ve sadece melas içeren iki tekrarlı şahit (blank) reaktörleri kurulmuştur (Tablo 7.7). Kontrol amacıyla, iki test reaktör çeşidinin UAKM derişimleri esas alınarak, karbon kaynağı içermeyen (2 tekrarlı) iki farklı kontrol reaktörü de kurulmuştur.

Tablo 7.7. Melasla kurulan kesikli anaerobik reaktörlerin çeşitleri ve özellikleri

Reaktör Çeşidi	S/X_0 (g KOİ / g UAKM)	Teorik başlangıç KOİ derişimi (g/L)	Reaktör içi UAKM derişimi (g/L)
Şahit	-	3,5	-
Kontrol 1	-	-	6,8
Kontrol 2	-	-	1,1
Test (1)	0,5	3,5	6,
Test (2)	1	3,5	3,4
Test (3)	1,5	3,5	2,3
Test (4)	2	3,5	1,7
Test (5)	2,5	3,5	1,4
Test (6)	3	3,5	1,1

Deneyler, 100 mL toplam ve 73 mL etkin hacme sahip kesikli modda işletilen cam reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Tüm test ve şahit reaktörlerindeki KOİ derişimi aynı (yaklaşık 3,5 g/L) tutulmuş; farklı S/X_0 değerlerini sağlamak amacıyla reaktörlere farklı miktarlarda karışık anaerobik çamur aşılmalıdır (Tablo 7.7). KOİ kaynağı olarak otuzda bir seyreltilmiş melas kullanılmıştır (Tablo 7.1). Besiyer çözelti olarak, NaHCO_3 (reaktör içerisindeki derişimi 6000 mg/L) dışında melasa ek olarak bir besiyer çözeltisi eklenmemiştir. Bunun nedeni karbon kaynağı olarak kullanılan melasın zengin besiyer özellikler içermesidir (Tablo 7.1). Tüm ekimler yapıldıktan ve reaktör içi pH değerlerinin 8,2 olduğu belirlendikten sonra, reaktörler plastik kapaklarla kapatılmıştır. Reaktörlerin tepe gazları, N_2 gazı ile 4 dakika

uçurularak oksijenin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Reaktörler 125 rpm'lik sallayıcıda ve 35 ± 2 °C'lik sabit sıcaklıkta 33 gün inkübe edilmiştir. Bu süreç boyunca, reaktörlerin gaz üretimi ve gaz içeriği günlük olarak ölçülmüştür. Deneyin sonlandırılmasını takiben, reaktörler açılarak reaktör içeriğinin AKM, UAKM, UYA, KOİ, ve pH analizleri gerçekleştirilmiştir.

7.1.3.2.2. İki-aşamalı sistemde, fotofermantasyon reaktör deneyleri

Bölüm 7'nin giriş bölümünde de anlatıldığı üzere, metanojenesis sistemini takiben fotofermantasyon sistemi uygulaması ilk olarak bu iş paketinde araştırılmıştır. Bunun sebebi, Projenin, (metanojenesis-fotofermantasyon dizinini içeren) diğer iş paketlerinde yapılması planlanan fotofermantasyon deneylerine ön bilgi sağlamaktır. Dolayısıyla, proje önerisinde yer almamasına rağmen, İş Paketi 6 kapsamında iki-aşamalı kesikli anaerobik-fotofermantasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu deney kapsamında, melas kullanılarak kurulan anaerobik reaktör çıkış suları kesikli fotofermantasyon reaktörlerinin giriş suyu olarak kullanılmıştır. Literatür çalışmalarına bakıldığında ya karanlık fermantasyon-fotofermantasyon ya da karanlık fermantasyon-anaerobik çürütme (metanojenesis) şeklinde iki-aşamalı çalışmalara rastlanılmaktadır. Yapılan bu çalışma anaerobik çürütme - fotofermantasyon ikilisine yönelik ilk araştırma olma niteliği taşımaktadır.

Bu çalışmada besin olarak, özellikleri Tablo 7.8'de verilen, kesikli anaerobik reaktör çıkış suları kullanılmıştır. Fotofermantasyon giriş suyu olarak kullanılan bu atıksuda formik ve bütirik aside rastlanmamış; daha çok propiyonik ve göreceli az miktarda asetik ve laktik asit gözlemlenmiştir. Tablo 7.8'de görüldüğü üzere, anaerobik çıkış suyu UYA derişimleri çok küçük değerlerde olmasına rağmen, belirli bir KOİ yükü bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, azot derişimleri de hidrojen üretimi için oldukça fazladır; Akköse vd. (2009) amonyak derişiminin 2 mM'ın üzerinde (>36 mg/L) olduğu durumlarda hidrojen üretilmediğini gözlemlemiştir. Bu koşullarda, reaktör içi C/N oranı yükselecektir. Abo-Hashesh vd. (2011) yüksek C/N oranının hidrojen üretimini inhibe ettiğini ve "polyhydroxy butyrate" (PHB) oluşumunu desteklediğini belirtmiştir. Dolayısıyla, bu fotofermantasyon çalışmasında, oldukça düşük UYA ve yüksek azot derişimine sahip giriş suyu (anaerobik reaktör çıkış suları) sebebiyle, hidrojenin üretilmemesi olasıdır. Fakat olası PHB üretilebilirliği, bu projenin ek bir çıktısı olacaktır. Bunun yanında, projenin bu aşamasında kurulan anaerobik reaktörlerin düşük UYA derişimli çıkış suyu esas alınarak, iki-aşamalı anaerobik reaktör-fotofermantasyon sisteminin uygun bir konfigürasyon olmadığı düşünülmemelidir. Nitekim anaerobik reaktör başlangıç KOİ değerleri (yaklaşık 3,5 g/L) oldukça düşüktür; dolayısıyla UYA'nın çoğu anaerobikler tarafından kullanılmıştır. Fakat projenin metanojenesis-fotofermantasyon içeren diğer iş paketlerinde, anaerobik reaktör başlangıç KOİ değerleri yüksek tutularak veya anaerobik

inkübasyon süresi kısa tutularak, anaerobik çıkış UYA derişimlerinin fotofermantasyon için anlamlı UYA derişimlerinde (>20 mM) korunması sağlanabilir. Nitekim, bu iş paketinden elde edilen sonuçlar sayesinde, İş Paketi 3 ve İş Paketi 4'de metanojenesis takip eden fotofermantasyon reaktörlerine UYA derişimi aktarabilmek için, anaerobik sistem inkübasyon süreleri kısa tutulmuş ve başarı sağlanmıştır. Bu nedenle, anaerobik reaktör çıkış suları, takip eden fotofermantasyon reaktöründe hidrojen üretimi amaçlı besin olarak kullanılabilir ve tüm sistemin toplam enerji verimi artırılabilir (İş Paketi 3 ve 4).

Tablo 7.8. İki-aşamalı sistemde kesikli anaerobik reaktörlerin çıkış suyu özellikleri

Anaerobik reaktör çeşitleri		çKOİ (mg/L)	Asit çeşidi ve derişimi (mM)			TKN (mg/L N)
S/X ₀	Replika No		Laktik	Asetik	Propiyonik	
0,5	1	665	0,00	0,14	0,38	661
	2	629	0,00	0,15	0,43	594
	3	775	0,00	0,13	0,38	577
1	1	506	0,00	0,08	0,22	179
	2	675	0,00	0,11	0,32	319
	3	654	-	-	-	241
1,5	1	605	0,00	0,10	0,28	185
	2	575	0,00	0,09	0,29	190
	3	635	0,00	0,09	0,28	269
2	1	570	0,00	0,09	0,25	190
	2	510	-	-	-	151
	3	457	0,00	0,08	0,28	230
2,5	1	374	0,01	0,09	0,29	101
	2	507	0,02	0,08	0,31	151
	3	444	0,00	0,09	0,33	146
3	1	460	-	-	-	78
	2	290	0,00	0,07	0,30	123
	3	305	0,00	0,10	0,28	34
Şahit		1522	1,24	6,25	0,30	101

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında, anaerobik reaktör çıkış sularındaki az miktarda UYA ve yüksek TAN derişimine rağmen, iki-aşamalı metanojenesis-fotofermantasyon sistem deneylerine devam edilmesine karar verilmiştir. Böylelikle, kesikli fotofermantasyon deneyleri

anaerobik reaktör çıkış suları ile kurularak, PHB üretimi, mikroorganizma büyümesi ve olası hidrojen üretimi araştırılması amaçlanmıştır. Her bir anaerobik reaktör için, birer kesikli fotofermantasyon reaktörü (19 adet) kurulmuştur. Reaktörlerin özellikleri Tablo 7.9'da verilmiştir.

Tablo 7.9. İki-aşamalı sistemde kesikli fotofermantasyon reaktörlerinin özellikleri

Anaerobik reaktör çeşidi		Giriş suyu	Karşılık gelen fotofermantasyon reaktörlerinin özellikleri	
S/X _o	Replika No	çKOİ ^a (mg/L)	X _o (mg/L)	S/X _o
0,5	1	665	70,7	9,4
	2	629	66,9	9,4
	3	775	82,4	9,4
1	1	506	53,8	9,4
	2	675	71,8	9,4
	3	654	69,6	9,4
1,5	1	605	64,4	9,4
	2	575	61,2	9,4
	3	635	67,6	9,4
2	1	570	60,6	9,4
	2	510	54,3	9,4
	3	457	48,6	9,4
2,5	1	374	39,8	9,4
	2	507	53,9	9,4
	3	444	47,2	9,4
3	1	460	48,9	9,4
	2	290	30,9	9,4
	3	305	32,4	9,4
Şahit ^b		1522	-	-

^a Farklı S/X_o'da işletilen her bir kesikli anaerobik reaktörün çıkış çKOİ derişimidir.

^b Melasla kurulan anaerobik reaktör setindeki şahit reaktör çıkış suyu

Reaktörlerin toplam ve etkin hacmi sırasıyla 55 ve 15 mL olarak belirlenmiştir. Her bir reaktöre, ilgili anaerobik reaktörün süzölmüş (0,7 µm) çıkış suları (yaklaşık 12-13 mL) eklenmiştir. Tüm reaktörlere, İş Paketi 2'de (Bölüm 3.2.3.2) gerçekleştirilen fotofermantasyon deneyi sonuçlarına göre, en yüksek hidrojen üretim hızını sağlayan S/X_o ve ışık şiddeti

uygulanmıştır. Bu bağlamda, her bir reaktörün çKOİ içeriğine göre, S/X_o oranı 9,4 g KOİ/g UAKM değeri sağlanacak şekilde *R.capsulatus* kültürü aşılanmıştır. Tüm reaktörlere ışık şiddeti 3955 lux olacak şekilde aydınlatma sağlanmıştır.

Aşılanacak bakteri kültür miktarı ve reaktör içi UAKM derişimi belirlenirken, UAKM-OD kalibrasyon eğrisi (Şekil EK-A1) kullanılmıştır (EK-A). Deneyler sabit sıcaklıktaki (30°C) inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

7.1.4. Analitik Yöntem

AKM, UAKM, TAN, Toplam Kjehdal Azotu (TKN) ve alkalinite analizleri Standart Metod'a göre gerçekleştirilmiştir (APHA, AWWA, WEF, 2005). çKOİ için, reaktörden alınan örnekler öncelikle Sartorius marka cam lifi filtrelerden (0,7 µm) süzölmüş; süzöntü örneklere EPA onaylı reaktör çürütme metodu uygulanarak çKOİ analizleri yapılmıştır (Hach Water Analysis Handbook, 1989). Melastaki metal (SHIMADZU AA-6300 cihazı ile) hizmet alımı yoluyla (ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda) ölçölmüştür. SO₄, Cl, PO₄, NO₃ analizleri iyon kromatografi cihazı ile ölçölmüştür (Dionex, ICS1000 IC).

Karanlık fermantasyon ve anaerobik reaktörlerde üretilen tepe gazı hacmi su-yer değiştirme cihazı (water displacement device) ile ölçölmüştür (Johnson ve Young, 1983). Reaktörlerin tepe gazı H₂ analizleri, Termal Kondaktivite Detektörü (TCD) ve Supelco Carboxen 1010 kolonu ile donatılı olan GC (Agilent Technologies 6890N) ünitesinde yapılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak Argon kullanılmış ve 26 mL/dakika akış ayarlanmıştır. Enjektör sıcaklığı 160°C, detektör sıcaklığı 170°C'de sabit tutulmuş, fırın sıcaklığı ise 140°C'ye ayarlanmıştır.

Anaerobik reaktörlerin tepe gazı CH₄ analizleri ise TCD ve Capillary Column CP-Sil 8 (CP8752, Varian) ile donatılı GC (Agilent 6890) ünitesinde yapılmıştır. Bu GC'de, enjektör sıcaklığı 100°C ve detektör sıcaklığı 250°C'de sabit tutulmuş, taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmış ve 4,11 psi sabit basınçta ve 45°C fırın sıcaklığında çalışılmıştır. Gaz numunelerindeki kompozisyonu belirlemek için kullanılan kalibrasyon grafikleri Şekil EK-A2'de sunulmuştur.

UYA kompozisyonu ve derişimleri refractive index detektörü kullanan HPLC (SHIMADZU 20A) cihazı ile ölçölmüştür. Buna göre, laktik, formik, asetik, propiyonik, izo-bütirik, bütirik ve izo-valerik asitleri analiz edilmiştir. Analiz edilen numune miktarı 10 µL'dir. Fırın sıcaklığı 66 °C'ye ayarlanmış ve HPLC kalitesinde 0,085 M'de sülfürik asit çözeltisi mobil faz olarak kullanılmıştır. Akış hızı 0,4 mL/dakika'ya ayarlanmıştır. Numunelerdeki UYA derişimleri, standart asit karışım solüsyonu ile hazırlanan kalibrasyon grafiklerine göre hesaplanmıştır

(EK-A, Şekil EK-A3). tUYA derişimini hesaplamak için, her bir asit derişimi moleküler ağırlığına bölünmüş ve asetik asidin moleküler ağırlığıyla çarpılmıştır; tüm asitlerin asetik asit (HAc) cinsinde eşlenik derişimlerinin toplamı tUYA derişimini vermektedir (Yılmaz ve Demirer, 2008).

Bu iş paketinin karanlık fermantasyon çalışmasında, reaktör setlerinin tasarımı ve gaz üretim sonuçlarının modellenmesi için MiniTab (Minitab Pro 16.1.0.0) programı kullanılmıştır. Deney setleri, bu programın Tepki Yüzeyi Metodu (Response Surface Methodology) - Box-Behnken yöntemine göre tasarlanmıştır. Gaz üretim sonuçlarının modellenmesi için öncelikle hidrojen üretim verim ve hız (prodüktivite) değerleri hesaplanmıştır. Kullanılan bağımsız değişkenlerin (başlangıç pH, KOİ ve X_o), maksimize edilmek istenen 'tepki' değerlerine (hidrojen üretim verim ve hızına (prodüktivitesine)) etkisi, MiniTab programının grafiksel ve istatistiksel analizleriyle incelenmiştir. Diğer bir deyişle, MiniTab programı ile, deneysel veriler kullanılarak üç boyutlu grafikler oluşturulmuş ve maksimum üretim hızını ve(ya) verimini ifade edecek olan bağımsız değişkenli denklemler (tepki modelleri) hesaplanmıştır. Oluşturulan modellerin (denklemlerin) anlamlılığını denetlemek amacıyla MiniTab programında ANOVA analizleri yapılmıştır. Bu istatistiksel analiz sonuçlarına göre, tepki modelleri (denklemleri) modifiye edilmiştir. Oluşturulan modellere göre, tepkilerin (hidrojen üretim verimi ve hızının) maksimum değere ulaşmasını sağlayacak bağımsız değişkenler ve değerleri, MiniTab programının Tepki Optimizasyonu uygulaması kullanarak elde edilmiştir.

Fotofermantasyon deneyleri sonunda yapılması planlanan polyhydroxy butyrate (PHB) analizleri, mikrobiyel herhangi bir büyüme olmadığı ve UYA derişimleri düşük olduğu gerekçesiyle, bu çalışmada gerçekleştirilmemiştir.

7.2. Bulgular ve Tartışma

7.2.1. Melasla Üç-Aşamalı Kesikli Sistem Deneyi Sonuçları

Bu çalışma, karanlık fermantasyon, metanojenesis ve fotofermantasyon kesikli reaktör deneyleri olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır.

7.2.1.1 Üç-Aşamalı Sistemde; Melasla Kesikli Karanlık Fermantasyon Reaktör Deneyi Sonuçları

Üç-aşamalı sistemin ilk aşamasını oluşturan bu çalışmada, başlangıç pH, orijinal karbon kaynağı melas ile sağlanan KOİ ve mikroorganizma (X_o) derişimlerinin karanlık fermantasyona etkisi araştırılmıştır. Reaktör çeşitleri ve içerikleri belirlenirken, Tepki Yüzeyi

Metodu (TYM) kullanılmış; bu sayede, en yüksek hidrojen üretiminin sağlanacağı bir üçlü parametre kombinasyonu bulunması amaçlanmıştır. Daha önce de belirtildiği gibi, bu sette etkisinin araştırıldığı parametreler KOİ (10, 30, 50 g/L), X_0 (2500, 5000, 7500 mg/L UAKM) ve pH (4, 5,5, 7)'dir.

Bu çalışmada, reaktörlerin işletimi sırasında diğer kesikli karanlık fermantasyon deneylerinde gözlenmeyen bir durum gözlenmiştir. İnkübasyonun 60.saatinden itibaren düşük KOİ derişimine sahip reaktörlerde vakum gerçekleşmiştir. Benzeri şekilde inkübasyonun ilerleyen saatlerinde aynı vakum oluşumu diğer bazı reaktörlerde de gözlenmiştir. Deney sonlandığında (tüm reaktörlerde gaz üretiminin sonlanması), 30 reaktörden 17'sinde vakum oluştuğu saptanmıştır (Tablo 7.10). Reaktörlerde vakumun oluşmaya başlamasına denk gelen işletim saatleri ve tüm reaktörlerin sonlandırılma anındaki çıkış pH değerleri Tablo 7.10'da ayrıntılı olarak verilmiştir. Tablo EK-J1'de reaktörlerin hangi sırayla vakum yaptıkları takip edilebilir (EK-J).

Tablo 7.10. Vakum yapan reaktörlerin reaksiyon süreleri ve tüm reaktörlerin işletim sonu pH'ları

Başlangıç			Kod	Vakum oluşumunun ilk gözleendiği zaman (inkübasyon saati) ^a	Çıkış pH
KOİ (g/L)	X_0 (mg/L UAKM)	pH			
10	5000	4	M13	109	4,85
10	5000	4	M27	205	4,74
30	2500	4	M16	-	3,38
30	2500	4	M 7	-	3,62
30	7500	4	M2	-	3,86
30	7500	4	M6	-	3,89
50	5000	4	M24	282	,49
50	5000	4	M30	-	3,83
10	2500	5,5	M15	157	4,77
10	2500	5,5	M18	133	4,9
10	7500	5,5	M21	60	5,26
10	7500	5,5	M25	60	5,26
30	5000	5,5	M1	-	4,1
30	5000	5,5	M3	441	4,74
30	5000	5,5	M8	323	3,95

Başlangıç			Kod	Vakum oluşumunun ilk gözlemlendiği zaman (inkübasyon saati) ^a	Çıkış pH
KOİ (g/L)	Xo (mg/L UAKM)	pH			
30	5000	5,5	M19	-	4,06
30	5000	5,5	M22	-	4,79
30	5000	5,5	M29	-	4,75
50	2500	5,5	M4	441	3,84
50	2500	5,5	M11	-	3,79
50	7500	5,5	M14	-	4,25
50	7500	5,5	M23	-	3,95
10	5000	7	M10	109	5,6
10	5000	7	M28	85	5,59
30	2500	7	M7	-	3,82
30	2500	7	M12	-	3,95
30	7500	7	M5	282	5,24
30	7500	7	M20	323	5,39
50	5000	7	M9	369	3,85
50	5000	7	M26	282	3,93

^a Deney süresince vakum gözlenmeyen reaktörler – ile gösterilmiştir.

Tablo 7.10'da görüldüğü üzere, vakum yapan reaktörlerin çıkış pH değerleri genellikle diğer reaktörlerin çıkış pH'larından daha yüksektir. Bu durum, önceki çalışmalarda alışlagelen reaksiyonlardan farklı reaksiyonların gerçekleştiğini göstermektedir. Reaktörlerde vakum oluşumu, göreceli daha yüksek çıkış pH değerleri ve farklı olası reaksiyonlar, homoasetojenik bakterilerin varlığı ve aktive olması ile açıklanabilir (Chen vd., 2009). Daha önce belirtildiği üzere, homoasetojenik bakteriler, bir stres durumunda ya da ortamdaki sübstratın tüketildiği koşullarda, metabolizmalarını ototrofik olarak çözünmüş CO₂ ve tepe gazındaki H₂'yi kullanarak asetat üretmeye dönüştüren asetojenik bakterilerdir (Saady, 2013). Homoasetojenesis temelde 2 reaksiyonla gerçekleşmektedir; buna göre homoasetojenler sübstrattan direk asetat üretimine geçmekte (Denklem 7.1) ya da çözünmüş karbondioksit ve gaz fazdaki hidrojeni kullanarak asetat üretmektedir (Denklem 7.2) (Chen vd., 2009). Literatür araştırması sonucunda, karanlık fermantasyon çalışmaları kapsamında özel olarak homoasetojenlerin aktivitesini anlamaya yönelik yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Nitekim bu konu araştırılması gereken bir konu olmaya devam etmektedir (Saady, 2013). Fakat son yıllarda yapılan araştırmalarda, üretilen H₂ miktarında

azalma (H_2 yüzdesinin azalması) ya da üretilen asetat miktarının H_2 üretiminden bağımsız şekilde çok yükselmesi gibi, homoasetojenik bakterilerin aktive olması ile açıklanabilecek durumlar gözlenmiştir (Chen vd., 2009; Wu vd., 2009; Won ve Lau, 2011). Sübstrat derişimindeki radikal düşüş sonrası ya da yüksek HBS'de işletilen sürekli reaktörlerde, homoasetojenik bakterilerin aktivitesinin (Denklem 7.2), dolayısıyla hidrojen tüketiminin, arttığı belirtilmiştir (Wu vd., 2009; Dinamarca ve Bakke, 2009). Özellikle sürekli reaktör çalışmalarında, yüksek HBS'de işletilen sistemlerde bu durum sıklıkla gözlenmiştir; optimum HBS olarak 8-20 saat önerilmiştir. Buna ek olarak, Wu vd. (2009) hidrojen üretici asidojenlerin (besin derişiminde azalma vb. bir nedenle) büyüme hızları düştüğünde, hidrojen üretmeyen diğer metabolik yolları tercih etmeye başlayabildiklerini belirtmektedir.

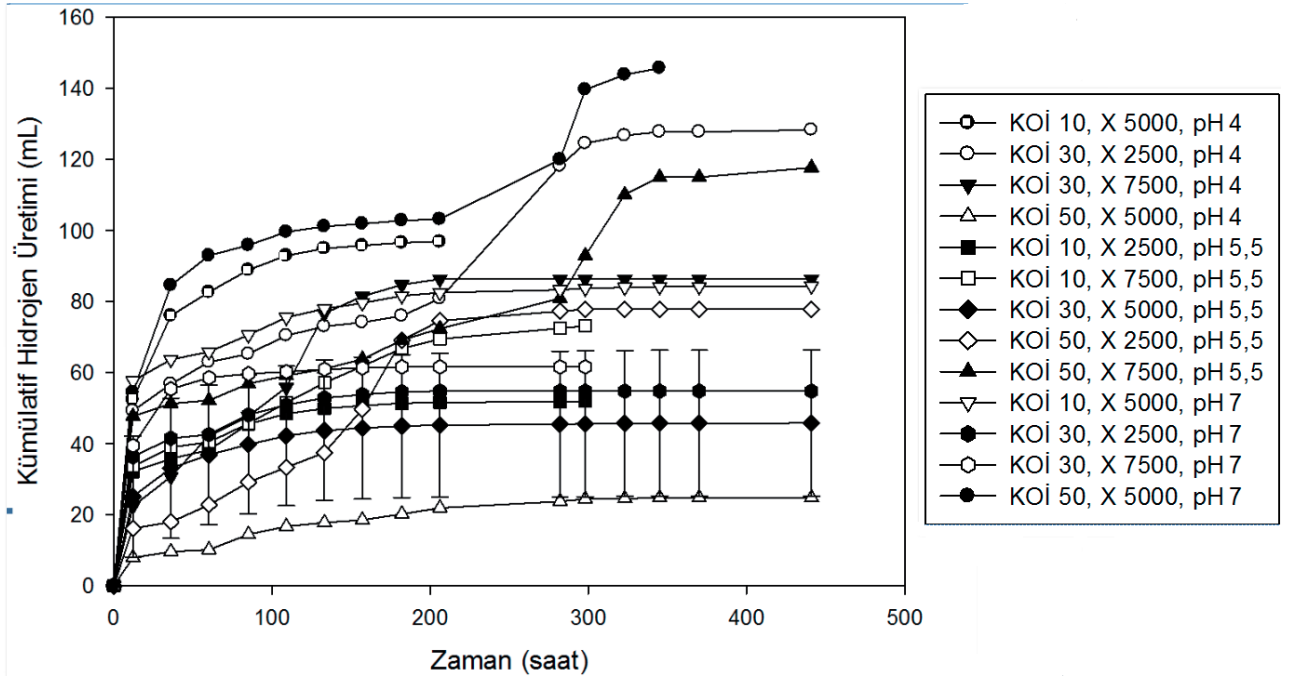


Bu iş paketinde gerçekleştirilen karanlık fermantasyon çalışmasında da, vakum yapan reaktörlerin tepe gazındaki H_2 yüzdesinin, vakumun gözlendiği inkübasyon anına yaklaştıkça azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 7.10). Örneğin, vakumun en geç gözlendiği M3 ($KOİ=30$, $X_o=5000$, $pH=5,5$) ve M4 ($KOİ=50$, $X_o=2500$, $pH=5,5$) kodlu reaktörlerde, kurulumdan vakumun gözlendiği zamana kadar geçen 441 saatlik sürede, tepe gazındaki H_2 yüzdesi M3 kodlu reaktörde %40'tan %20'lere, M4'te ise %37'den %8'e kadar düşmüştür. Reaktörlere herhangi bir gaz giriş-çıkışı olmadığı dikkate alındığında, H_2 gaz yüzdesindeki düşüş, üretilen gazın olası başka reaksiyonlarda kullanıyor olduğunu işaret etmektedir. Oh vd. (2004), ısı ön-işlemin homoasetojenik bakterileri elimine etmekte başarısız kaldığı sonucuna varmıştır. Saady (2013) ise şu ana kadar uygulanmış hiçbir ön-işlemin bu bakterileri engellemekte başarılı olmadığını vurgulamıştır. Bu durumu, homoasetojenlerin pek çok özelliğinin (spor oluşturabilme özelliği gibi) H_2 üretici bakterilerle özdeş olması ve H_2 üreticileri seçmek için uygulanan herhangi bir ön-işlemin homoasetojenleri de etkilememesi ile açıklamıştır (Saady, 2013). Ayrıca, her iki türün optimum pH'sının aynı aralığa düşmesi (Oh vd., 2004) sebebiyle, hidrojen üretimi sırasında (az miktarda da olsa) bir yandan sürekli olarak tüketimin de gerçekleştiği belirtilmektedir (Saady, 2013).

Bu çalışmada elde edilen göreceli yüksek çıkış pH değerleri ve (speküle edildiği üzere) homoasetojenlerin aktive olması (hidrojen ve karbondioksit tüketmeleri ve vakum oluşumu) daha önce kurulan setlerde gözlenmemiştir. İş Paketi 2 kapsamında, sukrozla ve bu çalışmadaki ile aynı $KOİ$ ve pH değerlerinde kurulan karanlık fermantasyon reaktörlerinde (Bölüm 3.2.1.3), benzeri bir vakum gözlenmemiştir. Aynı işletim koşulları ve aynı aşı çamuru

ile çalışılırken benzeri bir homoasetojenesis aktivitesinin sadece melas çalışmasında gözlenmesi, melas içeriğinde yerel (intrinsic) homoasetojenlerin varlığı ve uygun koşullar olduğunda aktive olmaları ile açıklanabilir.

Yukarıda ayrıntılı olarak belirtildiği şekilde vakum oluşumuna rağmen, tüm reaktörlerin gaz üretimleri (vakum oluşan reaktörlerde, vakumun gözleendiği ilk ana kadar) kümülatif olarak hesaplanmıştır. İki tekrarlı çalışılan her reaktördeki ortalama kümülatif hidrojen üretim miktarları Şekil 7.1'de verilmiştir. Bu çalışmanın verim, hidrojen yüzdesi vb. tüm sonuçları, her reaktör çeşidi için tekrarlı çalışılan reaktörlerin ortalama değerleri hesaplanarak, Tablo 7.11'de de verilmiştir.



Şekil 7.1. Kümülatif hidrojen üretiminin zamana karşı değişimi (35°C, melas) (TYM'e göre 6 tekrarlı kurulan KOİ=30, X₀=5000, pH=5,5 reaktörü için standart sapma değerleri verilmiştir).

Şekil 7.1'de görüldüğü gibi, toplam hidrojen gazı üretimi 24,8-147,8 mL arasında değişmektedir. En düşük hidrojen üretimi 24,8 mL ile başlangıç KOİ, pH ve X₀ değerleri sırasıyla 50 g/L, pH=4, ve 5000 mg/L UAKM olan reaktör çeşidinde gözlemlenmiştir. En yüksek hidrojen üretimi ise başlangıç KOİ, pH ve X₀ değerleri sırasıyla 50 g/L, pH=7, 5000 mg/L UAKM olan reaktör çeşidinde gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, aynı başlangıç KOİ (50 g/L) ve UAKM (5000 mg/L) derişimlerinde, yüksek pH değerinde (pH=7) daha yüksek gaz üretimi gözlemlenmiştir. Fakat bu durum, çalışılan her ortak KOİ-X₀ ikilisi için geçerli değildir (Tablo 7.10). Ayrıca aynı başlangıç KOİ ve pH değerine sahip reaktörlerdeki hidrojen üretimi,

değişen başlangıç X_0 değerinden etkilenmemekte; X_0 'a bağlı belirgin bir artış veya azalış eğilimi gözlenmemektedir.

Tablo 7.11. Melasla kurulan 13 farklı reaktör çeşidinin hidrojen üretim verimi ve hız (prodüktivite) hesapları ^a

Başlangıç			Çıkış pH	Toplam üretilen gaz (mL, 35°C)	H ₂ yüzdesi (%)		Toplam H ₂ üretimi (mL, 35°C)	Verim (mLH ₂ /gKOİ) ^b	Verim (mmol H ₂ /g KOİ)	Üretim hızı (mLH ₂ /L _{reaktör} ·saat) ^d
KOİ (g/L)	X ₀ (mg/L UAKM)	pH			Başlangıç dönemi ^b	Bitiş dönemi ^c				
10	5000	4,0	4,8	402	36,3	18,7	96,8	64,6	2,88	4,67
10	5000	7,0	5,6	333	32,9	25,2	84,4	56,2	2,51	6,10
10	7500	5,5	5,3	284	30,8	15,3	74,4	49,6	2,22	8,26
10	2500	5,5	4,8	89	36,4	30	52,1	34,7	1,55	2,34
30	2500	4,0	3,5	497	11,3	11,6	12,3	28,5	1,27	3,38
50	5000	7,0	3,9	634	51	16,6	147,8	19,7	0,88	3,40
30	7500	4,0	3,9	325	23,7	10,6	86,3	19,2	0,86	2,21
50	7500	5,5	4,1	370	41,7	8,1	117,7	15,7	0,71	2,33
30	7500	7,0	5,3	197	37,1	20,7	61,6	13,7	0,61	1,41
30	2500	7,0	3,9	155	42,7	24,2	54,8	12,2	0,54	1,10
50	2500	5,5	3,8	275	33,6	9,8	77,8	10,4	0,47	1,18
30	5000	5,5	4,8±0,4	189±101	31,4	21,9	46±21	10±4,6	0,46±0,2	1,17 ± 0,6
50	5000	4,0	4,2	83	34,2	16,8	24,8	3,3	0,15	0,45

^a Değerler 2 tekrarlı çalışılan reaktör çeşitlerinin ortalamalarıdır. Yalnızca KOİ=30, pH= 5,5, X₀=5000 koşuluna sahip reaktör çeşidi TYM tasarımına göre 6 tekrarlı çalışılmış ve standart sapmaları verilmiştir.

^b Üretilen toplam gaz miktarının, reaktör tepe gazı hacmini (100 mL) geçtiği, tepe gazının tamamıyla yıkandıktan sonraki reaksiyon zamanındaki değerlerdir. İnkübasyon süresinin başlangıç dönemlerine denk gelmektedir.

^c Her bir reaktör için üretilen günlük gaz miktarının 20 mL'nin altına düştüğü reaksiyon zamanındaki değerlerdir. İnkübasyon süresinin sonlarına denk gelmektedir.

^d Değerler, üretilen gaz miktarları standart koşullara (0°C sıcaklık ve 1 atm) çevrilerek hesaplanmıştır.

Tablo 7.11'de görüldüğü üzere, en yüksek verim 2,88 mmol/g KOİ ile KOİ=10 g/L, X₀=5000 mg/L ve pH=4,0 kombinasyonunda çalışılan reaktörlerde elde edilmiştir. X₀ = 5000 mg/L değeri de, düşük KOİ koşullarında, verimi pozitif şekilde etkilemiştir. Fakat belirli bir pH

değerinin verim ya da üretim hızına pozitif bir etkisinin olduğu söylenememektedir (Tablo 7.11). Tabloda ortalama H₂ yüzdeleri iki ayrı reaksiyon zamanı (inkübasyonun başlangıç ve bitiş dönemlerine denk gelen süreler) için verilmiştir; H₂ yüzdelerinde görülen azalma ileriki bölümlerde açıklanmaktadır.

Deney sonuçları, ham veriler üzerinden değerlendirilse de, bu çalışma TYM'e göre tasarlandığı için, en yüksek hidrojen üretim koşullarını TYM grafik-istatistiksel ve optimizasyon analiz sonuçlarını dikkate alarak belirlemek uygun olacaktır. Bu nedenle 3 bağımsız değişkenin hidrojen üretim verim ve hızı (prodüktivite) üzerindeki rölatif etkileri ANOVA analizleri ve TYM yaklaşımı ile incelenmiş ve aşağıda sunulmuştur.

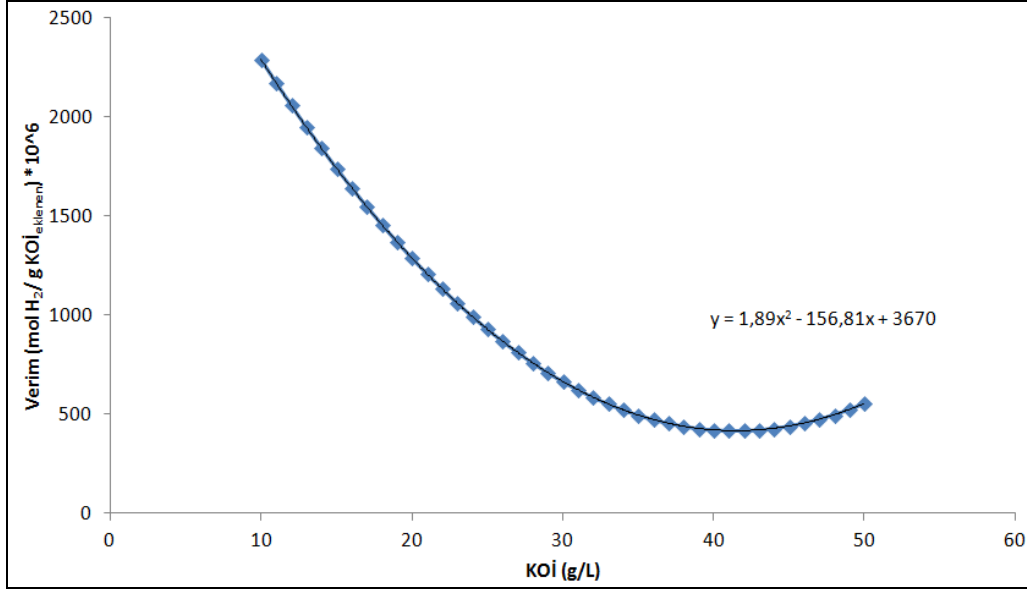
Tepki Yüzeyi Metodu- Hidrojen üretim verimi

Tepki Yüzeyi Metodu (TYM), öncelikle, hidrojen veriminin maksimum değere ulaştığı bağımsız değişken değerlerini belirlemek amacıyla uygulanmıştır. Metodun tepki değerlerini incelemesi sağlanmış ve ilk ANOVA tablosu oluşturulmuştur. İlk ANOVA tablosunda bazı parametrelerin (X₀ ve pH) ve ilişkilerinin (interactions) (KOİ*pH, KOİ*X₀ gibi) anlamlılığı çok düşük çıkmıştır. Bunu takiben, bağımsız değişkenler ya da ilişki terimleri iteratif şekilde çıkartılarak ardışık ANOVA analizleri yapılmış ve üretim verimini en iyi tanımlayan model (denklem) belirlenmiştir (Denklem 7.3). Elde edilen modelin uyumluluğu yüksek derecede anlamlıdır (tüm p değerleri, p<0,05). Modelin R-Sq (R²) değeri %64,11 bulunmuştur. Diğer bir deyişle, bağımsız değişkenler üretim verimini %64,11 oranında açıklamaktadır. Detaylı ANOVA sonuçları Tablo EK-J2'de verilmiştir (EK-J).

Denklem 7.3 (hidrojen üretim verimi):

$$\text{Verim (mol H}_2\text{/g KOİ)} * 10^6 = 3369,96 - 156,81 * \text{KOİ} + 1,89 * \text{KOİ} * \text{KOİ}$$

Denklem 7.3'de görüldüğü üzere, hidrojen üretim verimini anlamlı (significant) şekilde etkileyen tek değişken KOİ'dir. Değişken etkileşimleri de (örneğin, pH*KOİ), pH ve KOİ değişkenleri gibi anlamlı olmadıkları için, denklemde yer almamıştır. Verim değerleri (mol H₂ bazında girildiği için) küçük çıkmış, bu nedenle veriler 10⁶ ile çarpıldıktan sonra MiniTab'de kullanılmıştır. Gerçek verimi elde etmek için, denklem KOİ değerleri ile çözüldükten sonra, çıkan sonuç 10⁶'ya bölünmektedir. Önerilen denklemin (modelin) grafiği Şekil 7.2'de sunulmuştur.



Şekil 7.2. H₂ üretim veriminin KOİ derişimine bağılı değişimi (35°C, melas)

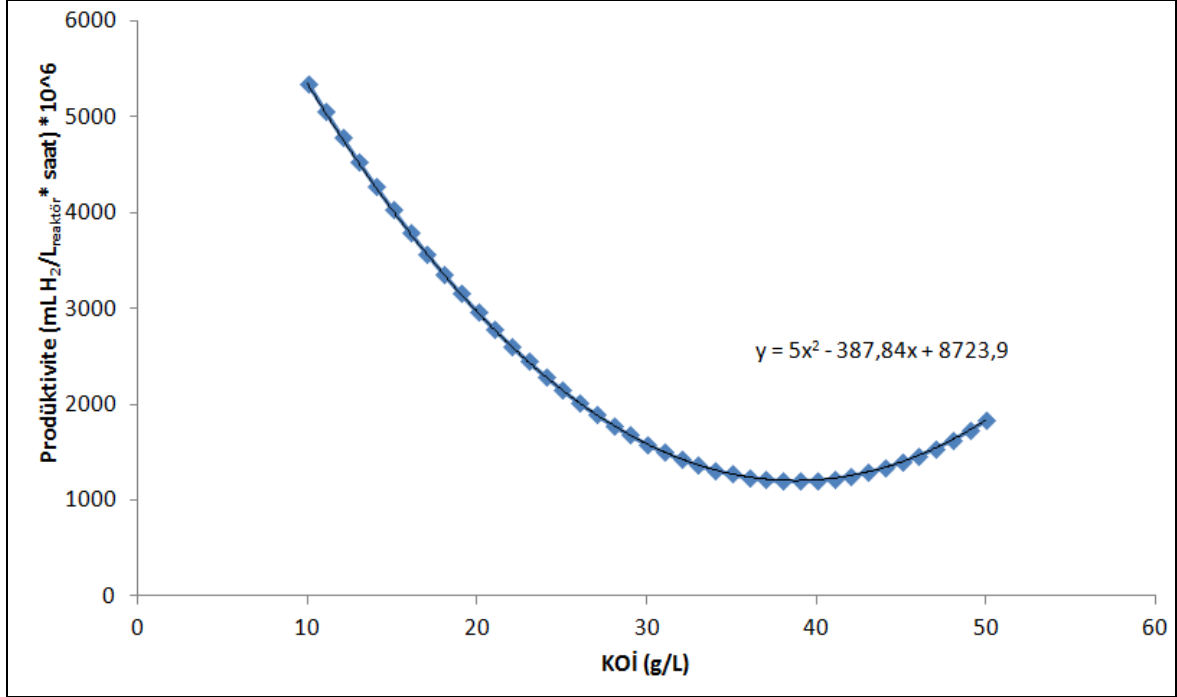
TYM model optimizasyonu analizine göre, çalışılan aralıkta, maksimum hidrojen üretim veriminin elde edildiği KOİ değeri 10 g/L olarak belirlenmiştir. Bu değişken değeri kullanıldığında elde edilecek tahmini tepki değeri (hidrojen üretim verimi) 2,2906 mmol H₂/g KOİ'dir. Mathcad değişkenler arasında bir anlamlılık karşılaştırması yapmadığı için, istatistiksel analizlerin iteratif olarak gerçekleştirildiği MiniTab'ın sonuçları esas alınmış; MathCad ile ikinci bir denklem kontrolü (hem üretim verimi hem de hızı için) yapılmamıştır.

Tepki Yüzeyi Metodu- Hidrojen üretim hızı (prodüktivite)

TYM, verimin yanı sıra, hidrojen üretim hızının maksimum değere ulaştığı bağımsız değişken değerlerini belirlemek amacıyla da uygulanmıştır. İlk ANOVA tablosunda bazı parametrelerin (X₀ ve pH) ve etkileşimlerinin (KOİ*pH, KOİ*X₀ gibi) anlamlılığı çok düşük çıkmıştır. Bunu takiben, model bazı değişken ve etkileşim parametrelerin çıkarılması ile geliştirilmiş ve ANOVA ile en son elde edilen modelin uygunluğu analiz edilmiştir. Hidrojen üretim hızını en iyi tanımlayan model Denklem 7.4'de sunulmuştur. Denklem 7.4'de görüldüğü üzere, hidrojen üretim hızını anlamlı (significant) şekilde etkileyen tek değişken (verim modelinde olduğu gibi) KOİ'dir. Tek değişkenli modelin uyumluluğu yüksek derece anlamlıdır (tüm p değerleri, p<0,05). Modelin R-Sq değeri (R² =%38,73) oldukça düşük çıkmıştır. Detaylı ANOVA sonuçları Tablo EK-J3'de verilmiştir (EK-J). Modelde tek değişkenle tanımlanan üretim hızının en yüksek olduğu nokta KOİ=10 g/L'dir. Bu denklemin grafiği Şekil 7.3'de sunulmuştur. İzdüşüm ve yüzey grafikleri, denklem tek değişkenle ifade edildiği için (verim modelinde olduğu gibi) çizilememektedir.

Denklem 7.4 (hidrojen üretim hızı-produktivite):

$$\text{Prodüktivite (mL H}_2\text{/L}_{\text{reaktör}}\cdot\text{saat)} \cdot 10^3 = 8723,87 - 387,84 \cdot \text{KOİ} + 5,00 \cdot \text{KOİ} \cdot \text{KOİ}$$



Şekil 7.3. Üretim hızının (prodüktivitenin) KOİ'ye bağlı değişimi (35°C, melas)

Bu çalışmada, homoasetojenlerin melas içerisindeki olası varlığı ve uygun koşullar (indirgenen organik karbon kaynağının tükenmesi, UYA'da inhibisyon seviyelerine ulaşılması ve stres koşulları) oluştuğunda, aktive olmaları speküle edilmişti. Üretim hızı değerlerini açıklamak için kurulan modelin açıklayıcılığının $R^2 = \%38,73$ seviyesinde kalması, homoasetojenlerin varlığı ve aktivite olmaları ile ilişkilendirilmiştir. Bilindiği üzere, modelde kullanılan tepkiler (hidrojen üretim verimi ve hızı), olası bir homoasetojenesis varlığı ve aktivitesinde, etkilenecektir. Örneğin, belirli bir üçlü parametre kombinasyonunda, homoasetojenler aktive olduklarında, üretilen hidrojen miktarı azalacak dolayısıyla hidrojen üretim verim ve hızı değişecektir. Homoasetojenesis sonucu UYA miktarında H₂ üretimiyle paralel olmayan bir artış gerçekleşebilir (Saady, 2013). Fazla UYA derişimi pH'ı ve hidrojen üretim verim ve hızını etkileyebilir. Bu değişim / etkileşimler, mevcut bağımsız değişkenle $\%38,73$ oranında açıklanabilmektedir. Oysa, İş Paketi 2 kapsamında, sukrozla (bu çalışmadaki KOİ ve pH değerlerinin aynı olduğu) ve TYM kullanılarak kurulan karanlık fermantasyon çalışmasında (Bölüm 3.2.1.3) anlamlı bir model sonucu çıkmış; hidrojen üretim hızını ve verimini etkileyen parametre ve kombinasyonları hakkında yorum yapılabilmiş ve

optimum koşullar belirlenebilmişti. Bu çalışmada ise, üretim hızı düşük bir yüzde ve sadece KOİ değişkeni ile açıklanabilmektedir. Modelin düşük oranda açıklanabilirliğine yönelik bir diğer sebep ise, kullanılan değişkenlerin birbirinden bağımsız olmadığıdır. Melas gibi orijinal ve kompleks bir karbon atığı ile çalışılırken, homoasetojenlerin varlığı dikkate alınarak, üretim verim / hızının daha farklı bağımsız değişkenlerle açıklanmasına çalışılabilir.

UYA ve KOİ Analiz Sonuçları

Reaktörlerin çıkış UYA analizleri Tablo 7.12'de verilmiştir. Yüksek başlangıç KOİ derişimine (KOİ=50 g/L) sahip reaktörlerdeki çıkış UYA derişimleri, düşük KOİ'li reaktörlerde ölçülen UYA derişimlerinden belirgin şekilde yüksektir. Neredeyse tüm reaktörlerde en fazla üretilen asit çeşidi asetik asittir. Öte yandan, başlangıç KOİ derişimi yüksek olan reaktörlerin (30 ve 50 g/L) bir kısmında, çıkış laktik asit derişimi asetik aside yakın değerlerdedir. En yüksek çıkış asetik asit derişimi 115,7 mM (6942 mg/L) ile KOİ=50, $X_o=5000$, pH=7 reaktöründe tespit edilmiştir. Asetik asit derişiminin 25 mM'ın altında olduğu reaktörlerde hidrojen üretim veriminin 1,5 mmol H₂/g KOİ'nin üzerinde; 25 mM'ın üstünde olduğu koşullarda ise 0,46 mmol H₂/g KOİ'ye kadar düştüğü gözlenmiştir (Tablo 7.11, 7.12). Dolayısıyla yüksek UYA derişimi olası inhibisyon koşullarını göstermektedir. Serbest asetik asit ve bütirik asit derişimleri sırasıyla 50 ve 63 mM iken H₂ üretiminin tamamıyla inhibe olduğu belirtilmiştir (Van Ginkel ve Logan, 2005b). Yan ürünlerin toplam etkisi, örneğin, toplam uçucu yağ asidi (tUYA) derişimi de inhibisyonda ve metabolik yoldaki sapmada etkin olabilir. Dolayısıyla, inhibisyona yol açacak asit tipini (asetik asit ve(ya) bütirik asit ve(ya) tUYA) belirlemek için, bu odakta bir çalışma yapılmalıdır.

Tablo 7.12. Melasla kurulan kesikli karanlık fermantasyon reaktörleri çıkış asit çeşitleri ve derişimleri

Başlangıç			Asit Kompozisyonları (mM) ^a							Toplam UYA (mM, HAc)
KOİ (g/L)	X_o (mg/L)	pH	Laktik	Formik	Asetik	Propiyonik	İso-bütirik	Bütirik	İso-valerik	
10	5000	4	2,2	2,3	22,0	2,3	0,1	10,1	0,8	35,2
30	2500	4	49,6	0,1	69,0	7,3	3,9	0,1	0,0	108,2
30	7500	4	43,5	2,3	67,5	4,5	0,0	0,2	0,1	103,3
50	5000	4	27,5	0,1	56,1	13,8	0,2	6 6	0,2	90,1
10	2500	5,5	1,9	3,4	15,9	2,7	0,2	6,6	0,3	28,
10	7500	5,5	0,2	0,2	24,0	2,8	0,3	12,0	0,3	34,8
30	5000	5,5	23,9	2,4	36,6	4,5	0,0	25,4	1,6	76,5
50	2500	5,5	72,9	0,1	72,6	6,3	1,7	8,6	0,2	132,2

Başlangıç			Asit Kompozisyonları (mM) ^a							Toplam
KOİ (g/L)	X _o (mg/L)	pH	Laktik	Formik	Asetik	Propiyonik	İso-bütirik	Bütirik	İso-valerik	UYA (mM, HAc)
50	7500	5,5	95,0	6,0	106,4	11,5	0,0	20,6	1,4	200,9
10	5000	7	2,7	0,0	26,7	3,6	0,8	11,8	2,0	39,4
30	2500	7	63,4	7,4	36,6	3,9	0,0	14,5	0,1	101,5
30	7500	7	0,9	4,8	56,4	5,9	0,0	28,1	0,7	87,1
50	5000	7	122,7	9,5	115,7	6,4	0,0	27,4	0,4	233,7

^a Asitlerin moleküler ağırlıkları (g/mol); Laktik asit 90,08; Formik asit 46,03; Asetik asit 60,05; Propiyonik asit 74,08; İso-bütirik asit 88,11; Bütirik asit 88,11; İso-valerik asit 102,13.

Reaktörlerin çıkış AKM, UAKM ve çKOİ değerleri Tablo EK-J4'de görülebilir (EK-J). İş Paketi 2 kapsamında sukrozla (çözünmüş KOİ kaynağı) kurulan karanlık fermantasyon setinde düşük bir çKOİ giderimi (%5-10) gözlenmişti (Bölüm 3.2.1.3). Bu çalışmada, çıkış suyu ardışık anaerobik reaktörlerde kullanılacağı için süzölmüş ve çıkış derişimi çKOİ bazında verilmiştir (Tablo EK-J4). Bu nedenle, KOİ giderimi hesaplanmasa da, karanlık fermantasyon süresince ciddi bir KOİ giderimi olmayacağı öngörülmektedir.

7.2.1.2. Üç-Aşamalı Sistemde; Kesikli Anaerobik Reaktör Deneyi Sonuçları

Üç-aşamalı sistemin ikinci aşamasını oluşturan kesikli anaerobik (metanojenezis) reaktör deneyleri 49 gün sürmüştür. Bu çalışma süresince üretilen toplam biyogaz ve metan gazı miktarları Şekil 7.4'de, elde edilen metan yüzdeleri, verim değerleri ve üretim hızları Tablo 7.13'de; zamana karşı toplam UYA derişimi ve toplam UYA (tUYA) kompozisyonundaki derişimler ise Şekil 7.5'de verilmiştir.

Şekil 7.4'de göröldüğü üzere, en yüksek metan gazı üretimi 'KOİ 50-X 5000-pH 4' (AR30) kodlu reaktörlerde gözlemlenmiştir. Sonuçlar, Tablo 7.5'de sunulan reaktörlerin giriş çKOİ değerleri ile karşılaştırıldığında, giriş çKOİ değeri arttıkça, beklenildiği gibi, metan üretiminin arttığı anlaşılmaktadır. Reaktörler arasında gaz üretimindeki farkın sebebini araştırmak, diğer bir deyişle, ön aşama olan karanlık fermantasyonun metan üretimine etkisini belirlemek için, normalize edilmiş değerlere ihtiyaç vardır. Bu nedenle, metan üretim verimi, metan üretim hızı, reaktörlerde üretilen toplam metan ve tepe gazındaki metan yüzdesi hesaplanarak Tablo 7.13'de sunulmuştur. Buna göre, 'KOİ 50-X 5000-pH 7' (AR9 ve AR26) ve 'KOİ 50-X 7500-pH 5,5' (AR14 ve AR23) kodlu reaktörler 12 mL CH₄/L.saat değeri ile en yüksek metan

üretim hızına sahiptir. Buna karşılık 'KOİ 30-X 7500-pH 7' (AR5 ve AR20) kodlu reaktörler ise 15 mmol/g $\text{çKOİ}_{\text{eklenen}}$ ve 461 mL CH_4/g $\text{çKOİ}_{\text{eklenen}}$ (35°C) değerleri ile en yüksek metan üretim verimine ve %83 ile en yüksek metan gazı yüzdesine sahiptir. İnkübasyon süresince üretilen toplam metan gazı miktarına bakıldığında ise 'KOİ 50-X 5000-pH 4' (AR30) kodlu reaktör 639 mL üretim ile ilk sıradadır. Tablo 7.13'de görüldüğü üzere, bazı reaktörlerde, teorik verim değeri olan 395 mL CH_4/g KOİ değerinden daha yüksek verimler elde edilmiştir. Bu durum, reaktörlere besin ile birlikte partiküler KOİ eklenmesi (veya reaktörlere eklenen besin hacminin teorik olarak hesaplanandan daha fazla eklenmesi) sonucu olabilir. Dolayısıyla, hesaplanan KOİ değerinden daha fazla KOİ eklenmesi, teorik değere göre hesaplanan verimin (mL/g çKOİ), 395 mL CH_4/g KOİ değerinden daha fazla olmasına yol açmaktadır. Bu durum %6-15'lik bir hata payına yol açmıştır.

Tablo 7.13'de görüldüğü üzere, bu çalışmada elde edilen metan yüzdeleri (%64-83), tek aşamalı anaerobik reaktör çalışmalarında elde edilen metan yüzdelerine (%55-68) kıyasla oldukça yüksektir (Giordano vd., 2011). Nitekim, bu çalışmadaki metan yüzdeleri, melasın direk besin kaynağı olarak kullanıldığı (karanlık-fermantasyonun ön aşama olmadığı) bir sonraki kesikli anaerobik reaktör çalışmasında (İş Paketi 6, Bölüm 7.2.2.1) elde edilen %67-70 değerlerine göre de yüksektir.

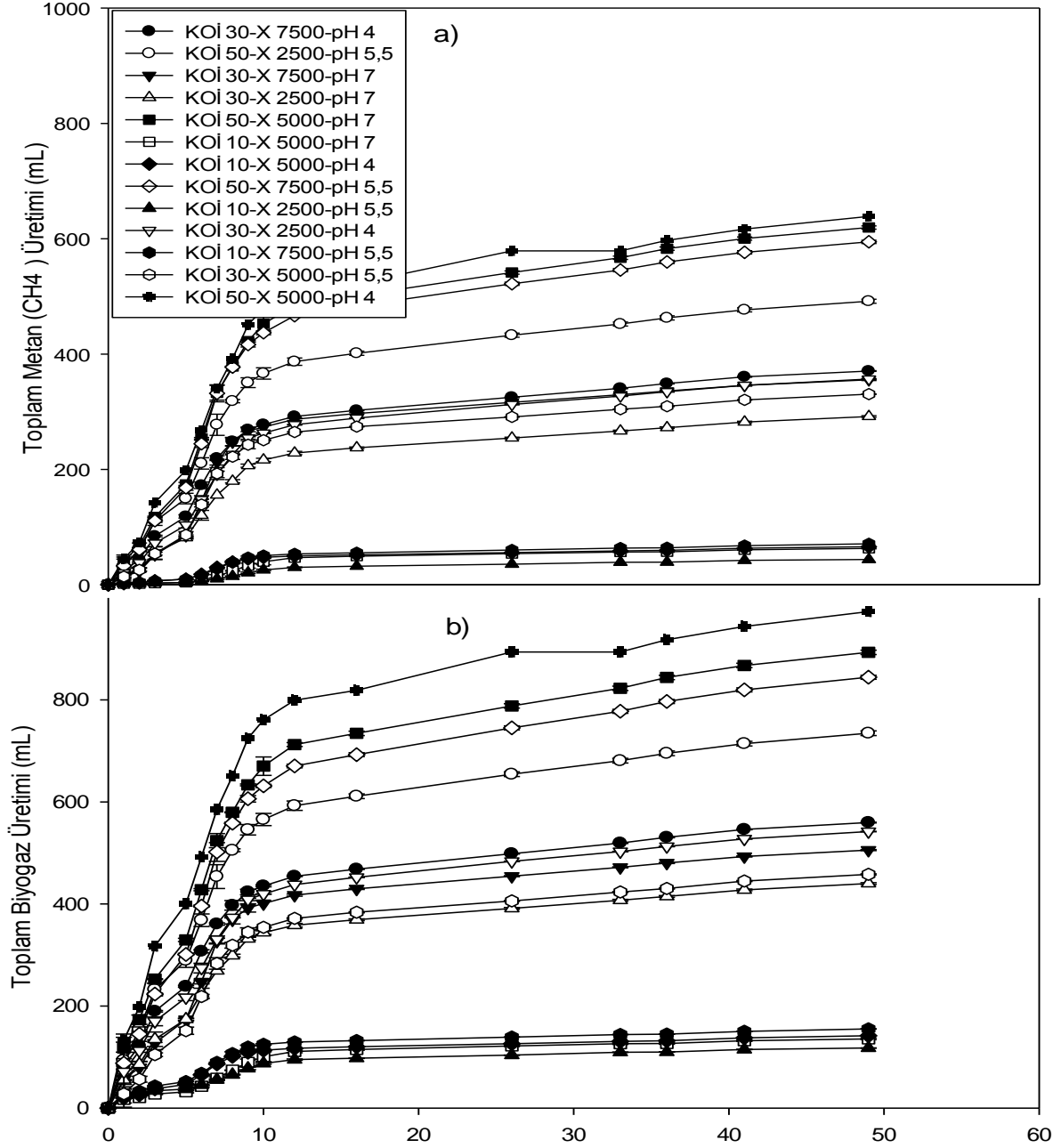
Tüm reaktörlerde S/X_0 oranı sabit tutulduğu ve metan üretim verimleri eklenen çKOİ bazında normalize edildiği için, reaktörler arasında verim bazında gözlenen farklılıklar (Tablo 7.13), giriş suyundaki (karanlık fermentasyon reaktörlerinin çıkış suları, Tablo 7.12) farklı UYA türleri (farklı KOİ kaynağı) ve ilgili derişimleri ile ilişkilendirilmiştir. Tepegazında gözlenen %83'e varan yüksek metan yüzdeleri, karbon kaynağından CO_2 'ye dönüştürülen bir yüzdenin ön aşama olan karanlık fermentasyon sisteminde ayrılmış olmasıyla açıklanabilir. Buna ek olarak, yüksek metan yüzdeleri, farklı UYA türleri (farklı KOİ kaynağı) ve ilgili derişimleri ile de açıklanabilir. Tablo 7.12'de ve Şekil 7.5'te (ilk güne ait UYA çeşitlerinden) görüldüğü gibi karanlık fermentasyon çıkış suyu UYA kompozisyonu temel olarak asetik, laktik ve bütirik asitten oluşmaktadır. Fakat bu asitler farklı reaktör tiplerinde farklı derişimlerde bulunmaktadır. Karbon kaynağı olarak melas kullanılan ve karanlık fermentasyon ile metanojenesis reaktörlerinin ardışık işletildiği diğer çalışmalarda da karanlık fermentasyon çıkış suyu karakterizasyonu bu çalışmaya dikkate değer biçimde benzemektedir (Şekil 7.5) (Park vd., 2010; Lin vd., 2010). Şekil 7.5'te zamana göre UYA tüketimine bakıldığında laktik ve bütirik asidin fermentasyonunun hızlı gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Laktik ve bütirik asidin diğer UYA türlerine göre hızlı tüketimi literatürde de rapor edilmiştir (Pipyn ve Verstraete, 1981; Cheong ve Hansen, 2008). Ayrıca, laktik asidin etanol ile birlikte, metanojenlerin ihtiyaç duyduğu enerji (ATP) değerinin karşılanması açısından UYA türlerine göre avantaj sağladığı

ifade edilmiştir (Pipyn ve Verstraete, 1981; McInerney ve Bryant, 1981; Fox ve Pohlan, 1994). Ek olarak, laktik asit fermantasyonu ortamda hidrojen gazı varlığında daha ekzergonik bir reaksiyon olarak gerçekleşmektedir; bu durum ortamdaki hidrojen ile karbondioksiti kullanarak metan üreten hidrojenetrofik metanojenler için uygun şartların reaktörlerde oluştuğuna dair bir göstergedir (Fennell and Gossett, 1997). Dolayısıyla bu çalışma çerçevesinde kullanılan substrattaki laktik asit derişiminin dominant olması, çalışma sonucunda elde edilen yüksek metan üretim verimlerini ve biyogaz kompozisyonunda %83'lere ulaşan metan yüzdesini desteklemektedir. Formate (veya H_2 'yi) ve CO_2 'yi kullanarak metan üreten hidrojenetrofik metanojenlerin varlığı da olasıdır (Ferry vd., 1974). Nitekim, Bölüm 9'da sunulan moleküler analiz sonuçları (Bölüm 9.2.2.1), AKR-Karanlık fermantasyon sistemi çıkış suyu ile beslenen AKR-Metanojenesis sisteminde *Methanospirillum hungatei* türünün varlığını ispat etmiştir. *Methanospirillum hungatei* türü, H_2 veya formate'i elektron donörü olarak, CO_2 ile birlikte kullanan ve metan üreten bir metanojendir. Dolayısıyla, aynı aşı çamur kaynağının kullanıldığı bu çalışmada da *Methanospirillum hungatei* türünün varlığı, 2.aşama olan metanojenesis sistemindeki yüksek metan yüzdesini ve metan üretim verimini açıklayabilir.

Han ve Shin (2004)'ün gıda endüstrisi atıksuyu ile yaptığı çalışma da karanlık fermantasyon sonrası UYA analizi ve anaerobik fermantasyon sonrası metan yüzdesi açısından bu çalışmaya benzerlik göstermektedir. Ayrıca, laboratuvar ölçekli ve iki-aşamalı anaerobik fermantasyon çalışmalarında da biyogaz içerisinde %80'lere varan metan yüzdesi elde edilmiştir (Kalia vd., 2000; Houbroun vd., 2003). Şekil 7.5'de görüldüğü üzere, asetik asitteki zamana göre dalgalanma, asetik asidin bir yandan metan üretimi için tüketilirken eş zamanlı olarak diğer uçucu yağ asitlerinden fermantasyon sonucunda oluşturulması ile açıklanabilir. Şekil 7.5'de verilen UYA analizleri, GC'de yaşanan teknik sorunlar sebebiyle, inkübasyon sırasında değil, reaktörler sonlandırıldıktan sonra yapılabilmektedir. Şekil 7.5'de görüldüğü üzere, inkübasyon sonunda (49.gün) yapılan UYA analizlerine göre, tüm reaktörlerde sadece az miktarda asetik aside (en yüksek derişim 2,3 mM) rastlanmıştır.

Propiyonik asit diğer UYA türlerine göre daha zor ve yavaş fermente olan bir UYA türüdür. Dolayısıyla reaktör içi başlangıç propiyonik derişiminin düşük olması, metan üretim verimlerinin yüksek olmasını açıklayan bir diğer faktördür (Şekil 7.5) (İnanç vd., 2005; Wang vd., 2006). 2-4. günler arasında tüm reaktörlerde propiyonik asit derişiminin artması ise karanlık fermantasyon sırasında asidojenesis reaksiyonuna tabi tutulamamış karbon (şeker) kaynağının tüketimi ile yorumlanabilir. Şekil 7.5'te görüldüğü üzere propiyonik asit derişimindeki artış, laktik ve bütirik asitlerin bütün reaktörlerde neredeyse tamamen tüketildiği 2-4. günler arasına denk gelmektedir. Propiyonik asit derişiminin artış gösterdiği 3-

5 ve 7-11. günler arasında tüm reaktörlerde metan üretim hızı düşüş göstermektedir (Şekil 7.4 ve 7.5). 5-7. günler arasında ise propiyonik asit derişiminin azalmasıyla birlikte, metan üretim hızı maksimum değerine ulaşarak Tablo 7.13'de verilen değerler elde edilmiştir.



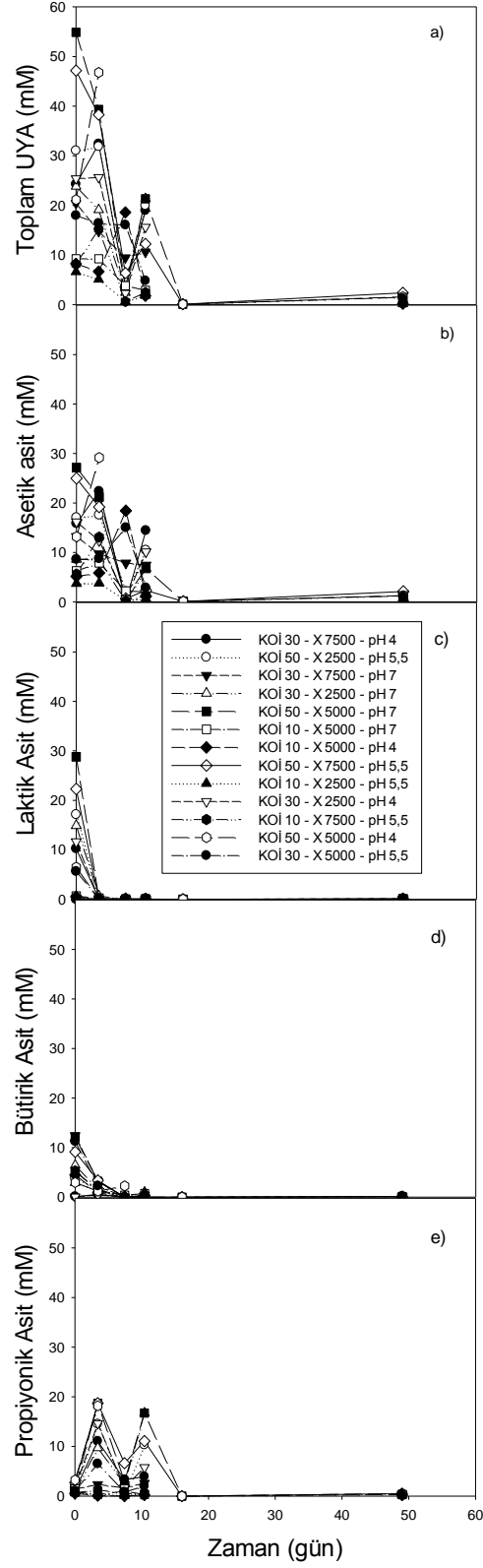
Şekil 7.4. Üç-aşamalı sistemde, anaerobik reaktörlerde üretilen toplam a) metan ve b) biyogaz miktarı (35°C, S/X₀: 0,5 g KOİ/g UAKM, pH: 7-7,5)

Tablo 7.13. Üç-aşamalı sistemin ikinci aşamasını oluşturan metanojenesis reaktörlerinde elde edilen metan yüzdesi ve verim değerleri

Karanlık fermantasyon reaktörlerinin özellikleri ve takip eden Anaerobik Reaktör numarası (AR)	Üretilen toplam CH ₄ miktarı ^a (mL)	CH ₄ yüzdesi (%)	CH ₄ üretim verimi ^a (mL CH ₄ /g çKOİ)	CH ₄ üretim verimi (mmol CH ₄ /g çKOİ)	CH ₄ üretim hızı ^a (mL CH ₄ /L.saat)
KOİ 30-X 7500-pH 4; AR2, AR6	371 ± 1	77 ± 2	385 ± 17	14 ± 1	7
KOİ 50-X 2500-pH 5,5; AR4, AR11	492 ± 4	79 ± 1	387 ± 20	14 ± 1	10
KOİ 30-X 7500-pH 7; AR5, AR20	356 ± 1	83 ± 1	461 ± 25	15 ± 2	9
KOİ 30-X 2500-pH 7; AR7, A12	292 ± 1	81 ± 0	422 ± 6	14 ± 1	6
KOİ 50-X 5000-pH 7; AR9, AR26	620 ± 3	80 ± 1	442 ± 11	14 ± 0	12
KOİ 10-X 5000-pH 7; AR10, AR28	63 ± 1	64 ± 1	273 ± 10	9 ± 1	1
KOİ 10-X 5000-pH 4; AR13, AR27	66 ± 0	66 ± 1	243 ± 21	9 ± 1	2
KOİ 50-X 7500-pH 5,5; AR14, AR23	595 ± 3	78 ± 1	444 ± 13	15 ± 1	12
KOİ 10-X 2500-pH 5,5; AR15, AR18	44 ± 0	54 ± 4	253 ± 19	8 ± 1	1
KOİ 30-X 2500-pH 4; AR16, AR17	357 ± 1	80 ± 1	439 ± 8	14 ± 0	7
KOİ 10-X 7500-pH 5,5; AR21, AR25	71 ± 0	67 ± 2	291 ± 13	9 ± 0	2
KOİ 50-X 5000-pH 4; AR24, AR30	639 ± 0	76 ± 0	454 ± 0	15 ± 0	11
KOİ 30-X 5000-pH 5,5; AR1,AR3,AR8,AR9,AR22,AR29	331 ± 1	81 ± 1	435 ± 16	14 ± 1	8 ± 0,3

^a Metan gaz hacimleri 35°C'daki değerleri göstermektedir.

Yüksek metan yüzdesinin ve üretim veriminin bir diğer sebebi ise, ön aşama olan karanlık fermantasyon çalışmasında speküle edildiği gibi homoasetojenlerin varlığı ile ilişkilendirilebilir. Melasta bulunan ve(ya) karanlık fermantasyon sürecinde aktive olan homoasetojenler, reaktörlerin çıkış suyunun anaerobik reaktörlerde kullanılması sürecinde bu ortamda da çoğalmış olabilir. Düşük substrat derişimlerine ulaşıldığında, homoasetojenler, ortamdaki çözülmüş CO₂ ve tepe gazındaki hidrojenin tüketilmesi (Denklem 7.2) ile daha fazla asetat üreterek CH₄ yüzdesinin artmasını sağlamış olabilir. Bu durum, tepe gazındaki CO₂'nin zaman içinde azalması ve CH₄ miktarının artmasına yol açacaktır. Yine aynı şekilde, şekerden asetat üretimi de (Denklem 7.1) bu artışı ve metanojenlerin ortamda daha baskın hale gelmesi ve metan yüzdesinin artmasını açıklayabilir.



Şekil 7.5. Üç-aşamalı sistemde, anaerobik reaktörlerde zaman karşı toplam UYA derişimi ve kompozisyonlarındaki değişim (UYA analizleri, teknik sebepler nedeniyle, reaktörler sonlandırıldıktan sonra yapılabildiği; 49.gün sonunda yapılan UYA analizlerinde en yüksek 2,3 mM asetik aside rastlanmıştır). (35°C, S/X₀: 0,5 g KOI/ g UAKM, pH: 7-7,5)

7.2.1.3. Üç-Aşamalı Sistemde; Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyi Sonuçları

Üç-aşamalı sistemde, kesikli anaerobik reaktörler sonlandırıldıktan sonra (49.gün), reaktörlerden alınan çıkış suları ile kurulan fotofermantasyon reaktörleri 7 gün (168 saat) boyunca işletilmiştir. Bu süre zarfında hidrojen üretimi sürekli olarak incelenmiş ancak hiçbir reaktörde hidrojen üretimi gözlenmemiştir (veri sunulmamıştır). Bu durum, öngörüldüğü üzere, anaerobik çıkış suyunda fotofermantasyon deneyleri için kullanılacak yeteri kadar UYA yükünün kalmamış olması ile açıklanmıştır. Nitekim, giriş suyu UYA analizleri, tüm reaktörlerde sadece az miktarda asetik asidin kaldığını (en yüksek 2,3 mM) göstermiştir (Şekil 7.5). Fotofermantasyon deneylerinin sonunda yapılan analizler de asetik asit derişiminin reaktörlerde 0,1-1,2 mM arasında değiştiğini göstermiştir (veriler sunulmamıştır). Reaktörlerin işletildiği süre zarfında ise herhangi bir UYA üretimine / değişimine rastlanmamıştır.

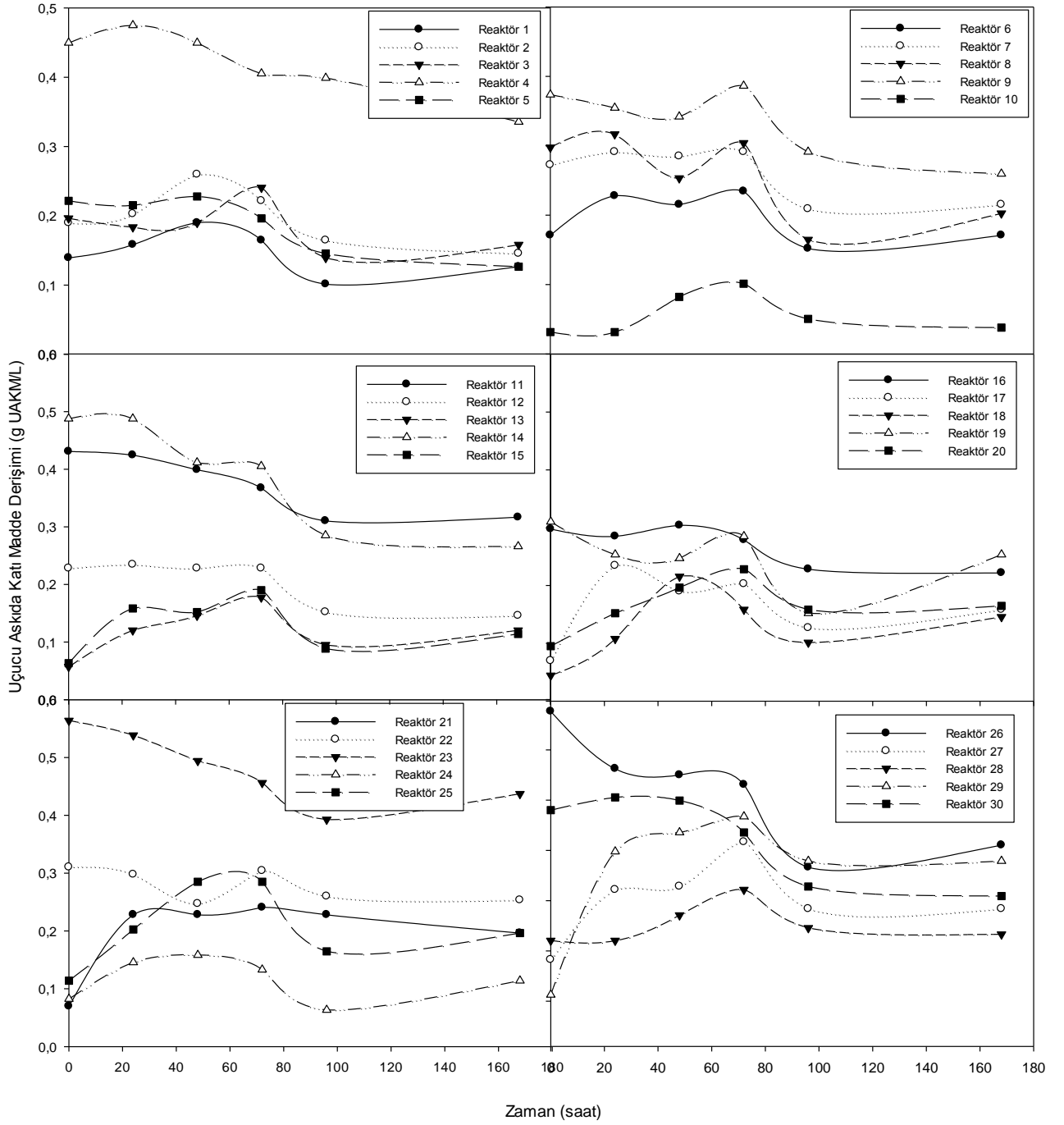
Anaerobik (metanojenesis) reaktörlerin işletimi sırasında, UYA analizleri, GC'de yaşanan sorunlar sebebiyle, reaktörler sonlandırıldıktan sonra yapılabilmştir. Dolayısıyla, tüm UYA'nın tüketiminden (Şekil 7.5) sonra kurulan fotofermantasyon reaktörlerinde herhangi bir hidrojen üretimi olmamıştır. Fotofermantasyon reaktörlerinde besin olarak kullanılan anaerobik reaktörlerin çıkış suyu özelliklerine bakıldığında çKOİ derişiminin 115-1382 mg/L arasında değiştiği gözlenmektedir (Tablo 7.6). Deney sonuçları, HAc, HBU ve HPr dışında, çKOİ derişimine yol açan herhangi bir organik çeşidinin fotofermantasyonda besin olarak kullanılmadığını da göstermiştir. Bu sonuçlara rağmen, üç-aşamalı (veya iki-aşamalı) sistemlerde fotofermantasyon sisteminin anaerobik (metanojenesis) reaktörü takiben kurulamayacağı çıkarımı yapılmamalıdır. Anaerobik reaktör çıkış suyu ile fotofermantasyon reaktörlerinin kurulumu ve hidrojen üretimi, uygun anaerobik inkübasyon süresi ile sağlanabilir. Anaerobik reaktörlerin, UYA'nın tüketimini engelleyecek şekilde, daha kısa sürelerde inkübe edilmesi, ardışık fotofermantasyon için uygun tür ve miktarda UYA teminini sağlanabilir. Örneğin, Şekil 7.5'de görüldüğü üzere, 3-10 günlük inkübasyon süresi sonunda alınan anaerobik reaktör çıkış suyu, takip eden fotofermantasyon reaktöründe, herhangi bir seyreltmeye gerek duyulmadan hidrojen üretimini sağlayacak özelliktedir. Nitekim, benzeri yaklaşım, İş Paketi 3 ve 4'te başarıyla sunulmuştur (Bölüm 4 ve Bölüm 5). Böylesi bir anaerobik reaktör, kısa bekletme süresine sahip olacağı için ekonomik açıdan da uygun olabilecektir.

Şekil 7.6'da görüldüğü üzere, işletilen reaktörlerin neredeyse tamamında bakteriyel derişim belirgin bir artış göstermemiştir. Bakteriler kısa bir durgunluk fazından (stationary phase)

sonra ölüm fazına (death phase) geçmişlerdir. Bu sonuç da, bakteriyel büyüme için, reaktörlerde uygun türde ve yeterli derişimde UYA'nın olmadığını doğrulamaktadır.

Tepegazında eser miktarda dahi hidrojen gözlemlenememesinin diğer bir nedeni yüksek pH değerleri olabilir. Reaktör içerisindeki pH değerleri günlük alınan numuneler ile takip edilmiş ve deney süresince 8,9-9,9 değer aralığında seyrettiği belirlenmiştir. Koku vd. (2002) tarafından *Rhodobacter* türünün farklı bir kültürü için verilen optimum pH aralığı 6,5-7,5 olarak belirtilmiştir. Ayrıca Sasikala vd. (1991) ise yaptıkları çalışmada hidrojen üretimi için optimum pH aralığının 6-9 olduğunu belirtmişlerdir. Bergey ve Holt (1994) ise bakteriyel büyümenin gözlemlenebileceği optimum pH aralığını 6,5-7,5 olarak belirtmiştir. Bu durumda reaktör içi pH değerlerinin, bakteriyel büyüme ve hidrojen üretimi için uygun olmadığı söylenebilir.

Otoklav öncesi pH değerleri 6,4'e ayarlanmasına rağmen, reaktör pH değerleri ilk günün sonunda alınan numunelerde 8,5-9,2 aralığında ölçülmüştür. Bu durum partiküler azot parçacıklarındaki amonyağın otoklav sırasında salınımı ile de açıklanabilir. Amonyak derişimi üç-aşamalı sistemde, karanlık fermentasyon ve metanojenenesis (anaerobik) reaktörlerde hidroliz aşamasında da artmış olabilir. Dolayısıyla, giriş suyunda yeterli UYA derişimi (ve uygun UYA türü) olmuş olsa dahi, yüksek amonyak derişimleri de fotofermantatif hidrojen üretiminin olumsuz etkileyebilecekti. Fotofermantasyon deneyleri öncesinde, numune miktarının yetersiz oluşu sebebiyle, TKN/amonyak analizleri gerçekleştirilememiştir. Bundan sonraki aşamalarda, amonyak derişiminin olası etkileri dikkate alınmalıdır.



Şekil 7.6. Üç-aşamalı sistemde, kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde *R.Capsulatus* derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOI/g UAKM, 3955 lux)

7.2.2. Melasla İki-Aşamalı Kesikli Sistem Deneyleri Sonuçları

Bu çalışma, ardışık anaerobik (metanojenes) ve fotofermantasyon kesikli reaktör deneyleri olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Bu çalışma, proje önerisinde sunulmamakla birlikte,

melasın üç-aşamalı kesikli sistem deneyi sonuçlarıyla karşılaştırma yoluyla karanlık fermantasyonun etkisinin araştırılması için gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, projenin zaman-takvimine göre, metanojenesis takip eden fotofermantasyon çalışmasının araştırıldığı ilk çalışmadır.

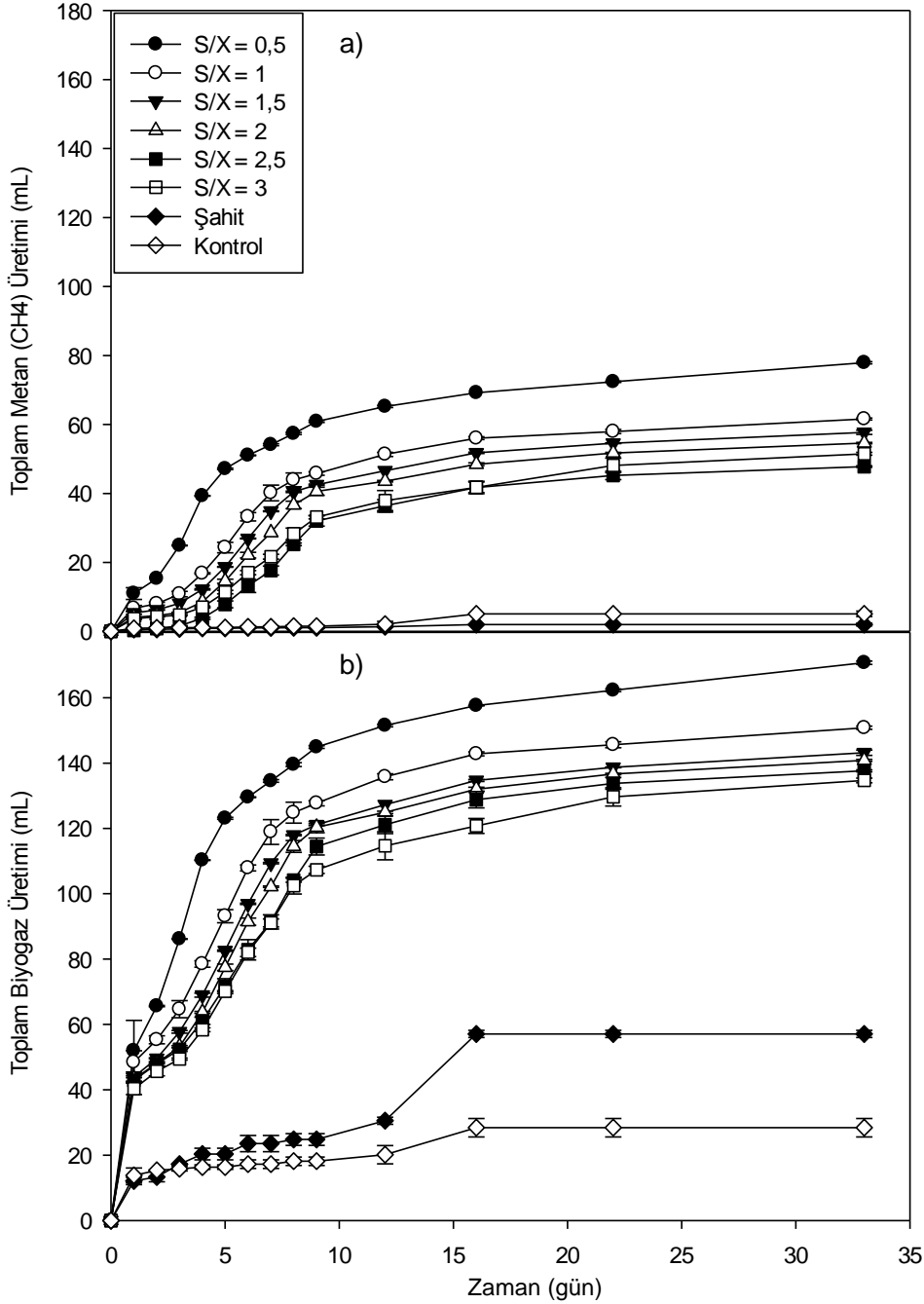
7.2.2.1. İki-Aşamalı Sistemde; Melasla Kesikli Anaerobik Reaktör Deneyi Sonuçları

Kesikli anaerobik reaktörlerde üretilen toplam biyogaz ve metan gazı miktarlarının zamana ve başlangıç S/X_0 'e göre değişimi Şekil 7.7 ve Şekil 7.8'de gösterilmiştir. Reaktörlerin metan üretim verim ve hızları, ve anaerobik arıtılabilirlik yüzdeleri Tablo 7.14'de sunulmuştur. İnkübasyon öncesi (başlangıç) ve inkübasyon sonrası (çıkış) UYA analizi sonuçları Tablo 7.15'de; çıkış $çKOİ$ ve UYA değerlerinin $KOİ$ bazında karşılaştırılması Tablo 7.16'da; AKM ve UAKM analizi sonuçları ise Tablo 7.17'de verilmiştir.

Şekil 7.7'de görüldüğü üzere, sadece mikroorganizma eklenen kontrol ve sadece melas eklenen şahit reaktörlerinde, beklenildiği gibi, metan üretimi yok denecek kadar azdır. Şekil 7.7, Şekil 7.8 ve Tablo 7.14'de görüldüğü üzere, en yüksek metan üretim miktarı (77,9 mL) ile başlangıç S/X_0 oranının 0,5 olduğu koşullarda gözlenmiştir. S/X_0 oranı, 0,5'den 2,5'e arttırıldıkça üretilen toplam metan miktarı 77,9 mL'den 47,8 mL'e düşmektedir (tüm test reaktörlerinde başlangıç $KOİ$ derişimi aynıdır). Başlangıç S/X_0 oranının 3 olduğu koşulda ise metan üretimi S/X_0 2,5 reaktörüne yakın bir değer olan 51,8 mL'dir. Bu çalışmanın en uygun S/X_0 sonucu, literatür verilerini destekler niteliktedir (Alkaya ve Demirer, 2009; Jimenez vd., 2003; Fang vd., 2010). Alkaya ve Demirer (2009)'un çalışmasında 0,2-3,5 arasında başlangıç S/X_0 değerleri çalışılmış ve en yüksek metan verimi başlangıç S/X_0 oranının 1 olduğu reaktörlerde tespit edilmiştir. Karbon kaynağı olarak (şeker kamışı ve şeker pancarından) şeker üretim prosesi atıksuyunun kullanıldığı bu çalışmada, başlangıç S/X_0 oranının 1'den büyük olduğu reaktörlerde metan veriminin düştüğü kaydedilmiştir (Alkaya ve Demirer, 2009).

Tablo 7.14'de, metan üretim miktarına benzer şekilde, başlangıç S/X_0 oranı 0,5'den büyük değerlerde metan üretim veriminin ve hızının ve arıtılabilirliğin de azaldığı gözlenmektedir. Öte yandan, inkübasyon süresince biyogaz kompozisyonundaki metan yüzdesinin azaldığı bir reaktör tespit edilmemiştir (veriler sunulmamıştır) ve neredeyse tüm reaktör çeşitlerinde benzer metan yüzdeleri elde edilmiştir (Tablo 7.14). Dolayısıyla, başlangıç S/X_0 oranı sebebiyle, metanojenlerin inhibisyonunun gerçekleşmediği düşünülmektedir. Fakat Tablo 7.14'de S/X_0 oranının artmasıyla düşen anaerobik arıtılabilirlik yüzdeleri ve neredeyse tüm oranlarda gözlenen benzer metan yüzdeleri dikkate alındığında, bu çalışmada,

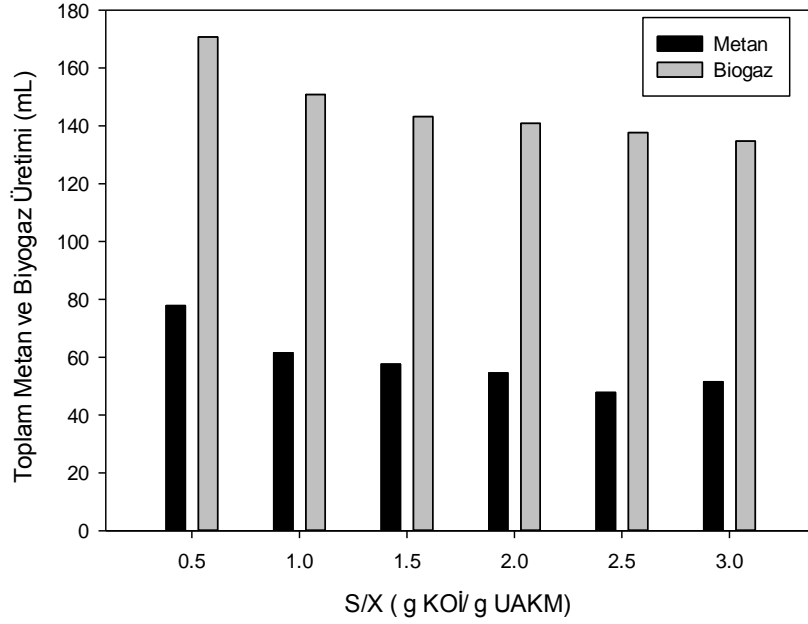
metanojenesis aşaması öncesinde bir inhibisyonun gerçekleşmiş olduğu ve bu nedenle UYA üretimi ve paralelinde CO₂ üretiminin durduğu düşünülmektedir.



Şekil 7.7. Melasla kurulan anaerobik reaktörlerde üretilen toplam a) metan gazı, b) biyogaz miktarı (35°C, KOİ: 3,5 g/L, pH: 8,2)

Bu çalışmanın dikkate değer bir başka sonucu, metan üretimi açısından uygun bir karbon kaynağı olarak bilinen glikoz ile gerçekleştirilen ilk çalışmaya (İş Paketi 2, Bölüm 3.2.2) kıyasla, bu çalışmada daha yüksek metan üretim verimlerinin elde edilmesidir. İş Paketi 2 Bölüm 3.2.2'de, glikozla kesikli anaerobik reaktör deneylerinde en yüksek metan üretim

verimi olarak 267 ± 13 mL CH₄/g çKOİ (35°C) elde edilmişti. Bu çalışmada ise bu değer $311,4 \pm 11$ mL CH₄/ çKOİ'e yükselmiştir (Tablo 7.14). Bu durum, karbon kaynağının gaz üretim veriminde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Melas çeşitli mikro- ve makro-nütriyentler içermesi ve doğal olması sebebiyle anaerobik mikroorganizmalar için daha uygun bir besin kaynağıdır.



Şekil 7.8. Farklı başlangıç S/X₀ oranında üretilen toplam biyogaz ve metan gazı değerleri (35°C, melas, KOİ: 3,5 g/L, pH: 8,2)

Tablo 7.14. İki-aşamalı sistemde, kesikli anaerobik reaktörlerin üretim hızı, verimi ve arıtılabilirlik sonuçları

S/X ₀ (g KOİ / g UAKM)	Üretilen toplam metan gazı miktarı (mL) ^a	Anaerobik arıtılabilirlik yüzdesi (%)	Metan gazı yüzdesi (%)	Metan üretim verimi (mL CH ₄ /g KOİ) ^a	Metan üretim verimi (mmol CH ₄ /g KOİ)	Metan üretim hızı (mLCH ₄ / L.saat) ^a
0,5	77,9± 0,3	73,3	67,3 ± 0,6	311,4± 11	12,3± 0,5	4,0
1	61,6± 0,3	58,7	67,1± 0,5	246,2± 8	9,7± 0,1	2,7
1,5	57,7± 0,6	55,3	70,1± 0,1	230,6± 9	9,1± 0,1	2,8
2	54,5± 0,2	52,4	68,8± 0,9	218,4± 7	8,6± 0,1	2,7
2,5	47,8± 0,2	45,8	67,7± 0	191,3± 5	7,6± 0,2	2,0
3	51,5± 0,4	48,7	67,3± 0,5	206,1± 7	8,2± 0,3	2,0

^a Metan gaz hacimleri 35°C'daki değerleri göstermektedir.

Anaerobik çürütme sırasında besin olarak kullanılan karbon kaynağı öncelikle hidroliz yapan mikroorganizmalar tarafından monomerik yapılara dönüştürülmektedir (Mc Carty, 1982). Örnek olarak, glikozun aminoasitlere kadar parçalanması verilebilir. Hemen peşinden ise söz konusu monomerik yapılar UYA, H₂ ve asetik aside dönüştürülmektedir. Bir sonraki basamak ise üretilmiş olan çeşitli uçucu yağ asitlerinin (propiyonik asit, bütirik asit, vd.) hidrojen üreten asetojenik mikroorganizmalar tarafından asetik asit, H₂ ve CO₂'ye dönüştürülmesidir (Mc Carty, 1982). Tablo 7.15'de sadece melasın eklendiği şahit reaktörü incelendiğinde ve daha önce Tablo 7.2'de de verildiği üzere, melasın içeriğinde UYA bulunmaktadır. İnkübasyon sonunda, mevcut UYA derişimlerinin artarak 6,3 mM asetik asit, 0,3 mM propiyonik asit ve 1,2 mM laktik asit üretildiği gözlemlenmiştir. Bu durum, daha önce belirtildiği üzere, melasın içeriğinde hidroliz/asidifikasyon faaliyetini gerçekleştiren yerel mikroorganizmaların bulunduğunu göstermektedir.

Tablo 7.15. İnkübasyon öncesi (başlangıç) ve inkübasyon sonrası (çıkış) asit derişimleri

Reaktör Çeşidi	S/X _o (g KOI /g UAKM)	Asetik Asit (mM)		Propiyonik Asit (mM)		Laktik Asit (mM)	
		Başlangıç	Çıkış	Başlangıç	Çıkış	Başlangıç	Çıkış
Şahit	0,0	0,8	6,3	0,2	0,3	0,9	1,2
Test (1)	0,5	1,1	0,1	0,0	0,4	0,8	0,0
Test (2)	1,0	0,9	0,1	0,9	0,3	0,8	0,0
Test (3)	1,5	1,0	0,1	0,6	0,3	1,0	0,0
Test (4)	2,0	0,9	0,1	0,0	0,3	1,0	0,0
Test (5)	2,5	0,7	0,1	0,3	0,3	0,7	0,0
Test (6)	3,0	0,9	0,1	0,3	0,3	1,0	0,0

Tablo 7.15'de görüldüğü üzere, test reaktörlerinde asetik ve propiyonik asit az miktarda da olsa tespit edilmiş; laktik ve bütirik asitlere ise ratlanmamıştır. Melasla gerçekleştirilen sürekli anaerobik fermantasyon çalışmalarında, hidroliz yapan mikroorganizmaların özellikle asetik, propiyonik, laktik ve bütirik asit ürettiği belirtilmektedir (Wang vd., 2009; Park vd., 2010). Asetik ve bütirik asit derişimlerinin propiyonik ve laktik asit derişimlerine göre baskın olduğu ifade edilmektedir (Wang vd., 2009; Park vd., 2010). Bu çalışmada ise, asetik ve propiyonik asitler başlıca UYA tipleridir. Ayrıca propiyonik asit göreceli olarak asetikten daha fazla üretilmiştir. Bu durum, üretilen asetik asidin (fermantasyon basamaklarında) diğer asitlere göre daha hızlı tüketilmesi ile açıklanmıştır. Ayrıca, bütirik asit ve laktik asidin asetik aside dönüştürülmesi, propiyonik aside göre daha hızlı gerçekleşmektedir (Wang vd., 2009). Laktik asidin asetik aside dönüşümü, diğer asit türlerinin eşdeğer sürecine göre, daha hızlıdır (Park

vd., 2010; Wang vd., 2009). Bu bilgi, UYA analizlerinde, beklenilen aksine, bütirik ve laktik aside rastlanılmamasını da açıklamaktadır.

Tablo 7.16'da, farklı başlangıç S/X_0 'e sahip reaktörlerdeki çıkış toplam UYA (tUYA) değerlerinin çıkış çKOİ bazında eşlenikleri ile karşılaştırılması verilmektedir. Tablo 7.16'daki veriler, anaerobik çürütme ile melasın içeriğindeki çKOİ kaynaklarının tamamının UYA'ya dönüştürülmediğini göstermektedir. Bu noktada UYA türlerine dönüştürülemediği olan çKOİ kaynağının, melas için özellikle şeker olarak kaldığı düşünülmektedir. Tablo 7.16'da artan S/X_0 ile beraber azalan çıkış çKOİ derişimleri gözlenmektedir (başlangıç KOİ derişimi tüm reaktörlerde aynıdır). Artan S/X_0 ile beraber azalan artılabilirlik ve neredeyse sabit metan yüzdeleri dikkate alındığında (Tablo 7.14), azalan çKOİ derişimi hidroliz ve(ya) asidojenesis / asetojenesis aşamalarındaki olası bir inhibisyona işaret edebilir. Dolayısıyla, artan S/X_0 ile beraber düşen artılabilirlik, metan gazı üretim miktarı ve verimi, metanojenlerin inhibisyonuna ek olarak, öncesinde, ön aşamalarda (asidojenesis/asetojenesis) gerçekleşen bir inhibisyon sonucu UYA ve paralelinde CO_2 üretiminin durması kaynaklı olabilir. Bu durum, metanojenesisin gerçekleşmesini engelleyerek, tepegazı yüzdesinin de sabit kalmasına yol açmış olabilir.

Anaerobik inkübasyon sonucunda reaktörlerdeki mikroorganizma derişiminin artması beklenmektedir. Anaerobik mikroorganizmaların, aerobiklere göre daha yavaş bir üreme hızına sahip oldukları bilinmektedir. Bu nedenle, anaerobik inkübasyon öncesindeki UAKM derişiminin inkübasyon sonunda %5-10 artması beklenmektedir (Bryers, 1984). Tablo 7.17'de görüldüğü üzere, reaktörlerde inkübasyon başlangıcında ve sonucunda ölçülen UAKM derişimleri farkı %5-15 arasında değişmektedir. Sadece Test 5 reaktör çeşidinde inkübasyon sonucu ölçülen UAKM değeri inkübasyon öncesi ölçülen UAKM değerinden düşüktür. Bu istisnai verinin deneysel bir hatadan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 7.16. Başlangıç S/X_0 'e göre çıkış çKOİ , pH ve tUYA-KOİ eşdeğerinin derişimi

Parametre	Reaktör Çeşidi (Başlangıç S/X_0)					
	0,5	1	1,5	2	2,5	3
tUYA'nın KOİ eşdeğer derişimi (mg/L KOİ)	51,12	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
Çıkış çKOİ (mg/L) ^a	690±9	612±17	604±10	512±15	^b	352±8
Çıkış pH	7,36±0,05	7,28±0,07	7,20±0,05	7,20±0,08	7,05±0,05	7,05±0,09

^a Tüm reaktörlerin başlangıç çKOİ derişimleri 2935 mg/L'dir.

^b Deneysel hata sebebiyle belirlenememiştir.

Tablo 7.17. Farklı başlangıç S/X₀ oranlarına göre başlangıç ve çıkış AKM ve UAKM derişimleri

Reaktör Çeşidi	S/X ₀	AKM (g/L)		UAKM (g/L)	
		Başlangıç	Çıkış	Başlangıç	Çıkış
Test (1)	0,5	18,13 ± 0,8	19,18 ± 1,4	6,26 ± 0,3	6,45 ± 0,4
Test (2)	1	8,07 ± 0,4	11,14 ± 1,4	2,97 ± 0,2	3,54 ± 0,2
Test (3)	1,5	7,04 ± 0,5	8,46 ± 0,7	2,49 ± 0,2	2,95 ± 0,3
Test (4)	2	5,54 ± 0,3	5,27 ± 0,4	2,01 ± 0,1	1,90 ± 0,1
Test (5)	2,5	3,56 ± 0,1	3,48 ± 0,3	1,53 ± 0,01	1,38 ± 0,1
Test (6)	3	3,23 ± 0,1	3,47 ± 0,3	1,33 ± 0,04	1,35 ± 0,1

7.2.2.2. İki-Aşamalı Sistemde (Melasla); Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyi Sonuçları

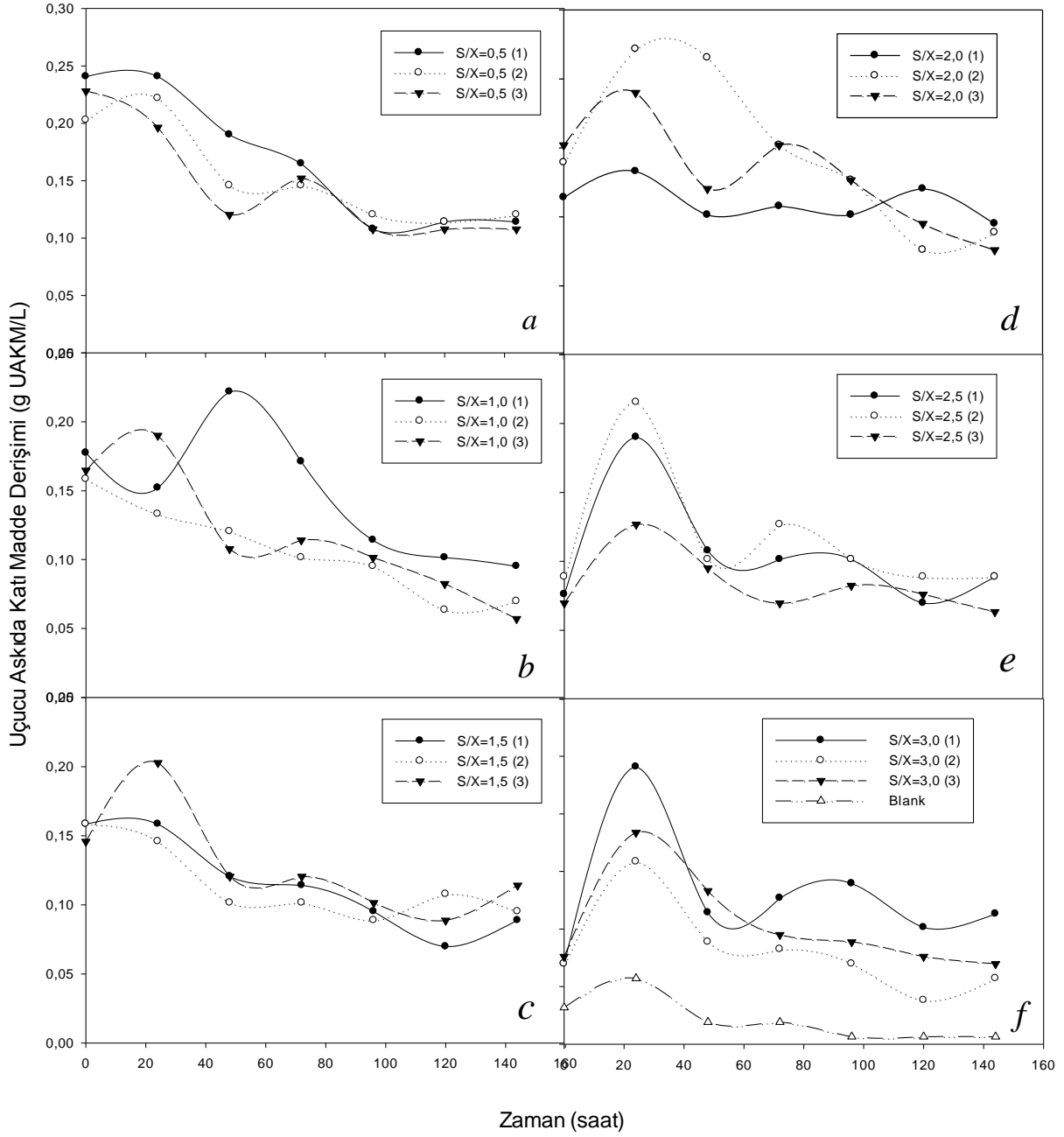
İki-aşamalı sistemde, melas ile kurulan ve 33 gün boyunca işletilen anaerobik reaktörler sonlandırıldıktan sonra alınan çıkış suları fotofermantasyon sisteminin besini olarak kullanılmıştır. Üç-aşamalı kesikli sistemdeki fotofementasyon çalışmasıyla zamanlı kurulan bu çalışmada, fotofermantasyon reaktörleri 6 gün (144 saat) boyunca işletilmiştir. Bu süre zarfında hidrojen üretimi sürekli olarak incelenmiş ancak hiçbir reaktörde hidrojen üretimi gözlenmemiştir. Bunun nedeni, üç-aşamalı sistemde olduğu gibi, anaerobik çıkış suyunda fotofermantasyon deneyleri için kullanılacak yeteri kadar UYA kalmamış olmasıdır (Tablo 7.15 ve 7.16). Bunun yanı sıra, anaerobik çıkış sularında ölçülen UYA dışı KOİ kaynakları ve derişimleri de hidrojen üretimine katkıda bulunmamıştır (Tablo 7.16). Bu sonuçları, bakteri derişimlerinin incelenmesi ile de desteklemek mümkündür. Şekil 7.9'da görüldüğü üzere, S/X₀ oranının 0,5 g KOİ/g UAKM olduğu anaerobik reaktörlerin çıkış suları ile beslenen fotofermantasyon reaktörlerinde, bakteriyel derişim herhangi bir artış göstermemiş ve bakteriler kısa bir durgunluk fazından (stationary phase) sonra ölüm fazına (death phase) geçmişlerdir. Diğer tüm S/X₀ oranına sahip reaktörlerde ise bakteri derişimleri ilk 24 saat içerisinde artış göstermiş ancak daha sonra düşüğe geçmiştir. Bunun sonucunda, başlangıçtaki düşük UYA derişimlerinin (Tablo 7.15, 0,1 mM asetik asit, 0,3-0,4 mM propiyonik asit) bakterilerin yalnızca kısa bir süre için üreyebilmeleri ve hayatta kalabilmeleri için kullanıldığı yorumu yapılabilir.

Bu elde edilen sonucu, iki-aşamalı ardışık anaerobik reaktör-fotofermantasyon sisteminin uygun bir konfigürasyon olmadığı şeklinde yorumlamak doğru olmayacaktır. Üç-aşamalı

sistemdeki fotofementasyon çalışması ile eşit zamalarda kurulan bu çalışmada, anaerobik reaktörler, içerisindeki UYA derişimlerinin neredeyse tamamı tükenene kadar işletilmiştir. Dolayısıyla anaerobik reaktörlerin işletimi sırasında fotofermantasyon reaktörlerinde hidrojen üretimi gözlenebilmesi için yeterli UYA derişimi kalmamıştır. Bu sorunun anaerobik reaktörlerden ara ara alınacak numunelerdeki UYA derişimlerine bakılarak giderilebileceği öngörülmektedir. Bu sayede anaerobik reaktörler UYA derişimlerinin tamamının tükenmesi beklenmeden sonlandırılabilir ve fotofermantasyon için yeterli UYA derişimine sahip giriş suyu olarak kullanılabilir.

Fotofermantasyon deneyi süresince düzenli olarak alınan numunelerle UYA analizi yapılmıştır. Yapılan UYA analizlerinde herhangi bir UYA derişimine rastlanmamıştır (veriler sunulmamıştır). Bu sonuç da, KOİ kaynağı olan diğer organiklerin fotofermantasyon sırasında kullanılmadığını göstermektedir.

Düşük UYA derişiminin yanı sıra, yüksek azot derişimleri de hidrojen üretiminin gözlenememesinin nedenlerindedir. Akköse vd. (2009) amonyum iyonu derişiminin 2 mM (36 mg/L)'ın üzerinde olduğu durumlarda hidrojen üretilmediğini gözlemlemiştir. UYA derişiminin yeterli olduğu durumlarda, TAN analizlerinin yapılması gerekmektedir. Nitekim yüksek TAN derişimi hidrojen üretimini negatif etkileyecektir. Bunun yanında, PHB üretimi de dikkate alınmalıdır. Yükselen C/N oranının PHB oluşumunu desteklediği belirtilmiştir (Abo-Hashesh vd., 2011). Hizmet alınarak yapılması planlanan PHB analizinin yapılacağı cihaz arızalandığı için, PHB analizleri yapılamamıştır.



7.3 Sonuç

Melastan üç-aşamalı (kesikli karanlık fermantasyon + kesikli metanojenesis + kesikli fotofermantasyon dizininde) sistemde toplam enerji üretiminin/veriminin araştırıldığı ve melas ile işletilen karanlık fermantasyonun optimum başlangıç koşullarının (toplam enerji üretiminin maksimizasyonunun sağlandığı koşulların) incelendiği İş Paketi 6 kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özet olarak sunulmuştur.

Üç-aşamalı sistemde, ilk aşama olan kesikli karanlık fermantasyon deneyleri;

Karbon kaynağı olarak **melasın** kullanıldığı kesikli karanlık fermantasyon deneyi Tepki Yüzeyi Metodu (TYM) ile tasarlanmış ve yorumlanmıştır.

- Melasla kurulan kesikli karanlık fermantasyon deneylerinde, üretim verimi ve hızı üç değişkenli (başlangıç KOİ, pH, X_0) TYM ile açıklanamamıştır (3 değişkenli model oluşturulamamıştır). Bu durum, seçilen değişkenlerin verim ve hız üzerinde etkin olmadığı anlamına gelmemektedir. Çalışılan işletim koşullarının, karbon kaynağının ve olası homoasetojenlerin aktivitesinin modelin açıklayıcılığını etkilediği düşünülmektedir.
- TYM sonuçlarına göre, hidrojen üretim verimi ve hızını anlamlı (significant) şekilde etkileyen tek değişken KOİ'dir. Maksimum hidrojen üretim veriminin ve hızının elde edildiği KOİ 10 g/L olarak belirlenmiştir.
 - Başlangıç X_0 değerinin hidrojen üretim verimi ya da hızı üzerinde bir etkisi yoktur.
- Deneysel verilere göre, en yüksek hidrojen üretim verimi **2,88 mmol H_2 /g KOİ** ile KOİ=10 g/L, X_0 =5 g/L ve pH=4,0 kombinasyonunda çalışılan reaktörlerde elde edilmiştir. Sukrozla karşılaştırıldığında bu değer düşüktür. Fakat sukroz çalışmasında eklenen tüm KOİ'nin sukroz bazında olduğu; melas çalışmasında ise (literatür verilerine göre) eklenen melasın sadece %50'sinin sukroz olduğu dikkate alındığında, orijinal karbonla yüksek bir verim elde edilmiştir.
- Deneysel verilere göre, hidrojen üretim hızı en yüksek, **8,26 mL H_2 / $L_{reaktör}$ ·saat (0,37 mmol H_2 / $L_{reaktör}$ ·saat)** ile, KOİ=10 g/L, X_0 =7,5 g/L ve pH=5,5 kombinasyonunda çalışılan reaktörlerde elde edilmiştir.
- Orijinal karbon kaynağının kullanıldığı karanlık fermantasyon sistemlerinde, stres koşullarında homoasetojenlerin etkin hale gelmesi olasıdır. Bu durum, üretilen gazın hidrojen yüzdesi, hidrojen üretim verimi ve hızında, beklenene kıyasla, sapmalara neden olabilmektedir.

Üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan kesikli anaerobik reaktör deneyleri;

İlk organik karbon kaynağının melas olduğu üç-aşamalı (karanlık fermantasyon-metanojenesis-fotofermantasyon) sistemde, karanlık fermantasyon çıkış suları ile kurulan kesikli anaerobik reaktör çalışmasında;

- En yüksek metan üretim verimi ve yüzdesi (%83), $KOI=30$ g/L, $X_o=7500$, $pH=7$ kombinasyonundaki karanlık fermantasyon çıkış suları ile kurulan anaerobik reaktörlerde elde edilmiştir.
 - Bu koşullarda en yüksek metan üretim verimi **15 mmol CH_4/g $\dot{C}KOI_{eklenen}$** 'dir (461 mL CH_4/g $\dot{C}KOI_{eklenen}$, $35^\circ C$).
- En yüksek metan üretim hızı (**12 mL $CH_4/L.saat$; 0,475 mmol $CH_4/CH_4/L.saat$**), $KOI=50$ g/L, $X_o=5000$, $pH=7$ ve $KOI=50$ g/L, $X_o=7500$, $pH=5,5$ kombinasyonundaki karanlık fermantasyon çıkış suları ile kurulan anaerobik reaktörlerde elde edilmiştir.

İki-aşamalı sistemde, 1.aşama olan kesikli anaerobik reaktör deneyleri;

İlk organik karbon kaynağının melas olduğu iki-aşamalı (Metanojenesis-fotofermantasyon) sistemde, **melasla** kurulan kesikli anaerobik reaktör çalışmasında;

- En yüksek metan verimi (311,4 mL CH_4/g $\dot{C}KOI$ ($35^\circ C$); **12,3±0,5 mmol CH_4/g $\dot{C}KOI$**) ve metan üretim hızı (**4 mL $CH_4/L.saat$; 0,158 mmol $CH_4/L.saat$**), S/X_o değerinin 0,5 g KOI/g UAKM olduğu reaktörde elde edilmiştir.
 - Glikozla kurulan kesikli anaerobik reaktör deneylerinde en yüksek metan üretim verimi 267 ± 13 mL CH_4/g $\dot{C}KOI$ ($35^\circ C$) olarak elde edilmişti. Bu karşılaştırma, karbon kaynağının gaz üretim veriminde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir.
 - Melas çeşitli mikro- ve makro-nütriyentler içermesi ve doğal olması sebebiyle anaerobik mikroorganizmalar için daha uygun bir besin kaynağıdır.
- S/X_o oranı, 0,5'den 2,5'e arttırıldıkça üretilen toplam metan miktarı, üretim verimi ve hızı düşmektedir.
- Bu ardışık dizin anaerobik çürütme - fotofermantasyon ikilisine yönelik ilk araştırma olma niteliği taşımaktadır.

Üç-aşamalı ve iki-aşamalı sistemlerdeki anaerobik reaktörler karşılaştırıldığında, iki-aşamalı sistemde direk melas; üç-aşamalı sistemdeki anaerobik reaktörlerde ise karanlık fermantasyon çalışması sonrasında hidrolize edilmiş melas suyunun kullanıldığı görülmektedir. Bu iki deney setinin performans karşılaştırması, karanlık fermantasyon gibi bir ön aşamayla, melasın anaerobik çürütülebilirliğinin etkileyici şekilde arttığını göstermiştir.

Karanlık fermantasyon ön aşaması sayesinde, takip eden anaerobik (metanojenesis) reaktörde,

- Metan üretim hızı 3 kat; verimi ise 1,24 kat artmıştır.
 - Metan üretim hızı 4 mL CH₄/L.saat'ten 12 mL CH₄/L.saat'e artmıştır.
 - Metan üretim verimi, 12,3±0,5 mmol CH₄/g çKOİ'den 15 mmol CH₄/g çKOİ'ye artmıştır.
- Biyogazdaki metan gazı yüzdesi %83 gibi oldukça yüksek değerlere ulaşmıştır.

Üç-aşamalı sistemde, 3.aşama olan kesikli fotofermantasyon reaktör deneyleri;

İlk organik karbon kaynağının melas olduğu üç-aşamalı (karanlık fermantasyon-metanojenesis-fotofermantasyon) sistemde, kesikli anaerobik reaktör çıkış suyu ile beslenen kesikli fotofermantasyon çalışmasında;

- Kesikli anaerobik reaktör çıkış suyunda yeterli miktarda UYA türü (HAc, HPr ve HBU) ve derişimi olmaması sonucu, herhangi bir H₂ üretimi ve mikrobiyel büyüme gerçekleşmemiştir.
- Giriş suyunda (anaerobik reaktör çıkış suyu), KOİ kaynağı olan diğer organik karbonlar, *R.Capsulatus* için hidrojen üretiminde ve mikrobiyel büyümede kullanılmamıştır.

İki-aşamalı sistemde, 2.aşama olan kesikli fotofermantasyon reaktör deneyleri;

İlk organik karbon kaynağının melas olduğu iki-aşamalı (Metanojenesis-fotofermantasyon) sistemde, kesikli anaerobik reaktör çıkış suyu ile beslenen kesikli fotofermantasyon çalışmasında;

- Kesikli anaerobik reaktör çıkış suyunda yeterli miktarda UYA türü (HAc, HPr ve HBU) ve derişimi olmaması sonucu, herhangi bir H₂ üretimi ve mikrobiyel büyüme gerçekleşmemiştir.
- Giriş suyunda (anaerobik reaktör çıkış suyu), KOİ kaynağı olan diğer organik karbonlar, *R.Capsulatus* için hidrojen üretiminde ve mikrobiyel büyümede kullanılmamıştır.
- Yüksek UYA ve TAN derişimi varlığında, olası yüksek TAN derişimi veya PHB üretimi kaynaklı hidrojen üretiminde düşüş-inhibisyon gözlemlenebilir. TAN derişimi analiz edilmeli ve fotofermantasyon öncesi ön işlemler yapılarak derişimi azaltılmalıdır.
- Bu ardışık dizin anaerobik çürütme - fotofermantasyon ikilisine yönelik ilk araştırma olma niteliği taşımaktadır. Burada elde edilen sonuçlar, İş Paketi 3 ve 4'de başarıyla uygulanmış ve metanojenesis sistemini takiben fotofermantasyon reaktörleri başarı ile işletilmiştir.

Bu sonuçlardan, üç-aşamalı (veya iki-aşamalı) sistemlerde fotofermantasyon sisteminin anaerobik (metanojenesis) reaktörü takiben kurulamayacağı çıkarımı yapılmamalıdır. Anaerobik reaktör çıkış suyu ile fotofermantasyon reaktörlerinin kurulumu ve hidrojen üretimi, uygun anaerobik inkübasyon süresi ile sağlanabilir. Anaerobik reaktörlerin, UYA'nın tüketimini engelleyecek şekilde, daha kısa sürelerde inkübe edilmesi, ardışık fotofermantasyon için uygun tür ve miktarda UYA teminini sağlayacaktır. Nitekim Bölüm 4 ve 5'de belirtildiği üzere, bu iş paketinde elde edilen çıkarımlar, İş Paketi 3 ve 4'de başarıyla uygulanmış ve metanojenesis sistemini takiben fotofermantasyon reaktörleri işletilebilmiştir.

Üç-aşamalı ve İki-aşamalı sistemlerden elde edilen toplam enerji verimleri

İlk aşamada melasın organik karbon olarak kullanıldığı İş Paketi 6 kapsamında yapılan çalışmalarda, 2 farklı reaktör entegrasyonu oluşturulabilmektedir. Entegrasyonu yapılan sistem kombinasyonları şu şekildedir;

1. Üç-aşamalı Kesikli karanlık fermantasyon + Kesikli metanojenesis (anaerobik) + Kesikli fotofermantasyon sistemi
2. İki-aşamalı Kesikli metanojenesis (anaerobik) + Kesikli fotofermantasyon sistemi

Bunlara ek olarak, tek-aşamalı kesikli metanojenesis (anaerobik) sisteminin, iki-aşamalı Kesikli karanlık fermantasyon + Kesikli metanojenesis (anaerobik) sistemi ile karşılaştırması; dolayısıyla, karanlık fermantasyonun metan üretimine etkisi de belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, melasın metanojenesis öncesinde, ön aşama olarak karanlık fermantasyona tabi tutulmasının, tek aşamalı metanojenesise kıyasla çok daha avantajlı olduğunu göstermiştir. Buna göre, iki-aşamalı (kesikli karanlık fermantasyon + kesikli metanojenesis) sistemde, tek aşamalı metanojenesise kıyasla, metan üretim hızı 3 kat, verimi ise 1,24 kat arttırılabilmektedir.

İş Paketi 6'da, melasın ilk karbon kaynağı olarak kullanıldığı üç-aşamalı reaktör konfigürasyonundan elde edilen toplam H₂ ve CH₄ üretimi / verimi ve toplam enerji üretiminin araştırılması planlanmıştır. Fakat, yukarıda bahsedildiği üzere, metanojenesis çıkış suyu ile fotofermantatif hidrojen üretimi gerçekleştirilememiştir. Dolayısıyla, üç-aşamalı sistemden elde edilen toplam enerji verimi hesaplanamamıştır. Buna ek olarak, bu iş paketinde, toplam enerji üretiminin maksimizasyonunun sağlandığı koşulların, üç-aşamalı sistemde melas ile işletilen karanlık fermantasyonun optimum başlangıç koşulları olarak belirlenmesi planlanmıştır. Fakat, fotofermantasyon gerçekleşmediği için, üç-aşamalı sistemde yer alacak karanlık fermantasyonun optimum koşulları tanımlanamamıştır. Karanlık fermantasyonun optimum koşulu olarak, ilk iki aşamanın toplam enerji veriminin maksimum olduğu dizini baz

almak da doğru bir yaklaşım olmayacaktır. Bilindiği üzere, hidrojenin ısı enerji değeri, metanın neredeyse 3 katına eşittir. Metan üretiminden fotofermantasyona aktarılacak karbon kaynağı, 3.aşama olan fotofermantasyonda daha yüksek enerji eldesine yol açabilir. Nitekim projenin iş-zaman çizelgesine göre İş Paketi 6'dan daha sonra gerçekleştirilen İş Paketi 4 sonuçlarına bakıldığında (Bölüm 5.4), aynı çıkarımın gözlendiği saptanmıştır. Dolayısıyla, üç-aşamalı sistemde, karanlık fermantasyon için optimum koşulların belirlenebilmesi için fotofermantasyon aşamasının da bulunması gerekmektedir.

Kesikli karanlık fermantasyonda en yüksek verim ve hızın sağlandığı koşullar, üç-aşamalı sistemde takip eden her aşama için en yüksek verim / hız değerine yol açmayabilir. Tablo 7.18'de, ilk iki aşamanın (karanlık fermantasyon ve çıkış suları ile kurulan metanojenesis) en yüksek metan / hidrojen üretim verimi ve hızının sağlandığı reaktör tipleri (işletim koşulları) verilmiştir.

Tablo 7.18. Melasla kurulan üç-aşamalı kesikli reaktör sisteminde, en yüksek verim ve hızın elde edildiği koşulların karşılaştırması

Parametre	En yüksek değerlerin elde edildiği başlangıç koşulları ^a			
	1.AŞAMA: Karanlık fermantasyon		2.AŞAMA: Metanojenesis	
Üretim hızı	0,37 mmol/L.saat	KOİ=10 g/L, X _o =7,5 g/L, pH=5,5	0,475 mmol CH ₄ /L.saat	KOİ=50 g/L, X _o =5 g/L, pH=7 ve KOİ=50 g/L, X _o =7,5 g/L, pH=5,5
Üretim verimi	2,88 mmol H ₂ /g KOİ _{eklenen}	KOİ=10 g/L, X _o =5 g/L, pH=4,0	15 mmol CH ₄ /g çKOİ _{eklenen}	KOİ=30 g/L, X _o =7500, pH=7

^a Üç-aşamalı ardışık bir sistem olduğu için, koşullar ilk aşama olan karanlık fermantasyon reaktör çeşitlerine göre adlandırılmıştır.

Tablo 7.18'de görüldüğü ve beklenildiği üzere, karanlık fermantasyonda en yüksek verim veya hızın elde edildiği koşullar, anaerobik aşamada en yüksek üretim verim veya hızının elde edildiği koşullarla aynı değildir. En yüksek verim veya hızın elde edildiği başlangıç KOİ değeri, karanlık fermantasyonda 10 g/L KOİ iken, bu değer metanojenesis için metan verimi baz alındığında 30 g/L KOİ, hız baz alındığında ise 50 g/L'ye çıkmaktadır. Karanlık fermantasyonda, yüksek KOİ değerleri hızlı UYA / H₂ oluşumu ve fermantasyonun

inhibisyonuna yol açabilir. Karanlık fermantasyonun inhibisyonu, yüksek ısıl enerji değerine sahip hidrojenin üretimini, dolayısıyla üç-aşamalı sistemi daha ilk aşamadan olumsuz etkileyecektir. Dolayısıyla, karanlık fermantasyonu olumsuz etkilemeyecek koşullar, İş Paketi 7'de melasla işletilecek AKR-karanlık fermantasyon sistemi için de esas alınmalıdır. Kesikli karanlık fermantasyon sisteminde en yüksek hız veya verimin elde edildiği reaktörlerin çıkış suyu ile kurulan metanojenesis sistemleri incelendiğinde, her iki anaerobik reaktörde de aynı verim ($9 \text{ mmol CH}_4/\text{g çKOİ}$) ve hız ($0,08 \text{ mmol CH}_4/\text{L.saat}$) eldesi gözlenmiştir (Tablo 7.11, Tablo 7.13). Karanlık fermantasyonda, limitleyici noktanın hızdan ziyade verim olduğu dikkate alınır, İş Paketi 7'de melasla kurulacak AKR-karanlık fermantasyon sistemi için, kesikli sistemde yüksek verim sağlayan KOİ (10 g/L) ve UAKM (5 g/L) değerlerinin baz alınmasına karar verilmiştir. Bu sonuçlar, sukrozla kurulan AKR-karanlık fermantasyon sistemi başlangıç koşulları ile de uyumludur.

İş Paketi 6'da, ek olarak, melasın ilk karbon kaynağı olarak kullanıldığı iki-aşamalı metanojenesis + fotofermantasyon sisteminin araştırılması planlanmıştır. Fakat, yukarıda bahsedildiği üzere, melasla kurulan metanojenesis çıkış suyu ile de fotofermantatif hidrojen üretimi gerçekleştirilememiştir. Dolayısıyla, iki-aşamalı sistemden elde edilen toplam enerji verimi hesaplanamamıştır. Yine de, iki-aşamalı metanojenesis + fotofermantasyon sisteminin ilk olarak bu iş paketinde araştırılmış olması, iş-zaman çizelgesine göre daha sonra gerçekleşen İş Paketi 4 ve ayrıca İş Paketi 3 için yol haritasının çıkarılmasını sağlamıştır.

8. ÜÇ-AŞAMALI SİSTEMDE MELASLA KARANLIK FERMANTASYONUN OPTİMİZASYONU

Proje önerisinin 7.İş Paketi (İP 7) kapsamında yapılması hedeflenen çalışmalar aşağıda sunulmuştur;

- Bir AKR kurularak karanlık fermentasyon çalışmasının yapılması
 - Bu AKR'nin, İş Paketi 6'da melasla işletilen kesikli karanlık fermentasyon ve İş Paketi 3'de sukrozla işletilen AKR-Karanlık fermentasyon deneyleri sonuçlarına göre, belirlenen optimum koşullarda (başlangıç KOİ, UAKM, HBS, KBS, vb.) işletilmesi
 - AKR'nin farklı HBS değerlerine tabi tutulması ve HBS'nin (ya da farklı organik yükleme hızlarının) karanlık fermentasyona etkisinin araştırılması
 - Her HBS değerinde kararlı koşullar oluştuğunda çıkış sularının toplanması ve takip eden diğer reaktör aşamaları için -20°C 'de saklanması
- Her HBS'de ayrılan karanlık fermentasyon çıkış sularının, öncelikle, kesikli anaerobik (metanojenesis) reaktörlerde besin olarak kullanılması yoluyla, metan üretim veriminin araştırılması
- Kesikli metanojenesis reaktörlerinin çıkış sularının, kesikli fotofermentasyon reaktörlerinde besin olarak kullanılması ve hidrojen üretim veriminin araştırılması

Yukarıda bahsedilen üç-aşamalı sistem ile maksimum enerji üretiminin (veya sonuçlara göre H_2/CH_4 veriminin) elde edildiği koşullar, orijinal karbon kaynağı melasla işletilen AKR-Karanlık fermentasyon sistemi için optimum işletim koşulları olarak tanımlanmıştır. Böylelikle, işletim koşullarının ardışık olarak üç-aşamaya ve tüm aşamalardan elde edilen toplam metan ve hidrojen üretimine (toplam enerji verimine) etkisi belirlenmiştir.

8.1 Gereç ve Yöntem

8.1.1 Mikrobiyel Kültür

8.1.1.1 Karanlık Fermantasyon Kültürü

AKR Karanlık fermentasyon deneyleri için Ankara Atıksu Arıtma Tesisi Anaerobik Çürütme Tankı çıkışından karışık anaerobik çamur (mikroorganizma kültürü) alınmıştır. Bu çamurun ortalama AKM ve UAKM derişimleri sırasıyla 40644 ± 1002 ve 9108 ± 890 mg/L'dir. Anaerobik çamur ön işleme tabi tutularak 1 saat 105°C 'de ısıl işlem uygulanmıştır (Ozkan vd., 2010). Bu sayede, hidrojen üreten asidojenik bakterilerin seçilmesi ve üretilecek hidrojeni tüketebilecek hidrojenetrofik metanojenesis mikroorganizmalarının elimine edilmesi amaçlanmıştır.

8.1.1.2 Anaerobik Kültür-Metanojenesis

Kesikli anaerobik reaktörlerde, Ankara Tatlar Atıksu Arıtma Tesisi anaerobik çürütme tankından alınan karışık kültür kullanılmıştır. Kültüre herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. Deneylerde kullanılan karışık anaerobik kültürün AKM ve UAKM derişimleri sırasıyla 32267 ± 1097 ve 13217 ± 443 mg/L; pH değeri ise 8,5'dir.

8.1.1.3 Fotofermantasyon Kültürü

Fotofermantasyon deneylerinde ODTÜ Hidrojen Araştırma Laboratuvarı stoklarında bulunan mor-kükürtsüz bakteri türü olan *Rhodobacter capsulatus* (DSM 1710) kullanılmıştır. Bu bakteri, İş paketi 2'de de belirtildiği gibi (Bölüm 3.1.1.3), Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu-Leibniz DSMZ Enstitüsü'nden temin edilmiş olup, ODTÜ-Hidrojen Araştırma Laboratuvarı stoklarında -80°C 'de saklanmaktadır. Fotofermantasyon deneylerinde aşı kültürü olarak kullanılan *Rhodobacter capsulatus* (DSM 1710), Bölüm 3.1.1.3'de belirtilen protokole göre steril ortamda çoğaltılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

8.1.2 Deneysel Yöntem

8.1.2.1 Melasla İşletilen AKR-Karanlık Fermantasyon Deneyleri

İş Paketi 7'de kullanılan AKR düzeneği ve işletim prensibi, Bölüm 4.1.2'de sukrozla işletilen AKR-Karanlık fermentasyon düzeneğine benzerdir (Şekil 4.1). İş Paketi 3'de deneyimlenen işletim problemlerini (numune alma noktasındaki ve su-yer değiştirme cihazı bağlantılarındaki sorunlar, vb.) gidermek amacıyla, kontrolü daha kolay olabilecek daha küçük hacimde bir AKR tasarlanmış ve deneylerde kullanılmıştır. Bu bağlamda, bu çalışmada kullanılan AKR, 10 cm çap, 30 cm yükseklik ve 3 L iç hacme sahip silindir pleksiglas malzemedен yaptırılmıştır. AKR'nin toplam ve etkin hacmi sırasıyla 3 ve 2,3 L'dir.

Reaktör kurulumunda, İş Paketi 3'de edinilen ön bilgiler ve tecrübe doğrultusunda (Bölüm 4.2.1), reaktörün işletimi sırasında yaşanan aksaklıklar dikkate alınmış ve reaktörün çeşitli aksamaları yeniden tasarlanmıştır (pH probu, gaz vanaları, pH-stat düzeneği hortumlarının

değiştirilmesi gibi). Reaktör kabini, tek parça pleksi glass-üstü kendinden sıkıştırılmalı çelik kapaklı reaktör kabini ile değiştirilmiş; böylece oksijen sızıntısı ve gaz kaçağından meydana gelebilecek olası gaz kompozisyonu tutarsızlığının önüne geçilmiştir. Ayrıca pH-stat sisteminde kullanılan silikon hortumların çapı arttırılarak, pH'nın daha kısa sürede istenilen 5,5 değerine ulaşması ve sabitlenmesi sağlanmıştır.

AKR'nin işletimi, besleme, anaerobik periyot (karıştırma), çökme ve boşaltma olmak üzere 4 periyot içeren döngülerden oluşmaktadır. Besleme, anaerobik reaksiyon (karıştırma) ve boşaltma periyotları dijital zamanlayıcılarla otomatik olarak başlatılıp durdurulabilecek şekilde kontrol edilmiştir (Bölüm 4.2.1). Besin olarak, seyreltilmiş melas çözeltisi kullanılmıştır. Bu projede kullanılan melasın özellikleri İş Paketi 6'da Bölüm 7.1.2'de sunulmuştur (Tablo 7.1). Besleme periyodu sırasında seyreltilmiş ve pH'sı 5,5'e ayarlanmış melas çözeltisi pompa ile AKR'ye beslenmiştir. Giriş KOİ derişimi olarak, İş Paketi 6 (melasla kesikli reaktör, Bölüm 7.3) deney sonuçlarına göre 10 g/L KOİ_{toplam} esas alınmış; dolayısıyla OYH olarak 20,9 g KOİ/L.gün uygulanmıştır. Aynı şekilde, İş Paketi 6'dan (Bölüm 7.3) ve İş Paketi 3'den (Bölüm 4.3) edinilen bilgiler ışığında, reaktör içi başlangıç UAKM derişimi olarak 5 g/L uygulanmıştır.

İş Paketi 3'te (Bölüm 4.2.1 ve Bölüm 4.3), sukrozla işletilen AKR-Karanlık fermentasyon çalışmasında en yüksek H₂ üretim hızı / veriminin elde edildiği koşullar pH=5,5 ve HBS 12 saat olarak belirlenmişti. Bu bilgiler ışığında, ve kesikli sistemler ve ardışık-kesikli sistemler için optimum pH işletim koşullarının farklı olacağı ön bilgisi ile (Bölüm 4.3), İş Paketi 7 kapsamında işletilen AKR-Karanlık fermentasyon sistemi de, pH 5,5'de ve 12 saatlik HBS'de çalıştırılmıştır. AKR'de bir döngü süresi, araştırılması hedeflenen HBS (12 saat) değerine göre 8 saat olarak belirlenmiştir. Bu kapsamda, bir döngüde belirlenen periyot süreleri, 3 dakika besleme periyodu, 7,6 saat anaerobik periyot (ve karıştırma), 20 dakika çökme ve 2 dakika boşaltma olmak üzere 4 periyottan oluşmaktadır.

Bu bölümün giriş kısmında belirtildiği üzere, proje önerisinde, AKR-Karanlık fermentasyon sistemi için uygun HBS değerinin belirlenmesi amaçlanmıştı. Fakat İş Paketi 3'de (Bölüm 4.2.1 ve Bölüm 4.3), sukrozla işletilen AKR-Karanlık fermentasyon çalışmasında, optimum HBS değerinden ziyade, KBS parametresinin de önemi ortaya çıkmıştır. Özellikle, homoasetojenesisin ve metanojenesisin olası etkisini azaltmak için araştırılması gereken ve sistemin üretim kapasitesini ve kararlılığını etkileyen önemli bir parametrenin KBS olduğu belirlenmiştir. Görece kısa (3-5 gün aralığındaki) ve sabit bir şekilde uygulanan KBS değerlerinin sistemin kararlılığını ve hidrojen üretim verimini artırabileceği belirlenmiştir. İş Paketi 3 AKR-Karanlık fermentasyon çalışmasında, 5.İşletim sürecinde, KBS değerinin 4 güne ayarlanması planlanmıştı. Şekil 4.8'de görüleceği üzere, işletim süresince KBS 1-6

günler arasında salınım gösterirken ortalama 4,2 gün elde edilmiştir. KBS'nin sabitlenememesi, hızlı büyüme hızına sahip karanlık fermantasyon mikroorganizmalarının varlığının yanısıra, reaktörden çamur atılımındaki olası düzensizlikle ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak, İş Paketi 7'de AKR-Karanlık fermantasyon çalışması kapsamında, HBS'den ziyade KBS'nin araştırılmasına, sabitlenmesi için yöntemler geliştirilmesine ve sabit bir KBS değerinin hidrojen üretimine etkisinin araştırılmasına karar verilmiştir. Bu doğrultuda, İş Paketi 3 sonuçları ve literatür verileri doğrultusunda KBS değeri 3 gün olarak belirlenmiştir.

AKR işletme koşulları (KBS, çökme süresi gibi), hidrojen üretimini artırmak amacıyla süreç içerisinde iyileştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, AKR 3 defa yeni aşı çamuru ile aşılanarak yeniden kurulmuş ve 3 farklı işletim sürecine tabi tutulmuştur.

8.1.2.2 Üç-Aşamalı Sistemde; Melasla İşletilen AKR-Karanlık Fermantasyon Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Metanojenesis (Anaerobik) Reaktör Deneyleri

Bu çalışmada işletilen kesikli metanojenesis reaktörleri, üç-aşamalı sistemin enerji veriminin araştırılması için, karanlık fermentasyon ile fotofermentasyon reaktörlerinin arasındaki basamaktır (2.aşamadır). Reaktörlerin substrat kaynağı, melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon sistemi 3. işletim sürecinin (2.-4.günlerine ait) çıkış suyu, yani fermente edilmiş melastır. Çıkış suyu homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra karakterizasyonu belirlenmiş ve Tablo 8.1'de sunulmuştur.

Tablo 8.1. Kesikli metanojenesis deneyinde substrat olarak kullanılan AKR-karanlık fermentasyon sisteminin çıkış suyu özellikleri

Parametre	Değer
çKOİ (mg/L)	8628±312
TAN (mg/L NH ₄ -N)	8±0,2
Alkalinite (mg/L CaCO ₃)	2122± 68
pH	6,3
Asetik asit (mM)	24±0,2
Propionik asit (mM)	15±0,1
Bütirik asit (mM)	20±0,1
İso-bütirik asit (mM)	2±0,02
Toplam UYA (mM HAc)	51,4±0,1

Tek tip test reaktöründen oluşan bu çalışmada, 4 adet paralel test reaktörü kurulmuştur (Tablo 8.2). Kontrol ve şahit reaktörleri ikişer replikadan oluşmaktadır (Tablo 8.2). Dört test

reaktöründen iki tanesi, inkübasyon sürecinde aralıklarla sıvı numune alınarak yapılan UYA analizleri sonucunda, üçlü sistemin son basamağı olan fotofermentasyon reaktörlerine besin sağlamak amacıyla inkübasyondan çekilmiş ve içerikleri -20°C'de muhafaza edilmiştir. İlgili reaktörlerin inkübasyondan çekileceği zamana dair kriter, İş Paketi 3'te optimum fotofermentatif H₂ üretimi için ihtiyaç duyulan UYA derişimi (35 mM, >20 mM HAc) olmuştur. Diğer iki test reaktörü ise inkübasyona 14 gün devam ettirilerek AKR-karanlık fermentasyon ve metanojenesisin peş peşe gelmesiyle oluşan iki-aşamalı sistemin verimi de araştırılmıştır. Bu sayede, iki ve üç-aşamalı sistemler arasında enerji verimliliği açısından karşılaştırmalı yorum yapmak mümkün olacaktır. Ayrıca, İş Paketi 3'de optimum olarak belirtildiği üzere, S/X_o oranları tüm reaktörlerde "1" olarak kurgulanmıştır.

Tablo 8.2. Kesikli metanojenesis deneylerinde kullanılan reaktör tipleri ve özellikleri

Reaktör Tipi	S/X _o (g KOI / g UAKM)	Substrat kaynağı ^a	Reaktör içi çKOI derişimi (g/L)	Başlangıç pH
Test 1	1	Süzülmüş KF çıkış suyu	5,2	7,3
Test 2	1	Süzülmüş KF çıkış suyu	5,2	7,3
Test 3	1	Süzülmüş KF çıkış suyu	5,2	7,3
Test 4	1	Süzülmüş KF çıkış suyu	5,2	7,3
Şahit	-	Süzülmüş KF çıkış suyu	5,2	7,3
Kontrol	-	-	-	7,3

^a KF: karanlık fermentasyon

Reaktörlerin gaz üretimi ve gaz içeriği günlük olarak ölçülmüştür. Inkübasyon sırasında reaktörlerden her gün UYA analizi için sıvı numune alınmıştır. Böylelikle, üç-aşamalı sistemin 3.aşaması için, diğer bir deyişle, metanojenesis reaktörlerinin ardışık reaktörlerini oluşturacak fotofermentasyon deneyleri için, anaerobik reaktörlerin çıkış suyu UYA içeriği ve zamana karşı değişimi araştırılmıştır.

Deneyler, 250 mL toplam ve 198 mL etkin hacme sahip kesikli modda işletilen cam reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Karanlık fermentasyon çıkış suyu öncelikle 8000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve ardından filtre kağıtlarından (0,7 µm) süzölmüştür. Reaktörlere çeşitli mikro-makro nutriyent içeren herhangi bir besiyer eklenmemiştir. İş Paketi 6'da ek olarak gerçekleştirilen iki-aşamalı sistemin metanojenesis sonuçları (Bölüm 7.3) ve Park vd. (2011)'in çalışmasının gösterdiği üzere, fermente edilmiş melas anaerobik mikroorganizmalar açısından metan üretimi için gerekli besiyer çözeltileri içermektedir.

Test reaktörlerinde başlangıç pH değerini 7-7,5 değerine aralığına getirebilmek için 1 N NaOH çözeltisi kullanılmıştır. Reaktörlerin tepe gazları, N₂ gazı ile 4 dakika uçurularak oksijenin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Reaktörler 125 rpm'de çalıştırılan sallayıcıda ve 35±2°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir.

8.1.2.3 Melasla Üç-Aşamalı Sistemde; Kesikli Metanojenesis Reaktör Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyleri

İş Paketi 7 kapsamında yapılan bu çalışmanın amacı, orijinal karbon kaynağı melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon sistemi çıkış suyuyla kurulan kesikli metanojenesis çıkış sularının takip eden kesikli fotofermantasyon reaktörlerine etkisini araştırmaktır. Bu sayede, üç-aşamalı sistemden elde edilebilecek toplam enerji verimi araştırılmıştır.

AKR-Karanlık fermantasyon çıkış suyu ile kurulan kesikli metanojenesis reaktörlerinin çıkış suyu, kesikli fotofermantasyon reaktörleri için giriş suyu olarak kullanılmıştır. Bu kapsamda, kesikli metanojenesis reaktörlerden Test 1 ve Test 4 olarak isimlendirilen reaktörler (Tablo 8.2) sırasıyla inkübasyon süreçlerinin 3. ve 4. gününde işletimden çekilmişler ve fotofermantasyon reaktörleri için iki farklı giriş suyu oluşturmuşlardır. Daha önce İş Paketi 3 kapsamında kesikli metanojenesis reaktör çıkış suyunda amonyum iyonu kaynaklı sorun gözlemlendiği belirtilmiştir. Bu nedenle, kurulum öncesi kesikli metanojenesis reaktörleri çıkış suyu amonyum iyonu derişimlerine bakılmıştır. Kesikli metanojenesis reaktör çıkışlarındaki (Test 1 ve Test 4) amonyum derişimleri 39,4±2,1 mg/L NH₄-N ve 32,2±1,6 mg/L NH₄-N olarak ölçülmüştür. Literatürde ise amonyum iyonu derişiminin 2 mM (36 mg/L NH₄ veya 28 mg/L NH₄-N) ve üzeri olduğu koşullarda fotofermantasyon reaktörlerinde hidrojen üretiminin durduğu belirtilmiştir (Akköse vd., 2009). Bu durumda daha önceki iş paketlerinde uygulanan ve proje önerisinde B planı olarak sunulan yöntemlerden havayla sıyırma yöntemiyle amonyak uçurulması yöntemi uygulanmıştır (EK-E). Bu yöntem sayesinde 39,4±2,1 mg/L NH₄-N ve 32,2±1,6 mg/L NH₄-N derişimlerine sahip kesikli metanojenesis reaktör çıkış sularındaki amonyum derişimleri limit değerinin altına düşürülerek kesikli fotofermantasyon deneyi kurulmuştur. Havayla sıyırma yöntemi sonrası fotofermantasyon giriş sularındaki amonyum iyonu derişimleri Tablo 8.3'de verilmiştir.

Özellikleri Tablo 8.3'de verilen, iki farklı kesikli anaerobik reaktör çıkış suları (Test 1 ve Test 4) kullanılarak 2 tekrarlı (aynı özellikte) kesikli fotofermantasyon reaktörleri kurulmuştur. Test 1 ve Test 4 suları ile kurulan reaktörlerin toplam ve etkin hacmi sırasıyla 55 ve 50 mL'dir. Her bir reaktöre homojen olarak karıştırıldıktan sonra süzölmüş (0,7 µm) ve otoklavlanmış çıkış suyu eklenmiştir. Reaktörlere, S/X₀ oranı 9,4 g KOİ/g UAKM sağlanacak şekilde *R.capsulatus* kültürü aşılantmıştır. İş Paketi 2'de (Bölüm 3.2.3.2) elde edilen

fotofermentasyon deneyi sonuçlarına göre, reaktörler, en yüksek hidrojen üretim hızını sağlayan 3955 lux ışık şiddetinde aydınlatılmış ve S/X_o 9,4 g KOİ/g UAKM oranı sağlanmıştır.

Tablo 8.3. Fotofermantasyon reaktörleri için kullanılan giriş sularının özellikleri

Parametreler	Değerler ^a	Değerler ^b
çKOİ (g/L)	1,4±0.2	1,1±0.2
TAN (mg/L NH ₄ -N)	3,7±1,5	3,2±1,2
pH	7,6	7,5
Asetik asit (mM)	14,8	6,7
Propionik asit (mM)	1	1,5
Bütirik asit (mM)	4,3	1,3
tUYA (mM HAc)	18,5	8,8

^a Test 1 metanojenesis reaktör çıkış sularının analiz değerleri
^b Test 4 metanojenesis reaktör çıkış sularının analiz değerleri

8.1.3 Analitik Yöntem

AKM, UAKM ve alkalinite ölçümleri Standart Metod'a göre gerçekleştirilmiştir (APHA, AWWA, WEF, 2005). çKOİ için, reaktörden alınan örnekler öncelikle Sartorius marka cam lifi filtrelerden (0,7 µm) süzölmüş; süzöntü örneklere EPA onaylı reaktör çürütme metodu uygulanarak çKOİ analizleri yapılmıştır (Hach Water Analysis Handbook, 1989).

Kesikli anaerobik reaktörlerde ve AKR'de üretilen tepe gazı hacmi su-yer değiştirme cihazı (water displacement device) ile ölçülmüştür (Johnson ve Young, 1983). AKR-Karanlık fermentasyon sisteminde tepe gazı kompozisyonu, TCD ile donatılı olan GC (Thermo Scientific Co.) ünitesinde analiz edilmiştir. Birbirine seri bağlı iki kolonda metan (CH₄), azot (N₂), karbondioksit (CO₂), oksijen (O₂) ve hidrojen (H₂) ayrıştırılabilmektedir. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmış; enjektör sıcaklığı 50°C, detektör sıcaklığı 80°C, fırın sıcaklığı ise 35°C'da sabit tutulmuştur. Gaz numunelerinin kompozisyonu standart gaz karışım tüplerinden alınan gaz kompozisyonu ile hazırlanan kalibrasyon grafiklerine göre hesaplanmıştır (Şekil EK-F1).

Fotofermentasyon deneylerinde üretilen toplam gaz hacmi ise her reaktör için ayrı yaptırılmış olan gaz toplama tüplerine deney süresi boyunca biriktirilerek hesaplanmıştır. Fotofermentasyon reaktörlerinde tepe gazı kompozisyonu, TCD ve Supelco Carboxen 1010 kolonu ile donatılı olan GC (Agilent Technologies 6890N) ünitesinde yapılmıştır. Taşıyıcı gaz

olarak Argon (26 mL/dakika akış) kullanılmıştır. Enjektör sıcaklığı 160°C, detektör sıcaklığı 170°C, fırın sıcaklığı ise 140°C'dir.

UYA kompozisyonu ve derişimleri refractive index detektörü kullanan HPLC (SHIMADZU 20A) cihazı ile 10 µL numune kullanılarak ölçülmüştür. Buna göre, laktik, formik, asetik, propiyonik, izo-bütirik, bütirik ve izo-valerik asitleri analiz edilmiştir. HPLC çalışma protokolü şu şekildedir; fırın sıcaklığı 66°C; mobil faz HPLC kalitesinde 0,085 M'de sülfürik asit çözeltisi; akış hızı 0,4 mL/dakika. Numunelerdeki UYA derişimleri, standart asit karışım solüsyonu ile hazırlanan kalibrasyon grafiklerine göre hesaplanmıştır (Şekil EK-A3). Toplam UYA (tUYA) derişimi için, her bir asit derişimi moleküler ağırlığına bölünerek ve asetik asidin moleküler ağırlığıyla çarpılmaktadır. Tüm asitlerin, asetik asit (HAc) cinsinden eşdeğer derişimlerinin toplamı tUYA derişimini vermektedir (Yılmaz ve Demirer, 2008).

AKR-Karanlık fermentasyon sisteminde pH kontrolü pH-stat ünitesi (pH kontrol ünitesi, Eutech) ile yapılmıştır. Bu ünite baz olarak 2 M NaOH ve 2 M HCl çözeltisi kullanılmıştır. Karanlık fermentasyon deneylerinde elde edilen tüm sonuç şekillerinde sunulan pH değeri, bir döngünün reaksiyon (anaerobik) periyodu sırasında alınan tüm ölçümlerin ortalamasıdır.

Fotofermentasyon reaktörlerinden alınan örneklerin optik yoğunluk ölçümleri 660 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu UV-1201) gerçekleştirilmiştir. Ölçülen her bir optik yoğunluk için kuru kütle ağırlığı hesaplanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve reaktörlerde zamana karşı UAKM derişimi izlenmiştir (Şekil EK-A1, EK-A).

Moleküler analizler, sürekli reaktörlerden alınan numuneler için gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, AKR-karanlık fermentasyon reaktöründen, başlangıç aşısı çamuru ve işletim süresince belirli aralıklarla ya da sistemde belirgin bir değişim gözlemlendiği durumlarda çamur örnekleri alınmıştır; numuneler -20°C'de saklanmıştır. Moleküler analizler (DNA izolasyonu, PCR-DGGE analizleri) ve sonuçları İş Paketi 8 kapsamında yer almaktadır. Dolayısıyla, AKR-Karanlık fermentasyon çalışmasına ait moleküler analiz sonuçları Bölüm 9'da sunulmuştur.

8.2 Bulgular ve Tartışma

8.2.1 Melasla İşletilen AKR-Karanlık Fermantasyon Deneyi Sonuçları

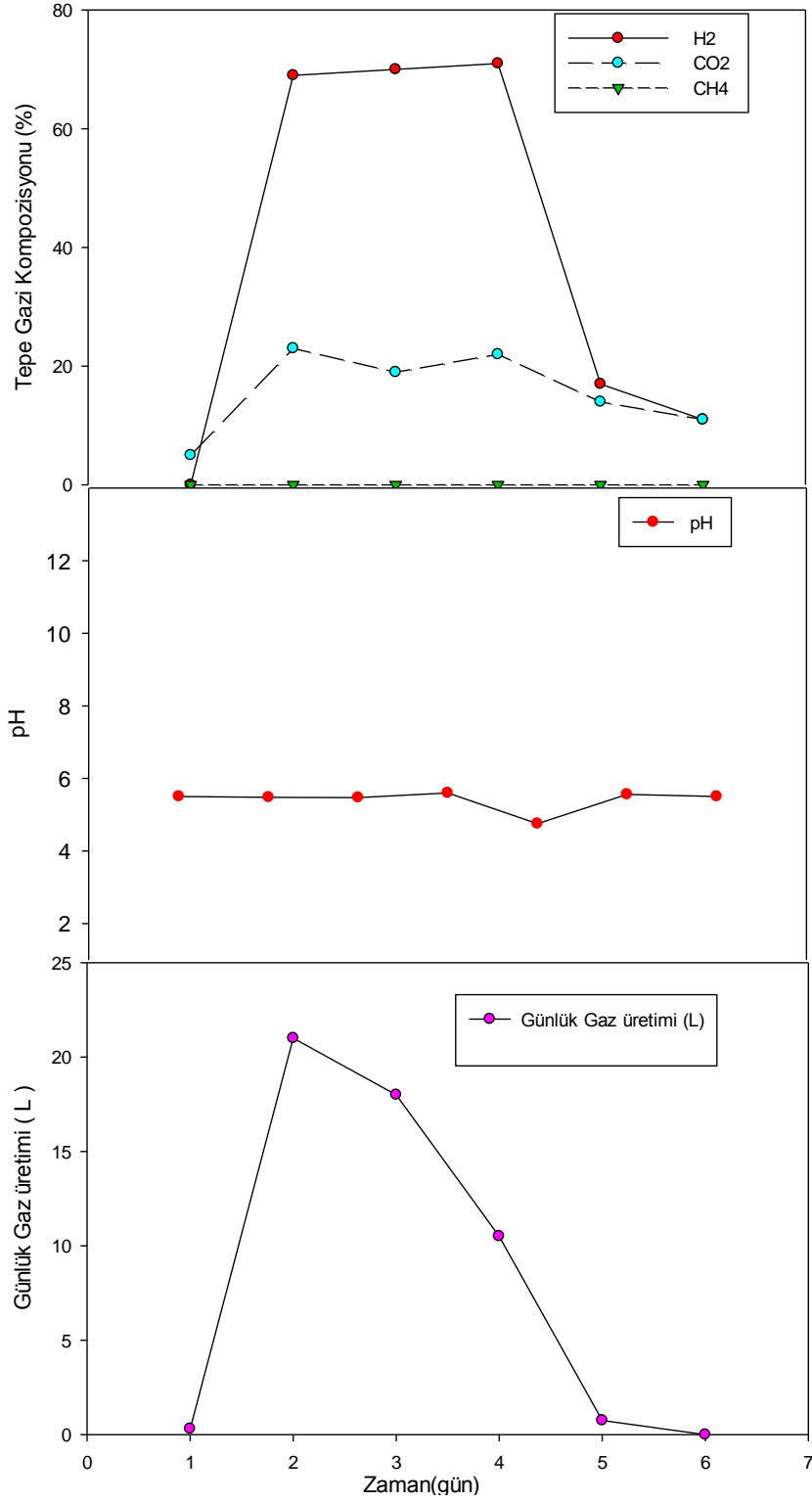
Orijinal karbon kaynağı melasla yapılan AKR-Karanlık fermentasyon çalışmaları 3 farklı işletim sürecinden oluşmaktadır. Diğer bir deyişle, AKR 3 defa yeni aşısı çamuru ile aşılansak,

yeniden kurulmuş ve belirli bir süre işletilmiştir. Her işletim sürecinde, hidrojen üretiminin artırılması ve bu bağlamda, işletim koşullarının (KBS, dolayısıyla çökme süresi gibi) hidrojen üretim verimini artıracak şekilde iyileştirilmesi hedeflenmiştir. Bu bölümde, 3 farklı işletim süreci ve elde edilen sonuçlar sunulmuştur.

1.İŞLETİM SÜRECİ: KBS_{teorik} : 3 gün, Çökme süresi: 20 dk

İlk AKR çalışması olan bu işletim sürecinde, KBS'nin 3 günde sabitlenmesi amacıyla, öncelikle çökme süresinin 20 dakikaya ayarlanmasına karar verilmiştir. İş Paketi 3 kapsamında yapılan AKR-Karanlık Fermantasyon deneylerinde (Bölüm 4.2.1), aynı HBS (12 saat) ve döngü süresi (8 saat), fakat çökme süresi olarak 40-72 dakika uygulanmıştı. Bu deneylerde, daha önce belirtildiği üzere, mikroorganizmaların yüksek büyüme hızları ve reaktör içi çamurun etkin atılamaması sebebiyle, KBS istenilen değerlerde etkin bir şekilde sabitlenememişti. Bu doğrultuda, 20 dakikalık çökme süresi sayesinde, gün içinde gerçekleşen 3 döngüde de çamur atımının eşit şekilde gerçekleşeceği öngörüsü ile ilk olarak 20 dakikalık çökme süresinin etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar Şekil 8.1 ve Tablo 8.4'de sunulmuştur.

Şekil 8.1b'de görüldüğü üzere, pH tüm döngülerde 5,5 değerinde seyretmiştir. Şekil 8.1a'da görüldüğü üzere, AKR H₂ tepegazı yüzdesi, projenin bu aşamasına kadar daha önce gözlenmemiş bir yüzdeye; %70'e ulaşmıştır. Böylesine yüksek bir H₂ gazı yüzdesi, melasın içeriğinde yer alan olası yerel mikroorganizmalar ve melasın yüksek nütriyent içeriği ile ilişkilendirilmiştir. Yüksek hızda hidrojen gazı üretimi (2.gün itibariyle) ve pik H₂ yüzdesi 2-3 gün devam ettikten sonra, İş Paketi 3'de de gözlemlendiği gibi, hidrojen üretim olumsuz etkilenmiş ve hatta gaz üretimi tamamıyla sona ermiştir (Şekil 8.1a, 8.1c). İşletimin 4.gününü takiben gözlenen düşük hidrojen yüzdesi (%10), hidrojenin homoasetojenesis gibi bir reaksiyonla tüketiminden ziyade; AKR'nin işletim prensibi sonucu tepegazının döngü sonunda N₂ gazı ile yıkanması kaynaklıdır. Dolayısıyla, düşük hidrojen gazı üretimi koşullarında (5.gün), tepegazı H₂ yüzdesi de düşük kaydedilmiştir. Sonuç olarak, çok yüksek hidrojen yüzdesi ve üretiminin, 4.gün sonunda, hem hidrojen üreticileri hem de sukrozla işletilen AKR-karanlık fermantasyon çalışmasında (İş Paketi 3) genelde gözlemlenen homoasetojenesis ve metanojenesis de inhibe ettiği düşünülmüştür.



Şekil 8.1. AKR-Karanlık fermantasyon I.İşletim sürecinde, a) Tepe gazı kompozisyonu, b) Ortalama pH, c) Günlük gaz üretimi değerlerinin zamana göre değişimi (HBS: 12 saat; Döngü süresi: 8 saat; OYH: 20,9 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 10 g/L; ortalama KBS: 1,8 gün; T: 35°C, pH: 5,5, çökme süresi: 20 dakika)

Tablo 8.4. Melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin 1. ve 3. işletim süreçlerine ait hidrojen üretim verimleri ve hızları

AKR İşletim süreci no	İşletim günü	Verim ^a			Üretim hızı (mol H ₂ /L.gün)
		(mmol H ₂ /g KOİ)	(g H ₂ /g heksoz)	(mol H ₂ /mol heksoz)	
1	1	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	8,43	0,018	1,62	0,25
	3	7,02	0,015	1,35	0,21
	4	4,21	0,009	0,81	0,13
	5	0,05	0,00	0,01	0,00
	6	-	-	-	-
3	1	0,00	0,00	0,00	0,0
	2	3,56	0,008	0,69	0,11
	3	6,02	0,013	1,16	0,18
	4	5,50	0,012	1,06	0,16
	5	0,11	0,00	0,02	0,00
	6	0,00	0,00	0,00	0,00

^a 1 g heksoz: 1,07 g KOİ eşleniği esas alınarak hesaplanmıştır. Hesaplarda kullanılan KOİ, eklenen toplam KOİ bazındadır.

İşletim, Şekil 8.1'de gözlendiği üzere, 6 gün sürmüştür. İşletimin 5.günü takiben gaz üretimi tamamen durmuştur. Gaz üretimi sonlandığı için, reaktör işletimi sonlandırılmıştır. Gaz üretiminin sonlanmasına bir etken olarak, yukarıda bahsedildiği üzere, yüksek hidrojen yüzdeleri ve H₂ kaynaklı inhibisyon sunulabilir. Diğer bir sebep ise, hidrojen üreticilerin reaktörden atılmış olması olabilir. İşletim süresince reaktör içi UAKM derişimin ciddi şekilde azaldığı tespit edilmiştir (veriler sunulmamıştır). Bundaki başlıca etmen, çökme süresi olarak 20 dakikanın uygulanmış olmasıdır; henüz AKR işletimine adapte olmamış ve yeterli miktara büyümemiş mikroorganizmalar işletimin başlamasını takiben, daha çökmeden reaktörden atılmış olabilir. Nitekim, bu işletim sürecinde, 20 dakikalık çökme süresi etkisi ile, ortalama KBS'nin 1,8 güne düştüğü tespit edilmiştir. Yaklaşık 2 günlük bir KBS uygulaması karanlık fermantasyon mikroorganizmalarının sistemden atılmasına yol açmıştır. Dolayısıyla, bir sonraki işletim sürecinde, KBS değeri yine 3 günde tutulurken, çökme süresi olarak her döngüde 40 dakika etkin şekilde uygulanacaktır.

Yüksek H₂ yüzdesi kaynaklı olası inhibisyona rağmen, melasla işletilen AKR-karanlık fermantasyon sisteminin 1. işletme sürecinde, İş Paketi 3'de sukrozla kurulan AKR-karanlık fermantasyon sisteminin optimum koşullarında elde edilen verim-hız değerlerine yakın değerler elde edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen 1,62 mol H₂/mol heksoz değeri (8,43 mmol H₂/g KOİ) değeri, Bölüm 4.2.1'de, üç-aşamalı sistem için optimum işletme koşulunda

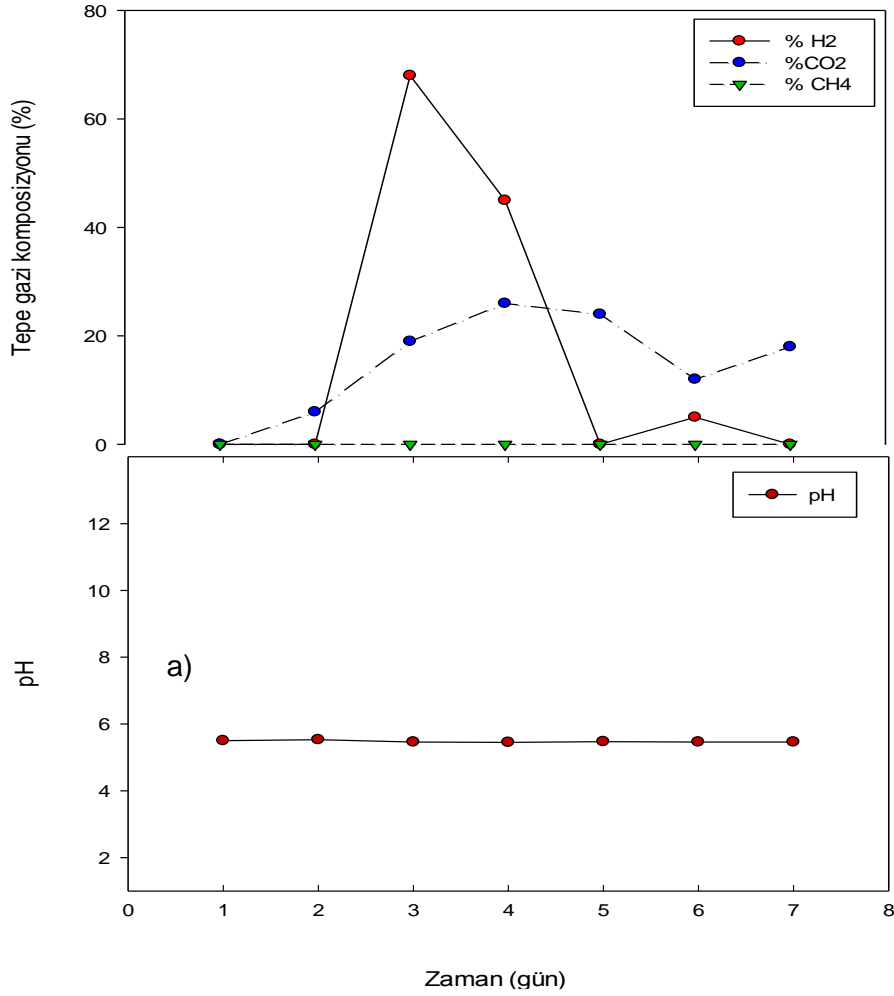
(5.ışletme süreci) elde edilen 1,66 mol mol H₂/mol heksoz verim değerine oldukça yakındır. Bu çalışmada elde edilen hidrojen üretim hızı da, 0,25 mol H₂/L.gün değeri ile sukrozla ışletilen AKR-Karanlık fermantasyon sistemi 5.ışletim süreci hız değerine (0,28 mol H₂/L.gün) değerine oldukça yakındır.

2.İŞLETİM SÜRECİ: KBS: 3 gün, Çökme süresi: 40 dk

2.İşletim sürecinde, 1.İşletim sürecinin aynı ışletim koşulları uygulanmış; sadece bir döngüdeki çökme süresi 40 dakikaya artırılarak çamur kaybının kontrol altına alınması amaçlanmıştır. Bu uygulamanın gün içindeki 3 döngü boyunca da kontrollü şekilde gerçekleşmesi sağlanmıştır. Bu ışletim sürecine ait deneysel veriler (pH değişimi, tepe gazı kompozisyonu) Şekil 8.2'de sunulmuştur.

Şekil 8.2a'da görüldüğü üzere, çökme süresinin 40 dakikaya artırıldığı 2.İşletim sürecinde de tepegazı hidrojen yüzdesi (3.günde) aniden %70'lere çıkmış; bunu takiben azalarak 5.günde sıfırlanmıştır. Bu ışletim sürecinde yaşanan teknik aksaklıklardan dolayı üretilen toplam gaz miktarı kayıt altına alınamamış; bu sebeple hidrojen üretim verim ve hız değerleri hesaplanmamıştır. Gaz toplama ünitesinde yaşanan kaçak sorunu çözülmüş, fakat bunu takiben boşaltma vanasında yaşanan sorun sebebiyle, besin taşmış ve mikroorganizma kaybı olmuştur. Bu nedenlerle, AKR-2.İşletim süreci durdurulmuştur.

Bu ışletim sürecinde sorun yaşanmış olsa da, özellikle gaz kompozisyonu bazında elde edilen deneysel çıkarımlar önemlidir. Şekil 8.2a'da görüldüğü üzere, bu ışletim sürecinde, her zaman gözlenenin aksine, hidrojenin ani üretimi (H₂ yüzdesinin aniden artışı) 3.gün itibariyle gerçekleşmiş; önceki iki günde ise hidrojen üretimi gerçekleşmemiştir. Buna ek olarak, ilk günlerde hidrojen üretilmezken, CO₂ üretimi (dolayısıyla olası alkol üretimi) gözlenmiştir. Bu durum ışletim süreçlerinin başında melastan hidrojen üretiminde bir aklimasyon sürecinin gerekli olabileceği fikrini doğurmuştur. Bu doğrultuda, bundan sonraki ışletimlerde, hidrojen üretimi gözlenmeden diğer döngü ve besleme süreçlerine geçilmesi yerine, reaktör aş çamuru ile aşılandıktan ve ilk besleme periyodundan sonra hidrojen gazı üretiminin beklenmesi planlanmıştır. İkinci beslemenin ancak hidrojen üretimi gerçekleştikten sonra yapılmasına karar verilmiştir.



Şekil 8.2. AKR-Karanlık fermantasyon 2.İşletim sürecinde, a) Tepe gazı kompozisyonu, b) Ortalama pH, değerlerinin zamana göre değişimi (HBS: 12 saat; Döngü süresi: 8 saat; OYH: 20,9 g KOİ/L.gün; (b) na giriş KOİ değeri 10 g/L; ortalama KBS: 3,1 gün; T: 35°C, pH: 5,5, çökme süresi: 40 dakika)

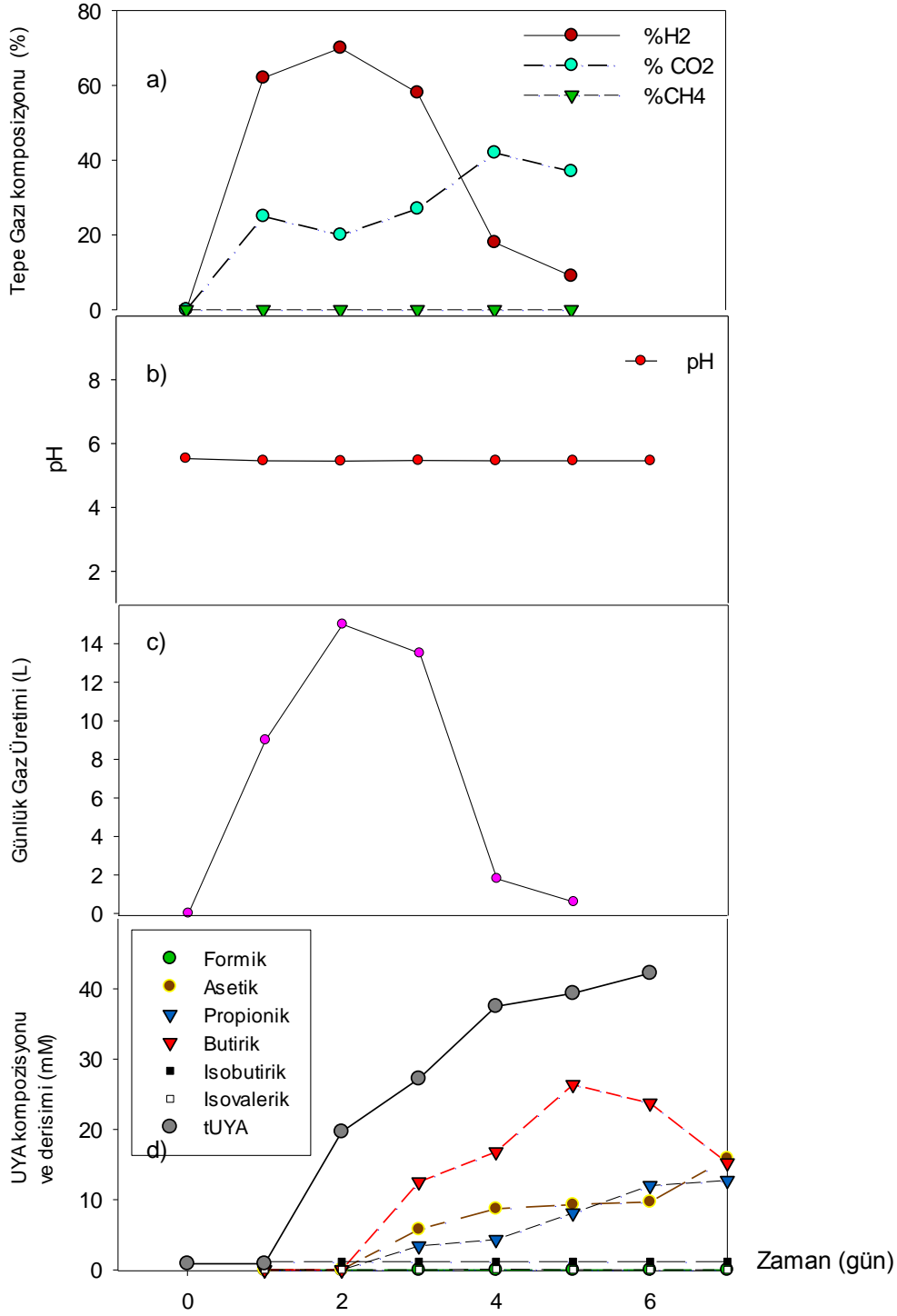
3.İŞLETİM SÜRECİ: KBS: 3 gün, Çökme süresi: 40 dk, Melas için aklımasyon

Bu işletim süreci, 2.İşletim sürecinin benzeri olup teknik aksaklıklar giderilerek yeniden uygulanmıştır. Ek olarak aşı çamurunun melasa aklımasyonu için, ilk besleme periyodu sonrası, gaz üretimi görülünceye kadar sisteme ikinci bir besleme yapılmamıştır. 3.İşletim sürecine ait tepe gazı kompozisyonu, pH değerleri, günlük gaz üretimi ve UYA derişimleri Şekil 8.3'de sunulmuştur. Günlük hidrojen üretim verim ve hız değerleri Tablo 8.4'de gösterilmiştir.

Şekil 8.3'da görüldüğü üzere, pH, %H₂ ve günlük gaz üretim miktarı gibi değerlerin 1-3.günler arasında kararlı bir tutum seyretmiştir. Önceki işletim süreçlerinde olduğu gibi, hidrojen yüzdesi %70'lere ulaşmış; işletimin 13.döngüsünü (4.gün) takiben hidrojen üretimi ve gaz üretimi eş zamanlı olarak azalarak tamamiyle sona ermiştir. Bu çalışmada reaktörün bütün döngüleri arasındaki senkronizasyonu anlamak için gün içinde değişik zamanlarda gaz analizleri yapılmış, hidrojenin üretim davranışı ve değişen tepe gazı kompozisyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Hidrojen üretiminin, çamurun yeni besinle karşılaştıktan sonraki 4 saat içinde maksimuma ulaştığı ve toplam gaz kompozisyonundaki değerlerin %70'e ulaştığı tespit edilmiştir.

Bu işletimde elde edilen en yüksek (maksimum) hidrojen üretim verimi ve hızı değerleri, sırasıyla, 1,16 mol H₂/mol heksoz değeri (6,02 mmol H₂/g KOİ) ve 0,18 mol H₂/L.gün'dür (Tablo 8.4, 3.gün). Bu değerler, düşük olmamakla birlikte işletim sürecine kıyasla daha düşük verim ve hız eldesi gözlemlenmiştir. Bu iki süreç arasındaki tek farkın çökme süresi olduğu dikkate alındığında, 20 dakikanın daha yüksek hidrojen üretimine yol açtığı anlaşılmaktadır. Fakat, 20 dakikalık çökme süresi, genelde 2,5 g/L UAKM derişiminde sabitlenen reaktör içeriğinin daha da azalarak, reaktörden atılımına sebep olmuştur. Dolayısıyla, çökme süresinin 40 dakikada uygulanmasına karar verilmiştir. Bu çalışmada elde edilen verim ve hız değerleri, İş Paketi 3'de sukrozla kurulan AKR-karanlık fermantasyon sisteminin optimum koşullarında elde edilen verim-hız değerlerine (1,66 mol mol H₂/mol heksoz; 0,28 mol H₂/L.gün) yakındır. İş Paketi 3'deki çalışmalarda karbon kaynağı olarak sukroz kullanılmış, bu çalışmada ise belli bir yüzdesi (yaklaşık %80i alınabilir) sukroz olan melas kullanılmıştır (Bölüm 7, Tablo 7.1). Dolayısıyla, verim hesabında kullanılan (ya da eklenen) karbonun tümü hidrojen üretiminde kullanılmamakta; fakat verim hesaplanırken tüm KOİ sukroz (veya heksoz) gibi düşünülerek dahil edilmektedir. Dolayısıyla, İş Paketi 3'e kıyasla az görünen verim değerleri, gerçek sukroz değerleri baz alınarak hesaplandığında, optimum koşullara yaklaşmaktadır.

Reaktör içi pH değeri, önceki işletimlerde de olduğu gibi, işletim süresince 5,5'da sabitlenebilmiştir (Şekil 8.3b). H₂ üretimine paralel yüksek miktarda UYA üretimine rağmen, sabit pH'nın sağlanması, melasın yüksek alkalinite içeriği ve otomatik pH kontrollü ile ilişkilendirilmiştir. UYA üretimine bakıldığında (Şekil 8.3d), baskın asit tipinin bütirik asit olduğu, bunu asetik asidin takip ettiği görülmektedir. Bu sonuç, projenin bu aşamasına kadar elde edilen asetik asit domine olmuş karanlık fermantasyon çalışmalarından farklı bir bulgudur. Melasla kurulan kesikli karanlık fermantasyon çalışmalarında da en çok asetik, bunu takiben bütirik asit üretilmiştir. Bu işletme sürecinde gözlemlenen bu durumun, pH ve KBS'nin işletim boyunca kontrollü ve sabit eldesi olduğu düşünülmektedir.



Şekil 8.3. AKR-Karanlık fermentasyon 3.İşletim sürecinde, a) Tepe gazı kompozisyonu, b) Ortalama pH, c) Günlük gaz üretimi, d) Çıkış suyu UYA çeşit ve derişim, değerlerinin zamana göre değişimi (HBS: 12 saat; Döngü süresi: 8 saat; OYH: 20,9 g KOİ/L.gün; ortalama giriş KOİ değeri 10 g/L; ortalama KBS: 3,0 gün; T: 35°C, pH: 5,5, çökme süresi: 40 dakika)

Bu işletme sürecinde hiçbir ölçümde metana rastlanmamıştır. HBS'nin üretilen toplam gaz ve hidrojen üretim verimi üzerinde etkin olduğu belirlenmiştir. Veriler ve daha önceki deneysel süreçler, 36 saate göre 12 saatlik HBS'nin daha yüksek miktarda gaz üretimi ve hidrojen yüzdesi sebebiyle daha uygun olduğunu göstermişti (Bölüm 4.2.1). Ayrıca 12 saat HBS'de çalışılmasının metanojenleri baskılama konusunda da pH 5,5 ile birlikte etkili olduğu belirlenmişti. Bunla ek olarak, bu iş paketinde, reaktörün KBS 3 günde sabit tutulabileceği (HBS 12 sat, döngü süresi 8 saat, çökme süresi 40 dakika) belirlenmiştir. Sabit KBS'de, reaktörün operasyonel anlamda (pH, reaktör içi VSS yaklaşık 2500 mg/L'de) kararlı bir şekilde işletilebildiği belirlenmiştir. Fakat, beklenenin aksine, sabit ve düşük KBS uygulamasında, yüksek hidrojen üretimi ve verimi bazında uzun soluklu kararlı bir işletim sağlanamamıştır. Bunda başlıca etmenin, karbon kaynağı melas kullanımı sebebiyle, çok yüksek hidrojen yüzdelerinin elde edilmesi ve takiben hidrojen kaynaklı inhibisyon olduğu düşünülmektedir. Yine de, sürecin kararlılık süresinin düşük olması sebebiyle, döngü süresinin yeterli olup olmadığını anlamak ve üretilen hidrojen miktarını arttırmak amaçlı ek bir çalışma yapılmıştır (veriler sunulmamıştır). Bu çalışmada yeni çamurla yeniden kurulan reaktörde hidrojenin olağan maksimum yüzdeye (%70) ulaşması beklenmiş ve döngü süresi 8 saatten 16 saate çıkarılmıştır. Diğer bir deyişle, döngünün 8 saatin sonunda bitmesi engellenerek, 16 saat boyunca (saatlik) izlenmesi sağlanmıştır. Bu süreçte üretilen gaz miktarı 10.saatten sonra hızla azalmaya başlamış ve 15.saatte durmuştur. Bir sonraki döngüde üretilen %71 hidrojen oranında azalma gözlenmiş, sonraki döngülerde gaz üretimi olmamıştır. Dolayısıyla, 8 saatlik döngü süresinin yeterli olduğu belirlenmiştir. Döngü süresinin 16 saate çıkarılması, reaktör içereğinin yüksek H₂ yüzdesindeki gaz ile daha uzun süre kontak halinde olmasına ve inhibisyonun daha kısa sürede gerçekleşmesine sebep olmuştur. Nitekim, gaz üretimi maksimum 1,5 gün içinde sona ermiştir.

Bu işletim sürecinde en yüksek hidrojen üretimin gözleendiği günlerde (2.-4.günler) reaktör çıkış suyu toplanarak, üç-aşamalı sistemde 2.aşama olan kesikli metanojenesis deneylerine giriş suyu olmak üzere ayrılmıştır.

Melasla gerçekleştirilen AKR-Karanlık fermantasyon çalışmasında elde edilen önemli sonuçlar

Bu iş paketinde, her taze çamur kültürü ile başlatılan üç AKR işletim sürecinde de, hidrojen üretimi sırasında sürekli olan bir süreç saptanmıştır;

- Bir döngü süresince işletimin ilk 4 saatinde toplam gaz üretim hızı düşük hızda seyrederken sonraki zamanda (5-6-7-8. Saatlerde) üretim hızında artış gözlenmiştir.

- Yaklaşık 5.saatten sonra üretilen gazın %70'e yakını hidrojenidir. İşletimin 8.saatinde yeni döngü başlamakta ve bir sonraki döngüde aynı süreç yaşanmaktadır. Günde 3 defa gerçekleşen bu döngü süreci ile reaktör 3-4 gün süresince stabil seyrederken 5.günde gaz üretimi hızla azalarak durmaktadır.

Gerçekleştirilen karanlık fermentasyon işletme süreçlerinin sonuç özeti Tablo 8.5'de verilmiştir. Tablo 8.5'de görüldüğü üzere, melasla işletilen AKR-Karanlık fermentasyon çalışmasında, mol H₂/g KOİ heksoz birim baz alındığında elde edilen maksimum verimler (1,16-1,62 mol H₂/mol heksoz) karışık anaerobik kültürle çalışan AKR'ler için rapor edilen H₂ verim değer aralığındadır (0,5-2,8 mol H₂/mol heksoz) (Arooj vd., 2008; Van Ginkel ve Logan, 2005a). Maksimum üretim hızı değerleri ise 4,57-6,39 L H₂/L_{rxr}.gün'dür. Bu değerler de literatürde sunulan 0,5-6,7 L/L_{rxr}.gün değerlerine benzerlik göstermektedir. (Wu vd., 2009; Badiei vd., 2011). Bu iş paketinde, (İş Paketi 3 AKR çalışmasına kıyasla) sabit ve düşük KBS değerlerinde çalışılsa da, daha uzun soluklu ve kararlı hidrojen üretimi sağlanamamıştır. Bunun sebebi, melasla işletilen bu sistemlerde, proje kapsamında yapılan karanlık fermentasyon çalışmaları arasında en yüksek H₂ yüzdesinin (%70) elde edilmesi ve bu yüksek yüzdenin (ve dolayısıyla kısmi basıncın) sistemi inhibe etmesidir. Yüksek hidrojen kısmi basıncı (veya yüzdesi), genelde gözlemlenen homoasetojenesis ve metanojenesis dahi inhibe etmiştir.

Tablo 8.5. Melasla işletilen AKR-Karanlık fermentasyon işletim süreçlerinden elde edilen sonuçlar ^a

İşletim No	Çökme süresi (dakika)	Maksimum H ₂ üretim ^b			Tepegazı maksimum H ₂ yüzdesi (%)	İşletim süresi (gün)	Kararlılık süresi (döngü)	KBS _{ort} (gün) ^c
		verimi (mol H ₂ /mol heksoz)	verimi (mmol H ₂ /g KOİ)	hızı (mol/L.gün)				
1	20	1,62	8,43	0,25	70	6	3	1,8
2	40	-	-	-	71	6	2	3,1
3	40	1,16	6,02	0,18	70	7	3	3,0

^a Tüm işletim süreçlerinde, çökme süresi dışında uygulanan işletim parametreleri aynıdır. (KOİ giriş: 10 g/L, OYH 20,9 g KOİ/L.gün, HBS: 12 saat, döngü süresi: 8 saat, hedeflenen pH: 5,5, hedeflenen KBS: 3 gün)

^b 2. işletim sürecinde, teknik problemler sebebiyle gaz üretimi kayıt altına alınmamıştır.

^c Ortalama KBS

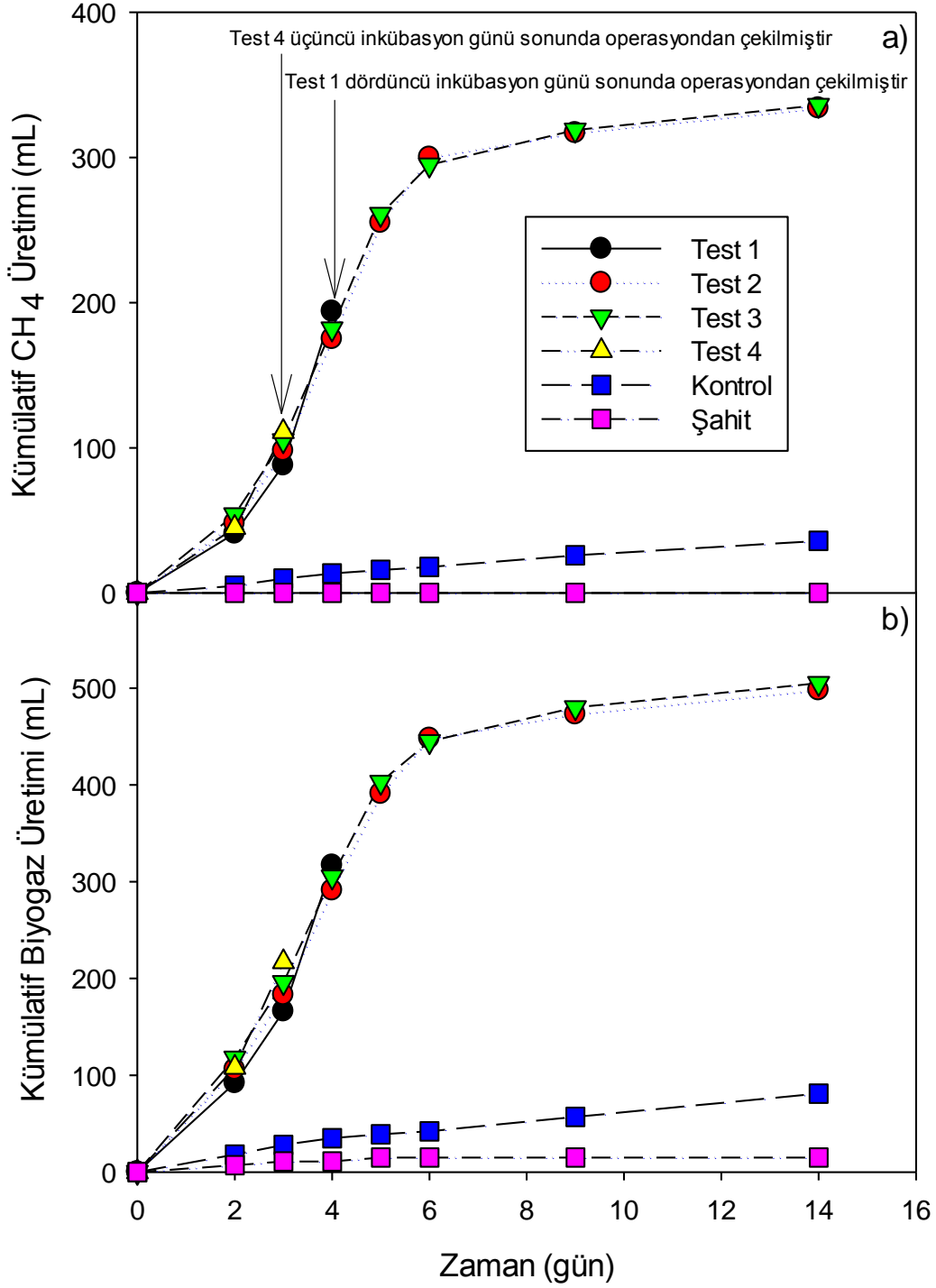
Çökme süresi olarak 20 dakika uygulandığında, mikroorganizmalar ortam şartlarına aklime olamadan reaktör içeriği atılmaktadır. Bu nedenle, 40 dakikanın uyguladığı çökme süresi en

uygun koşul olarak belirlenmiştir. Döngü süresi olarak 8 saat uygun bulunmuş, 10. saatin üzerinde hidrojen üretiminin azaldığı tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak, ilk olarak bu çalışmada, karanlık fermantasyon sonucu üretilen en baskın asit tipinin bütirik asit olduğu belirlenmiştir. Bu durum, melas içeriği, sağladığı ortam koşulları ve ayrıca olası yerel mikroorganizma türlerinin baskın olması ile ilişkilendirilebileceği gibi; sabit pH 5,5 ve 3 günlük KBS sebebiyle zenginleşen bütirik asit üreticileri ile de açıklanabilir.

8.2.2 Üç-Aşamalı Sistemde; Melasla İşletilen AKR-Karanlık Fermantasyon Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Metanojenesis Reaktör Deneyi Sonuçları

Üç-aşamalı sistemin 2. aşamasını oluşturan kesikli anaerobik (metanojenesis) reaktör deneylerinde üretilen toplam biyogaz ve metan gazı miktarları Şekil 8.4'de verilmiştir. Ondört günlük inkübasyon sonucunda elde edilen verilere göre, en yüksek metan üretim verimi Test 3 reaktöründe ($326 \text{ mL CH}_4/\text{g çKOI}_{\text{eklenen}}$) gözlemlenmiştir. Test 2 ve Test 3 reaktörleri, AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin ardışık reaktörü olarak, iki-aşamalı sistemin 2. aşamasını oluşturmaktadır. Test 1 ve 4 reaktörleri ise üç-aşamalı sistemde 2. aşamayı (AKR-Karanlık fermantasyon ve fotofermentasyon arasındaki basamağı) sembolize etmektedir.

Tablo 8.6'da ve Şekil 8.4'de görüldüğü üzere, iki-aşamalı metanojenesis reaktör çalışmalarında (Test 2 ve 3) elde edilen metan verimleri, üç-aşamalı çalışmada yer alanlara (Test 1 ve 4) kıyasla dikkate değer ölçüde daha yüksektir. Bunun sebebi, üç-aşamalı sistemde metanojenesis takip edecek ardışık fotofermentasyon reaktörlerine anlamlı miktarda UYA bırakmak amacıyla, Test 1 ve 4 reaktörlerinin inkübasyon sonlanmadan sırasıyla 3. ve 4. günlerde operasyondan çekilmiş olmasıdır. Test 2 ve 3 reaktörlerinin ortalama metan üretim verimleri $325 \text{ mL CH}_4/\text{g çKOI}_{\text{eklenen}}$ olarak gözlemlenmiştir. Bu değerler, İş Paketi 3 kapsamında gerçekleştirilen iki-aşamalı sistem deneylerinin ilgili metanojenesis çalışmasının sonuçları ile oldukça yakındır ($344 \text{ mL CH}_4/\text{g çKOI}_{\text{eklenen}}$, Bölüm 4.3). Test 1 ve 4 reaktörlerinin metan üretim verimleri ise sırasıyla $188 \text{ mL CH}_4/\text{g çKOI}_{\text{eklenen}}$ ve $111 \text{ mL CH}_4/\text{g çKOI}_{\text{eklenen}}$ 'dir. Dolayısıyla, üç-aşamalı sistemin enerji verimi hesaplanırken bu değerler dikkate alınacaktır. İş Paketi 3 kapsamında gerçekleştirilen üç-aşamalı sistemdeki metanojenesis çalışmasının metan üretim verimi de ($116 \text{ mL CH}_4/\text{g çKOI}_{\text{eklenen}}$), bu çalışmadaki değerlere oldukça yakındır. Test 1 ve 4 reaktörlerinin inkübasyondan çekildiği gün sonucunda içeriğinde bulunan tUYA derişimleri sırasıyla $11,7 \text{ mM (HAc)}$ ve $20,5 \text{ mM (HAc)}$ olarak belirlenmiştir (Tablo 8.6).



Şekil 8.4. Melasla üç-aşamalı sistemde, kesikli metanojenesis reaktörlerde üretilen kümülatif a) metan ve b) biyogaz miktarı (35°C, çKOİ: 5,2 g/L, pH: 7,3, S/X₀: 1 g KOİ/ g UAKM)

Tablo 8.6. Melasla üç-aşamalı sistemin 2.aşamasını oluşturan metanojenesis reaktörlerinde elde edilen metan yüzdesi ve verim değerleri

Reaktör tipi	Belirtilen inkübasyon gününe ait tUYA derişimleri (mM, HAc)				CH ₄ üretim verimi ^a (mL CH ₄ /g çKOİ _{eklenen})	CH ₄ üretim hızı (mol /L.saat)	Çıkış çKOİ (mg/L)
	İnkübasyon başlangıcı (reaktör içi)						
	3.gün	4.gün	14. gün (deney sonu)				
Test 1		17,4	11,7 ^b	-	188	0,0009	-
Test 2	31,2 ± 0,06	16,4	9,6	2,1	324	0,0006	686±10
Test 3		16,3	10,2	2,3	326	0,0007	725±20
Test 4		20,5 ^b	-	-	111	0,0006	-

^a Metan gaz hacimleri 35°C'daki değerleri göstermektedir.

^b Reaktörler ilgili tUYA derişimleri gözlemlendiğinde inkübasyondan çekilmiştir.

Tablo 8.7'de görüldüğü üzere, bu çalışmada iki-aşamalı sistem için elde edilen metan üretim verimleri, benzer karbon kaynağı kullanılmış olan Weiland (1993) ve Yeoh (1997)'nin çalışmalarında elde ettiği değere nazaran daha yüksek iken; Bull vd. (1983) ve Nasr vd. (2012)'nin çalışmalarında elde ettiği değerlerden düşük olarak gözlemlenmiştir. Yine de elde edilen verim, teorik değere yakındır ve %82'lik bir degradasyon verimine işaret etmektedir.

Tablo 8.7. Karanlık fermantasyon ve metanojenesis içeren iki-aşamalı sistem çalışmalarında 2.aşamayı oluşturan metanojenesis reaktörlerinin verim değerleri

Reaktör tipi ^a	Karbon kaynağı	CH ₄ üretim verimi (mL/g çKOİ _{eklenen})	Referans ^b
AYR ^b	Sentetik glikoz	356	Bull vd. (1983)
TKTR ^c	Şeker endüstrisi atık suyu	230	Weiland (1993)
Kesikli	Thin stillage	372	Nasr vd. (2012)
Kesikli	Şekerkamışından alkol üretimi artığı (stillage)	190	Yeoh (1997)
Kesikli	Fermante melas	325	Bu çalışma: Test 2 ve 3'ün ortalaması

^a FBR: Akışkan yataklı reaktör; TKTR: Tam karıştırmalı tank reaktör

^b 1 atm ve 35°C baz alınarak hesaplanmıştır.

8.2.3 Melasla Üç-Aşamalı Sistemde; Kesikli Metanojenesis Reaktör Çıkış Suyu ile Kurulan Kesikli Fotofermantasyon Reaktör Deneyi Sonuçları

Bu deneyler, üç-aşamalı sistem için, daha kısa süre inkübasyona tabi tutulan 2.aşama kesikli metanojenesis reaktörleri (Test 1 ve Test 4) çıkış suları ile kurulmuştur. Bu iki reaktör paralel reaktörler olsa da, farklı inkübasyon sürelerine tabi oldukları için, her çıkış suyu ile iki replikalı fotofermantasyon reaktörleri kurulmuştur (Bölüm 8.1.2.3). İşletim 9 gün (216 saat) sürmüştür. Bu süreç sonunda fotofermantasyon reaktörlerinden elde edilen verimler ve üretim hızları Tablo 8.8'de sunulmuştur. Inkübasyon süresince Test 1 ve Test 4 çıkış sularıyla kurulan reaktörlerin kümülatif hidrojen üretimi ve bakteriyel büyüme eğrileri sırasıyla Şekil 8.5; Şekil 8.6 ve Şekil 8.7; Şekil 8.8'de verilmiştir.

Test 1 reaktörünün çıkış suyu ile kurulan 2 eş (tekrarlı) fotofermantasyon reaktörde de inkübasyon süresince düşük gaz üretimi gözlemlenmiştir (Şekil 8.5). Bununla birlikte, bakteriyel büyümenin de yetersiz kaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 8.6). Test 4 reaktörleri çıkış suyu ile kurulan iki tekrarlı kesikli fotofermantasyon reaktörleri ise, Test 1 çıkış suyu ile kurulan reaktörlere kıyasla daha fazla miktarda gaz üretmiştir (Şekil 8.7). Bununla birlikte, bu reaktörlerde de bakteriyel büyümenin (Test 1'e kıyasla daha fazla olmasına rağmen) yetersiz kaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 8.8).

Tablo 8.8. Test 1 ve Test 4 kesikli metanojenesis reaktörleri çıkış suları ile kurulan 3.aşama fotofermantasyon reaktörlerinin verim ve üretim hızı değerleri

Anaerobik reaktör çıkış suyu	Kurulan 2 tekrarlı reaktör no	H ₂ üretim verimi (g H ₂ /g çKOİ) ^a	H ₂ üretim hızı (mmol H ₂ /L.saatt)	Besin dönüştürme verimi (%)	Işık dönüştürme verimi (%)	Toplam üretilen H ₂ (mmol)
Test 1	Reaktör 1	0,006	0,057	4,5	0,05	0,12
	Reaktör 2	0,006	0,029	4,5	0,05	0,12
	Ortalama	0,006	0,043	4,5	0,05	0,12
Test 4	Reaktör 1	0,034	0,029	26,9	0,06	0,33
	Reaktör 2	0,049	0,045	39,6	0,09	0,49
	Ortalama	0,042	0,037	33,2	0,07	0,41

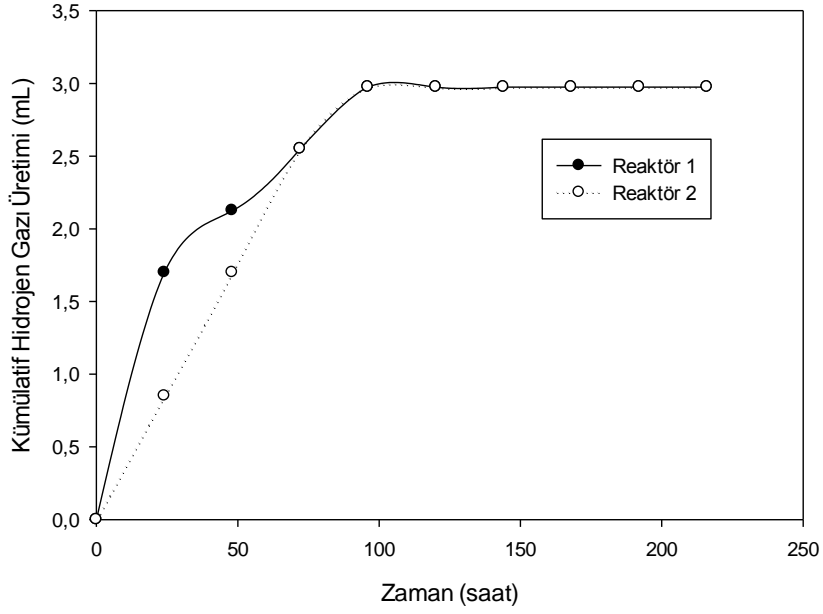
^a çKOİ bazında eklenen HAc esas alınmıştır (Tüm HAc tüketilmiştir). 1 g asetik asidin KOİ eşleniği 1,067 g KOİ'dir.

Tablo 8.8'de görüldüğü üzere, hem Test 1 hem de Test 4 çıkış suyu ile kurulan reaktörlerin ortalama hidrojen üretim hızları (sırasıyla, 0,043 ve 0,037 mmol H₂/L.saatt), daha önce İş Paketi 2 kapsamında belirlenen optimum koşulda elde edilebilecek üretim hızı değerine (1,04

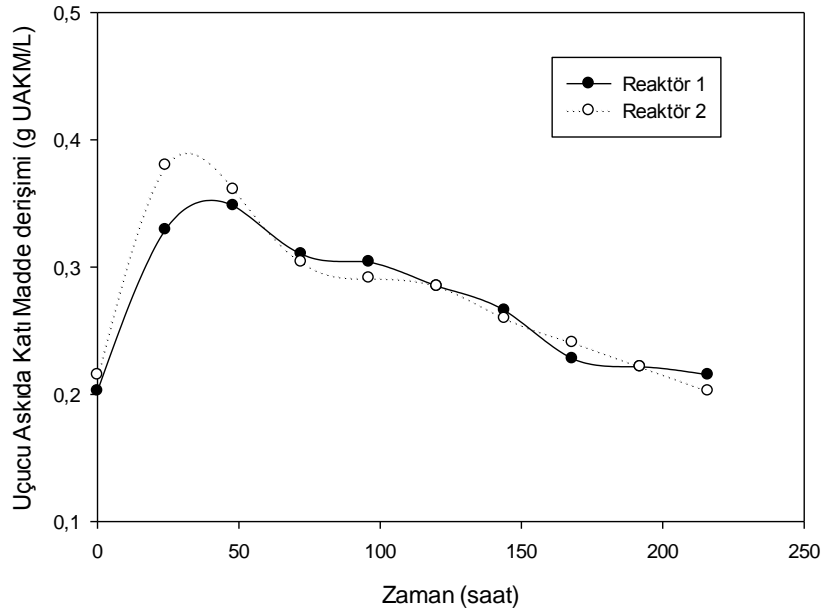
mmol H₂/L.saate göre düşüktür. Aynı şekilde, elde edilen hidrojen üretim verimleri de (0,006 g H₂/g asetat; 0,006 g H₂/g KOİ-HAc ve 0,044 g H₂/g asetat; 0,042 g H₂/g KOİ-HAc), İş Paketi 2 kapsamında optimum işletim koşullarında elde edilen en yüksek verim değerlerinin (0,11 g H₂/g asetat; 0,10 g H₂/g KOİ) yarısından azdır. Bu beklenir bir durumdur; zira, optimum koşullar karbon kaynağının herhangi bir ön aşamanın çıkış suyu olmadığı ve çok daha yüksek başlangıç derişimi (35 mM) için tanımlanmıştır. Benzer fotofermantatif hidrojen verimleri, İş Paketi 3'de aynı dizinle (AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon) fakat ilk karbon kaynağının sukroz olduğu çalışmada da (0,049 g H₂/g asetat; 0,052 g H₂/g KOİ-HAc; 1,56 mmol H₂/mmol HAc) elde edilmiştir (Bölüm 4.2.3, Bölüm 4.3). Bu durum, düşük giriş HAc derişimleri ve İş Paketi 3'de tanımlandığı üzere, AKR-Karanlık fermantasyon kaynaklı olası inhibe edici bir maddenin üretimi sebebiyle olabilir. Bu çalışmada Test 4 reaktör çıkış suyundan elde edilen hız değerleri ise, İş Paketi 3'de sukrozla işletilen benzer üç-aşamalı sistemin fotofermantatif hidrojen üretim hızına (0,17 mmol H₂/L.saate) kıyasla çok daha yüksek çıkmıştır.

Tablo 8.8'de, Test 1 reaktörü çıkış suyu ile kurulan fotofermantasyon reaktörünün Test 4 ile kurulana kıyasla daha yüksek üretim hızına sahip olduğu gözlenmektedir. Bu durum, inkübasyondan daha erken çekilmiş olması sebebiyle Test 1 reaktöründe daha fazla tUYA ve HAc olması ile ilişkilendirilebilir (14,8 mM HAc, Tablo 8.3). Öte yandan, Test 4 reaktörü çıkış suyu ile kurulan fotofermantasyon reaktörlerinde verim daha yüksektir. Bu durum da, Şekil 8.9 ve Şekil 8.10'da görüleceği üzere, Test 4 reaktörü çıkış suyu ile kurulan fotofermantasyon reaktöründe, hemen hemen tüm asetik asidin tüketilirken, Test 1 çıkış suyu ile kurulanlarda asidin tamamıyla tüketilmemesi ile açıklanmıştır. Nitekim, asit tüketimine paralel olarak, Test 4 çıkış suyu ile kurulan fotofermantasyon reaktörlerinde UAKM derişimi daha fazladır (Şekil 8.6 ve Şekil 8.8).

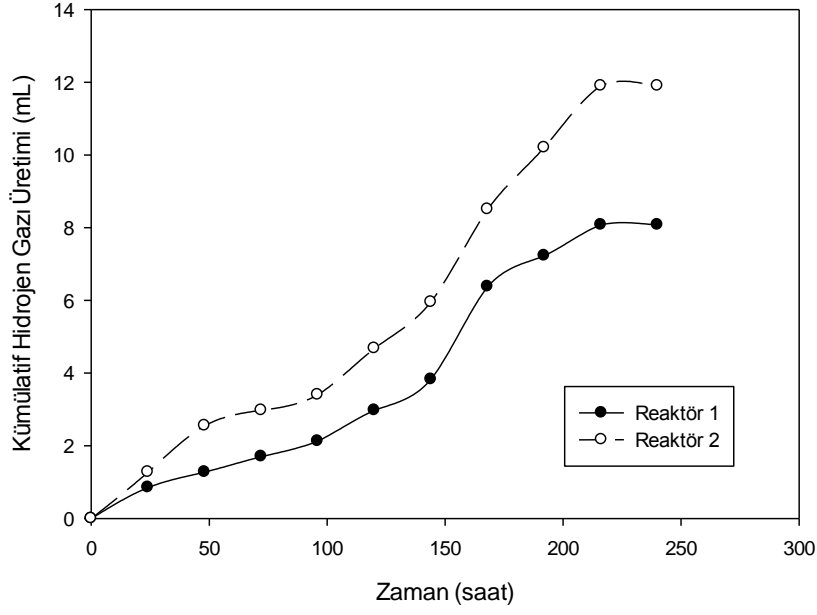
Test 1 çıkış suyu ile iki tekrarlı kurulan 3.aşama fotofermantasyon reaktörlerinin UYA derişimlerinin ortalaması alınmış ve UYA derişiminin zamana karşı değişimi Şekil 8.9'da verilmiştir. Şekil 8.9'da görüldüğü üzere, asetik asitin tamamı tüketilmemiş; 96.saatten itibaren tüketim hızı neredeyse durmuştur. Butirik asit de, ilk 48 saat içerisinde tüketilmenin aksine hafif bir artış göstermiş ve daha sonra az bir miktarı tüketilmiştir. Asetik asit yaklaşık 9,5 mM'dan 4,5 mM'a kadar tüketilirken, 5,3 mM başlangıç derişimine sahip butirik asit 5,8 mM'a kadar yükseldikten sonra 4,3 mM'a kadar tüketilmiştir. Eser miktardaki propiyonik asidin ise (1,2 mM) ilk 48 saat içerisinde büyük niktarının tüketildiği gözlenmiştir. Bununla beraber reaktörlerde 1,1 mM derişime kadar çıkan formik asit üretimi gözlenmiştir.



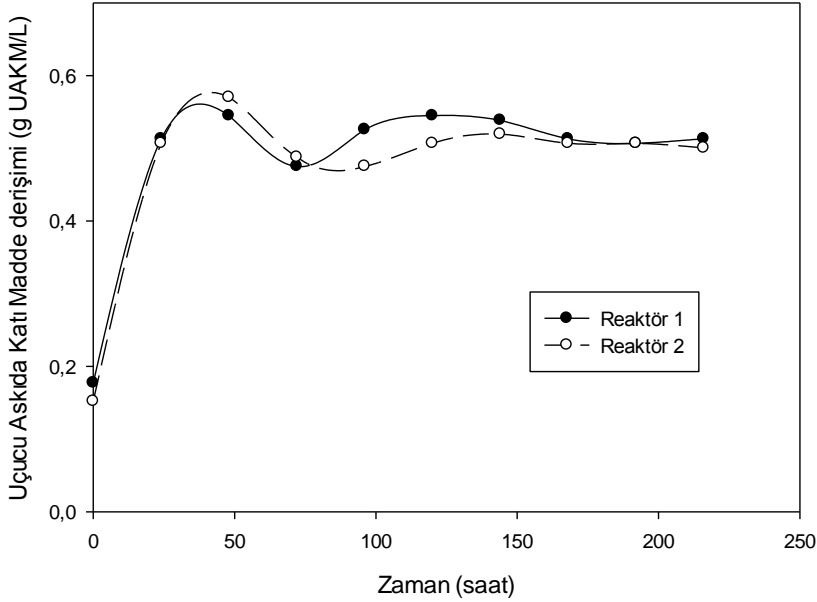
Şekil 8.5. Test 1 çıkış suyu ile iki tekrarlı kurulan 3.aşama fotofermantasyon reaktör deneyinde toplam hidrojen gazı üretimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)



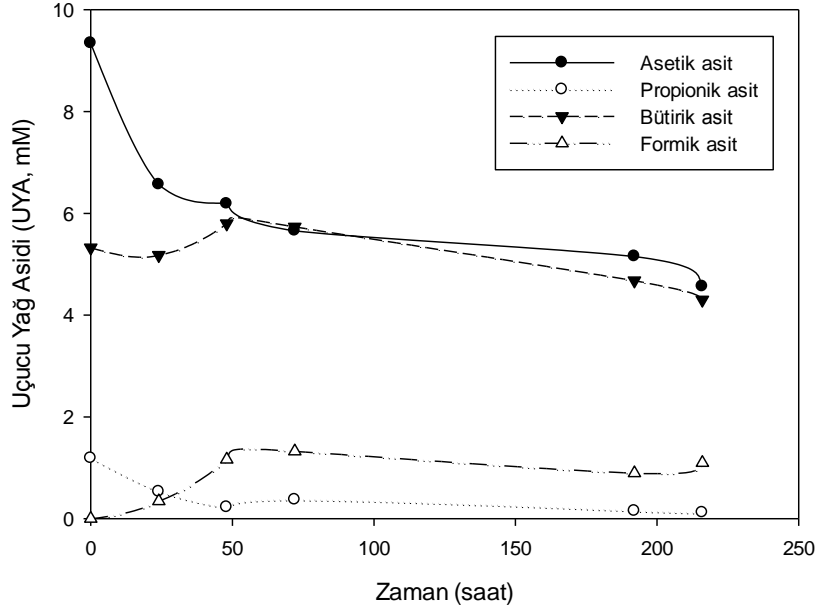
Şekil 8.6. Test 1 çıkış suyu ile iki tekrarlı kurulan 3.aşama fotofermantasyon reaktörlerinde *R.Capsulatus* derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)



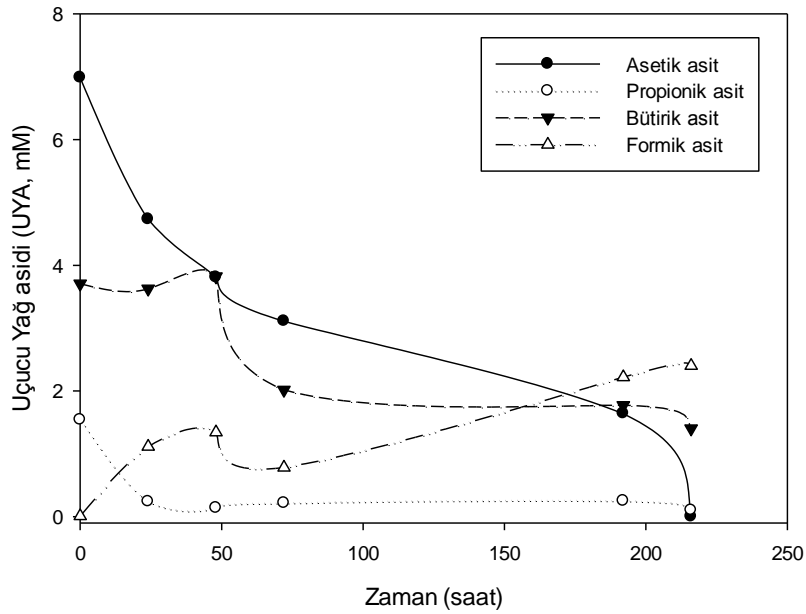
Şekil 8.7. Test 4 çıkış suyu ile iki tekrarlı kurulan 3.aşama fotofermantasyon reaktör deneyinde toplam hidrojen gazı üretimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)



Şekil 8.8. Test 4 çıkış suyu ile iki tekrarlı kurulan 3.aşama fotofermantasyon reaktörlerinde *R.Capsulatus* derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)



Şekil 8.9. Test 1 çıkış suyu ile iki tekrarlı kurulan 3. aşama fotofermantasyon reaktörlerinde ortalama UYA derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)



Şekil 8.10. Test 4 çıkış suyu ile iki tekrarlı kurulan 3. aşama fotofermantasyon reaktörlerinde ortalama UYA derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)

Şekil 8.10'da görüldüğü üzere, Test 4 çıkış suyu ile iki tekrarlı kurulan 3. aşama fotofermantasyon reaktörlerinde asetik asidin tamamı (7 mM) deney süresince düzenli olarak tüketilmiştir. Butirik asit ise, Test 1 suyu ile kurulan reaktörlerdekine benzer şekilde, ilk 48

saat içerisinde tüketilmenin aksine hafif bir artış göstererek daha sonra bir miktarı tüketilmiştir. 3,7 mM başlangıç derişimine sahip butirik asit 3,8 mM'a yükseldikten sonra 1,4 mM'a kadar düşmüştür. Eser miktardaki propiyonik asidin ise (1,5 mM) ilk 24 saat içerisinde büyük çoğunluğunun tüketildiği gözlenmiştir. Bununla beraber reaktörlerde 2,4 mM derişime kadar çıkan formik asit üretimi gözlenmiştir.

8.3 Sonuç

Organik karbon kaynağı **melasla** işletilen AKR-karanlık fermantasyon sistemi için optimum işletim koşullarının incelendiği ve melasın kullanıldığı üç-aşamalı sistemin (sırasıyla AKR-Karanlık fermantasyon, kesikli anaerobik ve kesikli fotofermantasyon dizini) enerji veriminin araştırıldığı İş Paketi 7 kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özet olarak sunulmuştur.

Üç-aşamalı sistemde, 1. aşama olan melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon sistemi deneyleri;

- Melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon sisteminde, İş Paketi 3 AKR çalışması ve İş Paketi 6 melasla karanlık fermantasyon çalışması baz alınarak, işletim koşulları belirlenmiştir. Uygulanan HBS: 12 saat, döngü süresi: 8 saat, giriş KOİ: 10 g/L, OYH: 20,9 g KOİ/L.gün, pH: 5,5'dir.
- Sabit ve düşük KBS değerinin, homoasetojen ve metanojenleri ortamdaki uzaklaştırarak kararlı hidrojen üretiminde etkin bir parametre olacağı gerekçesi ile 3 günlük KBS'nin etkisi araştırılmış; bu değer çeşitli işletim koşulları ile sabitlenmeye çalışılmıştır.
- Yüksek büyüme hızına sahip karanlık fermantasyon kültürünü, sabit ve düşük bir KBS'de işletebilmek için, AKR çökme süresi önemli bir parametredir.
 - 20 dakikalık bir çökme süresi, KBS değerinin ortalama 1,8 güne düşmesine; bu da karanlık fermantasyon bakterilerinin yeterli miktarda büyümeden sistemden atılmasına neden olmaktadır.
 - 40 dakika çökme süresi, göreceli daha düşük verime yol açsa da, sabit UAKM derişiminde kültür eldesi sağlanmıştır.
 - AKR, 3 günlük KBS değerinde sabit pH ve işletim koşullarında işletelebilmştir.
- Sabit ve düşük (3 gün) KBS'nin sağlanmasına rağmen, uzun soluklu (ve yüksek miktarda) hidrojen üretimi elde edilememiştir.
 - Bunun başlıca sebebinin, %70'lere varan H₂ gazı yüzdesi (ve kısmi basıncı) ve takibinde sistemin inhibisyonu kaynaklı olduğu düşünülmektedir.
 - Yüksek hidrojen kısmi basıncı (veya yüzdesi), genelde gözlemlenen homoasetojenesis ve metanojenesis dahi inhibe etmiştir.

- Bu kadar yüksek değerlerde ve tekrarlanabilirliği yüksek H₂ yüzdesi, projenin ilk defa bu aşamasında deneyimlenmiştir. Bu durum, nütriyent açısından oldukça zengin melasın, fermantasyon bakterilerini desteklemesi ve melas içeriğinde bulunabilecek olası yerel mikroorganizmaların desteği ile açıklanabilir.
- Döngü süresi olarak 8 saat, AKR'de hidrojen üretimi için uygun bulunmuştur; 10.saatin üzerinde hidrojen ile kontakın artması sonucu hidrojen üretimi azalmakta; kararlı işletim süreleri daha da azalmaktadır.
- Daha önce belirlenen HBS (12 saat), giriş KOİ (10 g/L), başlangıç pH (5,5) bilgilerine ek olarak, bu iş paketinde optimum çökme süresi (40 dakika), döngü süresi (8 saat) ve KBS (3 gün) değerleri belirlenmiştir. Bu koşullarda (3.İşletim sürecinde) elde edilen;
 - en yüksek hidrojen üretim verimi **6,02 mmol H₂/g KOİ** (veya **12,04 mg H₂/g KOİ**; **1,16 mol H₂/mol heksoz**);
 - en yüksek hidrojen üretim hızı ise **0,18 mol H₂/L.gün**'dür.
- İlk olarak bu çalışmada, karanlık fermantasyon sonucu üretilen en baskın asit tipinin butirik asit olduğu belirlenmiştir. Bu durum, melas içeriği, sağladığı ortam koşulları ve ayrıca olası yerel mikroorganizma türlerinin baskın olması ile ilişkilendirilebileceği gibi; sabit pH 5,5 ve 3 günlük KBS sebebiyle zenginleşen bütirik asit üreticileri ile de açıklanabilir.
- AKR'de karanlık fermentatif hidrojen üretimi, kararlı koşullarda uzun süreli gerçekleşmemektedir. Düşük KBS değerlerinde çalışılabilir, fakat yüksek miktardaki H₂ tepegazının sistemden uzaklaştırılması gerekmektedir.
- KBS 3 gün değeri, mikrobiyal popülasyonun büyük çoğunluğunun hidrojen üreticilerden oluşmasını sağlamada etkili bir parametredir. Hidrojen üretiminin bitmesini takiben gaz üretiminin de durması çoğunluğun hidrojen üreticilerden olduğu teorisini desteklemektedir.

Melasla üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan kesikli metanojenesis deneyleri;

- Melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon (3.İşletme sürecine ait) çıkış suyu ile kurulan kesikli metanojenesis reaktör deneylerinde, 14 günlük (gaz üretimi sonlanana kadar devam eden) inkübasyon sonunda:
 - En yüksek metan verimi olarak **326 mL CH₄/g çKOİ_{eklenen}** (12,9 mmol CH₄/g çKOİ_{eklenen}; **0,206 g CH₄/g çKOİ_{eklenen}**) elde edilmiştir.
 - Bu verim, iki-aşamalı (AKR-Karanlık Fermantasyon + Kesikli Metanojenesis) entegre sisteminin verim hesabında kullanılmıştır.
- Üç-aşamalı sistem için, kesikli metanojenesis sisteminden, takip eden fotofermantasyona karbon kaynağı (HAc) bırakmak adına, inkübasyon yarıda

kesilmiştir. 4.gün inkübasyonu sonlandırılan reaktörden en yüksek metan üretim verimi ve hızı elde edilmiştir. Üç-aşamalı sistemde yer alan kesikli metanojenesis reaktörlerinde elde edilen

- En yüksek metan üretim verimi 188 mL CH₄/g çKOİ_{eklenen} (7,44 mmol CH₄/g çKOİ_{eklenen}; 0,12 g CH₄/g çKOİ_{eklenen})'dir. En yüksek metan üretim hızı 0,9 mmol CH₄/g çKOİ_{eklenen} (0,014 g CH₄/g çKOİ_{eklenen})'dir.
- Öte yandan, takip eden fotofermantasyon sisteminde en yüksek hidrojen üretim veriminin sağlandığı çıkış suyu baz alındığında ise, 3.gün inkübasyonu sonlandırılan kesikli metanojenesis sisteminden elde edilen verim 111 mL CH₄/ g çKOİ_{eklenen} (4,39 mmol CH₄/g çKOİ_{eklenen}; 0,07 g CH₄/g çKOİ_{eklenen})'dir.
- Üç-aşamalı sistem verimi hesaplanırken, en yüksek toplam verim hesabı ve hidrojenin daha yüksek ısı enerji değeri baz alınarak, metan verimi için 111 mL CH₄/ g çKOİ_{eklenen} (4,39 mmol CH₄/g çKOİ_{eklenen}; **0,07 g CH₄/g çKOİ_{eklenen}**) değeri kullanılacaktır.

Melasla üç-aşamalı sistemde, 3.aşama olan kesikli fotofermantasyon reaktör deneyleri;

- Melasla üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan kesikli anaerobik reaktörleri çıkış suyu ile kurulan fotofermantasyon reaktörlerinde elde edilen
 - En yüksek hidrojen üretim verimi **1,33 mol H₂/mol asetat** (0,044 g H₂/g asetat; **0,042 g H₂/g KOİ-HAc**)'dir.
 - En yüksek hidrojen üretim hızı **0,043 mmol H₂/L.saat**'tir.
 - Verim değerleri İş Paketi 2 kapsamında optimum işletim koşullarında elde edilen en yüksek verim değerinden (3,3 mol H₂/mol HAc asetat; 0,11 g H₂/g asetat; 0,10 g H₂/g KOİ-HAc) düşüktür.
 - Ama, aynı dizinle (AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon) fakat ilk karbon kaynağının sukroz olduğu çalışmadaki değerlerle (0,049 g H₂/g asetat; 0,052 g H₂/g KOİ-HAc; 1,56 mmol H₂/mmol HAc) karşılaştırılabilir düzeydedir.
 - Bu durum, düşük giriş HAc derişimleri ve İş Paketi 3'de tanımlandığı üzere, AKR-Karanlık fermantasyon kaynaklı olası inhibe edici bir maddenin üretimi sebebiyle olabilir.

Üç-aşamalı ve İki-aşamalı sistemlerden elde edilen toplam enerji verimleri

İş Paketi 7 kapsamında yapılan çalışmalarda, 2 farklı reaktör entegrasyonu oluşturulabilmektedir. Bu sayede 2 farklı entegrasyondan elde edilen toplam enerji verimleri karşılaştırılabilmektedir. Entegrasyonu yapılan sistem kombinasyonları şu şekildedir;

3. İki-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli metanojenesis (anaerobik) sistemi
4. Üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli metanojenesis (anaerobik) + Kesikli fotofermantasyon sistemi

Bu 2 farklı reaktör entegrasyonundan elde edilen toplam enerji miktarını belirlemek ve karşılaştırabilmek için her bir reaktör aşamasına ait verim aynı birime dönüştürülmüştür; verimler g KOİ başına üretilen g H₂ veya g CH₄ bazında tanımlanmış ve toplam enerji g çKOİ bazında (kJ/g çKOİ) hesaplanmıştır. Entegre sistemlerden elde edilen olası maksimum verim ve enerji eldesi araştırıldığı için, her bir reaktör aşamasındaki maksimum verim dikkate alınmıştır. Fakat ardışık bir sistem olduğu için, bir aşamaya ait giriş suyunun, bir önceki aşamanın çıkış suyu olmasına ve bu koşullarda elde edilen verimlerin kullanılmasına dikkat edilmiştir.

Melasla beslenen **AKR-karanlık fermantasyon sistemi için en uygun işletim koşulu olarak**, üç-aşamalı sistemde en yüksek toplam ısı enerjisi elde edilmesine yol açan koşulların tanımlanması planlanmıştır. Fakat, bu iş paketinde, AKR-Karanlık fermantasyon sistemi için, HBS yerine, sabit ve düşük KBS'de işletilen AKR koşullarının optimizasyonu (çökme süresi, döngü süresi gibi) esas alınmıştır (Bölüm 8.1.2.1). Bu karar, İş Paketi 3 ve İş Paketi 6 kapsamında elde edilen sonuçlar doğrultusunda belirlenmiştir (Bölüm 8.1.2.1). Hidrojen üretiminin artırılması ve bu bağlamda, işletim koşullarının (KBS sabitlemesi, dolayısıyla çökme süresi gibi) hidrojen üretim verimini artıracak şekilde iyileştirilmesi hedefiyle, üç işletme süreci uygulanmıştır. Her işletme sürecinde, parametreler geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu işletim süreçlerinden ilkinde, düşük çökme süresi sebebiyle, KBS değeri yaklaşık 2 güne düştüğü için reaktör içi çamur atılmıştır. 2. işletim sürecinde de teknik aksaklıklar sebebiyle çamur atımı gerçekleşmiştir. Dolayısıyla, sadece 3. işletim sürecine ait çıkış suları, takip eden kesikli metanojenesis sisteminin giriş suyu olarak kullanılmıştır. AKR-karanlık fermantasyon süreçleri, her aşamada iyileşmeyi baz alarak yönetildiği için, kendi içinde kararlı hidrojen üretiminin sağlandığı en son işletim süreci (3. işletim süreci), melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon sistemi için optimum koşulları oluşturmaktadır. Bu koşullar; pH=5,5; HBS=12 saat, döngü süresi=8 saat, OYH=20,9 g KOİ/L.gün ve KBS_{ortalama} =3 gün, çökme süresi=40 dakika olarak belirlenmiştir.

Optimum AKR-karanlık fermantasyon (3.işletim) çıkış suyu ile kurulan kesikli metanojenesis sistemi, ve bu sistemin çıkış suları ile kurulan fotofermantasyon sisteminden (üç-aşamalı entegre sistemi) elde edilen maksimum verim ve enerji eldeleri, Tablo 8.9'da sunulmuştur. Kesikli metanojenesis reaktörleri, paralel kurulmuş olmasına rağmen, farklı zamanlarda inkübasyondan çekildikleri için, farklı çıkış UYA derişimine sahiptirler. Entegre sistemin metan verim değeri belirlenirken, üç-aşamalı sistemin enerji toplamı ve hidrojenin metana kıyasla daha yüksek ısıl enerjiye sahip olduğu göz önünde bulundurulmuştur. Bu sebeple, daha yüksek fotofermantatif hidrojen veriminin sağlandığı metanojenesis çıkış suyuna ait reaktör ve bu reaktörden elde edilen metan verimi hesaplarda kullanılmıştır. İki-aşamalı AKR-karanlık fermantasyon + kesikli metanojenesis (14 günlük en uzun inkübasyonu içerir) entegre sisteminin enerji eldesi de Tablo 8.10'da verilmiştir.

Tablo 8.9. İlk karbon kaynağının melas olduğu üç-aşamalı sistemde elde edilen maksimum H₂ veya CH₄ üretim verimleri ve enerji değeri ^a

Üç-aşamalı sistemin aşamaları	Verim ^b	Verim (g H ₂ /g çKOİ _{eklenen} veya g CH ₄ /g çKOİ _{eklenen})	Üretilen ısıl enerji (kJ/g çKOİ _{eklenen})	
			Brüt	Net
1.Aşama (AKR-Karanlık fermantasyon)	1,16 mol H ₂ /mol heksoz ^b	0,012	1,70	1,43
2.Aşama (Kesikli Metanojenesis)	0,07 mmol CH ₄ /g çKOİ _{eklenen}	0,12	6,67	6,00
3.Aşama (Kesikli fotofermantasyon)	1,33 mol H ₂ /mol HAc (0,032 g H ₂ /g HAc)	0,042	5,96	5,02
Toplam brüt ısıl enerji (kJ/g çKOİ _{eklenen})	-	-	14,33	-
Toplam net ısıl enerji (kJ/g çKOİ _{eklenen})	-	-	-	12,45

^a Brüt ısıl enerji hesabında, H₂ için 141.8 kJ/g, CH₄ için 55.58 kJ/g; Net ısıl enerji değerleri = H₂ için 119.47 kJ/g, CH₄ için 49.98 kJ/g değerleri kullanılmıştır (Lewandowski, 1999).

^b 1,16 mol H₂/mol heksoz değeri, 0,01204 g H₂/ g KOİ değeri ve 1 g heksoz=1,07 g KOİ eşleniği kullanılarak hesaplanmıştır ; 1 g HAc= 1,066 g KOİ

Tablo 8.10. İlk karbon kaynağının melas olduğu iki-aşamalı sistemde (AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli Metanojenesis) elde edilen maksimum H₂ veya CH₄ üretim verimleri ve enerji değeri ^a

İki-aşamalı sistemin aşamaları	Verim ^b	Verim (g H ₂ /g çKOİ _{eklenen} veya g CH ₄ /g çKOİ _{eklenen})	Üretilen ısıl enerji (kJ/g çKOİ _{eklenen})	
			Brüt	Net
1.Aşama (AKR-Karanlık fermantasyon)	1,16 mol H ₂ /mol heksoz	0,012	1,70	1,43
2.Aşama (Kesikli - Metanojenesis)	12,9 mmol CH ₄ /g çKOİ _{eklenen}	0,206	11,45	10,30
Toplam brüt ısıl enerji (kJ/g çKOİ _{eklenen})	-	-	13,15	-
Toplam net ısıl enerji (kJ/g çKOİ _{eklenen})	-	-	-	11,73

^a Brüt ısıl enerji hesabında, H₂ için 141.8 kJ/g, CH₄ için 55.58 kJ/g; Net ısıl enerji değerleri = H₂ için 119.47 kJ/g, CH₄ için 49.98 kJ/g değerleri kullanılmıştır (Lewandowski, 1999).

^b 1,16 mol H₂/mol heksoz değeri, 0,01204 g H₂/g KOİ değeri ve 1 g heksoz=1,07 g KOİ eşleniği kullanılarak hesaplanmıştır ; 1 g HAc= 1,066 g KOİ

Tablo 8.9'da görüldüğü üzere, üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon entegre sisteminde, birim karbon kaynağından (g KOİ) elde edilen toplam brüt ısıl enerji 14,33 kJ/g KOİ'dir. İş Paketi 3'te, aynı reaktör dizininden fakat sukroz karbon kaynağı ile yapılan çalışmada ise 13,47 KJ/g çKOİ (veya 13,47 kJ/g KOİ) enerji elde edilmiştir (Bölüm 4.3, Tablo 4.13). Dolayısıyla, karbon kaynağı olarak melasın kullanıldığı üç-aşamalı sistem daha yüksek enerji eldesi sağlamaktadır. Bu iki üç-aşamalı entegre dizin karşılaştırıldığında, aradaki farkın, melas kullanılan sistemde kesikli metanojenesis sisteminin daha yüksek verim elde etmesi kaynaklı olduğu anlaşılmıştır.

İlk karbon kaynağının melas olduğu bu çalışmada elde edilen 14,33 kJ/g çKOİ, H₂/heksoz birimine dönüştürülecek olursa; üç-aşamalı sistemden 0,10 g H₂/g KOİ; 0,11 g H₂/g heksoz veya 9,63 mol H₂/mol heksoz elde edilmektedir. Dolayısıyla, bu projede önerilen üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon sistemi bugüne kadar literatürde iki-aşamalı hidrojen sistemlerinden elde edilen en yüksek verimden (7,2 mol H₂/mol heksoz) daha yüksek bir verim eldesi sağlamıştır. Diğer bir deyişle, üç-

aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon entegre sistemi sayesinde, mol H₂/mol heksoz birimi bazında, verim yaklaşık %34 artırılmıştır. Önerilen üç-aşamalı sistemde hidrojen bazında elde edilen toplam verim değeri (9,63 mol H₂/mol heksoz), ekonomik değer olarak tanımlanan 8 mol H₂/mol heksoz veriminden (Yokoi vd., 2002) fazladır. Hatta bu değer (ve dolayısıyla elde edildiği üçlü konfigürasyon), teorik değer olan 12 mol H₂/mol heksoz değerine (Özgür vd., 2010; Argun ve Kargı, 2011) de yaklaşması sebebiyle oldukça önemlidir.

Önerilen üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon sistemi, iki-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli Metanojenesis entegre sistemi ile de karşılaştırılabilir. Bu bağlamda, aynı atıksuların kullanıldığı işletme koşullarında, sadece iki-aşamalı olduğu ve bu süreçlerdeki maksimum verimler kullanılmalıdır. Tablo 8.9'a bakıldığında, melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon ve bu reaktörün çıkış suyu ile beslenen ve inkübasyonunun sonuna kadar beklenen kesikli metanojenesis reaktörünün entegrasyonundan 13,15 kJ/g KOİ toplam (brüt) enerji elde edilmektedir. Bu sonuç, üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon sisteminin, iki-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli Metanojenesis sistemine kıyasla, enerji üretimi bazında daha avantajlı olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla, 2.aşama olan metanojenesisten, 3.aşama olan fotofermantasyona enerji aktarmanın etkisi, üç-aşamalı sistemin birim karbondan (g KOİ) daha yüksek enerji elde etmesini sağlamıştır. Üç-aşamalı sisteme geçişle, birim karbondan elde edilen enerji yaklaşık %9 artırılmıştır.

9. POPÜLASYON DİNAMIĞININ BELİRLENMESİ

Projenin 8.İş Paketi (İP 8) kapsamında yapılması hedeflenen çalışmalar aşağıda sunulmuştur:

- Sürekli reaktörlerden (sukroz ve melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon sistemleri ve AKR-Metanojenesis sisteminden) belirli aralıklarla çamur numunelerinin alınması
- Çamur numunelerinin total DNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi
- DNA izolasyonu yapılan numunelere arkeyal ve bakteriyel 16srRNA genine ait evrensel primerlerin kullanılması ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulanması
- PCR numunelerine, Denatüre Gradyan Jel Elektroforezi (DGGE) prosedürü uygulanması
- DGGE jellerinde görüntülenen bantların kesilerek saflaştırılması ve hizmet alımıyla sekanslanması. Elde edilen sekansların, veri tabanlarında tanımlanmış mevcut türlere ait 16srRNA sekanslarla karşılaştırılarak filojenik ağaçta yerlerinin; dolayısıyla mikrobiyel türlerin tanımlanması

Bu iş paketi sayesinde, (ardışık kesikli çalışan) sürekli karanlık fermantasyon ve metanojenesis reaktörlerinde farklı işletim koşullarında baskın hale gelen veya ortamdaki uzaklaştırılan mikrobiyel türlerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Böylelikle hidrojen ve metan üretimi sırasında AKR sistemlerinde gözlenen ya da speküle edilen koşullar, moleküler analizler yoluyla mikrobiyel türlerle ilişkilendirilebilmiştir.

İş Paketi 8 kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar, raporun bu bölümünde üç kısımda sunulmuştur: i) Literatür taraması, ii) AKR çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen moleküler çalışmalar, ve iii) TUBİTAK 2221 kapsamında gerçekleştirilen qPCR çalışmaları.

Bu bölümün son kısmında yer alan TUBİTAK 2221 kapsamında gerçekleştirilen qPCR çalışmaları, daha önce, 3.Gelişme raporunda sunulmuş çalışmalardır. Üçüncü gelişme raporunda belirtildiği üzere, TUBİTAK 2221 (Konuk ve Akademik İzinli) Bilim İnsanı Destekleme Programı kapsamında, Proje Yürütücüsünün daveti ile Prof. Dr. Metin Duran (Villanova Üniversitesi, A.B.D.) ODTÜ Çevre Mühendisliği Bölümü'ne misafir araştırmacı

olarak gelmiştir. Kabul edilen TÜBİTAK 2221 ortak araştırma projesi kapsamında, karışık anaerobik kültürlerde en hassas tür olan asetiklastik metanojenlere odaklanılarak bu türlerin nicel olarak ölçümü için son dönemlerde geliştirilmiş ve yurtdışında yaygın olarak kullanılan qPCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu; RT-PCR) yöntemi kullanılmıştır. Proje Yürütücüsünün TÜBİTAK 1001 (112M252 kodlu) projesi kapsamında yer almayan ve desteklemek amacıyla başlatılan bu ek çalışma/proje, 1001 proje çıktılarının değerlendirilmesi ve ek bilgi sağlaması açısından da önemlidir. Bu bağlamda, final raporunda TÜBİTAK 2221 kapsamında gerçekleştirilen qPCR çalışmalarının sonuçları da sunulmuştur.

9.1 Literatür Taraması

Proje önerisinde, popülasyon dinamiğinin belirleneceği kültür tipi olarak AKR (sürekli reaktör) kültürleri esas alınmıştır. Bu bağlamda, projede AKR çalışmalarını kapsamı nedeniyle, literatür araştırmalarında, karanlık fermentasyon ve anaerobik çürütme çalışmalarına odaklanılmıştır. Diğer bir deyişle, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ve DGGE (Denatüre Gradyan Jel Elektrofrezisi) analizlerinin yapıldığı karanlık fermentasyon ve anaerobik çürütme çalışmaları dikkate alınmıştır. Karanlık fermentasyon ve anaerobik çürütme çalışmalarında kullanılan örnek PCR-DGGE çalışmaları, sırasıyla, Tablo 9.1 ve 9.2'de sunulmuştur. Bunlara ek olarak, PCR-DGGE ile yapılan moleküler analizlerde hidrojen üreticileri saptamaya yönelik yapılan çalışmalar ve kullanılan primerler araştırılarak Tablo 9.3'de sunulmuştur.

Tablo 9.1. PCR – DGGE analizlerinin gerçekleştirildiği karanlık fermentasyon çalışmalarına örnekler

Metod	Amaç	Reaktör tipi ^a	Özellikler	Kaynakça
PCR - DGGE	Ekstrem-termofilik şartlar altında H ₂ üretiminde yer alan mikrobiyal toplulukların incelenmesi	EGSB	Sıcaklık: 70±1°C, pH: 5, Besin: glikoz ve arabinoz karışımı	Abreu vd. (2010)
T -RFLP	Anaerobik karışık kültürle kurulan kesikli ve sürekli reaktörlerde biyohidrojen üretiminin araştırılması	Kesikli ve sürekli reaktörler	Besin: sükroz Ön-işlem: 100°C 15 dakika	Sung vd. (2002)
PCR - Dizi analizi	Selülozik hidrojen üreten yüksek sıcaklıktaki biyoreaktördeki mikrobiyotanın incelenmesi	CSTR	70 ± 1 °C, 240 gün işletim	Gadow vd. (2013)
RT- PCR / Dizi analizi	Yoğun melas çözeltilisinden biyohidrojen üretiminin geliştirilmesi için Clostridium ko-kültürlerinin incelenmesi	CSTR	Üç Clostridium türü ve farklı substrat derişimleri	Hsiao vd. (2009)
RT-PCR - Dizi analizi	Yoğun melas çözeltilisinden anaerobik fermentasyonla biyohidrojen üretiminin araştırılması	CSTR	Hacim: 4.0 L HBS: 3–24 saat Yükleme hızı: 40 g KOİ/L UAKM	Lay vd. (2010)

Metod	Amaç	Reaktör tipi ^a	Özellikler	Kaynakça
PCR - DGGE	Karanlık fermantasyonla hidrojen-üreten türlerde <i>Clostridium</i> türüne özgü (spesifik) PCR primerlerinin araştırılması ve uygulaması	CSABR	Besin: Xylose Dolgu malzemesi: aktif karbon + silikon-jel	Hung vd. (2008)
^a CSTR: continuously stirred tank reactor, EGSB: Expanded granular sludge bed; CSABR: Continuous stirred anaerobic bioreactor				

Tablo 9.3'de sunulan literatür taraması incelendiğinde, hidrojen üreticileri saptamaya yönelik yapılan çalışmalarda hidrojenaz A (Hyd A) ile 16S ribozomal genleri (16S rRNA) üzerine yoğunlaşıldığı anlaşılmaktadır. Fakat hidrojenaz A geni, tek başına, küçük çapta hidrojen üreticileri yakalayabilirken, 16S rRNA ile geniş çapta sonuç verebilir (Xing vd., 2007). Çünkü hidrojenaz A geni türden türe farklılık gösterebilirken universal primer 16S rRNA geni, türlerin genelini filogenetik ağacını çıkarmada etkilidir. Dolayısıyla, 16S rRNA geni kullanılarak elde edilen ürünlerin tüm hidrojen üreticilerinin belirlenmesi açısından daha yol gösterici olabilir.

Tablo 9.2. PCR – DGGE analizlerinin gerçekleştirildiği anaerobik çürütme çalışmalarına örnekler

Metod ^a	Amaç	Reaktör Tipi ^b / Özellikler	Kaynakça
PCR - ARDRA	Altı farklı anaerobik çamurun metanojenik yapısının incelenmesi	Psikofilik (10-14°C), mezofilik (37°C) ve termofilik (55°C) koşullardaki çamurlar	McHugh vd., (2003)
RT-PCR - DGGE	Peynir altı suyundan anaerobik arıtımı sırasında metanojenlerin yapısındaki değişimin nicelik ve nitelik olarak incelenmesi	Kesikli anaerobik reaktör	Lee vd. (2010)
RT-PCR, DGGE	Mandıra atıksuyu arıtımında kullanılan iki farklı reaktörde metanojenik popülasyon dinamiğinin incelenmesi	IFB ve EGSB HBS: 72 -12 saat 200 gün işletim süresi	Bialek vd. (2011)
PCR-DGGE	Birleşik reaktörlerde nitel ve nicel olarak mikrobiyal topluluğun popülasyon değişiminin incelenmesi	TAD ve MAD, 1 günlük katı bekletme süresi	Jang (2013)
RT-PCR	Anaerobik evsel atık çamur çürütücülerindeki asetiklastik metanojen türlerinin belirlenmesi	Endüstriyel ölçekli CSTR	Shigematsu vd. (2003)
PCR-DGGE	Kağıt endüstrisi atıksuyunun yukarı akışlı çamur yataklı (UASB) reaktörlerde giderimi sırasında, popülasyon dinamiğinin incelenmesi	Yukarı akışlı çamur yataklı (UASB) reaktörler	Roest vd. (2005)
PCR-DGGE, RT-PCR	Kağıt endüstrisi atıksuyunun yukarı akışlı çamur yataklı (UASB) reaktörlerde giderimi sırasında, popülasyon dinamiğinin incelenmesi	Yukarı akışlı çamur yataklı (UASB) reaktörler	de Bok vd. (2006)
^a PCR: Polymerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu), RT-PCR: Real-time PCR / gerçek-zamanlı (kantitatif) PCR, ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis			
^b IFB: Inverted Fluidized Bed, EGSB: Expanded Granular Sludge Bed, TAD (termofilik aerobik çürütme), MAD: mezofilik anaerobik çürütme			

Tablo 9.3. Moleküler analizlerde (PCR – DGGE) hidrojen üreticileri saptamaya yönelik yapılan çalışmalar ve kullanılan primerler

Gen adı	Amaç	Kullanılan Primer Sekansı	Referans
Bacteria 16S rRNA	16S rRNA yakalama şansını arttırmak için kültürdeki mevcut önemli mikro-	<i>Forward Primers</i> B8F (50-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG- 30) GM3F (50 - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG- 30) <i>Reverse primers</i> U1406R (50 - ACGGGCGGTGTGTRC - 30) EUB1492R(50 eACGGTTACCTTGTTACGACTT-30)	Chaganti vd. (2012)
Archea 16S rRNA	organizmaların tüm gen örneklerinin, PCR permütasyon kullanılarak gerçekleştirilmesi	<i>Forward Primers</i> A2F (50 eTTCCGGTTGATCCYGCCGGA - 30) ARCH20F (50 eTTCCGGTTGATCCYGCCRG - 30) <i>Reverse Primers</i> U1406R (50 eACGGCGGTGTGTRC - 30) Uni1392R (50 eACGGCGGTGTGTRC - 30)	
16S rRNA	Asidofil Hidrojen Üreten Bakterilerin Etanol-H ₂ -Üretim Sistemi, [Fe]hidrojenaz kullanarak genetik farklılığı analiz edilmesi	BSF341 (5-CCTACGGGAGGCAGCAG-3; E.coli 16S rRNA pozisyonları 341 to 357), BSR926 (5-CCGTCAATTYTTTTRAGTTT-3; E. coli 16S rRNA pozisyonları 917 to 926).	Xing vd. (2007)
Hyd A gene		[Fe]-H ₂ ase aminosit sekansı, universal primerleri hydF1 (5-GCCGACCTKACMATMATGGA-3) hydR1 (5-ATRCARCCRCCSGGRCAGGCCAT3),	
Hyd A 16S rRNA	Hidrojen üretebilen ısı ile muamele edilmiş çamur bakterilerinin fraksiyon profilinin çıkarılması ve bunu takiben bu organizmaların izole edilmesi ve hidrojen üretme yeteneklerinin doğrulanması	E1f (GCTGATATGACAATAATGGAAGAA) Hydrogenase gene Chang vd. (2006) E1r (GCAGCTTCCATAACTCCACCGGTTGCACC) Hydrogenase gene Chang vd. (2006) L1f (AAATCACCACAACAAATATTTGGTGC) Hydrogenase gene Chang et al. (2006) L1r (ACATCCACCAGGGCAAGCCATTACTTC) Hydrogenase gene Chang vd. (2006) 27F (AGAGTTTGATYMTGGCTCAG) Bacteria 16S rDNA Suzuki ve Giovannoni (1996) 357F (CCTACGGGAGGCAGCAG) Bacteria 16S rDNA Muyzer vd. (1993)	Wang vd. (2006)

Gen adı	Amaç	Kullanılan Primer Sekansı	Referans
		<p>357F-GC GC clamp : (CCTACGGGAGGCAGCAG) Bacteria 16S rDNA Muyzer vd. (1993)</p> <p>786F (GATTAATACCCTGGTAG) Bacteria 16S rDNA Neimark ve Kocan (1997)</p> <p>518R (ATTACCGCGGCTGCTGG) Bacteria 16S rDNA Muyzer vd. (1993)</p> <p>1492R (TACGGYTACCTTGTACGACT) Bacteria 16S rDNA Suzuki ve Giovannoni (1996)</p> <p>GC clamp: (CGCCCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGC ACGGGGGG) Muyzer vd. (1993)</p>	
Hyd A geni ve 16S rRNA	Gerçek zamanlı PCR ve FISH ile bir molaz atıksu biyohidrojen üreten sisteminde bir biyo-indeksi olarak klostridiyal hidrojenaz gen aktivitesinin araştırılması	<p>E1f (GCTGATATGACAATAATGGAAGAA) <i>Clostridium</i> <i>spp.nin</i> Hydrogenase geni Chang vd. (2006)</p> <p>E1r (GCAGCTTCCATAACTCCACCGGTTGCACC) <i>Clostridium spp.nin</i> Hydrogenase geni. Chang vd. (2006)</p> <p>EUB968F (AACGCGAAGAACCTTAC) Bacteria 16S rRNA Nielsen vd. (1999)</p> <p>UNIV1392R (ACGGGCGGTGTGTRC) Bacteria 16S rRNA Nielsen vd. (1999)</p> <p>AY652730 GC-clamp: (CGCCCCGGGGCGCGCCCCGGGGCGGGGCGG GGGCACGGGGGG) hydKE6-FIT (CTAAGCCTTCCACTGTAGGC) <i>Saccharobutylicum</i> - hydrogenase benzeri geni Chang vd (2006)</p> <p>EUB 338 (GCTGCCTCCCGTAGGAGT) 16SrRNA of eubacteria Amann vd. (1990)</p>	Chang vd. (2006)
16S rDNA	Fermentatif mikroorganizma topluluğu üzerinde şartlandırmanın hidrojen üretimine etkisi	<p><i>Forward primers:</i> GM-5F GC-clamp: (5'CGCCCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGG CACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'), <i>reverse primer:</i> DS907R: (5'-CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3')</p>	Kawaoshi vd. (2005)

Gen adı	Amaç	Kullanılan Primer Sekansı	Referans
16S rDNA	Karışık mikroorganizmalarla, sürekli biyolojik hidrojen üretimi için Sorgumla kurulan anaerobik AKR'nin mikroorganizma tayini	<i>Forward primer;</i> L340GCf (50-CCTACGGGAGGCAGCAG-30) with a GC clamp at the 50 end <i>reverse primer;</i> K517r (50-ATTACCGCGGCTGCTGG-30)	Saraphirom vd. (2011)
Hyd A Gene	Karanlık fermentasyonla hidrojen üreten bakteri popülasyonunun Filogenetik analizi ile fonksiyonel dna analizinin karşılaştırılması	<i>hydAClosF</i> (5'-ACCGGTGGAGTTATGGAAGC-3', (C. pasteurianum position F1258) 50-fluorescein phosphoramidite labeled <i>hydAClosR</i> (5'-CATCCACCTGGACATGCCAT-3', C. Pasteurianum position R1508)	Que´me´ne ur vd. (2011)

Tablo 9.1, 9.2 ve 9.3'deki ilgili çalışmalar değerlendirilmiş, benzer yöntemlerin kullanıldığı çalışmalarda sonuçlar / başarıları ve bu projedeki benzerliklere dikkat edilerek, hidrojen ve metan üreticilerinin moleküler analizleri için kullanılacak primerler, PCR ve DGGE koşulları belirlenmiştir. Bu sonuçlar Bölüm 9.2.1'de sunulmuştur.

9.2 AKR Sistemleri için Gerçekleştirilen Moleküler Çalışmalar

Bu bölümde, İş Paketi 3 ve İş Paketi 7 kapsamında sırasıyla sukroz ve melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon reaktörleri ve İş Paketi 4 kapsamında işletilen AKR-Metanojenesis reaktörü için gerçekleştirilen moleküler analiz yöntemleri ve analiz sonuçları sunulmuştur.

9.2.1 Gereç ve Yöntem

9.2.1.1 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda kullanılmak üzere, öncelikle, iki farklı DNA izolasyonu kitinin karşılaştırılmış, en verimli sonucun elde edildiği kit tipi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu doğrultuda OMEGA-EZNA ve Power MBIO Soil DNA İzolasyon kitleri kullanılmıştır. Söz konusu karşılaştırma için hem karanlık hem de metanojenesis reaktörlerinden birer numune kullanılmıştır. Numuneler bu kitlerle analiz edilmiş, izole edilen DNA ekstraktlarının derişimleri ODTÜ Merkez Laboratuvarlarında Nanodrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific) kullanılarak ölçülmüştür. Analiz sonuçları Tablo 9.4'de gösterilmiştir.

Tablo 9.4. DNA izolasyonunda kullanılan DNA kitleri, numune örnekleri ve analiz sonuçları

DNA Kiti	Numune No ^a	DNA derişimi	Birim	260/280	260/230
POWER MBIO	KF 1	38,8	ng/µl	1,87	1,35
	KF 2	36,4	ng/µl	1,92	1,3
	MR 1	52,5	ng/µl	1,85	1,85
	MR 2	47,3	ng/µl	1,85	1,9
OMEGA-EZNA	KF 1	352,5	ng/µl	1,88	1,41
	KF 2	412,1	ng/µl	1,88	1,4
	MR 1	202,1	ng/µl	1,87	1,54
	MR 2	192,2	ng/µl	1,88	1,38

^a KF: AKR-Karanlık fermentasyon numunesi, MR: AKR-Metanogenesis reaktör numunesi

Nükleik asitlerin saflık oranlarına göre, 260/280 (protein kontaminasyon) oranının 1,8 dolaylarında olması kullanılacak DNA'nın sağlıklı bir PCR uygulaması için uygun olduğunu gösterir. 260/230 oranının 2,0-2,2 aralığında olması ise, DNA izolasyonu sırasında kullanılan fenol, etanol gibi kimyasalların ekstraktı kontamine etmediğini ve ekstraktın PCR için sağlıklı bir ürün olduğunu gösterir. Tablo 9.4'e bakıldığında, 260/280 oranı her iki kit için de beklenen aralıktadır; dolayısıyla, PCR için uygun ekstraktlar elde edilmiştir. Tablo 9.4'de 260/230 oranına bakıldığında ise değerlerin 2,0-2,2 aralığında olmadığı gözlenmiştir. Olası bir kimyasal artığı kalmış olabilir; fakat yine de değerler kritik düzeyde değildir. Bu oranların ötesinde, izolasyon sonrası elde edilen nükleik asit derişimine bakıldığında OMEGA-EZNA kitinin daha verimli olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla projede OMEGA-EZNA kitinin kullanılmasına karar verilmiştir.

DNA izolasyonu için, AKR karanlık fermentasyon ve metanojenesis sistemlerinden belirli aralıklarla toplanan ve -20°C'de depolanan çamur numuneleri kullanılmıştır. DNA izolasyonu öncesinde çözdürülen çamur numuneleri 8000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, sıvısı ayrılan çamur, ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Çözdürülen numuneler, OMEGA-EZNA DNA Kitinde belirtilen protokole göre izole edilmiştir. Sonraki aşamalar için elde edilen sağlıklı DNA ekstraktları PCR ve DGGE analizlerine tabi tutulmuştur.

9.2.1.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Yatay Elektroferez

DNA izolasyonu sonrası elde edilen DNA fragmanları PCR analizine tabi tutulmuştur. PCR, deoksiribonükleik asitlerin in vitro ortamda uygun koşulların sağlanmasıyla çoğaltılarak milyonlarca hatta milyarlarca kopyasının elde edilmesi işlemidir (Madigon ve Martinko, 2006). Diğer bir deyişle, PCR, DNA üzerinde incelenmesi istenen bölgenin olinükleotid primerler kullanılarak çoğaltılmasıdır. Bu yöntemde, denatürasyon ile çift zincirin birbirinden ayrılması,

primerlerin ayrılmış olan DNA zincirlerine bağlanması (annealing), hedef bölgenin DNA polimeraz enzimi tarafından sentezlenmesi (zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturmak üzere uzaması-extension) aşamaları bulunmaktadır. Bu aşamalar, termal döngüler halinde tekrarlanır (Madigon ve Martinko, 2006).

PCR analizleri öncesinde, literatür taraması bölümünde de (Bölüm 9.1) belirtildiği gibi, tüm bakteriler ve archaea türleri için uygun olan PCR yöntemleri/koşulları ve primer setleri araştırılmıştır. Hem karanlık fermantasyon hem de metanojenesis AKR sistemlerindeki tüm bakteriler ve archeaların çoğaltılması için kullanılması planlanan primer setleri Tablo 9.5'de belirtilmektedir. Ayrıca PCR için kullanılan master karışımına dair detaylı içerik Tablo 9.6'da sunulmuştur.

Tablo 9.5. Tüm AKR çamur numuneleri için kullanılan primer setleri ve sekansları

Grup	Primer setleri ve sekansları	Referans
Tüm bakteri	<p>P338f (5'ACTCCTACGGGAGGCAGCAG'3)</p> <p>GC338F (5'CGCCCGCCGCGCCCCGCCC CGGCCCGCCGCCCCGCCCCA CTCCTACGGGAGGCAGC3')</p> <p>(40 bazlı, GC clamp DGGE çalışmaları için kullanılmıştır)</p> <p>P518r (5'ATTACCGCGGCTGCTGG3')</p>	Boon vd. (2002)
Archea	<p>Arch109 (T) F: 5'-ACT GCT CAG TAA CAC GT-3'</p> <p>Univ515 (GC)a R: 5'-ATC GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3'</p> <p>a: GC clamp for Univ-515 R : 5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3'</p>	de Bok vd. (2006), Roest vd. (2005)

PCR amplifikasyonu Thermo Scientific Thermal Cycler Block 5020 marka cihazda gerçekleştirilmiştir. Tüm bakterilerin 16S rRNA amplifikasyonu için, P338f ve P518r bakteriyel primerler kullanılmıştır (Boon vd. 2002; Tablo 9.5). Uygulanan PCR koşulları sırasıyla: başlangıç denatürasyon (94°C, 5 dakika), 35 döngülük denatürasyon (95°C, 1 dakika), bağlanma (53°C, 1 dakika) ve uzama-extension (72°C, 2 dakika) aşamalarından oluşmaktadır (Boon vd. 2002). En son olarak 72°C'da 10 dakika uzama uygulanmaktadır. Archea türleri için ise PCR koşulları başlangıç denatürasyon (94°C, 5 dakika), 35 döngülük denatürasyon (94°C, 30 saniye), bağlanma (52°C, 40 saniye) ve uzama-extension (72°C, 90 saniye) aşamalarından oluşmaktadır (de Bok vd.,2006; Roest vd., 2007). En son olarak 72°C'de 5 dakika uzama uygulanmaktadır. DGGE çalışmaları için elde edilen PCR ürünleri

12 saatten daha kısa bir süre -20°C'de depolanarak ve olabildiğince az bekletilerek taze bir şekilde kullanılmıştır.

Tablo 9.6. Master Karışımı için kullanılan kimyasal içerikleri ve hacimleri

Kimyasal (1 PCR tüpü için) ^a	Eklene Hacim (µL)
Taq Buffer –MgCl ₂ (10X)	2,5
dNTP karışımı (200 mM)	0,5
MgCl ₂ (15 mM)	1,5
Forward primer (0,2 µM)	0,5
Reverse primer (0,2 µM)	0,5
Taq Polymerase	0,125
Template (100 ng/µL)	1,2
ddH ₂ O	18
<i>Toplam:</i>	<i>24,83</i>

^a Kullanılan enzime göre opsiyoneldir.

Tüm PCR ürünleri, 4 µL GelRed® ile hazırlanmış %1'lik agaroz jelde 80 V'da 90 dakika yatay elektroforezde (BioRad Wide Mini Sub-Cell GT) yürütülmüştür. Bu sayede, negatif ve pozitif kontrollerin de eklendiği her PCR seti ve reaksiyonu sonrasında, reaksiyonun sağlıklı olup olmadığını belirlemek, diğer bir deyişle, elde edilen ampikon boyutlarının doğrulanması/kontrolü için PCR numuneleri küçük aralıklı DNA Mass Ruler (1500-100 bp) ile karşılaştırılmıştır (Boon vd., 2002).

9.2.1.3 Denatüre Gradyan Jel Elektroforezi (DGGE)

Tüm bakteriler için uygulanan DGGE işlemi Boon vd. (2002)'nin çalışması, Archea türleri için uygulanan DGGE işlemi ise de Bok vd. (2006)'nin çalışması baz alınarak gerçekleştirilmiştir. DGGE'nin, farklı AKR'lerden farklı zamanlarda alınan numuneler için uygulanmasından önce, DGGE cihazının (CBS Scientific) optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Farklı APS / TEMED oranları ve derişimleri araştırılarak sağlıklı bir DGGE jelinin elde edilmesine çalışılmıştır. Bu bağlamda, APS/ TEMED oranı 110 µL /10 µL olarak belirlenmiştir. Kullanılan PCR ürünü miktarı, uygulanan akım şiddeti ve süresi değiştirilerek, bantların ayrılabilirdiği DGGE koşulları araştırılmıştır; PCR ürünleri, bantların daha yoğun elde edilmesi maksadıyla, örnek başına 45 µL'ye kadar arttırılmış ve %8'lik (w/v) polyacrylamide jelde ve 1XTAE tamponunda (20 mM Tris, 10 mM asetat, 0,5 mM EDTA, pH 7,4) (Boon vd., 2002) hazırlanan jelde yürütülmüştür. Polyacrylamide jel hazırlanırken, tüm bakteriler için %40'tan %60'a gradyan, archaealar için

ise %30'tan %60'a gradyan şeklinde değişen denatürant (formamide + urea) kullanılmıştır. DGGE cihazının işletim koşulunun optimizasyonu sırasında farklı volt (40 V, 150 V, 180 V) ve yürütme süresi (7,5; 9; 16 saat gibi) kombinasyonları araştırılmıştır (veriler sunulmamıştır). Hem tüm bakteriler hem de archaealar için 450 dakika boyunca 60°C'de 180 V akım uygulanarak bantların kaymadan ayrılabilirdiği en iyi sonuç elde edilmiştir. DGGE sonrasında, jel 100 mL 1XTAE tamponu ve 15 µL GelRed® ile 20 dakika bekletilerek boyanmıştır. Ardından, jel görüntüleme cihazında jellerin görüntüleri kaydedilmiştir.

Bu çalışmada, daha önce belirtildiği üzere, hem karanlık fermentasyon hem de metanojenesis AKR'lerinde değişik işletim koşullarında mikrobiyal kültürdeki farklılaşma / popülasyon dinamiğinin değişimi araştırılmaktadır. Bu sebeple, mikroorganizmaların eşit uzunluktaki gen bölgeleri (örneğin: 16S rRNA; 180 bp) PCR ile çoğaltılmış ve sonrasında doğruluğu yatay elektroforezde kanıtlanmış bu fragmanlara (PCR ürünleri) DGGE uygulanarak mikroorganizmaların sahip olduğu eşit uzunluktaki gen bölgelerinin farklı baz dizilimlerinin denatürant (formamide ve urea) yardımıyla sekans spesifik erime noktalarının bantlar oluşturması amaçlanmıştır. Bu bantlar mikrobiyal toplulukların kültür içerisindeki popülasyon dinamiğinin hızlı şekilde karşılaştırılmasına ve incelenmesine olanak sağlamaktadır (Tzeneva vd., 2008). Aynı zamanda bantların sahip olduğu yoğunluk, o mikroorganizmanın popülasyondaki yoğunluğu hakkında bilgi vermektedir (Nikolcheva vd., 2003; Nübel vd., 1999). DGGE karışık kültürlerin profilinin oluşturulmasını ve aynı zamanda aralarındaki etkileşimleri gözlemlene olanağını sağlayan bir yöntemdir (Sanz ve Köchling, 2007).

9.2.1.4 Sekans Analizi

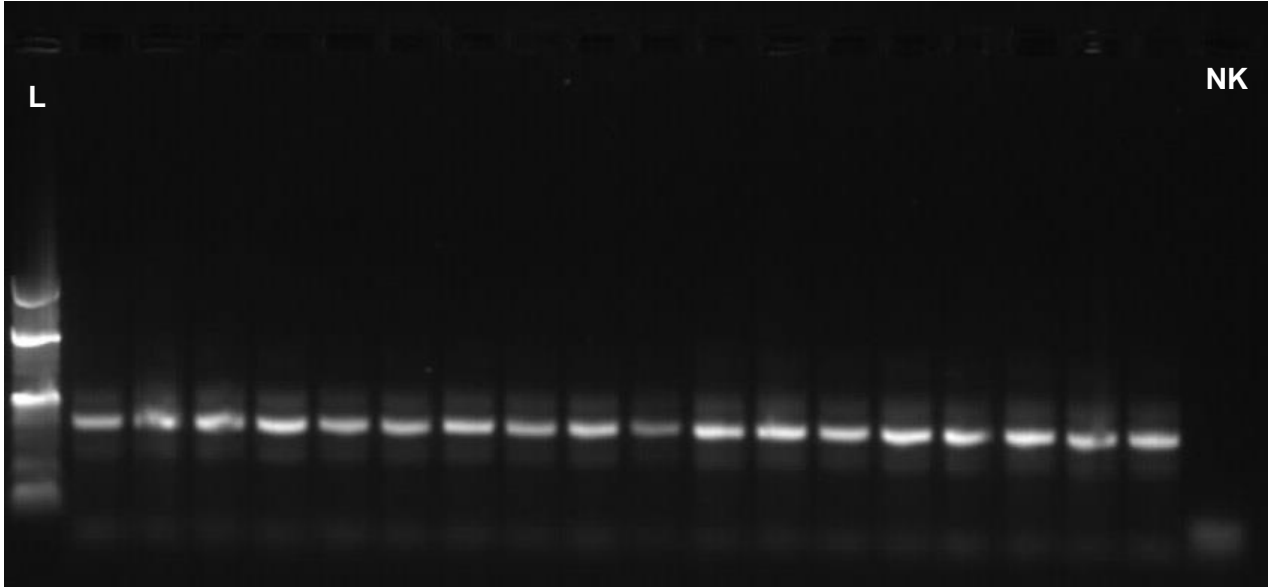
DGGE sonrası kesilen bantların saflaştırılması NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kiti (Macherey-Nagel) ile gerçekleştirilmiştir. Purifikasyon sonrasında tekrar PCR analizine tabi tutulan numunelerin sekans analizi hizmet kalemi ile gerçekleştirilmiştir. Sekans analizleri çift yönlü (forward + reverse sequencing) yapılarak hata payı düşürülmeye çalışılmıştır. Sekans analiz sonuçları National Center for Biotechnology Information (NCBI) sitesi-Basic Local Alignment (BLAST) aracı kullanılarak incelenmiş ve mikrobiyel türler tanımlanmıştır.

9.2.2 Bulgular ve Tartışma

9.2.2.1 AKR-Metanojenesis Sistemine (IP 4) Ait Moleküler Analiz Sonuçları

AKR-Metanojenesis reaktörü, İş Paketi 4 kapsamında üç-aşamalı sistemin 2.aşaması olarak ve ilk aşama olan (sukrozla işletilen) AKR-Karanlık fermantasyon sistemi çıkış suyu ile kurulmuştur (Bölüm 5.3.1). AKR-Metanojenesis reaktörü, 157 günlük işletim boyunca

öncelikle 80 günlük bir aklimasyon sürecinde, ardından farklı HBS-KBS kombinasyonlarının etkisinin araştırıldığı 6 farklı periyotta işletilmiştir. Reaktörden işletim süresince, belirli aralıklarla çamur numuneleri alınmış; Bölüm 9.2.1’de anlatıldığı üzere, çamur numunelerinden hem bakteriyel hem de archaeal türler için DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA ekstraktları, PCR ile çoğaltılmış; PCR ürünlerinin amplikon boyutlarının doğrulanması / kontrolü için DNA Mass Ruler ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, yatay elektroforez yapılmıştır. Örnek olarak, AKR-Metanojenesis reaktöründen archae için elde edilen bazı PCR numunelerinin yatay elektroforez görüntüsü Şekil 9.1’de sunulmuştur. Şekil 9.1’de istenilen 350-400 bp aralığında amplifiye olan DNA fragmanları; diğer bir deyişle, archaea için sağlıklı PCR ürünleri elde edildiği saptanmıştır. Benzeri şekilde, projede gerçekleştirilen tüm PCR işlemlerinde elde edilen (PCR) ürünleri, yatay elektroforezde yürütülerek, doğruluğu kanıtlandıktan sonra DGGE analizlerine tabi tutulmuştur. DGGE analizleri doğruluğunu kanıtlanmış PCR ürünleri ile gerçekleştirildiği için, Şekil 9.1 örneği dışında diğer yatay elektroforez görüntüleri bu raporda sunulmamıştır.



Şekil 9.1. AKR-Metanojenesis reaktörü; farklı işletim günlerinde alınan çamur numunelerinden archae için PCR ürünlerinin örnek yatay elektroforez görüntüsü (L: DNA Mass Ruler; NK: Negatif kontrol)

Doğruluğu kanıtlanmış, sağlıklı PCR ürünleri ile DGGE analizi gerçekleştirilmiş, DGGE görüntüsü Şekil 9.2’de verilmiştir. Şekil 9.2’de görüldüğü üzere, GC yüzdesi 30-60 arasında değişen farklı archaea türleri tespit edilmiştir. Şekil 9.2’de gösterilen jelin yüksekliği boyunca farklı yüksekliklerde beliren bantlar farklı archaea türlerini işaret etmektedir. Bazı bantların dikey dizilimde birbirine çok yakın noktalarda belirmelerinin sebebi, bir türün alt türleri ile

sırası gibi) ve tekrar yokolmuştur (MRA 8, MRA 10 gibi). Bunlara ek olarak, DGGE'de beliren her bant aynı yoğunluğa sahip değildir; bazı bantlar işletim süresince yüksek yoğunlukta (MRA 6 bant sırası), bazıları ise işletim süresince değişen yoğunluklarda gözlemlenmiştir.

Şekil 9.2'da belli bir yoğunluğa sahip ve işletim süresince sabit kalan veya yoğunluğu azalan/artan bantlar, sekans analizleri için numaralandırılmış ve sekans analizleri yaptırılmıştır. Sekans analiz sonuçları Tablo 9.7'de gösterilmiştir. Tablo 9.7'de görüldüğü üzere, sekans analizleri sonucunda AKR-Karanlık fermantasyon çıkış suyu ile işletilen AKR-Metanojenesis reaktöründe 2 archaea türü, *Methanospirillum hungatei* ve *Methanosaeta concilii* belirlenmiştir. Tüm işletim süresince reaktörde baskın olduğu belirlenen MRA 6 kodlu bantın (Şekil 9.2), sekans analizleri çıkmamıştır. Bu durum, sekans analizleri sırasında yaşanan bir sorunla ilişkili olabilir. MRA 1 ve MRA 2 aynı bant sırasında olan, dolayısıyla aynı türe ait olması beklenen kontrol amaçlı seçilmiş iki banttır. Nitekim, MRA 1 ve MRA 2 bantlarının *Methanospirillum hungatei* türüne ait olduğu belirlenmiştir. *Methanospirillum hungatei* hidrojen ve formate tüketen bir metanojen türüdür (Qui vd., 20014). Aynı zamanda hidrojenotrofiktir; en iyi %80 H₂ ve %20 CO₂ ortamlarında büyür, ve karbon kaynağı olarak asetat ve formate kullanabilir (Ferry vd., 1974). Ekiel vd. (1983) bu türün ürettiği metanın %99'unun CO₂ kaynaklı olduğunu belirlemişlerdir. Şekil 9.2'ye göre, *Methanospirillum hungatei* türü, aşı çamurundan (1.gün) yer almazken (amplifiye edilmemişken), aklimasyon sürecinde (1-80.günler) belirgin hale gelmiştir. Buna ek olarak, hem 20 günlük KBS (81.-135.günler) hem de 10 günlük KBS (136-157.günler) uygulanan günlerde reaktörde bulunmuş, tüm HBS koşullarında da varlığını sürdürmüştür. Öte yandan, tüm KBS ve HBS uygulamalarında varlığını sürdürse de, KBS 20 gün ve HBS 3 gün işletim koşullarında baskın hale geldiği gözlenmiştir (en yoğun bantla tanımlanan 107.günde). Bunun yanında, *Methanospirillum hungatei* türü 117.gün itibariyle (KBS: 20 gün, HBS: 1,5 gün), reaktörde azalmaya başlamış; işletimin sonuna doğru KBS değeri 10 güne düşürüldüğünde (136.gün) ve HBS sırasıyla 0,7 ve 1,5 günlük HBS uygulandığında *Methanospirillum hungatei* türü daha da silikleşmiştir. Dolayısıyla, KBS 20 günden 10 güne düşürüldükçe, *Methanospirillum hungatei* türünün baskın olmayan bir tür olduğu belirlenmiştir.

Tablo 9.7'de görüldüğü üzere, sekansı yapılamayan MRA 6 kodlu bant ve MRA 1 ve MRA 2 dışında tüm bantların *Methanosaeta concilii* olduğu belirlenmiştir. Jelin dikey hattı boyunca, farklı yükseklikte beliren bantların farklı G+C içerikli türler olması beklenmektedir. Dolayısıyla, bu türlerin *Methanosaeta concilii* türünün alt türleri olduğu düşünülmüştür. *Methanosaeta concilii* sadece asetatı karbon kaynağı olarak kullanan, diğer metan üretmeye yarayan substratları (H₂-CO₂, formate, metanol veya metilamin) kullanamayan Methanotrix genine ait bir metanojen türüdür. Şekil 9.2 incelendiğinde, bazı *Methanosaeta*

concilii türünün hem aşı çamurunda (MRA 5) yer aldığı; hem de farklı KBS (20 günden 10 güne) ve HBS değerlerinde (6 günden 0,7 güne) yaşayabildiği gözlemlenmiştir. Bölüm 5.1'de, AKR-Metanojenesis sisteminde, *Methanosarcina* türünün asetiklastik metan üreticiler arasından baskın tür haline getirilmesinin hedeflenmesindeki amacın, *Methanosaeta* türüne göre daha yüksek substrat duyarlılığına ($K_s = 49 \pm 19 - 280 \pm 77$ mg çKOİ/L) sahip olması (Fukuzaki vd., 1990); dolayısıyla, takip eden fotofermantasyon reaktörü için çıkış suyunda daha yüksek UYA derişimi elde edileceği düşüncesiydi. Ayrıca, KBS değeri 15 gün ve daha düşük değerlere indirildikçe *Methanosarcina* türünün baskın olduğu belirtilmiştir (Lee vd., 2011). KBS değeri daha yüksek (> 15 gün) anaerobik ortamlarda (ve genellikle konvansiyonel anaerobik çamur çürütücülerde) *Methanosaeta* türünün baskın asetiklastik tür olduğu bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında, işletim koşulları belirlenen AKR-Metanojenesis sisteminde, KBS 20 gün ve daha sonra 10 gün uygulaması yapılmıştır; KBS değeri düştükçe ve yüksek KOİ'de çalışıldığı için *Methanosarcina*'nın baskın olacağı düşünülmüştür. Fakat, moleküler analiz sonuçları, hedeflenenin aksine, sistemde çalışılan her koşul için (10-20 günlük KBS ve 0,7-6 günlük HBS) *Methanosaeta concilii* türünün yaşadığını göstermiştir. Kalyuzhnyi vd. (1996), OYH değeri arttıkça, *Methanosarcina* türünün reaktör içerisinde, *Methanosaeta* türüne kıyasla daha baskın olduğunu belirtmiştir. Bölüm 5'de Tablo 5.6'da görüleceği üzere, AKR-Metanojenesis sisteminde, OYH olarak en fazla 8,9 g çKOİ/L.gün uygulanabilmiştir. Dolayısıyla, *Methanosarcina* yerine, *Methanosaeta* türünün baskın hale gelmesi düşük OYH (< 10 g çKOİ/L.gün) değerleri kaynaklı olabilir.

Tablo 9.7. AKR-Metanojenesis reaktöründen farklı işletim günlerinde alınan çamur numunelerine ait archaea DGGE bantlarına karşılık gelen sekans analiz sonuçları

Sekans analizi yapılan bandın kodu	İşletim Günü	Archaea Türü
MRA 1	157	<i>Methanospirillum hungatei</i>
MRA 2	107	<i>Methanospirillum hungatei</i>
MRA 3	80	<i>Methanosaeta concilii</i>
MRA 4	147	<i>Methanosaeta concilii</i>
MRA 5	1	<i>Methanosaeta concilii</i>
MRA 6	117	- ^a
MRA 7	107	<i>Methanosaeta concilii</i>
MRA 8	80	<i>Methanosaeta concilii</i>
MRA 9	80	<i>Methanosaeta concilii</i>
MRA 10	80	<i>Methanosaeta concilii</i>

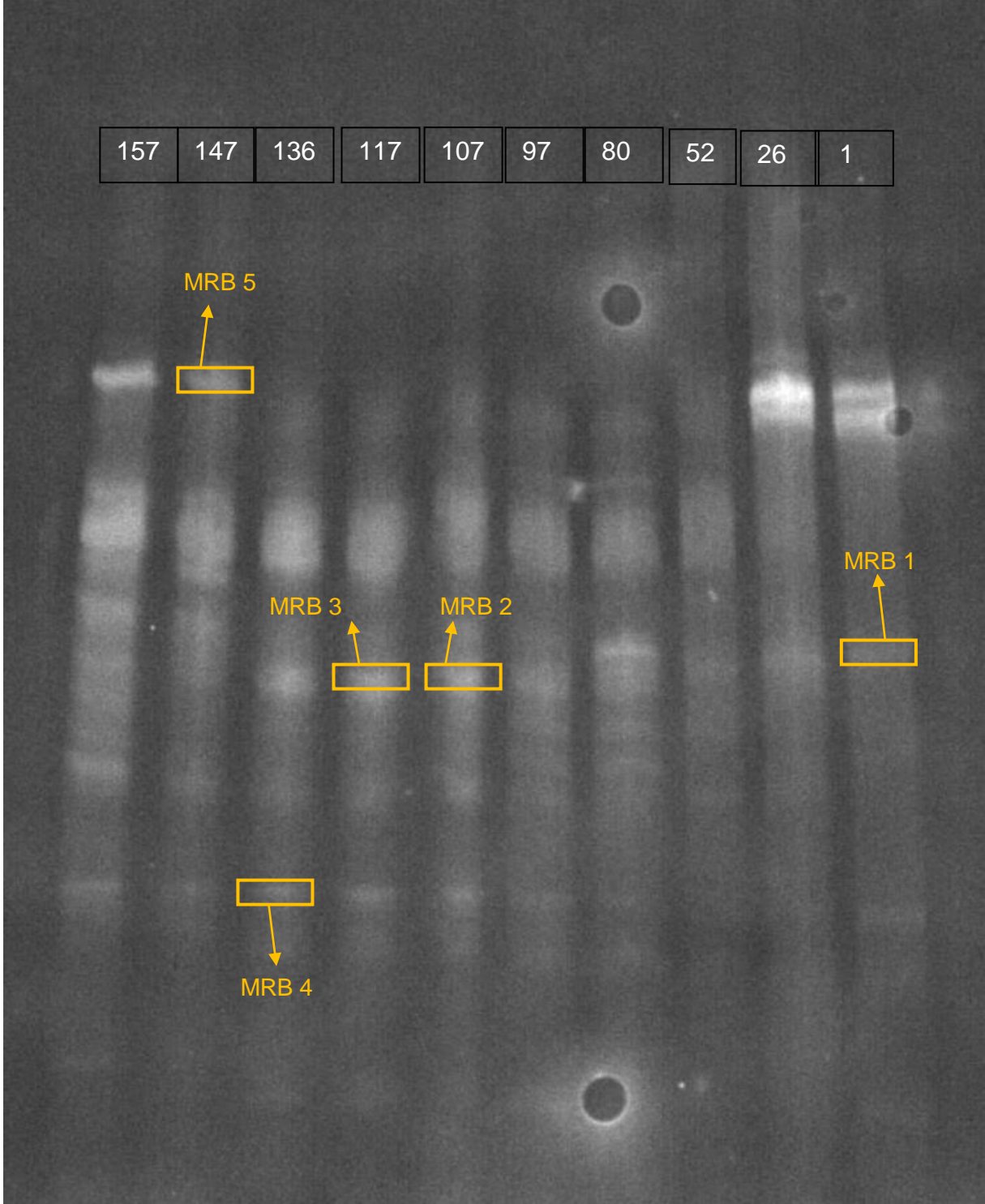
^a Sekans analizi çıkmamıştır.

Sonuç olarak, KBS'nin 20 günden 10 güne düşürülmesi, asetoklastik metanojen türünde bir değişikliğe yol açmamış, *Methanosaeta concilii* türü baskın tür olarak çalışılan tüm işletim koşulları ve kombinasyonlarında (10-20 günlük KBS ve 0,7-6 günlük HBS, Tablo 5.6) gözlenmiştir. Buna ek olarak, H₂-CO₂'den ve formateden metan üreten *Methanospirillum hungatei* türünün de reaktörde bulunduğu belirlenmiştir. KBS 20 günden 10 güne düşürüldükçe, *Methanospirillum hungatei* baskınlığı azalmaktadır. Burada dikkat edilmesi gereken bir husus, moleküler analizlerin, belirli primerlerle çalışıldığı için, tüm metanojenik türleri yakalayamayacağıdır. Dolayısıyla, belirlenen bu iki tür dışında başka türlerin de reaktörde yer alması olasıdır.

AKR-Metanojenesis sisteminden alınan çamur numuneleri, mevcut bakteri türleri için de araştırılmış, DNA izolasyonu sonrası, tüm bakteri primerleri ile 16S rRNA gen fragmanı çoğaltılmış, sonrasında DGGE analizleri yapılmıştır. AKR-Metanojenesis reaktöründen, farklı işletim günlerinde alınan çamur numunelerinde tüm bakteri için gerçekleştirilen DGGE görüntüsü Şekil 9.3'de gösterilmiştir. Daha önce belirtildiği üzere, DGGE jel fotoğraflarındaki her bantın farklı bir mikroorganizma türü olduğu varsayılmaktadır. Aynı zamanda bantların sahip olduğu yoğunluk, o mikroorganizmanın popülasyondaki yoğunluğu hakkında bilgi vermektedir (Nübel vd., 1999; Nikolcheva vd., 2003). Şekil 9.3 incelendiğinde, DGGE jelindeki bantların yayılmış olduğu belirlenmiştir. Bu durum, jel boyamasında kullanılan GelRed kimyasalının özellikleri sebebiyle, keskin / net bir görüntünün alınamaması ile açıklanabilir. Ayrıca, DGGE jelinin dökümü sırasında ya da dökümünden sonraki süreçte, işletimsel bir sorun (sıcaklık ve elektrik aksamında yaşanabilecek sorunlar) ile de ilişkilendirilebilir. Tüm bakteriye ait bantların sayısı sınırlıdır; dolayısıyla mikrobiyel çeşitliliğin az olması mümkündür. Bazı bantlar yoğunluğu az da olsa işletim süresince belirmiş (MRB 4), bazı bantlar ise işletimin sonunda belirgin hale gelmiştir (MRB 5). Az sayıda ve yoğunluğu çok kuvvetli olmasa da, DGGE jelinde süreklilik arzeden ya da sonradan gelişen/yok olan bantlar kesilerek sekans analizleri yaptırılmıştır. Sekans analiz sonuçları Tablo 9.8'de verilmiştir.

Tablo 9.8'de görüldüğü üzere, aşı çamurunda olması muhtemel MRB 1 ve MRB 5 bantları sekanslanamamıştır. Aynı olması beklenen ve kontrol amaçlı aynı sıradan kesilen MRB 2 ve MRB 3 bantları %99 benzerlikle *Clostridium saccharobutylicum* türü olarak tanımlanmıştır. *Clostridium* türleri hidrojen üreticiler arasında yer alan spor-yapıcı bakterilerdir. *Clostridium saccharobutylicum*, sukroz, früktoz manoz gibi çeşitli şekerlerden aseton, butanol ve etanol üreten spor-yapıcı bir bakteri olarak tanımlanmaktadır. Dolayısıyla, sukrozla beslenen AKR-Karanlık fermantasyon sistemi çıkış suyu ile beslenen AKR-Metanojenesis sisteminde olması

muhtemel bir bakteridir. Şekil 9.3'e bakıldığında *Clostridium saccharobutylicum* türünün işletim süresince (KBS ve HBS'den bağımsız olarak) reaktörde bulunduğu tespit edilmiştir. MRB2 ve MRB 3 hidrojen üretici *Clostridium acetobutylicum* türü ile de %96 ilişkilendirilmiştir.



Şekil 9.3. AKR-Metanojenesis reaktöründen farklı işletim günlerinde alınan çamur numuneleri için tüm bakteriler popülasyon dinamiğine dair DGGE jel görüntüsü (MRB: Metanojenesis reaktör-Bakteri)

MRB 4 kodlu bant ile tanımlanan bakteri türü ise %98 benzerlikle Gammaproteobacteria-Enterobacteriales familyasına ait *Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655* olarak tanımlanmış fakültatif anaerobik bir bakteridir (Tablo 9.8). Bu bakterinin de reaktörde işletimin başından itibaren yer aldığı, fakat HBS'nin 0,7-1,5 gün olduğu işletim günlerinde (109-157.günler) biraz daha yoğunlaştığı belirlenmiştir (Şekil 9.3).

Tablo 9.8. AKR-Metanojenesis reaktöründen farklı işletim günlerinde alınan çamur numunelerine ait tüm bakteri-DGGE bantlarına karşılık gelen sekans analiz sonuçları

Sekans analizi yapılan bandın kodu ^a	İşletim günü	Bakteri türü
MRB 1	1	- ^b
MRB 2	107	<i>Clostridium saccharobutylicum</i> DSM 13864 (%99) <i>Clostridium acetobutylicum</i> (%97)
MRB 3	117	<i>Clostridium saccharobutylicum</i> DSM 13864 (%96) <i>Clostridium acetobutylicum</i> (%96)
MRB 4	136	<i>Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655</i> (%98)
MRB 5	147	- ^b

^a MRB: Metanojenesis reaktör-Bakteri, ^b Sekans analizi çıkmamıştır.

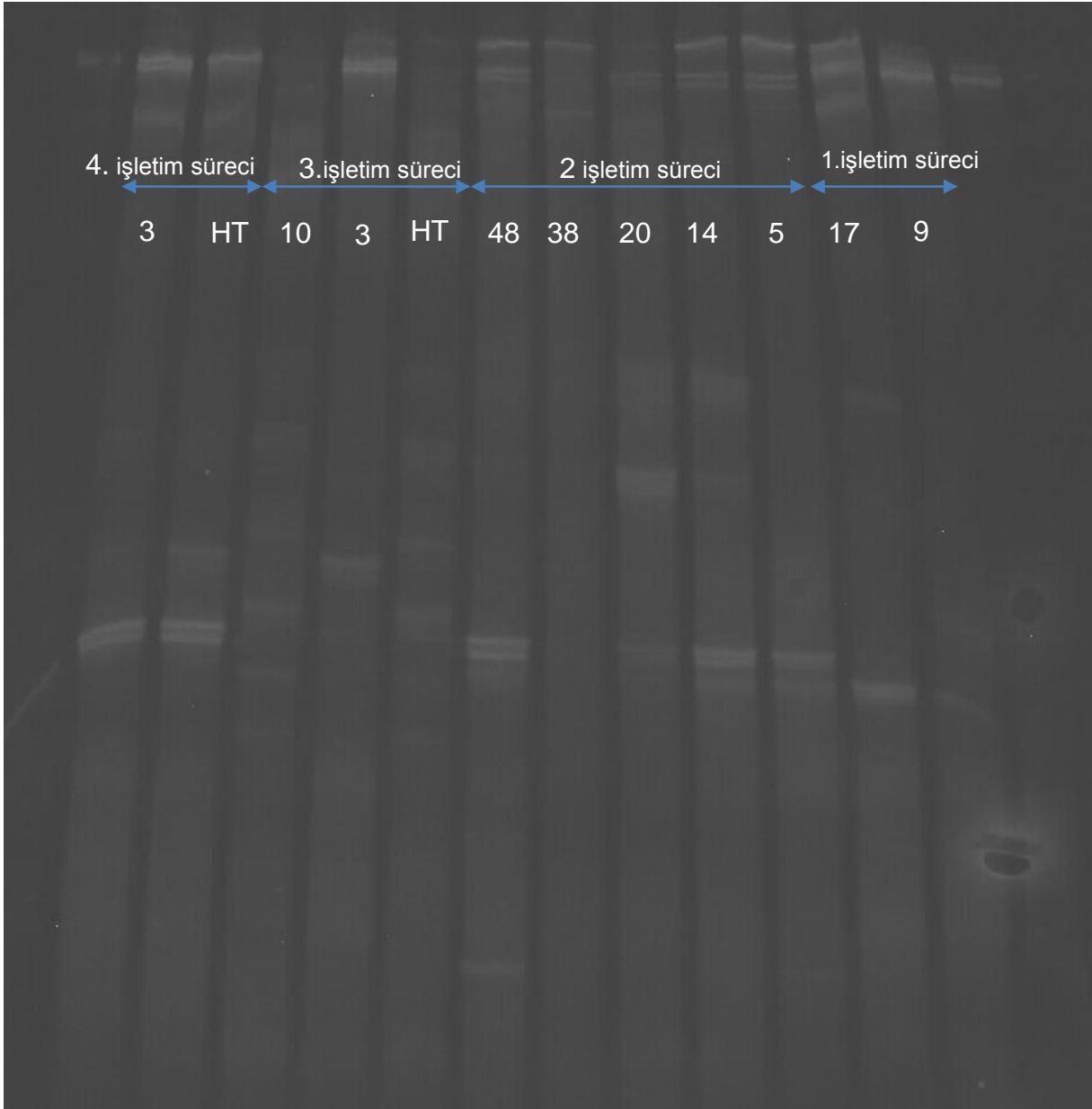
9.2.2.2 Sukrozla İşletilen AKR-Karanlık Fermantasyon Sistemine (IP 3) Ait Moleküler Analiz Sonuçları

AKR-Karanlık fermantasyon reaktörü, İş Paketi 3 kapsamında üç-aşamalı sistemin 1.aşaması olarak yer almış ve sukrozla işletilmiştir (Bölüm 4.2.1). AKR-Karanlık fermantasyon çalışması, işletim koşullarının farklı olduğu, her aşamada hidrojen üretiminin artırılması ve daha kararlı hale gelmesi için kurulan 5 farklı işletim sürecinden oluşmaktadır. Bu 5 farklı işletim süreci boyunca, belirli aralıklarla çamur numuneleri alınmış; Bölüm 9.2.1'de anlatıldığı üzere, hem bakteriyel hem de archaeal türler için DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA ekstraktları, PCR ile çoğaltılmış ve DGGE analizine tabi tutulmuştur.

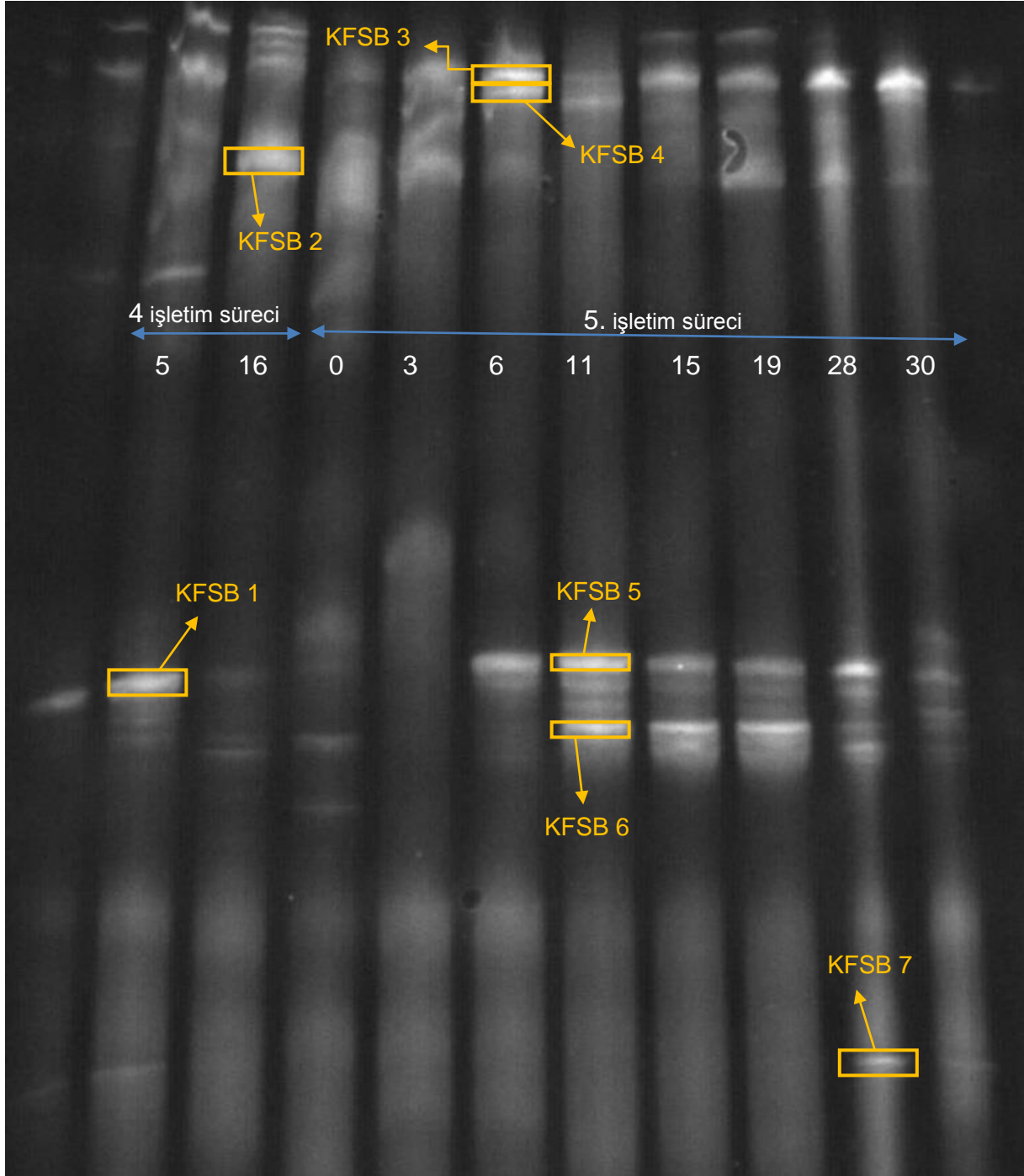
Sonuçlara göre, AKR-Karanlık fermantasyon 1.-5. İşletim süreçlerinden alınan çamur numunelerinin hiçbirinde, kullanılan archaeal primerlerle (Arch109(T)F / Univ515R) archaea türleri amplifiye edilememiş / çoğaltılamamıştır (DGGE jel görüntüsü bu sebeple sunulmamıştır). Bu beklenmedik bir durumdur; zira Bölüm 4.2.1'de belirtildiği üzere, 3.İşletim süreci hariç, tüm AKR-Karanlık fermantasyon süreçlerinde, işletimin sonuna doğru metan üretimi gözlemlenmiştir. İşletim sürecinin sonuna doğru gözlenen metanın tepegazı genellikle %10'a kadar çıkmış, daha uzun işletme süreçlerinde bu değer %50'ye kadar ulaşmıştır.

Bölüm 4.2.1’de bu metanojen türünün, hidrojenotrofik bir archaea türü olduğu, düşük pH 5,5 değerinde yaşayabilen ve yüksek UYA derişimlerini tolere edebilen bir tür olabileceği speküle edilmiştir. Dolayısıyla, bu çalışmada kullanılan archaea primerları ile etkili bir amplifikasyon yapılamamış olabilir. Buna ek olarak, çamur numuneleri (özellikle, 1.-4.işletme sürecine ait olan numuneler) uzun bir süre önce toplanmış / izole edilmiş olduğu için, -20°C’de depolansa bile, az miktarda (derişimde) bulunması durumunda degrades olmuş olabilir.

PCR-DGGE analizler aynı şekilde, tüm bakteriler için de yapılmış; sonuçlar, numunelerin fazla olması sebebiyle iki ayrı şekilde (Şekil 9.4 ve Şekil 9.5’de) sunulmuştur.



Şekil 9.4. Sukroz ile işletilen AKR-Karanlık fermantasyon deneyleri 1.-4.işletim sürecinde alınan çamur numuneleri için tüm bakteriler popülasyon dinamiğine dair DGGE jel görüntüsü (HT: ısıt ön-işlem uygulanan aşı çamuru)



Şekil 9.5. Sukroz ile işletilen AKR-Karanlık fermantasyon deneyleri 4. ve 5. işletim sürecinde alınan çamur numuneleri için tüm bakteriler popülasyon dinamiğine dair DGGE jel görüntüsü (0.Gün: Isıl ön-işlem uygulanan aşı çamurunu temsil etmektedir; KFSB: Karanlık fermantasyon-Sukroz-Bakteri)

Şekil 9.4’de görüldüğü üzere, AKR-Karanlık fermantasyon 1.-3.ışletim sürecine ait çamur numunelerini ve bakteri türlerini temsil eden ve mikrobiyal çeşitlilikle paralel olan DNA bant sayısı, beklenenden daha az ve düşük yoğunlukta gözlenmiştir. Isıl ön-ışletim uygulanmış anaerobik aşı çamurunda gözlemlenen bakteri türleri 1.-4.ışletim süreçlerinin tümünde tespit edilmiştir. Öte yandan sadece bazı ışletim süreçlerine özgü bakteri türleri de tespit edilmiştir. Şekil 9.4’de gözlemlenen bantlar kesilmiş ve saflaştırıldıktan sonra kontrol amaçlı ikinci bir DGGE analizine tabi tutulmuştur. 2.DGGE jel görüntülerinde bir bant gözlemlenmediği için (1.DGGE sonrası PCR ile çoğaltılmış olmasına rağmen yeterli miktarda olmadığı için), sekans analizi Şekil 9.4’de görülen bantlar için uygulanmamıştır. Bu durum, 1.DGGE sonrası jelden kesilen bantların saflaştırılma ve kesim sırasında UV altında degrade olması ile açıklanabilir. Ek olarak 2.DGGE öncesinde PCR yapılmıştır, bu da etkin gerçekleşmemiş olabilir. Şekil 9.4’deki bantlar sekansa tabi tutulmasa da, 4. ve 5.ışletim koşulları sırasında alınan numunelere 2.DGGE sonrası sekans yapılabilmiştir. Sekans analizi için jelden kesilen bantlar Şekil 9.5’de sarı kutularla gösterilmiştir. Şekil 9.5’de görülen bantların yoğunluğu yüksektir. Bu durum, ilgili mikrobiyel türün popülasyon içerisinde daha baskın / yoğun miktarda olduğunu göstermektedir. Sekans analizi sonuçları Tablo 9.9’da sunulmuştur.

Tablo 9.9. Sukroz ile ışletilen AKR-Karanlık fermantasyon deneyleri 4. ve 5.ışletim süreçlerinde alınan çamur numuneleri için tüm bakteri-DGGE bantlarına karşılık gelen sekans analiz sonuçları

Sekans analizi yapılan bandın kodu ^a	İşletim süreci no	İşletim Günü	Bakteri Türü
KFSB 1	4. İşletim	5	<i>Bifidobacterium thermophilum</i> (%97) <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> II1403 (%93)
KFSB 2	4. İşletim	16	- ^b
KFSB 3	5. İşletim	6	- ^b
KFSB 4	5. İşletim	6	<i>Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655</i> (%97)
KFSB 5	5. İşletim	11	- ^b
KFSB 6	5. İşletim	11	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 27774 (%97)
KFSB 7	5. İşletim	28	<i>Olsenella uli</i> DSM 7084 (%96)

^a KFSB: Karanlık fermantasyon-sukroz-bakteri; ^b Sekans analizi çıkmamıştır.

KFSB 1 ve KFSB 5 kodlu bantların, aynı sırada (G+C’de) yer alması sebebiyle, aynı tür olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda, sekans analizleri KFSB 1 bandını %97 benzerlik ile *Bifidobacterium thermophilum* ile ilişkilendirmiştir. Bu bakteri, non-patojenik ve yararlı bir

laktik asit bakterisidir. Hidrojen üretiminin azaldığı ortamda baskın olduğu Duandgmanee vd. (2007)'nin çalışmasında belirtilmiştir. KFSB 1 kodlu bant, %93 benzerlikle, laktik asit üreten *Lactococcus lactis subsp. lactis* II1403 ile de ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak, her iki tür de laktik asit üreten ve hidrojen üretimini olumsuz etkileyen bakterilerdir. KFSB 1 ve KFSB 5'in aynı tür olduğu varsayımıyla, laktik asit üreticilerinin 5. işletim sürecinde aşı çamurunda yer almazken, işletim süreci ilerledikçe 6, ve 11.günlerde baskın hale geldiği, ve işletimin sonuna kadar (arada yoğunluğunda azalma olsa da) reaktörde bulunduğu anlaşılmaktadır. Nitekim, Bölüm 4.2.1'de (Şekil 4.8), 3.gün itibariyle başlayan ve 8.günde pik yapan, 12.gün sonunda iyice azalan fakat işletim sonuna doğru (30.günde) yeniden üretilen laktik asit derişimi, moleküler analiz sonuçlarını ve bant yoğunluğu-popülasyon ilişkisini doğrulamaktadır. Laktik asit bakterileri, 4. işletim sürecinde de (5.gün) gözlenmiş; reaktör içi laktik asit derişiminin de bant yoğunluğuna paralel şekilde bu süreçte (4-5.günler) arttığı ve sonrasında, bantın yoğunluğunun kaybolduğu gibi 16.günde üretilmediği anlaşılmaktadır (Şekil 4.6).

Sekans analizinde belirlenemeyen KFSB 3 kodlu bant aşı çamurunda belirgin olmasa da 6.günde baskın hale gelmekte, 11.günde yoğunluğunda bir azalma olmakta; 19.gün sonrasında da, özellikle 28.-30.günderde yoğunluğu artmaktadır. Bant yoğunlukları, 5. işletim sürecinde gözlenen hidrojen üretimindeki azalış ve artışlara paralel şekilde, sırasıyla, azalmakta ve artmaktadır (Şekil 4.8). KFSB 3 kodlu bakteri, hidrojen üreten *Clostridium* türü, fakültatif *Enterobacter* türü ve *Bacillus* türüne (Argun ve Kargı, 2011) ait bir bakteri olabilir.

KFSB 4 kodlu bant %97 benzerlikle Gammaproteobacteria-Enterobacteriales familyasına ait *Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655* olarak tanımlanmış fakültatif anaerobik bir bakteridir. *Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655* türü % işleim sürecinde reaktörde 6.günde belirgin hale gelmekte sonrasında yoğunluğu azalmaktadır.

Şekil 9.5'de belirtilen KFSB 6 ve KFSB 7 kodlu bantlar ise, sırasıyla, *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 ve *Olsenella uli* DSM 7084 olarak tanımlanmıştır. *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 sulfat-indirgeyen anaerobik bir bakteridir; atıksuda, tuzlu sularda, endüstriyel sularda, çamurda vb. ortamda bulunabilirler. 5. işletim sürecinde, 11.-19.günlerde reaktörde baskın olduğu gözlemlenmiştir. Actinobacterial familyasından Coriobacteriaceae'e ait fermentatif, spor oluşturmeyen ve asetik ve laktik asit üreticisi olan *Olsenella uli* DSM 7084 türü ise, hem 4. hem de 5. işletim sürecinde reaktörde, kısa süreli, gözlemlenmiştir. 5. işletim sürecinde, 28.-30.günde üretilen laktik aside *Olsenella uli* DSM 7084 türü de yardımcı olmuş olabilir (Şekil 4.8).

9.2.2.3 Melasla İşletilen AKR-Karanlık Fermantasyon Sistemine (IP 7) Ait Moleküler Analiz Sonuçları

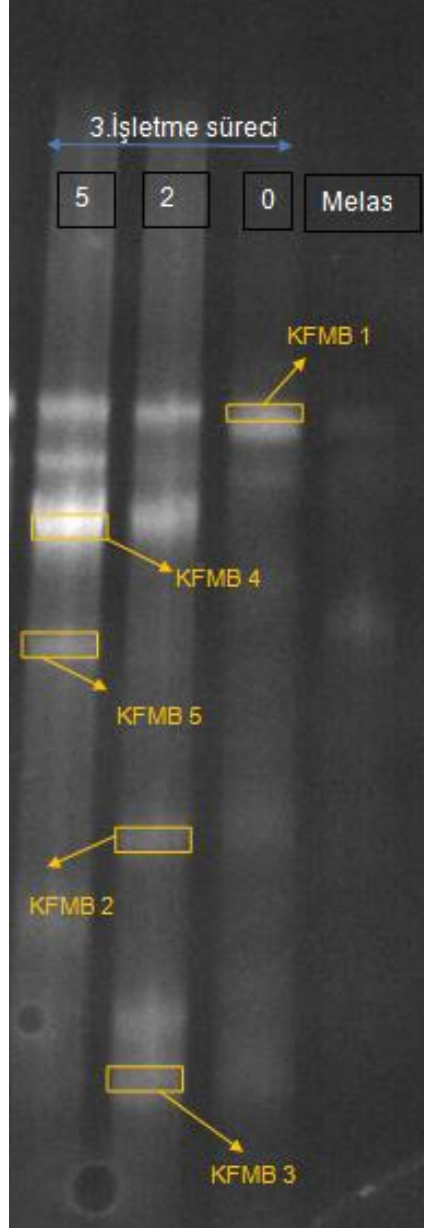
AKR-Karanlık fermantasyon reaktörü, İş Paketi 7 kapsamında üç-aşamalı sistemin 1.aşaması olarak yer almış ve melasla işletilmiştir (Bölüm 8.2.1). AKR-Karanlık fermantasyon çalışması, işletim koşullarının farklı olduğu, her aşamada hidrojen üretiminin artırılması ve daha kararlı işletim koşulları sağlanması (KBS, çökme süresi gibi) için kurulan 3 farklı işletim sürecinden oluşmaktadır. Bu işletim süreçlerinden ilkinde, düşük çökme süresi sebebiyle, KBS 2 güne düştüğü için reaktör içi çamur atılmıştır. 2. işletim sürecinde de teknik aksaklıklar sebebiyle çamur atımı gerçekleşmiştir. Dolayısıyla, moleküler analizler, sadece 3. işletim süreci için gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte, reaktörden belirli aralıklarla alınan çamur numuneleri, Bölüm 9.2.1'de anlatıldığı üzere, hem bakteriyel hem de archaeal türler için DNA izolasyonuna, ardından da PCR-DGGE analizlerine tabi tutulmuştur.

Melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon sisteminde herhangi bir archaeal türe rastlanmamıştır. Bu durum, kullanılan archaeal primerlerle (Arch109(T)F / Univ515R) olası archaeal türlerinin çoğaltılamaması ile açıklanabilir. Öte yandan, melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon çalışmalarında, sukrozla işletilen AKR'ye kıyasla, metan üretimi gözlemlenmemiştir (Şekil 8.1, 8.2 ve 8.3). Yüksek H₂ yüzdesi üreten bu AKR çalışmalarında, yüksek hidrojen kısmi basıncı ile metanojenler inhibe olmuş ve sistemden atılmış olabilir. Dolayısıyla, DGGE'de herhangi bir bandın gözlenmemesi beklenen bir durumdur.

Tüm bakteriler için yapılan DGGE ve sekans analiz sonuçları sırasıyla Şekil 9.6 ve Tablo 9.10'da sunulmuştur. Şekil 9.6'da görüldüğü üzere, DGGE jelinde 7 bant (bakteri türü) belirgin olarak gözlenmiş, süreklilik arz eden veya değişiklik gösterenler sekans analizine tabi tutulmuştur. Orijinal karbon kaynağı melas için de PCR-DGGE yapılmıştır. Melas için yapılan DGGE analizinde, gözlenen 1-2 bant varlığı çok silik oldukları için sekansı yapılmamıştır. Bu türlerin, melasla karanlık fermantasyon sırasında yüksek H₂ yüzdesine sebep olan hidrojen üretici türler olduğu çalışma sırasında speküle edilmişti (Bölüm 8.2.1). KFMB 1 kodlu bant hizasında yer alan silik bantlardan biri, sekans analizine göre *Pseudomonas poae* RE1-1-14 olarak tanımlanan, çimlerin köklerinde yaşayan bir bakteri türüdür. Şeker pancarından elde edilen melasın kullanıldığı bu çalışmada, bu tip bir bakterinin varlığı beklenebilir. Bu bakteri, aşı çamurunda ve işletim süresince reaktörde de varlığını korumuştur. KFMB 2 kodlu bant da, KFMB 1 bandının tanımlandığı *Pseudomonas poae* RE1-1-14 ile ilişkilendirilmiştir.

KFMB 4 kodlu bant, aşı çamuru ve melasta yer almayan fakat 6 günlük işletimin 2.gününde belirginleşen ve 5.günde yoğunlaşan bir bakteridir. 3. işletim sürecinde, AKR'de hidrojen

üretimine paralel, ama özellikle butirik asit oluşumuna paralel şekilde, banttaki yoğunluğu artmaktadır (Şekil 8.3 ve Şekil 9.6). Fakat KFMB 4 bandının *Arcobacter butzleri* RM4018 olduğu belirlenmiştir (Tablo 9.10). *Arcobacter* türleri arasında, sülfür oksitleyen, asetatı kullanan alt türleri; insan ve hayvanlar için patojen olan alt türleri bulunmaktadır. Asetat kullanan alt türü olan *Arcobacter sp.* de %97 benzerlikle KFMB 4 bandı ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 9.6. Melas ile işletilen AKR-Karanlık fermantasyon deneyleri 3. işletim sürecinde alınan çamur numuneleri için tüm bakteriler popülasyon dinamiğine dair DGGE jel görüntüsü (0.Gün: Isıl ön-işlem uygulanan aşı çamurunu temsil etmektedir; KFMB: Karanlık fermantasyon-Melas-Bakteri)

Tablo 9.10. Melas ile işletilen AKR-Karanlık fermentasyon deneyleri 3.İşletim sürecinde alınan çamur numuneleri için tüm bakteri-DGGE bantlarına karşılık gelen sekans analiz sonuçları

Sekans analizi yapılan bandın kodu	İşletim süreci no	İşletim Günü	Bakteri Türü
KFMB 1	3. İşletim	0	<i>Pseudomonas poae</i> RE1-1-14
KFMB 2	3. İşletim	2	<i>Pseudomonas poae</i> RE1-1-14
KFMB 3	3. İşletim	2	<i>Peptoclostridium difficile</i> 630 <i>Clostridium sticklandii</i> (%97)
KFMB 4	3. İşletim	5	<i>Arcobacter butzleri</i> RM4018
KFMB 5	3. İşletim	5	<i>Pelobacter carbinolicus</i> DSM 2380

^a KF5B: Karanlık fermentasyon-melas-bakteri

KFMB 3 kodlu bant ise patojenik olan *Peptoclostridium difficile* 630 ile %92, *Clostridium sticklandii* ile de %97 benzerlikle ilişkilendirilmiştir. *Peptoclostridium difficile* 630 spor oluşturan anaerobik ve patojenik bir bakteridir. *Clostridium sticklandii* ise patojenik olmayan ve karbon ve enerji kaynağı olarak amino asit kullanan anaerobik bir bakteridir.

İşletimin sonuna doğru (5.gün) belirgin olan *Pelobacter carbinolicus* DSM 2380 türü KFMB 5 bandı için tanımlanmıştır. *Pelobacter* türleri hidrojen üretebilen, S⁰ veya Fe(III)'yi elektron alıcısı olarak kullanan fermentatif bakterileridir. *Pelobacter carbinolicus* DSM 2380 oksijensiz ortamda demir- ve S⁰-indirgeyen mesofilik anaerobik bakteridir. Düşük hidrojen basıncında (hidrojenin paralel tüketildiği koşullarda), etanol üretebilmektedir. Ayrıca, asetat da üretebilmektedir. Şekil 8.3'de görüldüğü üzere (Bölüm 8.2.1), hidrojen yüzdesinin azaldığı günde belirginleşmiştir; hidrojen tüketimine paralel olarak etanol-asetat üretmiş olabilir.

Sonuç olarak, melasla işletilen AKR-karanlık fermentasyon sisteminde, çalışılan koşullarda, mikrobiyel çeşitliliğin çok olmadığı anlaşılmıştır. Reaktörlerde, archaea türüne rastlanılmamıştır; bu durum metan üretiminin gözlenmemesini de açıklamaktadır. Tüm bakteri türleri arasında, asetat tüketen / sülfür okistleyen *Arcobacter butzleri* RM4018, amino asit tüketen *Clostridium sticklandii*, ve hidrojen üreten *Pelobacter* türlerinin alt türü olan ve asetat ve etanol üreten *Pelobacter carbinolicus* DSM 2380 belirlenmiştir. Tüm bu bakteriler anaerobiktir. *Pelobacter* dışında hidrojen üreten *Clostridium* türü, fakültatif *Enterobacter* türü ve *Bacillus* türüne (Argun ve Kargı, 2011) ait bir bakteriye, çalışılan primerler ve moleküler işletim koşullarında rastlanmamıştır.

9.3 TUBİTAK 2221 Kapsamında Gerçekleştirilen qPCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Çalışmaları

TUBİTAK 2221 kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların araştırma konusu, farklı reaktör tür ve işletme koşullarının entegre biyohidrojen ve(ya) metan üretim proseslerinde asetat kullanan metanojen türlerinin dağılımının incelenmesidir. Söz konusu dağılım, asetiklastik metanojen türlerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) moleküler yöntemle nicel olarak ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte, kontrollü bir ölçüm yapılabilmesi için öncelikle rekombinant plasmid içeriğinde 270 bp moleküler ağırlığında *Methanosaeta* ve *Methanosarcina* türlerine özgün 16S rRNA gen parçalarını bulunduran *E. coli* kültürü kullanılarak qPCR moleküler yönteminin kalibrasyonu yapılmıştır (Conklin vd., 2006). qPCR kalibrasyon çalışması tamamlanmış olup, uygulanacak yöntem rutin kullanıma hazır hale getirilmiştir. Bu çalışma, üç-aşamalı entegre sistem konulu proje kapsamında yer lamayıp; ek olarak yapılmıştır.

9.3.1 Gereç ve Yöntem

9.3.1.1 Rekombinant *E. coli* Kültür Ekimi ve Stoklama Çalışmaları

Kantatif olarak belirlenecek *M.saeta* ve *M.sarcina* türlerine özgün 16S rRNA gen parçalarını plasmid olarak içeren *E. coli* kültürünün altı ayrı izolet stoku (her bir metanojen kültürü için üç izolet stoku) misafir araştırmacı Prof. Dr. Metin Duran tarafından ABD Villanova Üniversitesi'nden donmuş halde getirilmiştir. Bu *E. coli* kültürleri ilk olarak ABD University of Washington'da (Seattle, WA) geliştirilmiş; sonrasında Villanova Üniversitesi'ne bağışlanmıştır. Plasmidlerdeki tanıtm genleri *M.saeta* türüne özgü 915 baz çifti (GenBank erişim numarası GU475192) ve *M.sarcina* türüne özgü 921 baz çifti (GenBank erişim numarası GU475181) 16S rRNA gen parçalarıdır. Bu özgün gen parçaları plasmid haline dönüştürülmek üzere TOPO taşıyıcısına (Invitrogen, Valencia, CA) yüklenmiş sonrasında da taşıyıcı *E. coli* kültürüne yüklenmiştir. Plazmidlere ve kültüre ilişkin daha ayrıntılı bilgi Uludağ-Demirer vd. (2013) ve Conklin vd. (2006) çalışmalarında bulunabilir.

Donmuş *E. coli* kültürünün ekimi

Donmuş halde getirilen rekombinant *E. coli* izoletleri aşağıda tarif edildiği şekilde büyütülmüş ve qPCR çalışmalarında kullanılmak üzere stoklanmıştır.

- Toz halindeki katı besiyerden (Conda LB Broth (Lennox), Cat: 1231.00) 2,5 g tartılarak 100 mL ultra saf suda çözdürülmüştür.
- Hazırlanmış olan sıvı besiyer ile 6 adet 15'er mL'lik falkon tüp ve tüplerin yerleştirileceği taşıyıcı 20 dakika süresince otoklavda steril edilmiştir (121°C sıcaklık, 15 psi basınçta).
- Sterilizasyon sonrasında sıvı besiyer oda sıcaklığında soğutulmuş ve derişimi 100 µg/L olacak şekilde sıvı antibiyotik ampisilin (Fisher Scientific Amphicillin Sodium Salt, Code: BP1760-5, Lot: 116888) besiyere eklenerek karıştırılmıştır. Antibiyotik ekleme işlemi sıvı besiyerin sıcaklığı 50-55°C'nin altına indiğinde yapılarak, antibiyotiğin yapısının bozulmasına izin verilmemiştir. Antibiyotik sadece plasmid içeren *E. coli* kültürünün büyümesine olanak verdiği için ampisilin sayesinde plasmid içeren *E. coli* seçilebilmektedir.
- 15 mL hacmindeki her bir falkon tüpüne 12,5 mL sıvı besiyer alev çevresinde ve aseptik şartlarda dökülmüştür.
- 1 mL rekombinant plasmide sahip *E.coli* kültür numuneleri vorteks edilerek karıştırılmış ve 2'şer replika olmak üzere, sıvı besiyer ile falkon tüp içerisinde 5-10 mL'lik steril pipetler kullanılarak karıştırılmıştır.
- İşlem sonrasında elde edilen numuneler steril inkübatör içerisinde 37°C'de 24 saat süresince inkübasyona tabi tutulmuştur.

Ekimi yapılan kültürlerin depolanması

Standart plate agar katı besiyeri içerisinde büyütülmüş olan rekombinant plasmidi içeren *E.coli* kültürleri her bir numuneden yalnızca birer koloni alınarak tekrar antibiyotikli besiyerinde büyütülmüştür. Daha sonra dondurulan stoklama çözeltisi şu şekilde hazırlanmıştır: 1,341 g K₂HPO₄ (anhidroz), 0,3538 g KH₂PO₄ (anhidroz) ve 58,8 mL gliserol (saf) 100 mL ultra saf su içerisinde seyreltilerek 100 mL fosfat-tamponlu gliserol (58,8% gliserol, 100 mM, pH= 7,4) koruyucu besiyeri hazırlanmıştır. Sonraki işlemler aşağıda maddeler halinde ve sırasıyla verilmiştir.

- 100 mL fosfat-tamponlu gliserol (58,8% gliserol, 100 mM, pH= 7,4) 20 dakika boyunca otoklavda steril edilmiştir (121°C sıcaklık, 15 psi basınçta).
- Otoklavdan çıkarılan steril karışım oda sıcaklığında soğutulmuş ve 1,5 mL hacmindeki eppendorf tüplerine 330 µL hacminde dağıtılmıştır.
- LB sıvı besiyer içerisinde büyütülmüş rekombinant plasmide sahip *E.coli* kültürlerinden 1 mL hacminde alınarak eppendorf tüplerine eklenmiştir.
- İşlem sonucunda elde edilen numuneler -80°C'de saklanmıştır.

9.3.1.2 Depolanmış Numunelerin Tekrar Büyütülerek Plasmid İzolasyonunun Gerçekleştirilmesi ve Restriksiyon Enzimi ile *Methanosaeta* ve *Methanosarcina* Türlerine Özgün DNA Parçalarının Kesilmesi

-80°C'den çıkartılan numuneler öncelikle Bölüm 9.3.1.2'de açıklandığı şekilde tekrar büyütülmüştür. Ancak, bu ekim çalışmasında inkübasyon süresi 24 saat yerine 18 saat olarak seçilmiştir. Bunun sebebi, çoğalmakta olan *E. coli* populasyonunu büyüme eğrisindeki üstel gelişim evresinde tutarak daha sonra olabildiğince fazla miktarda plasmid ekstraksiyonu yapabilmektir. Hemen peşinden, 10 mL besiyer içerisinde çoğaltılan *E. coli* populasyonu Thermo Scientific SL 16R Centrifuge cihazı kullanılarak 8000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve dipte kalan pelet ayrıştırılarak izolasyona hazır hale getirilmiştir.

Plasmid izolasyonu Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit kullanılarak yapılmıştır. İzole edilmiş olan plasmid numuneleri restriksiyon enzimi ile *Methanosaeta* ve *Methanosarcina* türlerine özgün DNA parçaları kesilmiştir. Restriksiyon işlemi için gereken reaksiyon hacmi 20 µL olmak üzere, içeriğinde kullanılan malzemeler aşağıda belirtilmiştir:

- 250-300 ng miktarına denk gelecek hacimde ekstraksiyon sonrası numune (3-4 µL),
 - 2 µL Thermo Scientific marka 10X FastDigest Green parçalama tamponu,
 - 2 µL Thermo Scientific marka FastDigest Scal enzimi (#FD0434, Lot: 00155349)
- Geriye kalan hacim ari PCR suyu ile tamamlanmıştır.

Restriksiyon işlemi için gereken reaksiyon su banyosunda 37°C'de 3 saat boyunca inkübasyon ile sonuçlandırılmıştır. İşlem sonucunda DNA derişimleri Thermo Scientific Nanodrop 2000c Spectrophotometer cihazı ile ölçülmüştür.

9.3.1.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Amplifikasyonu

PCR amplifikasyonu için kullanılan protokol misafir araştırmacı Prof. Dr. Metin Duran'ın ABD'deki laboratuvarında optimize edilmiştir. Amplifikasyonunun öncesinde, kullanılacak olan primer çiftlerinin dizinimleri aşağıda verilmiştir. Primerler saf PCR suyu ile seyreltilerek reaksiyon için gerekli olan 30 pmol/µl derişimi elde edilmiştir. Kullanılan primer setleri aşağıdaki gibidir (Shigematsu vd., 2003).

Methanosaeta türü için kullanılacak primer seti;

MS1b 585F (5'-CCGGCCGGATAAGTCTCTTGA-3'; 585-605),

Sae 835R (5'-GACAACGGTCGCACCGTGGCC-3';855-835).

Methanosarcina türü için kullanılacak primer seti;
Mb1b 586F (5'-CGGTTTGGTCAGTCCTCCGG-3'; 586-605),
Sar 835R (5'-AGACACGGTCGCGCCATGCCT-3'; 854-835).

PCR amplifikasyonu Thermo Scientific Thermal Cycler Block 5020 marka cihazda gerçekleştirilmiştir. *M.saeta* ve *M.sarcina* türlerinin özgün DNA parçalarını barındıran ikişer kopya ve her iki türün DNA parçaları olmaksızın sadece primer setlerinin bulunduğu tek kopya (negatif kontrol) reaksiyon tüpü hazırlanmıştır. Reaksiyon hacmi 50 µl ve içeriği aşağıdaki gibidir:

- İçerisinde 100 ng izole edilmiş DNA parçası barındıracak hacimdeki numune,
- 5 µl 10X (NH₄)₂SO₄ Tag tampon (Thermo Scientific, Lot: 00136118),
- 1 µl dNTPs karışımı (0.2mM) (Thermo Scientific, #R0192, Lot: 00140076)
- 1 µl İleri (forward) primer ve 1 µl Geri (reverse) primer,
- 6 µl MgCl₂ (25 mM) (Thermo Scientific, Lot: 00134257),
- 0,5 µl Tag DNA Polimeraz (5 U/ µl) (Thermo Scientific, #EP0402, Lot: 00137342).

Geriye kalan hacim saf PCR suyu ile tamamlanmıştır. Negatif kontrol reaksiyonları içerisinde izole edilmiş DNA parçası bulunmamaktadır.

PCR reaksiyonu ile ilgili protokol: 94°C'de 2 dakika bekletme (denatürasyon) ile başlayarak devamındaki 30 döngü içerisinde 94°C'de 1 dakika, 55°C'de (annealing - bağlanma) 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika (elongation – uzatma) ile devam etmektedir. Döngü bittikten sonraki aşamada ise 72°C'de 10 dakika bekletme ile reaksiyon tamamlanmaktadır.

9.3.1.4 Yatay Elektroferez Aşaması

PCR reaksiyonu sonrasında, reaksiyonun sağlıklı bir şekilde gerçekleştiğini test etmek, diğer bir deyişle, elde edilen ampikon boyutlarını teyid etmek amacıyla PCR ürünleri yatay elektroferez kullanılarak yürütülmüştür. Kullanılan cihaz Thermo Scientific Owl Easycast™ B₂ markadır. Elektroferez için hazırlanan jelin içeriği ve yürütülen PCR ürün hacmi aşağıda açıklanmaktadır.

- 100 mL, 1X TAE Thermo Scientific Elektroferez Tamponu (50X sıvı tampon (#B49, Lot: 00139576)
- Agar olarak 1g Prona Agarose (Biomax, Lot: 124543PR) tartılarak 100 mL 1X TAE tamponu içerisinde mikrodalgada ısıtılarak tamamen çözdürülmüştür. Mikrodalgadan çıkarılan solüsyon oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Bu şekilde %1'lik agaroz jel elde edilmiştir.

- Agaroz jeli boyamak amacıyla solüsyon katılaştırmadan önce 15 µL Olerup SSP Gelred dropper Bottle (Product No: 103.302-05, Lot: 79S) eklenerek karıştırılmıştır.
- PCR sonucunda elde edilen her bir numuneden 5 µL alınarak 2 µL Thermo Scientific 6X DNA Loading Dye (#R0611, Lot: 00141296) ile boyanmıştır.
- Yürütülen PCR ürünlerinin (çıkış numunelerinin) moleküler ağırlıklarını karşılaştırma yoluyla tespit etmek için birinci jel kuyusunda 1 µL GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (0,5 µg/ µL) yani moleküler ağırlık belirteci 2 µL Loading Dye ile karıştırılarak yürütülmüştür.
- Yürütme işlemi sırasında 100 Volt gerilim 2 saat süresince uygulanmıştır.

9.3.1.5 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

Elektroforezde yürütülen ve amplikon boyutları teyid edilen DNA numuneleri qPCR işlemi için kullanıma hazır hale getirilmiştir. *M.saeta* ve *M.sarcina* türlerine özgün qPCR işlemi, sadece bu iki tür için geliştirilen özgün primer/sonda takımları ile gerçekleştirilmiştir ve dizin bilgileri aşağıda verilmiştir (Shigematsu vd., 2003).

Methanosaeta türü için kullanılacak primer/sonda seti;

- Forward primer: (5'-CCG GCC GGA TAA GTC TCT TGA-3'),
- Reverse primer: (5'-GAC AAC GGT CGC ACC GTG GCC-3'),
- TaqMan[®] sonda: (5'-ACC AGA ACG GAC CTG ACG GCA AGG-3').

Methanosaeta türü için kullanılacak primer/sonda seti;

- Forward primer: (5'-CGG TTT GGT CAG TCC TCC GG-3'),
- Reverse primer: (5'-AGA CAC GGT CGC GCC ATG CCT-3'),
- TaqMan[®] sonda: (5'-ACC AGA ACG GGT TCG ACG GTG AGG-3').

qPCR reaksiyon hacmi 25 µl olarak optimize edilmiştir. Söz konusu reaksiyon hacmi içerisinde:

- 4 µl PCR ürünü,
- 12,5 µl TaqMan[®] Environmental Master Mix 2.0 (Reaksiyon içerisindeki derişimi 1X olacak şekilde eklenmiştir),
- 1'er µl ileri ve geri primer (11.25 pmole miktarına karşılık gelecek şekilde eklenmiştir),
- 1 µl sonda (reaksiyon tüpü içerisinde *M.sarcina* için 3.125 pmole ve *M.saeta* için 2.5 pmole miktarına karşılık gelecek şekilde ari PCR suyu ile seyreltilmiştir),
- 6.5 µL PCR ari suyu bulunmaktadır.

qPCR reaksiyonu, protokol gereğince 50°C'de 2 dakika ve 95°C'de 10 dakika bekletme (denatürasyon) ile başlayarak devamındaki 40 döngü içerisinde 95°C de 15 saniye, 65°C de (annealing - bağlanma) 1 dakika ile devam ettirilerek sonuçlandırılmıştır. qPCR işlemini gerçekleştirmek için kullanılan Applied Biosystems 5020 Real-Time PCR cihazının ve kullanılan malzemelerin duyarlılığını ve saflığını test etmek amacıyla PCR ürünü içerisinde *M.sarcina* ve *M.saeta* türlerinin çoğaltılmış özgün DNA parçalarını bulunduran numuneler, her iki tür için de seri seyreltme yöntemi kullanılarak 4 farklı oranda seyreltilmiştir. Seyreltilmiş her bir numuneden üçer kopya ve her iki türün primer ve sonda setlerini barındıran ikişer kopya negatif kontrol numunesi reaksiyona tabi tutulmuştur. Negatif kontrol reaksiyon tüplerine PCR ürünü eklenmemiştir. Türler göre numunelerin seri seyreltme işleminden sonraki derişimleri "log gen kopyası/ μL " olarak Tablo 9.11'de verilmektedir.

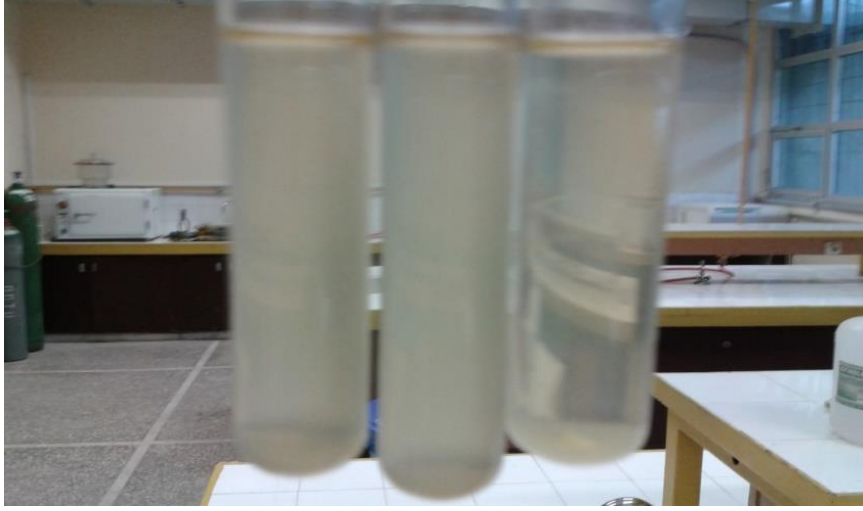
Tablo 9.11. *Methanosarcina* ve *Methanosaeta* türlerinin seri seyreltme işleminden sonraki derişimleri

Numune adı	Log gen kopyası/ μL
<i>Methanosarcina</i> 1	1,57
<i>Methanosarcina</i> 2	2,57
<i>Methanosarcina</i> 3	4,57
<i>Methanosarcina</i> 4	6,57
<i>Methanosaeta</i> 1	1,47
<i>Methanosaeta</i> 2	2,47
<i>Methanosaeta</i> 3	4,47
<i>Methanosaeta</i> 4	6,47

9.3.2 Bulgular ve Tartışma

9.3.2.1 Kültür Ekimi Çalışmalarının Sonuçları

Şekil 9.7'de görüleceği üzere ABD'den getirilen kültürlerin inkübasyon sonrasında sıvı besiyerin bulanık bir görüntü kazanması kültürün büyüdüğüne dair bilgi vermektedir. *E. coli* popülasyonunun zengin katı besiyer (agar) kullanımı, uygun bir inkübasyon sıcaklığı ve süresinden sonra gözle görülebilecek büyüklükte koloniler meydana getirdiğine dair gözlem ise Şekil 9.8'de paylaşılmaktadır.



Şekil 9.7. LB sıvı besiyer ile inkübasyon sonrası *E. coli* kültürünün çoğaldığına dair gözlem



Şekil 9.8. LB agar besiyer ile *E. coli* kültürünün çoğaldığına dair gözlem

9.3.2.2 DNA İzolasyonunun Gerçekleştirilmesine Dair Sonuçlar

Tekrar büyütülen kültürlerden ekstrakt edilen DNA'ların konsantrasyonları ve DNA izolasyonlarının saflığını belirten çeşitli dalgaboyu spektrofotometre ölçümleri Tablo 9.12'de verilmiştir. Nukleik asitlerin saflık oranlarına göre, 260/280 dalgaboyu ölçüm oranının 1,8 civarında, 260/230 oranının ise 2,0-2,2 arasında olması beklenir. Bu değerler göz önüne alınarak Tablo 9.12'deki DNA izolasyonları ve oranlar değerlendirildiğinde, elde edilen numunelerin (DNA ekstraktlarının) protein ve kimyasal kaynaklı kirlilik içermediği anlaşılmaktadır.

Tablo 9.12. DNA izolasyonu sonrası Nanodrop ölçüm sonuçları

	DNA (ng/μL)	260/280	260/230
<i>Methanosarcina 1</i>	53,7	1,82	2,05
<i>Methanosarcina 2</i>	58,2	1,83	2,08
<i>Methanosaeta 1</i>	85,8	1,86	1,83
<i>Methanosaeta 2</i>	98,4	1,73	1,78

9.3.2.3 PCR Amplifikasyon Sonuçları

Kültürlerden izole edilen DNA ekstraktları, elektroforezde görüntüleme öncesinde çoğaltılmalıdır. Çoğaltma işlemi (amplifikasyon) konvansiyonel PCR yöntemi kullanılarak qPCR’da kullanılacak olan primerlerle gerçekleştirilmiştir. PCR sonuçları ve DNA saflığını gösteren spektrofotometre ölçümleri Tablo 9.13’de görülmektedir. Daha önce belirtildiği üzere, nukleik asitlerin saflık oranlarına göre, 260/280 oranının 1,8 civarında, 260/230 oranının ise 2,0-2,2 arasında olması beklenir. Bu değerler göz önüne alınarak Tablo 9.13’deki PCR ürünlerinin saflığı değerlendirildiğinde, PCR ürünlerinin protein ve kimyasal kaynaklı kirlilik içermedikleri anlaşılmaktadır. DNA (ng/μL) olarak verilen derişimleri ise uygulanan protokol ile PCR reaksiyonu sonucunda amplifikasyonun başarılı bir biçimde yapıldığını göstermektedir.

Tablo 9.13. PCR sonrası nanodrop sonuçları

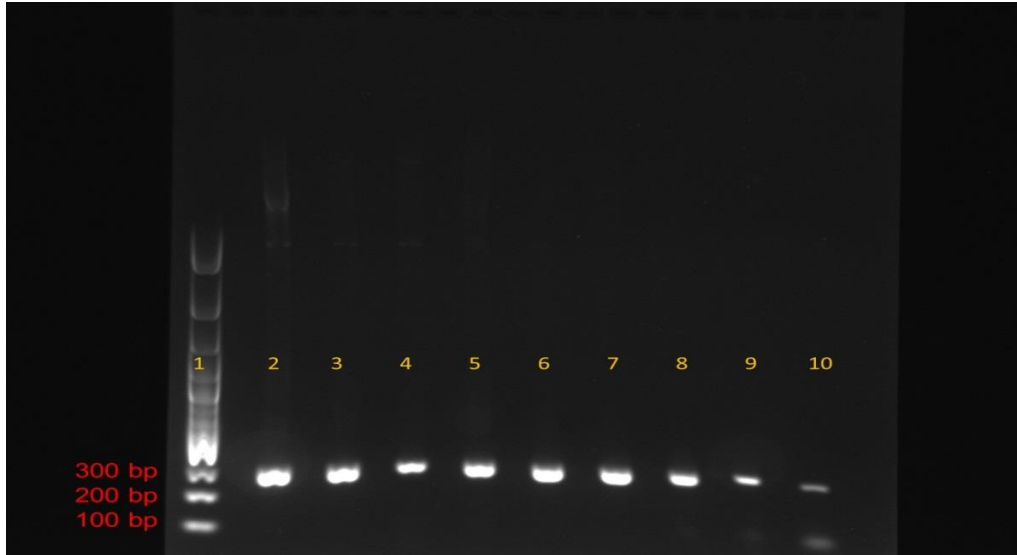
	DNA (ng/μL)	260/280	260/230
<i>Methanosarcina 1</i>	553,5	1,79	1,67
<i>Methanosarcina2</i>	601,2	1,75	1,62
<i>Methanosaeta 1</i>	559,6	1,84	1,71
<i>Met anosaeta 2</i>	519,8	1,85	1,75

9.3.2.4 Yatay Elektroforez Sonuçları

Elektroforez yöntemi ile yürütülen PCR ürünleri (çoğaltılan DNA numuneleri) Quantum-Capture yazılımı ve görüntüleme cihazı kullanılarak görüntülenmiştir. Yürütme sonucunda elde edilen görüntü Şekil 9.9’da verilmiştir. Şekil 9.9’da, 2-3-4-5 numaralı kuyularda yürütülen PCR ürünleri *M. saeta*, 5-6-7-8 numaralı kuyulardakiler ise *M.sarcina* türüne aittir. Daha önce belirtildiği üzere, bir numaralı kuyuda moleküler ağırlık belirteçleri yürütülmüştür. Moleküler ağırlık belirteçlerinin en ileriye yürümüş olan üç tanesinin moleküler ağırlığı baz çifti (base pair, bp) olarak Şekil 9.9’da belirtilmektedir. Ayrıca, 9 ve 10 numaralardaki kuyularda sırasıyla *M.saeta* ve *M.sarcina* primer setleri ile hazırlanan negatif kontrol reaksiyonlarının PCR ürünleri yürütülmüştür.

Öncelikle, elde edilen görüntüye bakıldığında uygulanan PCR protokolünün ve kullanılan cihazın sağlıklı sonuç verdiği görülmektedir. Şekil 9.9'da görüldüğü üzere, 2-3-4-5-6-7-8 numaralı kuyularda yürütülen *M.saeta* ve *M.sarcina* türlerine ait DNA parçaları moleküler ağırlık belirteçlerine kıyasla 300 bp değerine yakın moleküler ağırlığa sahiptir. Bu durum 270 bp moleküler ağırlığına sahip olduğu bilinen özgün (*M.saeta* ve *M.sarcina* türlerine ait) DNA parçalarının ortamdaki varlığını kanıtlamaktadır.

Dokuz ve 10 numaralı kuyulardaki negatif kontrol numuneleri moleküler ağırlık belirteçleri ile karşılaştırıldığında, olması gerektiği gibi bant kalınlığı (DNA yoğunluğu) diğer kuyulardakilere kıyasla ince olmasına rağmen 300 bp değerine yakın ve 100 bp değerinin altında iki bant olarak gözlemlenmiştir. Negatif kontrol numunelerinin, hazırlanışları gereği, sadece 100 bp değeri civarında zayıf bir bant olarak gözlemlenmesi beklenirken 300 bp değeri civarında bir başka bant gözlemlenmesi kullanılan primer setlerinin saflığını kaybetmesi ya da deney esnasında steril şartların yeterince sağlanamamış olması ile ilişkilendirilmiştir. Devam eden çalışmalarda saflığındaki bozulma ihtimaline karşılık primer setleri DNase enzimi kullanılarak saflaştırılacaktır.



Şekil 9.9. %1'lik agaroz jelde yürütülen PCR ürünlerinin yatay elektroforez sonucu görünümü

9.3.2.5 qPCR Sonuçları

M.sarcina ve *M.saeta* türlerinin özgün DNA parçalarından oluşan standart örnekler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde üçer kopya çalışılarak bu üç ölçümün ortalaması analizlerde kullanılmış ve sonuçlar Tablo 9.14 ve 9.15'de verilmiştir. Buradaki amaç, deneysel hataları ve farkları azaltmaktır. qPCR sonucunda *Methanosarcina* ve *Methanosaeta* türünün gen

kopyasını içermeyen negatif kontrol tüplerine ait sonuçlar da Tablo 9.16'da verilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen verilere göre seçilen zaman noktalarına (Cycle Time ya da CT) karşılık gelen gen miktarının logaritmik olarak derişimine dair grafikler Şekil 9.10 ve 9.11'de paylaşılmaktadır. Şekil 9.10 *M.saeta*, Şekil 9.11 ise *M.sarcina* türüne dair ilgili verilerle oluşturulmuştur. Doğrusal regresyon analizi sonucunda Şekil 9.10'da *M.saeta* türüne ilişkin standart eğrinin eğimi "-2,58", R² değeri "0,99" ve reaksiyon verimliliği % 123 olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde *M.sarcina* türüne ilişkin Şekil 9.11'deki standart eğrinin eğimi "-1,95", R² değeri "0,95" ve reaksiyon verimliliği % 223 olarak hesaplanmıştır. Her iki türün reaksiyon verimlerine dair (E) hesap aşağıdaki denkleme göre yapılmıştır (Ramakers vd., 2003).

$$\text{Verim (E)\%} = [(10^{-1/\text{eğim}}) - 1] * 100 \quad (\text{Denklem 9.1})$$

qPCR yöntemi ile yapılan ölçümün hassasiyeti standart eğrilerin eğim, R² ve reaksiyon verimliliği üzerinden yorumlanmaktadır. Bu açıdan, literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde R² "0,95" ile "1", standart eğrinin eğimi "-3 ile -4" arası ve eğime bağlı şekilde verimlilik değerinin %80-115 aralığında olması gerektiği bilinmektedir. Dolayısıyla Şekil 9.10'da *M.saeta* türü için oluşturulan standart eğrinin söz konusu değerleri literatüre yakınlık göstermektedir ve bu tür açısından yapılan analizin başarılı olduğu söylenebilir. Ancak, Şekil 9.11'deki *M.sarcina* türü için oluşturulan standart eğrinin eğim ve verimlilik değerleri yapılan çalışmanın referans alınabilecek bir sonuç vermediğine işaret etmektedir. Bu sonucun, deney düzeneğinin hazırlanışı ve seri seyreltme işlemi sırasında gerekli steril şartların ve hassasiyetin yeterince sağlanamamış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Taşkın vd., 2011).

Tablo 9.14. qPCR sonucunda *Methanosarcina* türünün farklı oranlarda seyreltilmiş numunelerine karşılık gelen CT değerleri

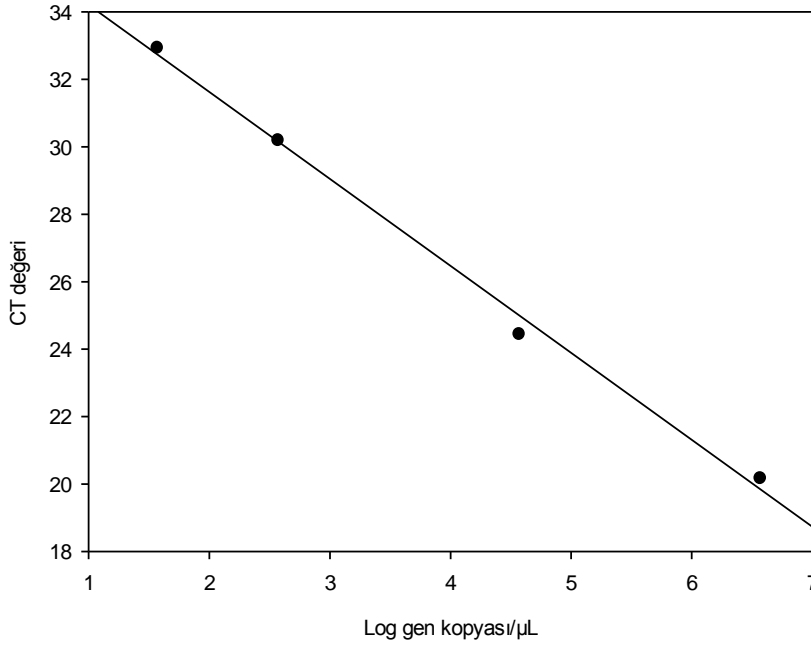
	Ortalama CT değeri	Log gen kopyası/ µL
<i>Methanosarcina 1</i>	31 ± 0,25	1,57
<i>Methanosarcina 2</i>	28,2 ± 0,05	2,57
<i>Methanosarcina 3</i>	26,4 ± 0,03	4,57
<i>Methanosarcina 4</i>	20,5 ± 0,15	6,57

Tablo 9.15. qPCR sonucunda *Methanosaeta* türünün farklı oranlarda seyreltilmiş numunelerine karşılık gelen CT değerleri

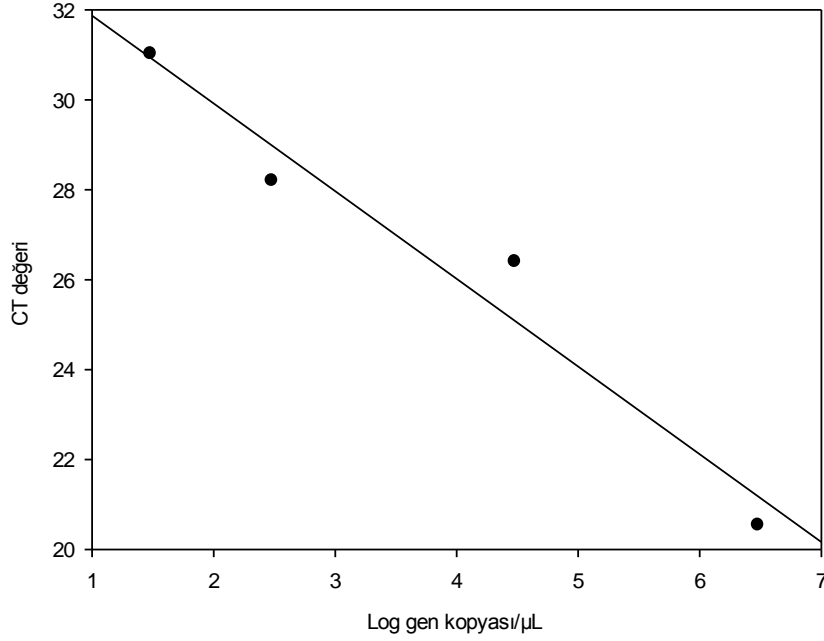
	Ortalama CT değeri	Log gen kopyası/ μ L
<i>Methanosaeta</i> 1	32,9 \pm 0,65	1,47
<i>Methanosaeta</i> 2	30,2 \pm 0,63	2,47
<i>Methanosaeta</i> 3	24,4 \pm 0,28	4,47
<i>Methanosaeta</i> 4	20,2 \pm 0,09	6,47

Tablo 9.16. qPCR sonucunda *Methanosarcina* ve *Methanosaeta* türünün gen kopyasını içermeyen negatif kontrol tüplerinde gözlemlenen CT değerleri

	CT değeri
<i>Methanosarcina</i> için negatif kontrol 1	32,13
<i>Methanosarcina</i> için negatif kontrol 2	32,16
<i>Methanosaeta</i> için negatif kontrol 1	32,12
<i>Methanosaeta</i> için negatif kontrol 2	32,01



Şekil 9.10. Farklı oranlarda seyreltilerek qPCR işlemine tabi tutulmuş *Methanosaeta* türüne ait DNA parçalarının standart eğrisi



Şekil 9.11. Farklı oranlarda seyreltilerek qPCR işlemine tabi tutulmuş *Methanosarcina* türüne ait DNA parçalarının standart eğrisi

Özet olarak, yukarıda verilen deneysel çalışma sonuçlarından görüldüğü üzere rekombinant *E. coli* kültürleri başarılı bir biçimde büyütülmüş, kültürlerden plasmid DNA çıkarılmış ve PCR yöntemiyle çoğaltılarak yatay elektroforez ile görüntülenmiştir. Bu doğrultuda, *E.coli*den çıkarılan DNA'lar ve yöntem rutin kullanım düzeyine getirilmiştir. TÜBİTAK projesi (Proje no: 112M252) çerçevesinde çalıştırılacak olan AKR metanojenesis sisteminde metanojenlerin belirlenmesinde kullanılabilir olan qPCR yöntemi için gereken standard eğri *M. saeta* türü için başarıyla geliştirilmiştir. Verimin yüksek çıktığı *M.sarcina* standard eğrisinin tekrarlanması gerekmektedir. *M.sarcina* qPCR standard eğrisinin de literatürde belirtilen kabul edilir verim ve R^2 değerleriyle tamamlanmasıyla qPCR yöntemi AKR'lerden alınan örneklerdeki metanojen türlerinin belirlenmesinde rutin olarak kullanılabilir. TÜBİTAK projesi (Proje no: 112M252) 'den bağımsız olarak TÜBİTAK 2221 kapsamında yapılan bu çalışmalar, projede çalışan bir bursiyerin yükek lisans tezinde de kullanılacaktır.

9.4 Sonuç

Bu bölümde, üç-aşamalı sistem entegrasyonunu konu alan TÜBİTAK projesinin (Proje no: 112M252) kapsamında, AKR reaktörlerinden alınan çamur numuneleri için yapılan moleküler analiz (PCR-DGGE-sekasn) sonuçları özet olarak sunmuştur. Bahsi geçen projeden bağımsız olarak TÜBİTAK 2221 kapsamında yapılan ek çalışmalar burada özetlenmemiştir.

AKR-Methanojenesis sistemi (İş Paketi 4) moleküler analiz sonuçları;

- KBS'nin 20 günden 10 güne düşürülmesi, asetiklastik metanojen türünde bir değişikliğe yol açmamıştır.
- *Methanosaeta concilii* türü, çalışılan tüm işletim koşulları ve kombinasyonlarında (10-20 günlük KBS ve 0,7-6 günlük HBS, Tablo 5.6) baskın tür olarak gözlenmiştir.
- Buna ek olarak, H₂-CO₂'den ve format'dan metan üreten *Methanospirillum hungatei* türünün de reaktörde bulunduğu belirlenmiştir. KBS 20 günden 10 güne düşürüldükçe, *Methanospirillum hungatei*'nin baskınlığı azalmaktadır.
- Moleküler analizlerde, belirli primerlerle çalışıldığı için, tüm metanojenik türler belirlenememiş olabilir. Belirlenen bu iki tür dışında başka türlerin de reaktörde yer alması olasıdır.
- İşletim süresince (KBS ve HBS'den bağımsız olarak) sukroz, früktoz, manoz gibi çeşitli şekerlerden aseton, butanol ve etanol üreten spor-yapıcı bir bakteri türü olan *Clostridium saccharobutylicum* türü tespit edilmiştir. İlgili bant, hidrojen üretici *Clostridium acetobutylicum* türü ile de ilişkilendirilmiştir. Sukrozla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon sistemi çıkış suyu ile beslenen AKR-Methanojenesis sisteminde hidrojen veya asit/alkol üreten bu bakterilerin gözlenmesi olasıdır.
- AKR-Methanojenesiste olması muhtemel tüm bakteriler ve archaeal türler sekans analizinde belirlenenlerle sınırlı değildir.

Sukrozla beslenen AKR-Karanlık fermantasyon sistemi (İş Paketi 3) moleküler analiz sonuçları;

- Sukrozla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon çalışmasında, laktik asit üretimine paralel şekilde sistemde (5. işletim süreci) baskın hale gelen laktik asit bakterilerinin (*Lactococcus lactis subsp. lactis* II1403 veya *Bifidobacterium thermophilum* ile *Olsenella uli* DSM 7084) varlığı belirlenmiştir.
- Hidrojen üreticilerden olan *Clostridium* türü, fakültatif *Enterobacter* türü ve *Bacillus* türüne ait bir bakterinin sekansı araştırılan gen fragmanları arasında gözlemlenememiştir.
 - Hidrojen üreten genleri esas alan primerlerle çalışılması düşünülebilir.
- Fakat 5. işletim sürecinde gözlenen hidrojen üretimindeki azalış ve artışlara paralel şekilde, sırasıyla, yoğunluğu azalan ve artan KFSB 3 kodlu bant, hidrojen üreten *Clostridium* türü, fakültatif *Enterobacter* türü ve *Bacillus* türüne ait bir bakteri olabilir.
- Moleküler analizler, reaktörde üretilen ürünleri ve olası bakteri türlerini doğrulamıştır.
- 5. işletim sürecinde, archaea türüne rastlanmamıştır.

- Neredeyse tüm işletim süreçlerinde metan gözlenmişken, metan üreticilerin moleküler analizlerde tespit edilememesi, kullanılan archaeal primerlerle ilgili genlerin çoğaltılmaması veya numunelerdeki DNA'nın degrade olması ile açıklanabilir.

Melasla beslenen AKR-Karanlık fermantasyon sistemi (İş Paketi 7) moleküler analiz sonuçları;

- Melasla işletilen AKR-karanlık fermantasyon sisteminde, çalışılan koşullarda, mikrobiyel çeşitliliğin çok olmadığı saptanmıştır.
- Reaktörlerde, archaea türüne rastlanılmamıştır; bu durum metan üretiminin gözlenmemesini de açıklamaktadır.
- Tüm bakteri türleri arasında, asetat tüketen / sülfür oksitleyen *Arcobacter butzleri* RM4018, amino asit tüketen *Clostridium sticklandii*, ve hidrojen üreten *Pelobacter* türlerinin alt türü olan ve asetat ve etanol üreten *Pelobacter carbinolicus* DSM 2380 belirlenmiştir. Tüm bu bakteriler anaerobiktir.
- *Pelobacter* dışında hidrojen üreten *Clostridium* türü, fakültatif *Enterobacter* türü ve *Bacillus* türüne ait bir bakteriye, çalışılan primerler ve moleküler işletim koşullarında rastlanmamıştır.
 - Spesifik hidrojen üreten genleri esas alan primerlerle çalışılması düşünülebilir.

10. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu projenin genel amacı, birim organik maddeden elde edilen enerjiyi, diğer bir deyişle, toplam hidrojen ve metan üretimini arttırmak için, üç-aşamalı karanlık fermantasyon, metanojenesis ve fotofermantasyon konfigürasyonunun geliştirilmesi ve enerji veriminin maksimizasyonu amacıyla üçlü sistemin uygun işletim koşullarının belirlenmesidir.

Bu projede araştırılmış olan üç-aşamalı konfigürasyon (karanlık fermantasyon + metanojenesis + fotofermantasyon) bugüne kadar çalışılmamış, özgün bir sistemdir. Proje önerisinde hedeflenen tüm aşamalar gerçekleştirilmiştir. Proje amacı ve kapsamı çerçevesinde,

- Bu özgün teknolojinin geliştirilmesi için her aşama, kesikli işletilen ve(ya) ardışık-kesikli modda sürekli işletilen reaktörlerle kademeli olarak entegre edilmiştir.
- Her aşama için, üçlü konfigürasyonun toplam enerji veriminin maksimizasyonu esas alınarak, uygun işletim koşulları (optimizasyonu) araştırılmıştır.
- Üç-aşamalı konfigürasyon, sentetik atıksu ve uygulama olarak şeker fabrikası yan ürünü melas ile işletilmiştir.
- Üç-aşamalı konfigürasyonun hem toplam enerji hem de metan ve hidrojen üretim verimi, çalışılan farklı besin kaynakları ve reaktör kombinasyonları, için araştırılmıştır.
- Farklı işletim koşullarında baskın olan popülasyon dinamiğinin belirlenmesi ve proseslerin daha iyi tanımlanması amacıyla, moleküler analizler gerçekleştirilmiştir.

Bu proje ile ülkemiz hedefleri arasında yer alan yenilenebilir enerji üretimi, atıkların düzensiz bertarafı ile çevreye verilecek zararların ve sera-gazı salınımının azaltımı ve sürdürülebilir kalkınma hedeflerine ulaşılması planlanmıştır. Nitekim, proje sonuçları, önerilen bu özgün teknolojinin, mevcut iki-aşamalı sistemlere (karanlık fermantasyon+metanojenesis ve karanlık fermantasyon+fotofermantasyon) kıyasla birim organik maddeden (g KOİ) elde edilen enerjiyi artırdığını göstermiştir.

10.1 Entegre Sistemlerden Elde Edilen Verim ve Enerji Değerleri, Öneriler

Projede araştırılması planlanan ve ek olarak araştırılan tüm üç-aşamalı ve iki-aşamalı entegre sistemler Tablo 10.1'de belirtilmiştir. Bu entegre sistemlerden elde edilen verimler ve enerji eldeleri Tablo 10.1'de sunulmuştur. Projede elde edilen sonuçlar, literatürde bugüne

kadar birim glikozdan (veya heksoz; ya da g KOİ eşleniğinden) pratikte elde edilen en yüksek H₂ verimi ve enerjisi, stokiyometrik olarak elde edilebilecek en yüksek enerji ve verim değerleri, ve iki-aşamalı hidrojen üretim sistemlerini ekonomik olarak anlamlı kılacak 8 mol H₂/mol heksoz verim (Yokoi vd., 2002) değerleri ile de karşılaştırılmıştır.

Projede önerilen üç-aşamalı sistemlerden (karanlık fermantasyon + metanojenesis + fotofermantasyon) elde edilebilecek maksimum enerji verimi hesaplanırken, her aşama için maksimum verimin elde edildiği (optimum) işletme koşulları esas alınmış ve bu koşullarda elde edilen (maksimum) verim değerleri kullanılmıştır. Fakat, ardışık bir sistem olduğu için, bir aşamaya ait giriş suyunun, bir önceki aşamanın çıkış suyu olmasına ve bu koşullarda elde edilen verimlerin kullanılmasına dikkat edilmiştir. Bir örnek verilecek olursa; üç-aşamalı AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon kombinasyonu için, öncelikle AKR-Karanlık fermantasyon sistemi optimize edilmiştir. Bu amaçla, AKR-Karanlık Fermantasyon sistemi, farklı işletim koşullarında işletilmiş; farklı işletim süreçlerinde elde edilen çıkış suları takip eden kesikli metanojenesis sistemine beslenmiştir. Kesikli metanojenesis sistemi çıkış suları ise takip eden fotofermantasyon sisteminde besin olarak kullanılmıştır. Bir başka deyişle, AKR-Karanlık fermantasyon sisteminden elde edilen farklı çıkış suyu sayısı kadar, üç-aşamalı konfigürasyon uygulaması gerçekleştirilmiştir. Ardından, her atıksu zinciri için, her aşamadan elde edilen enerji ve ilgili üç-aşamalı sistemden elde edilen toplam enerji hesaplanmıştır. AKR-Karanlık fermantasyon sistemi için optimum koşullar belirlenirken de, farklı atıksu zinciri sayısı kadar işletilen her üç-aşamalı sistemden elde edilen toplam enerji verimleri karşılaştırılmış; en yüksek enerjinin elde edildiği zincir; dolayısıyla başlangıç noktası olan AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin işletim koşulları, optimum koşullar olarak tanımlanmıştır.

Yukarıda anlatılan yaklaşım kapsamında, bu projede araştırılan ve Tablo 10.1'de verilen tüm üç-aşamalı ve iki-aşamalı sistemlere ait veriler, maksimum enerji (verim) eldesinin sağlandığı koşulları esas almaktadır. Entegre sistemlerden elde edilen toplam enerji miktarını belirlemek ve karşılaştırabilmek için herbir reaktör aşamasına ait verim aynı birime dönüştürülmüştür; verimler g çKOİ başına üretilen g H₂ veya g CH₄ bazında tanımlanmış ve toplam enerji g çKOİ bazında (kJ/g çKOİ) hesaplanmıştır. kJ/çKOİ bazında hesaplanan verimleri, mol H₂/mol heksoz bazındaki literatür verileri veya stokiyometrik verilerle karşılaştırabilmek için, 1 gram heksozun 1,07 g KOİ'ye eşdeğer olduğu bilgisi kullanılmıştır. Tablo 10.1'de, bu projede araştırılan entegre sistemlerden birim g KOİ başına elde edilen toplam enerji miktarları ve H₂ (veya CH₄) / heksoz bazlı verim eşlenikleri verilmiştir. Entegre sistemleri oluşturan herbir aşamadan elde edilen enerji bilgileri bu bölümde ayrıca verilmemiş; ilgili İş Paketinin olduğu bölümlerde (sonuç bölümlerinde) ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Tablo 10.1. Üç-aşamalı entegre sistemlerden elde edilen maksimum enerji ve verim değerlerinin karşılaştırması

Karbon kaynağı	Üç-aşamalı entegre sistem aşamaları ^a (araştırıldığı İP No)	Entegre sistemde üretilen toplam ısısal enerji ^b (kJ/g çKOİ _{eklenen})		Verim eşlenikleri (Birim H ₂ / birim karbon kaynağı) ^c		
		Brüt	Net	g H ₂ /g çKOİ	g H ₂ /g heksoz	mol H ₂ /mol heksoz
Sukroz	AKR-KF + Kesikli M + Kesikli F (IP 3)	13,47	11,58	0,095	0,102	9,18
	AKR-KF + AKR-M + Kesikli F (IP 4)	16,11	14,11	0,110	0,120	10,80
	AKR-KF + AKR-M + AK-F (IP 5)	14,55	12,80	0,103	0,110	9,90
Melas	AKR-KF + Kesikli M + Kesikli F (IP 7)	14,33	12,45	0,101	0,108	9,70
Karbon kaynağı	İki aşamalı entegre sistem aşamaları ^a (araştırıldığı İP No)	Brüt	Net	g H ₂ /g çKOİ	g H ₂ /g heksoz	mol H ₂ /mol heksoz
Sukroz	AKR-KF + Kesikli M (IP 3)	14,64	13,03	0,103	0,110	9,90
	AKR-KF + Kesikli FF (IP 3)	9,50	8,00	0,067	0,072	6,48
	AKR-KF + AKR-M (IP 4)	14,86	13,23	0,105	0,112	10,08
Melas	AKR-KF + Kesikli M (IP 7)	13,15	11,73	0,093	0,100	9,00
Stokiyometrik değerler – Literatür verileri^d						
Bugüne kadar iki-aşamalı H ₂ sisteminde elde edilen maksimum değer		10,60	8,93	0,075	0,080	7,20
Hidrojen sistemlerinin ekonomik olma eşiği		11,78	9,92	0,083	0,089	8
İki-aşamalı H ₂ sisteminde teorik maksimum H ₂ eldesi (besin: Glikoz, Denklem 2.8)		17,67	14,89	0,124	0,133	12
Tek-aşama anaerobik sistemde teorik maksimum CH ₄ eldesi (besin: Glikoz, Denklem 2.1)		13,85	12,46	0,098	0,105	3 mol CH ₄
İki-aşamalı CH ₄ sisteminde teorik maksimum CH ₄ eldesi (besin: Glikoz, Denklem 2.9 / 2.10)		15,12	13,27	0,107	0,114	4 mol H ₂ + 2 mol CH ₄
^a AKR-Karanlık fermantasyon reaktörü= AKR-KF; Kesikli M= Kesikli Metanojenesis (anaerobik) reaktör; Kesikli F= Kesikli Fotofermantasyon reaktörü, AKR-Metanojenesis= AKR-M, Ardışık-kesikli Fotofermantasyon = AK-F						
^b Brüt ısısal enerji hesabında, H ₂ için 141.8 kJ/g, CH ₄ için 55.58 kJ/g; Net ısısal enerji değerleri = H ₂ için 119.47 kJ/g, CH ₄ için 49.98 kJ/g değerleri kullanılmıştır (Lewandowski, 1999).						
^c kJ/g çKOİ biriminden g H ₂ /g heksoz birimine çevrim için, brüt enerji baz alınmıştır. 1 g heksoz= 1,07 g KOİ.						
^d İki-aşamalı H ₂ sistemi: KF+Fotofermantasyon; İki-aşamalı CH ₄ sistemi: KF + Metanojenesis						

İki-aşamalı sistemlerden elde edilen maksimum enerji hesaplanırken, sadece bahsedilen iki aşamada elde edilen maksimum enerji baz alınmıştır. Bir örnek verilecek olursa, AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli Metanojenesis +Kesikli Fotofermantasyon sisteminin, 10 g/L'lik ilk giriş KOİ değerinde üç-aşamalı işletilebilmesi için, kesikli metanojenesis sisteminden takip eden fotofermantasyon sistemine karbon kaynağı aktarılması gerekmektedir. Aksi takdirde, metanojenesis aşaması (karanlık fermantasyon giriş KOİ değeri 10 g/L olduğunda) UYA derişimini yüksek miktarda tüketmekte, takip eden fotofermantasyona besin kalmamaktadır (IP 6). Bu sebeple, üç-aşamalı işletimlerde, 2.aşama olan metanojenesis sisteminin inkübasyon süresi kısa kesilmiş veya HBS değeri (AKR çalışması) oldukça düşürülmüştür. Dolayısıyla, üç-aşamalı sistemdeki (Karanlık fermantasyon + Metanojenesis + Fotofermantasyon) metanojenesis aşamasından elde edilen verim ile iki-aşamalı sistemdeki (Karanlık fermantasyon + Metanojenesis) metanojenesis aşamasının verimi aynı değildir. İki-aşamalı sistemde (Karanlık fermantasyon + Metanojenesis), metanojenesisin de maksimum verimi esas alındığı için, inkübasyon süresi (veya HBS değeri) uzun tutulmuş; böylelikle iki-aşamalı sistemden maksimum enerji eldesi hedeflenmiştir.

Tablo 10.1'de görüldüğü üzere, bu projede araştırılan üç-aşamalı konfigürasyonlardan elde edilen maksimum brüt toplam ısı enerjisi değeri 13,47-16,11 kJ/g $\text{çKOİ}_{\text{eklenen}}$, H_2 bazında maksimum verim ise 9,18-10,80 mol H_2 /mol heksoz aralığında değişmektedir. Bu değerler, iki-aşamalı karanlık fermantasyon + fotofermantasyon sistemlerinde bugüne kadar elde edilen en yüksek verimden (7,2 mol H_2 /mol heksoz) %27-50 daha yüksektir (Tablo 10.2). Ayrıca, önerilen üç-aşamalı sistemlerin tüm kombinasyonları da (kesikli veya AKR tipi reaktör entegrasyonu), iki-aşamalı hidrojen sistemlerinin kurulumu için ekonomik değer sınırını oluşturan 8 mol H_2 /mol heksoz veriminden (Yokoi vd., 2002) %14-37 fazladır (Tablo 10.2). Hatta önerilen üç-aşamalı sistemlerle, glikozun (heksozun) fermantasyonundan elde edilebilecek maksimum teorik H_2 üretim verimine de (12 mol H_2 /mol heksoz, Özgür vd., 2010; Argun ve Kargı, 2011) oldukça yaklaşmıştır. Enerji bazında karşılaştırıldığında da, aynı şekilde, üç-aşamalı sistemlerden elde edilen enerji, bugüne kadar elde edilen enerjiyi %27-50 artırmıştır (Tablo 10.2).

Tablo 10.2. Üç-aşamalı entegre sistemlerden elde edilen maksimum enerji ve verim değerlerinin yüzde bazında karşılaştırması

Entegre / teorik sistem bilgisi ^a	Karşılaştırma için kullanılan referans değerler		
	7,20 mol H ₂ /mol heksoz veya 10,60 kJ/g çKOİ _{eklenen}	8,0 mol H ₂ /mol heksoz veya 11,78 kJ/g çKOİ _{eklenen}	15,12 kJ/g çKOİ _{eklenen}
<i>Bugüne kadar iki-aşamalı H₂ sisteminde elde edilen maksimum değer ^d</i> (7,20 mol H ₂ /mol heksoz veya 10,6 kJ/g çKOİ _{eklenen})	1	1,11	1,43
<i>Hidrojen sistemlerinin ekonomik olma eşiği</i> (8,0 mol H ₂ /mol heksoz veya 11,78 kJ/g çKOİ _{eklenen})	0,90	1	1,28
<i>İki-aşamalı CH₄ sisteminde teorik maksimum CH₄ eldesi ^d</i> (15,12 kJ/g çKOİ _{eklenen})	0,70	0,78	1
<i>Sukroz</i> AKR-KF + Kesikli M + Kesikli F (IP 3)	1,27	1,14	0,89
AKR-KF + AKR-M + Kesikli F (IP 4)	1,50	1,37	1,07
AKR-KF + AKR-M + AK-F (IP 5)	1,37	1,24	0,96
<i>Melas</i> AKR-KF + Kesikli M + Kesikli F (IP 7)	1,35	1,22	0,95
<i>Sukroz</i> AKR-KF + Kesikli M (IP 3)	1,38	1,24	0,97
AKR-KF + Kesikli FF (IP 3)	0,90	0,81	0,63
AKR-KF + AKR-M (IP 4)	1,40	1,26	0,98
<i>Melas</i> AKR-KF + Kesikli M (IP 7)	1,24	1,12	0,87

^a Referans sistemler ve bu sistemlerle enerji / verim bazında karşılaştırılan projede araştırılan entegre sistemler;

AKR-Karanlık fermantasyon reaktörü= AKR-KF; Kesikli M= Kesikli Metanojenesis (anaerobik) reaktör; Kesikli F= Kesikli Fotofermantasyon reaktörü, AKR-Metanojenesis= AKR-M, Ardışık-kesikli Fotofermantasyon = AK-F

^b Brüt ısı enerji hesabında, H₂ için 141.8 kJ/g, CH₄ için 55.58 kJ/g değerleri kullanılmıştır (Lewandowski, 1999).

^c kJ/g çKOİ biriminden g H₂/g heksoz birimine çevrim için, brüt enerji baz alınmıştır. 1 g heksoz= 1,07 g KOİ.

^d İki-aşamalı CH₄ sistemi: Karanlık fermantasyon + Metanojenesis (Denklem 2.9 + 2.10, Bölüm 2)

İki-aşamalı H₂ sistemi: Karanlık fermantasyon + fotofermantasyon

Üç-aşamalı reaktör konfigürasyonlarından elde edilen enerji ve verim (mol H₂ /mol heksoz bazında), tek-aşamalı ve iki-aşamalı metan üreten sistemlerden teorik olarak elde edilebilecek maksimum enerji ve verim değerleri ile de karşılaştırılmıştır. Tablo 10.1'de

görüldüğü üzere, araştırılan üç-aşamalı konfigürasyondan elde edilen maksimum brüt toplam ısı enerjisi (13,47-16,11 kJ/g $\text{çKOİ}_{\text{eklenen}}$), tek-aşamalı anaerobik sistemin teorik maksimum enerji eldesinden (13,85 kJ/g çKOİ) genellikle yüksektir. Tek-aşamalı anaerobik sistemin teorik maksimum enerji eldesinden daha yüksek enerji eldesi için, üç-aşamalı sistemde sukroz yerine melas kullanılmalı veya 1.aşamayı takip eden aşamalardan birinin veya ikisinin de ardışık kesikli modda sürekli işletilmesi gerekmektedir. İki-aşamalı anaerobik sistemden elde edilebilecek maksimum teorik enerji (15,12 kJ/g çKOİ) ile karşılaştırıldığında ise, üç-aşamalı konfigürasyonlardan yakın enerji eldesi sağlansa da; AKR-Karanlık fermentasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon sisteminin daha yüksek enerji eldesi sağladığı gözlenmiştir. Dolayısıyla, AKR-Karanlık fermentasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon kombinasyonu, genelde aşılması güç anaerobik sistem enerji eldesinin dahi üstünde bir enerji üretimi sağlamaktadır. Söz konusu bu sistem, iki-aşamalı karanlık fermentasyon + metanojenesis sisteminin teorikte elde edilen maksimum enerjiyi %7 artırmaktadır. Öte yandan, diğer üç-aşamalı konfigürasyonlar da, teorik değerlerin %89-96'sını sağlabilmesi açısından çok önemlidir (Tablo 10.2).

Önerilen üç-aşamalı konfigürasyonlar, teorik ve pratikte elde edilen enerji ve verim değerlerinin yanısıra, aynı deneysel ortamda ve koşullarda kurulan iki-aşamalı karanlık fermentasyon + fotofermantasyon ve karanlık fermentasyon + metanojenesis sistemleri ile de karşılaştırılmıştır (Tablo 10.1). Tablo 10.1'de görüldüğü üzere, metanojenesis içeren iki-aşamalı sistemlerden elde edilen enerji (13,15-14,86 kJ/g çKOİ), fotofermantasyon içeren iki-aşamalıya kıyasla (9,50 kJ/g çKOİ) oldukça yüksektir. Ayrıca, üç-aşamalı sistem konfigürasyonlarıyla (13,47-16,11 kJ/g $\text{çKOİ}_{\text{eklenen}}$) iki-aşamalı karanlık fermentasyon + metanojenesis sistemlerinden elde edilen enerjiye (13,15-14,64 kJ/g çKOİ) yakın enerji değerleri elde edilmektedir. Sadece AKR-Karanlık fermentasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon kombinasyonu, daha yüksek enerji eldesi (16,11 kJ/g çKOİ) sağlamıştır.

Özetlenecek olursa, önerilen üç-aşamalı konfigürasyonlar, iki-aşamalı karanlık fermentasyon+fotofermantasyon sistemlerinden çok daha yüksek enerji ve verim eldesi sağlamaktadır. Diğer bir deyişle, iki-aşamalı karanlık fermentasyon-fotofermantasyon sistemlerinde, toplam enerji üretimini artırmak için, ara aşama olarak bir metanojenesis sistemi eklenmesi toplam (brüt) ısı enerjisi ve verimini ciddi şekilde artırmaktadır (%27-50 artış). Önerilen üç-aşamalı konfigürasyonlar, iki-aşamalı karanlık fermentasyon + metanojenesis sistemleriyle karşılaştırıldığında ise, teorik değerlere oldukça yakın (%89-96) enerji verimleri elde edildiği belirlenmiştir. İlk iki aşamanın ardışık-kesikli modda işletildiği üç-aşamalı sistemler (AKR-Karanlık fermentasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli

fotofermantasyon kombinasyonu), tüm olası sistemlerle ve teorik değerlerle karşılaştırıldığında en yüksek enerji ve verim eldesini sağlamıştır.

İki-aşamalı karanlık fermantasyon-metanojenesis sistemine kıyasla, üç-aşamalı karanlık fermantasyon-metanojenesis-fotofermantasyon entegre sistemi kurmak, yakın değerlerde (ve bazı durumlarda daha yüksek) enerji eldesi sağlasa da, reaktör kurum ve işletimi açısından maliyeti artıracaktır. Dolayısıyla, reaktör konfigürasyonlarının seçimi ve uygulanmasında, elde edilen enerjiye ek olarak, kurulum maliyeti ve işletim giderleri de dikkate alınmalıdır. Buna ek olarak, entegre sistemlerin seçimi ve uygulamasında dikkat edilecek bir diğer nokta, entegre sistemin çıkış suyu karakteristiğidir. Bu projede, entegre sistemlerin, sadece enerji üretim verimleri bazında karşılaştırılması planlanmıştır. Tam bir enerji fizibilitesi yapılacak olursa, reaktörlerin kurum ve işletim giderlerinin yanısıra, entegre sistem çıkış atıksuyunun alıcı ortama deşarjı öncesinde arıtım gereksinimi ve harcanacak enerji de dikkate alınmalıdır. Üç-aşamalı sistem, giriş suyu karakteristiğine göre, daha düşük çıkış suyu kirliliğine sahip olabilir (IP 3), dolayısıyla, deşarj öncesi arıtım için gereken enerji ihtiyacı daha az olacaktır. Bu konu ileride araştırılması gereken bir konudur.

Bu projede araştırılan üç-aşamalı ve iki-aşamalı entegre sistemler birbiriyle karşılaştırılmıştır (Tablo 10.1). İlk karbon kaynağının sukroz olduğu üç-aşamalı sistemler karşılaştırıldığında, AKR-Karanlık fermantasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon entegre sisteminin birim g KOİ_{eklenen}'den en yüksek enerji eldesi (16,11 kJ/g çKOİ_{eklenen}) sağladığı gözlenmiştir. AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli Metanojenesis + Kesikli fotofermantasyon sisteminde, 2.aşama olan metanojenesis reaktör tipini AKR'ye dönüştürmek, enerjiyi 13,47'den 16,11 kJ/g çKOİ_{eklenen}'e artırmıştır. Öte yandan, bu sistemde bir değişiklik yapıp, 3.aşama da ardışık-kesikli fotofermantasyon olarak işletilirse, enerji eldesi 16,11'den 14,55 kJ/g çKOİ_{eklenen}'e düşmektedir. Bu durum, yüksek bekletme sürelerinde karanlık fermantasyonda olduğu tahmin edilen bir kimyasalın fotofermantasyonu inhibe etmesi ve(ya) düşük KOİ derişimleri ile açıklanmıştır. AKR'lerde HBS değeri arttıkça, toplam verim düşmektedir; özellikle bu durum 2.aşama olan fotofermantasyon sisteminde verimde azalma ve lag faz olarak ve granüler oluşumlarla kendini göstermiştir. Olası inhibisyon yaratan madde ileride araştırılması gereken bir konudur.

Sukrozla çalışılan iki-aşamalı sistemlerde (AKR-Karanlık fermantasyon+metanojenesis), 2.aşama olan kesikli metanojenesisin AKR tipine dönüştürülmesi, toplam verimde çok büyük bir değişikliğe yol açmamıştır (14,64'den 14,86 kJ/g çKOİ_{eklenen}'e artış). Sisteme 3.aşama olan bir kesikli fotofermantasyon eklenmesi ise birim enerjiyi çarpıcı şekilde 14,86'dan 16,11 kJ/g çKOİ_{eklenen}'e artırmıştır. Öte yandan, benzer etki, AKR-Karanlık fermantasyon + Kesikli

Metanojenesi + Kesikli fotofermantasyon konfigürasyonunda (13,47 kJ/g $\text{çKOİ}_{\text{eklenen}}$) hissedilmemiştir. Bunun sebebi, yine bekletme süresi ile açıklanabilir. Üç-aşamalı sistem enerjisinin maksimizasyonu kapsamında, AKR-metanojenesi için optimum bekletme süresi (HBS) 0,7 gün olarak belirlenmiştir. Kesikli metanojenesi sisteminde ise, reaktör inkübasyondan 6.gün itibariyle çekilmiş ve çıkış suyundaki UYA fotofermantasyona aktarılmıştır. Dolayısıyla, AKR-Karanlık fermentasyon + Kesikli metanojenesi + Kesikli fotofermantasyon sistemi, 2.aşamının AKR-metanojenesi olduğu eşleniğine kıyasla daha uzun inkübasyon sürelerine tabi olmuştur. Bu durum, inhibe edici madde(ler)nin daha belirgin hissedilmesine sebep olmuş olabilir.

Daha önce belirtildiği üzere, üç-aşamalı sistemde, metanojenesisten sonra fotofermantasyona UYA derişimi aktarılabilmesi için, metanojenesi yarıda kesilmektedir. Diğer bir deyişle, metanojenesisten fotofermantasyona enerji aktarılarak, metanın neredeyse 3 katı enerjiye sahip hidrojenin 3.aşamada üretimi sağlanmaktadır. Burada dikkat edilmesi gereken husus, AKR-karanlık fermentasyon sisteminde uygulanan giriş KOİ derişiminin 10-11 g/L olmasıdır. Bu değer, karanlık fermentasyon sonrası az bir miktarda giderilmekte (en düşük çıkış KOİ 9 g/L), uygun derişim değeri sebebiyle UYA, anaerobik reaktörlerde etkin şekilde tüketilmektedir. Dolayısıyla, daha yüksek KOİ derişimine sahip karanlık fermentasyon sistemleri, metanojenesi sisteminin yarıda kesilmesine gerek kalmadan, 3.aşama olan fotofermantasyona besin kalmasını sağlayabilirler. Yüksek giriş KOİ derişimlerinde (>15 g/L) çalışılan üç-aşamalı sistemler, daha yüksek enerji eldesi sağlayabilir. Fakat öncelikle, fotofermantasyon sistemi giriş suyundaki karanlık fermentasyon (ve ek olarak metanojenesi kaynaklı) olası inhibisyon kaynağının belirlenmesi ve giderilmesi gerekmektedir. Ayrıca, yüksek giriş KOİ derişiminin (> 30-40 g/L çKOİ) karanlık fermentatif H_2 üretimini de inhibe edebileceği dikkate alınmalıdır.

Kullanılan substrat kaynağının etkisi incelendiğinde, üç-aşamalı sistemlerde aynı reaktör tipi ve dizini için (AKR-Karanlık fermentasyon + Kesikli metanojenesi+Kesikli fotofermantasyon) melasın, sukroza kıyasla, daha yüksek enerji eldesi sağladığı gözlenmiştir (14,33 kJ/g çKOİ , Tablo 10.1). Bu durum, melasın zengin nutrijent içeriği, dolayısıyla mikroorganizmaların daha hızlı adaptasyonuna yol açması ve içerisindeki olası yerel mikroorganizmaların varlığı ile ilişkilendirilmiştir. Öte yandan, aynı etki, iki-aşamalı sistemde (AKR-Karanlık fermentasyon + Kesikli metanojenesi) gözlenmemiştir. Bunun sebebi, melasla işletilen AKR-Karanlık fermentasyon reaktöründe, çok yüksek H_2 (%70) yüzdelerine rağmen kıyasla daha düşük verim elde edilmiş olmasıdır. Karanlık fermentasyonun kararlı işletimi için araştırmalar devam etmelidir.

10.2 Üç-aşamalı Sistemdeki Aşamaların Optimizasyon Sonuçları ve Öneriler

Proje önerisinde belirtildiği üzere, **üç-aşamalı sistemin** maksimum enerji üretiminin (veya sonuçlara göre H_2/CH_4 veriminin) sağlandığı (optimum) koşul, araştırılan aşama için optimum işletim koşulu olarak belirlenmiştir. Bu bölümde, üç-aşamalı sistemi entegre ederken, her aşamanın optimizasyonu sırasında elde edilen sonuçlar özet halinde sunulmuştur. Her aşamaya ait ayrıntılı sonuçlar, ilgili İş Paketinin olduğu bölümlerde ayrıntılı olarak verilmiştir.

10.2.1 Karanlık Fermantasyon Aşaması

Glikoz ve sukrozla kurulan kesikli karanlık fermantasyon deneyleri;

- Karbon kaynağı **glikoz** iken, hidrojen üretiminde, başlangıç pH ve KOİ değerleri önemli parametrelerdir; pH-KOİ etkileşimlerinin dikkate alınması gerekmektedir.
- Çalışılan başlangıç KOİ değerlerinde (10, 25 ve 40 g/L), pH 5'den 7'ye çıktıkça, hidrojen üretim verimi ve hızı genellikle artmaktadır.
- Sabit başlangıç pH değerinde, başlangıç KOİ değeri 10'dan 40 g/L'ye artıkça, hidrojen üretim verimi düşmektedir.
- Başlangıç KOİ derişimlerinin yüksek olduğu koşullarda (40 g/L), yüksek başlangıç pH değerleri (pH 7) daha yüksek üretim hızlarında daha fazla miktarda hidrojen üretilmesini sağlamakta; UYA üretimi kaynaklı pH düşüşüne tampon oluşturmaktadır.
- Karbon kaynağı **sukroz** iken, maksimum hidrojen üretim veriminin sağlanacağı başlangıç pH değeri 7; KOİ değeri ise 10 g/L'dir. pH ve KOİ kombinasyonu, üretim verimini anlamlı şekilde açıklayabilmektedir.
 - Başlangıç KOİ değeri 10 g/L'den 50 g/L'ye artırıldığında verim azalmakta; pH değeri 4'ten 7'ye artıkça verim artmaktadır.
 - Başlangıç S/X_0 değerinin, üretim verimi üzerinde bir etkisi yoktur.
- TYM sonuçlarına göre, maksimum hidrojen üretim hızının (prodüktivitesinin) sağlanacağı başlangıç değerleri $KOİ=26,6$ g/L, $S/X_0=11,8$ ve $pH=6,7$ 'dir.
- Deneysel verilere göre, maksimum H_2 üretim verimi, başlangıç KOİ, S/X_0 ve pH değerlerinin sırasıyla, 10 g/L, 12 g KOİ/g UAKM ve $pH=7$ olduğu kombinasyonda sağlanmıştır. Bu koşullarda, 2,3 mol H_2 /mol sukroz_{eklenen} (1,21 mol H_2 /mol heksoz veya 6,3 mmol H_2 /g KOİ) verim elde edilmiştir.
- H_2 üretim veriminde olduğu gibi, en yüksek üretim hızı başlangıç KOİ, S/X_0 ve pH değerlerinin sırasıyla, 10 g/L, 12 g KOİ/g UAKM ve $pH=7$ olduğu kombinasyonda (10,6 mL H_2 /L_{reaktör}.saat) elde edilmiştir.

Melasla kurulan kesikli karanlık fermantasyon deneyleri;

- Üretim verimi ve hızı üç değişkenli (başlangıç KOİ, pH, X_0) TYM ile açıklanamamıştır. Çalışılan işletim koşullarının, karbon kaynağının ve olası homoasetojenlerin aktivitesinin modelin açıklayıcılığını etkilediği düşünülmektedir.
- TYM sonuçlarına göre, hidrojen üretim verimi ve hızını anlamlı (significant) şekilde etkileyen tek değişken KOİ'dir. Maksimum hidrojen üretim veriminin ve hızının elde edildiği KOİ 10 g/L olarak belirlenmiştir. Başlangıç X_0 değerinin hidrojen üretim verimi ya da hızı üzerinde bir etkisi yoktur.
- Deneysel verilere göre, en yüksek hidrojen üretim verimi **2,88 mmol H₂/g KOİ** ile KOİ=10 g/L, X_0 =5 g/L ve pH=4,0 kombinasyonunda çalışılan reaktörlerde elde edilmiştir.
- Deneysel verilere göre, hidrojen üretim hızı en yüksek, **8,26 mL H₂ /L_{reaktör}.saat (0,37 mmol H₂ /L_{reaktör}.saat)** ile, KOİ=10 g/L, X_0 =7,5 g/L ve pH=5,5 kombinasyonunda çalışılan reaktörlerde elde edilmiştir.
- Orijinal karbon kaynağının kullanıldığı karanlık fermantasyon sistemlerinde, stres koşullarında homoasetojenlerin etkinleşmesi olasıdır. Bu durum, üretilen gazın hidrojen yüzdesi, hidrojen üretim verimi ve hızında, beklenene kıyasla, sapmalara neden olabilmektedir.

Sukrozla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon sistemi deneyleri;

- Sürekli reaktörlerde karanlık fermentatif hidrojen üretiminde optimum pH değerinin, sukrozla çalışılan kesikli reaktör işletimindeki gibi 7 değil; 5,5 olduğu belirlenmiştir.
- AKR'de karanlık fermentatif hidrojen üretimi, kararlı koşullarda uzun süreli gerçekleşmemektedir.
 - Reaktör işletiminin N₂ ile havalandırılması vb. fiziksel değişiklikler, hidrojen üretimini artırmaktadır.
- %40 gibi H₂ tepegazı yüzdelerinin ardından, yüksek kısmi basınç kaynaklı inhibisyon gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu durum, homoasetojenlerin ve ilerleyen süreçte pH 5,5'da aktif hale gelebilen metanojenlerin etkinleşmesine; dolayısıyla, H₂ üretim veriminin düşük değerlerde gözlenmesine sebep olmaktadır.
 - Paralel şekilde H₂ üretim hızı da düşmektedir. Fakat karanlık fermantasyonda, sınırlayıcı faktör hızdan ziyade verimdir; bu sebeple sonuçların değerlendirilmesinde verim esas alınmıştır.
- Ortam pH'sı ve ardından HBS değeri optimize edilerek elde edilen en yüksek H₂ verimi **2,52 mol H₂/mol heksoz**'dur. Bu değer, AKR çalışmaları bazında literatürde bugüne kadar tanımlanan en yüksek değer olan 2,8 mol H₂/mol heksoz'a çok yakındır.

- En yüksek verimin elde edildiği koşullar; pH=5,5; HBS=12 saat, döngü süresi=8 saat, OYH=22,4 gKOİ/L.gün ve $KBS_{ortalama} = 9,5$ gün olarak belirlenmiştir.
- Bu işletim koşullarında hesaplanan üretim hızı $7,07 \text{ L H}_2/\text{L}_{\text{reaktör-gün}}$ 'dür.
- Karanlık fermantasyon çok itinali kontrol gerektiren, işletiminde olumlu ve olumsuz yönde çok hızlı tepki veren bir sistemdir.
- KBS parametresi, reaktörde hidrojen üreticilerinin baskınlaşması ve metanojenlerin atılması için etkin rol oynayan önemli bir parametredir.
- KBS'nin, sistemin üretim kapasitesini ve kararlılığını etkilediği belirlenmiştir. Görece kısa (3-5 gün aralığındaki) KBS değerleri, 9-15 günlük KBS değerlerine göre sistemi daha kararlı kılmaktadır.
 - Düşük KBS'nin (ortalama 4,2 gün) sistem verimini arttıramasa da sistemin ortalama bir verim değerinde kararlılık süresini arttırdığı belirlenmiştir.
- AKR çalışmalarında, sistematik bir UAKM atımına ihtiyaç vardır. Karanlık fermantatif bakterilerin büyüme hızının oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. KBS'yi HBS'ye eşitleyen kemostat sistemleri karanlık fermantasyon ile hidrojen üretimi için değerlendirilebilir.
- Üç-aşamalı sistemde en yüksek toplam enerjinin elde edildiği koşul esas alınarak, AKR-karanlık fermantasyon sistemi için en uygun işletme koşulları pH=5,5; HBS=12 saat, döngü süresi=8 saat, OYH=22,4 g KOİ/L.gün ve $KBS_{ortalama} = 4,2$ gün olarak belirlenmiştir. Bu koşulda elde edilen verim **1,66 mol H₂/mol heksoz**'dur.
- Moleküler analizler, reaktörde üretilen ürünleri ve olası bakteri türlerini doğrulamıştır; Laktik asit üretimine paralel şekilde sistemde baskın hale gelen laktik asit bakterilerinin (*Lactococcus lactis subsp. lactis* II1403 veya *Bifidobacterium thermophilum* ile *Olsenella uli* DSM 7084) belirlenmiştir.
- Hidrojen üreticilerden olan *Clostridium* türü, fakültatif *Enterobacter* türü ve *Bacillus* türüne ait bir bakterinin sekansı araştırılan gen fragmanları arasında gözlemlenememiştir.
 - Hidrojen üreten genleri esas alan primerlerle çalışılması düşünülebilir.
- Archaea türüne rastlanmamıştır. Neredeyse tüm işletim süreçlerinde metan gözlenmişken, metan üreticilerin moleküler analizlerde tespit edilememesi, kullanılan archaeal primerlerle ilgili genlerin çoğaltılamaması veya numunelerdeki DNA'nın degrades olması ile açıklanabilir.

Melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon sistemi deneyleri;

- Melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon sisteminde, HBS: 12 saat, döngü süresi: 8 saat, giriş KOİ: 10 g/L, OYH: 20,9 g KOİ/L.gün, pH: 5,5'dir.

- Sabit ve düşük KBS değerinin, homoasetojen ve metanojenleri ortamdaki uzaklaştırarak kararlı hidrojen üretiminde etkin bir parametre olacağı gerekçesi ile 3 günlük KBS'nin etkisi araştırılmış; bu değer çeşitli işletim koşulları ile sabitlenmeye çalışılmıştır.
- Yüksek büyüme hızına sahip karanlık fermantasyon kültürünü, sabit ve düşük bir KBS'de işletebilmek için, AKR çökme süresi önemli bir parametredir.
 - 20 dakikalık bir çökme süresi, KBS değerinin ortalama 1,8 güne düşmesine; bu da karanlık fermantasyon bakterilerinin yeterli miktarda büyümeden sistemden atılmasına neden olmaktadır.
 - 40 dakika çökme süresi, göreceli daha düşük verime yol açsa da, sabit UAKM derişiminde kültür eldesi sağlanmıştır.
 - AKR, 3 günlük KBS değerinde sabit pH ve işletim koşullarında işletebilmiştir.
- Sabit ve düşük (3 gün) KBS'nin sağlanmasına rağmen, uzun soluklu (ve yüksek miktarda) hidrojen üretimi elde edilememiştir.
 - Bunun başlıca sebebinin, %70'lere varan H₂ gazı yüzdesi (ve kısmi basıncı) ve takibinde sistemin inhibisyonu kaynaklı olduğu düşünülmektedir.
 - Yüksek hidrojen kısmi basıncı (veya yüzdesi), genelde gözlemlenen homoasetojenesis ve metanojenesis dahi inhibe etmiştir.
 - Bu kadar yüksek değerde ve tekrarlanabilirliği yüksek H₂ yüzdesi, nütriyent açısından oldukça zengin melasın, fermantasyon bakterilerini desteklemesi ve melas içeriğinde bulunabilecek olası yerel mikroorganizmaların desteği ile açıklanabilir.
- Daha önce belirlenen HBS (12 saat), giriş KOİ (10 g/L), başlangıç pH (5,5) bilgilerine ek olarak, bu iş paketinde optimum çökme süresi (40 dakika), döngü süresi (8 saat) ve KBS (3 gün) değerleri belirlenmiştir. Bu koşullarda (3.İşletim sürecinde) elde edilen;
 - en yüksek hidrojen üretim verimi **6,02 mmol H₂/g KOİ (1,16 mol H₂/mol heksoz)**; en yüksek hidrojen üretim hızı ise **0,18 mol H₂/L.gün**'dür.
- AKR'de karanlık fermentatif hidrojen üretimi, kararlı koşullarda uzun süreli gerçekleşmemektedir. Düşük KBS değerlerinde çalışılabilir, fakat yüksek miktardaki H₂ tep gazının sistemden uzaklaştırılması gerekmektedir.
- Melasla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon sistemi için optimum koşullar, pH=5,5; HBS=12 saat, döngü süresi=8 saat, OYH=20,9 g KOİ/L.gün ve KBS_{ortalama} =3 gün, çökme süresi=40 dakika olarak belirlenmiştir.
- Moleküler analizlerde, archaea türüne rastlanılmamıştır; bu durum metan üretiminin gözlenmemesini de açıklamaktadır.

- *Pelobacter* dışında hidrojen üreten *Clostridium* türü, fakültatif *Enterobacter* türü ve *Bacillus* türüne ait bir bakteriye, çalışılan primerler ve moleküler işletim koşullarında rastlanmamıştır.
 - Spesifik hidrojen üreten genleri esas alan primerlerle çalışılması düşünülebilir.

10.2.2 Metanojenesis Aşaması

Kesikli metanojenesis (anaerobik) deneyleri;

- S/X_0 oranı anaerobik arıtılabilirlik, metan üretim verim ve yüzdesini etkileyen önemli bir parametredir.
- En yüksek metan üretim verimi (267 ± 5 mL CH_4/g glikoz) veya anaerobik arıtılabilirlik yüzdesi (%68) S/X_0 oranının 1 olduğu koşullarda gerçekleşmektedir.
- S/X_0 oranının 2'den az olduğu koşullarda %55'in üzerinde verim sağlanabilmektedir.
- S/X_0 'in 2 olduğu işletimlerde aklimasyona ihtiyaç duyulurken, 2'den yüksek S/X_0 oranları metanojenlerin inhibe olmasına sebep olmaktadır.

Sukrozla üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan kesikli anaerobik reaktör deneyleri;

- AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin çıkış suları ile kurulan kesikli anaerobik (metanojenesis) reaktörlerinden yüksek metan üretim verimi ($337-344$ mL CH_4/g $\text{çKOİ}_{\text{eklenen}}$, 35°C 'da) elde etmiştir.
- Reaktörlerin inkübasyonu, gaz üretimi sonlanana kadar devam ettirildiğinde, 3.aşama olan fotofermantasyon için UYA kalmaması sebebiyle, işletimin 6-7.gününde inkübasyon sonlandırılmıştır. Kısa süreli inkübasyonda, farklı atıksu tipinin etkisi öne çıkmaktadır.
- Direk sukrozla da anaerobik reaktörler kurulmuş, 247 mL CH_4/g $\text{çKOİ}_{\text{eklenen}}$ verim elde edilmiştir.
- Sukrozla işletilen AKR-karanlık fermantasyon çıkış suyu ile kurulan 2.aşama anaerobik reaktörlerde verim, direk sukroz ile kurulan tek-aşamalı sisteme kıyasla %27-35 daha fazladır.

Sukrozla üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan AKR-Metanojenesis sistemi deneyleri;

- AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin 2 farklı çıkış suyu ile (I.kaynak ve II.kaynak çıkış suyu) kurulan AKR-Metanojenesis sistemi, 6 farklı periyotta (HBS-KBS kombinasyonunda) işletilmiştir.
 - 20 gün KBS değerinde 0,7, 1,5, 3 ve 6 günlük HBS değerleri; 10 gün KBS değerinde de 0,7 ve 1,5 günlük HBS değerleri araştırılmıştır.

- En yüksek ortalama metan üretim verimi 343 ± 17 mL CH_4/g $\text{çKOİ}_{\text{eklenen}}$ değeri ile KBS:20 gün, HBS: 6 gün'de elde edilmiştir. En yüksek maksimum metan üretim verimi (**395 mL CH_4/g $\text{çKOİ}_{\text{eklenen}}$**) yine aynı işletim koşullarında elde edilmiştir.
- HBS değeri, verim ve üretim hızını etkileyen ana parametredir.
- HBS değeri azaltıldıkça, çalışılan KBS değerinden (10 ve 20 gün) bağımsız olarak, ortalama metan üretim verimi düşmektedir.
 - HBS 3 ve 6 gün iken (OYH: 2,2-4,5 g $\text{çKOİ}/\text{L.gün}$), birbirine yakın verim elde edilmiştir. HBS 1,5 güne düşürüldüğünde, verim göreceli olarak düşmektedir.
 - HBS 0,7 gün (OYH: 8,9 g $\text{çKOİ}/\text{L.gün}$) iken, verim ciddi şekilde azalmaktadır.
- HBS değeri azaltıldıkça, çalışılan KBS değerinden (10 ve 20 gün) bağımsız olarak, (verimin aksine) metan üretim hızı artmaktadır.
- Aynı HBS, fakat farklı KBS koşullarında çalışıldığında, yakın verim ve hız değerleri elde edilmiştir.
- Aktif çamura aklime olan anaerobik aşı çamurunun, özellikle yüksek UYA içeren (35 mM; 2011 mg/L HAc) karanlık fermantasyon çıkış suyuna ve AKR işletim koşullarına aklimasyonu gerekmektedir.
- Üç-aşamalı sistemde, 3.aşama olan fotofermantasyon sistemine yeterli miktarda (>15 mM) UYA aktarmak için AKR-Metanojenesis sisteminde HBS'nin 0,7 gün gibi düşük değerlerde tutulması gerekmektedir.
 - KBS'nin 10 veya 20 gün olması çıkış tUYA derişimini belirgin şekilde değiştirmemektedir. Her iki koşulda da en baskın asit tipi, asetik asittir.
- Üç-aşamalı sistemde en yüksek toplam enerjinin elde edildiği koşul esas alınarak, AKR-metanojenesis sistemi için en uygun işletme koşulu HBS=0,7 gün, KBS=10 gün, OYH=8,9 g $\text{KOİ}/\text{L.gün}$, F/M=1,82 g $\text{çKOİ}/\text{g}$ UAKM.gün ve döngü süresi=12 saat (reaksiyon süresi 8-9 saat / çökeltme süresi 3-4 saat) olarak belirlenmiştir.
- KBS'nin 20 günden 10 güne düşürülmesi, asetiklastik metanojen türünde bir değişikliğe yol açmamıştır.
- *Methanosaeta concilii* türü baskın tür olarak çalışılan tüm işletim koşulları ve kombinasyonlarında (10-20 günlük KBS ve 0,7-6 günlük HBS) gözlenmiştir.
- Buna ek olarak, $\text{H}_2\text{-CO}_2$ 'den ve formateden metan üreten *Methanospirillum hungatei* türünün de reaktörde bulunduğu belirlenmiştir. KBS 20 günden 10 güne düşürüldükçe, *Methanospirillum hungatei*'nin baskınlığı azalmaktadır.
- Moleküler analizlerde, belirli primerlerle çalışıldığı için, tüm metanojenik türler belirlenememiş olabilir. Belirlenen bu iki tür dışında başka türlerin de reaktörde yer alması olasıdır.

- İşletim süresince (KBS ve HBS'den bağımsız olarak) sukroz, früktoz, manoz gibi çeşitli şekerlerden aseton, butanol ve etanol üreten spor-yapıcı bir bakteri türü olan *Clostridium saccharobutylicum* türü tespit edilmiştir. İlgili bant, hidrojen üretici *Clostridium acetobutylicum* türü ile de ilişkilendirilmiştir. Sukrozla işletilen AKR-Karanlık fermantasyon sistemi çıkış suyu ile beslenen AKR-Metanojenesis sisteminde hidrojen veya asit/alkol üreten bu bakterilerin gözlenmesi olasıdır.

Melasla üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan kesikli anaerobik reaktör deneyleri;

İlk organik karbon kaynağının melas olduğu üç-aşamalı (karanlık fermantasyon-metanojenesis-fotofermantasyon) sistemde, **kesikli karanlık fermantasyon çıkış suları** ile kurulan kesikli anaerobik reaktör çalışmasında;

- En yüksek metan üretim verimi ve yüzdesi (%83), $KOI=30$ g/L, $X_0=7500$, $pH=7$ kombinasyonundaki karanlık fermantasyon çıkış suları ile kurulan anaerobik reaktörlerde elde edilmiştir.
 - Bu koşullarda en yüksek metan üretim verimi **15 mmol CH_4/g $\dot{C}KOI_{eklenen}$** 'dir (461 mL CH_4/g $\dot{C}KOI_{eklenen}$, 35°C).
- Direk melasla kurulan kesikli anaerobik reaktör çalışmasında en yüksek metan verimi (311,4 mL CH_4/g $\dot{C}KOI$ (35°C); **12,3±0,5 mmol CH_4/g $\dot{C}KOI$**) S/X_0 değerinin 0,5 g KOI/g UAKM olduğu reaktörde elde edilmiştir.
 - Glikozla çalışıldığında daha düşük verim (267±13 mL CH_4/g $\dot{C}KOI$ (35°C)) eldesi, karbon kaynağının gaz üretim verimindeki önemli etkisi göstermektedir.
 - Melas çeşitli mikro- ve makro-nütriyentler içermesi ve doğal olması sebebiyle anaerobik mikroorganizmalar için daha uygun bir besin kaynağıdır.
- S/X_0 oranı, 0,5'den 2,5'e arttırıldıkça üretilen toplam metan miktarı, üretim verimi ve hızı düşmektedir.
- Karanlık fermantasyon gibi bir ön aşama, melasın anaerobik çürütülebilirliğinin etkileyici şekilde arttırmaktadır. Tek-aşamalı anaerobik sisteme kıyasla iki-aşamalı sistemde takip eden anaerobik (metanojenesis) reaktörde,
 - Metan üretim hızı 3 kat; verimi ise 1,24 kat artmıştır.
 - Biyogazdaki metan gazı yüzdesi %83 gibi oldukça yüksek değerlere ulaşmıştır.

Melasla üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan kesikli metanojenesis deneyleri;

- Melasla İşletilen **AKR-Karanlık fermantasyon çıkış suyu** ile kurulan kesikli metanojenesis reaktör deneylerinde,

- En yüksek metan verimi olarak **326 mL CH₄/g çKOİ_{eklenen}** (12,9 mmol CH₄/g çKOİ_{eklenen}; **0,206 g CH₄/g çKOİ_{eklenen}**) elde edilmiştir.
- Üç-aşamalı sistem için, kesikli metanojenezis sisteminden, takip eden fotofermantasyona karbon kaynağı (HAc) bırakmak adına, inkübasyon yarıda kesilmelidir. Üç-aşamalı sistemde 3.aşama olan fotofermantasyon sisteminde en yüksek hidrojen üretim veriminin sağlandığı çıkış suyu baz alındığında ise,
 - En yüksek metan verimi 111 mL CH₄/g çKOİ_{eklenen} (4,39 mmol CH₄/g çKOİ_{eklenen}; 0,07 g CH₄/g çKOİ_{eklenen})'dir.

10.2.3 Fotofermantasyon Aşaması

Kesikli fotofermantasyon deneyleri;

- S/X₀ oranı özellikle hidrojen üretim hızını etkileyen bir parametredir.
- Düşük S/X₀ oranları (5-9), daha yüksek hidrojen üretim hızlarına ve ışık dönüştürme verimlerine yol açmaktadır.
 - S/X₀ oranı 9'dan 20'ye arttıkça hidrojen üretim hızı ve ışık dönüştürme verimi kademeli olarak düşmektedir.
- TYM ile başlangıç S (asetat), X₀ (UAKM) ve I (Işık şiddeti) parametrelerinin ve etkileşimlerinin hidrojen üretim hızına önemli bir etkisi olduğu belirlenmiştir.
 - X₀ ve I etkileşimi de önemlidir. Hidrojen üretim hızı ışık şiddetindeki değişimlere daha hassastır.
- Kesikli sistemde, en yüksek hidrojen üretim hızının elde edildiği optimum değerler; S= 35,35 mM Asetat; X₀= 0,27 g UAKM/L; I= 3955 lux (263,6 W/m²) olarak bulunmuştur.
 - Bu değerler kullanıldığında elde edilecek tahmini en yüksek hidrojen üretim hızı 1,04 mmol H₂/L.saat'tir.
 - En yüksek hidrojen üretimi sağlayacak S/X₀ oranı 9,4 g KOİ/g UAKM'dir. Sadece asetat-KOİ eşdeğeri baz alındığında, en uygun S/X₀ oranı 8,3 g KOİ/g UAKM'dir (7,7 g asetat /g UAKM).
 - Deneysel olarak ise, hidrojen üretim hızları (prodüktivite) 0,27-0,91 (mmol H₂/L.saat) arasında; hidrojen üretim verimleri ise 0,02-0,11 g H₂/g asetat (0,019-0,10 g H₂/g KOİ) arasında değişmektedir.
 - Deneysel verilere göre, en yüksek hidrojen üretim hızı başlangıç besin, mikroorganizma ve ışık şiddeti değerlerinin sırasıyla 20 mM asetat, 0,2 g UAKM/L ve 4500 lux olduğu reaktörlerde elde edilmiştir.

- Deneysel verilere göre, en yüksek hidrojen üretim verimi ise başlangıç besin, mikroorganizma ve ışık şiddeti değerlerinin sırasıyla 20 mM asetat, 0,35 g UAKM/L ve 3000 lux olduğu reaktörlerde elde edilmiştir.
 - Elde edilen en yüksek verim 0,11 g H₂/g asetat'tır (3,3 mol H₂/ mol asetat; 51,6 mmol H₂/ g KOİ-HAc).
 - Bu koşullarda elde edilen üretim hızı 0,86 mmol H₂/L.saat'tir (19,3 mL H₂/L.saat, STP).
- TYM sonuçlarına göre, hidrojen üretim ve ışık dönüştürme verimleri, S, X₀ ve ışık şiddeti değişkenleri ve(ya) etkileşimleri ile (bu 3 değişkenli model ile) açıklanamamıştır.

Sukrozla beslenen iki-aşamalı ve üç-aşamalı sistemlerde sırasıyla 2.aşama ve 3.aşama olan kesikli fotofermantasyon reaktör deneyleri;

- AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin, sadece, II.Kaynak suyu ile kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde, hidrojen üretilmiştir.
 - Bu atıksu ile elde edilen hidrojen üretim hızı **0,48±0,08 mmol H₂/L.saat** tir.
 - Hidrojen üretim hızının optimum koşullarda elde edilecek değere (1,04 mmol H₂/L.saat) kıyasla düşük olması, AKR-karanlık fermantasyonunda oluşan farklı karbon kaynağı karışımları ve bunların bakteriler üzerindeki etkisi ile ilişkilendirilebilir.
 - Hidrojen üretim verimi, **1,61±0,24 mol H₂/mol asetat** veya 0,054 g H₂/g asetat (**0,050 g H₂/g KOİ-HAc**)'tir. Bu verim, S=21 mM HAc (30 mM tUYA), I= 3955 lux ve S/X₀= 8,3 g KOİ_{Asetat}/g UAKM (9,4 g KOİ/g UAKM) koşullarında elde edilmiştir.
- AKR-Karanlık fermantasyon sisteminin, I.Kaynak suyu ile kurulan kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde ise hidrojen üretilmemiştir.
 - Herhangi bir amonyum iyonu, pH, bakteriyel kontaminasyon, ışık şiddeti, tUYA veya bütirik asit derişimi kaynaklı bir inhibisyon bulunmamaktadır.
 - Benzer (TAN, UYA tipi ve derişimleri (20 mM HAc, 30 mM UYA), pH) özelliklerine sahip I.Kaynak ve II.Kaynak sularından sadece I.Kaynaktan hidrojen üretilmemesi, I.Kaynak suyunda bakterilere inhibisyon etkisi yaratabilecek bir maddenin veya maddelerin varlığını göstermektedir. Bu durum, I.Kaynak suyunun üretildiği AKR-Karanlık fermantasyon işletim süreçleri ile ilişkilendirilmiştir.
 - KBS olarak 10-15 gün uygulaması, 3-5 gün uygulamasına kıyasla inhibisyon maddesi üretilmesinde bir etmen olabilir.

- Öte yandan, karanlık fermantatif hidrojen üretiminin yüksek miktarda gözleendiği günlerde alınan çıkış sularıyla yüksek fotofermantasyon verim değerleri de elde edilebilmektedir.
 - Dolayısıyla, KBS parametresi tek başına inhibisyon maddesi üretiminden sorumlu olmayabilir.
 - Stabil ve efektif bir karanlık fermantasyon, daha yüksek UYA / HAc üretimi ve takip eden fotofermantasyonda da daha yüksek hidrojen üretimi demektir. Dolayısıyla, KBS gibi parametreler dikkate alınarak, stabil bir karanlık fermantasyon sağlanmalıdır.
- Karanlık fermantasyon çıkış suyu amonyum iyonu bazında yüksek derişime sahip olmadığı için, takip eden fotofermantasyon reaktörleri için ön arıtıma ihtiyaç duyulmamıştır.
- Üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan kesikli anaerobik reaktörlerin 2 farklı çıkış suyu ile kurulan fotofermantasyon reaktörlerinden, sadece, II.Kaynak suyunun kullanıldığı dizindeki fotofermantasyon reaktörlerinde hidrojen üretilmiştir.
 - Elde edilen hidrojen üretim hızı (prodüktivite) **0,17 mmol H₂/L.saate**, verimi ise **0,049 g H₂/g çKOİ**'dir (**0,052 g H₂/g asetat**, 1,56 mol H₂/mol HAc).
- Fotofermantasyonun hem 2.aşama hem de 3.aşama olduğu durumlarda, benzer hidrojen üretim verimleri ve farklı su kaynağı ile benzer inhibisyon gözlenmiştir.
 - Dolayısıyla, üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan metanojenesis sistemi fotofermantasyonu olumsuz etkilememektedir.
 - Fakat metanojenesis sisteminin varlığı, fotofermantatif H₂ üretim hızını üçte bir düşürmektedir. Bu durum, çözülmüş haldeki UYA derişiminin büyük oranda metanojenesis aşamasında tüketilmesi ile ilişkilendirilmiştir.
- Üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan AKR-Metanojenesis sisteminin çıkış sularından, sadece yeterli derişimde UYA eldesi olan çıkış suları ile de kurulan reaktörlerde hidrojen üretilmiştir.
 - En yüksek H₂ üretim verim ve hızı (**0,032±0,001 g H₂/g asetat** ve **0,10±0,005 mmol H₂/L.saate**), V.periyot çıkış suyundan elde edilmiştir.
 - Bu değerler, üç-aşamalı sistemin 2.aşaması olan kesikli metanojenesis reaktörleri çıkış suyu ile kurulan kesikli fotofermantatif reaktörlerin verim ve hızlarından da (0,052 g H₂/g HAc ve 0,17 mmol H₂/L.saate) daha düşüktür.

- Bu durumun, giriş suyunda bulunan ve fotofermantasyonu inhibe eden (amonyum iyonu, pH, sıcaklık, bakteriyel kontaminasyon ve yüksek tUYA derişiminden gibi faktörlerden farklı) bir madde olduğu düşünülmektedir.
- Benzeri durum, yukarıda bahsedildiği üzere, İş Paketi 3 kapsamında da gözlenmiş; inhibisyon üreten esas kaynağın AKR-Karanlık fermantasyon ünitesi olduğu gözlenmiştir. Fakat, bahsi geçen çalışmadan (Bölüm 4.2.3) daha düşük verim/hız eldesi, AKR-Karanlık fermantasyon sistemine ek olarak, AKR-Metanojenesis sistemi kaynaklı da bir inhibisyonun olduğunu gösterebilir.
 - Üç-aşamalı sistemde, ön aşamaların (AKR-Karanlık fermantasyon, AKR-Metanojenesis) KBS değeri arttıkça, inhibisyon etkisi artmaktadır.
- Kesikli anaerobik reaktörlerin ve AKR-Metanojenesis sisteminin çıkış suları yüksek amonyum derişimi içerdiği için, takip eden fotofermantasyonda besin olarak kullanılmadan önce ön arıtıma tabi tutulmalı, amonyak giderimi sağlanmalıdır.

Sukrozla üç-aşamalı sistemde (AKR-KF + AKR-M + Ardışık-Kesikli F) ardışık-kesikli fotofermantasyon deneyleri;

- Üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan AKR-Metanojenesis sisteminin çıkış sularıyla kurulan ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde düşük hidrojen üretimi gözlemlenmiştir.
- 3 farklı HBS (2, 4 ve 6 gün) araştırılmıştır. En yüksek hidrojen üretim hızının (**0,041 mmol H₂/L.saat**) sağlandığı HBS değeri 4 gün olarak belirlenmiştir.
- Hidrojen üretim verimlerine bakıldığında ise, çalışılan HBS değerleri arasında, 6 günlük HBS en yüksek hidrojen üretim verimini (**0,622 mol H₂/mol HAC; 0,0194 g H₂/g çKOİ-HAC**) sağlamıştır.
- Her iki giriş suyu ile işletilen ardışık-kesikli fotofermantasyon reaktörlerinde, zayıf bir büyüme ve granüler yapı gözlenmiştir. Optimum koşullarda veya kesikli sistemlerde elde edilen değerlere kıyasla gözlenen düşük hidrojen üretim ve verim değerlerinin, daha önce belirtildiği gibi, AKR-Karanlık fermantasyon ve AKR-Metanojenesis sistemlerinde inkübasyon sürecinde üretilen bir madde/kimyasal sebebiyle inhibisyonu kaynaklı olduğu düşünülmektedir.
- Üç-aşamalı sistemde (AKR-KF + AKR-M + Ardışık-Kesikli F) en yüksek toplam enerji veriminin elde edildiği koşul, ardışık-kesikli fotofermantasyonun optimum koşulu olarak belirlenmiştir. Bu değer HBS (veya KBS) değeri bazında 6 gündür.

Melasla üç-aşamalı sistemde, 3.aşama olan kesikli fotofermantasyon reaktör deneyleri;

- Melasla üç-aşamalı sistemde, 2.aşama olan kesikli anaerobik reaktörleri çıkış suyu ile kurulan fotofermantasyon reaktörlerinde elde edilen
 - En yüksek hidrojen üretim verimi **1,33 mol H₂/mol asetat** (0,044 g H₂/g asetat; **0,042 g H₂/g KOİ-HAc**)'dır. En yüksek hidrojen üretim hızı **0,043 mmol H₂/L.saat**'tir.
 - Bu değerler, ilk karbon kaynağının sukroz olduğu üç-aşamalı sistemde elde edilen değerlerle (0,049 g H₂/g asetat; 0,052 g H₂/g KOİ-HAc; 1,56 mmol H₂/mmol HAc) karşılaştırılabilir düzeydedir.

Yukarıda, aşamalar özelinde verilen önerilere ek olarak, bu proje sonuçları, yeni olasılıkları ve çalışma konularını da gündeme getirmiştir. Bu projede, şeker fabrikası yan ürünü melas kullanılmıştır. Farklı atıkların kullanımı, daha yüksek giriş KOİ değerlerinin etkisinin araştırılması ve üçlü sistemde geri-döngü gibi uygulamalarla, konfigürasyonun esnekliğinin geliştirilmesi yönünde çalışılabilir. Bu bağlamda, önerilen üçlü konfigürasyon yeni araştırma konularının / projelerin üretilmesinde temel oluşturabilme özelliğine sahiptir. Daha önce belirtildiği gibi, üç-aşamalı sistemde fotofermantasyonda inhibisyona yol açan olası maddenin tanımlanması da yeni bir araştırma konusunu oluşturmaktadır. Karanlık fermantasyonda gözlenen ve kararlı işletimi önemli ölçüde etkileyen homoasetojenesisin araştırılması ve kontrol edilebilir kılınması önemlidir. Moleküler analizler, daha zenginleştirilerek ve daha geniş spektrumlu analizlerle, karanlık fermantasyonun geliştirilmesine çalışılmalıdır.

Bu projede önerilen konfigürasyonla, ülkemiz hedefleri içerisinde yer alan, yenilenebilir enerji üretimi, atıkların kontrolsüz bertarafı ve takibinde olası sera-gazı salınımının azaltımı için bir alternatif teknoloji geliştirilmesi ve sürdürülebilir kalkınma hedefi gerçekleştirilebilmiştir. Ayrıca, yeşil teknolojide gereken iki önemli ham madde, metan ve hidrojen, aynı konfigürasyonla ve önemli bir verim eldesiyle üretilmiştir.

KAYNAKLAR LİSTESİ

Abo-Hashesh, M., Ghosh, D., Tourigny, A., Taous, A., Hallenbeck, P.C. 2011. "Single stage photofermentative hydrogen production from glucose: An attractive alternative to two stage photofermentation or co-culture approaches", *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 13889-13895.

Abreu, A.A., Alves, J.I., Pereira, M.A., Karakashev, D., Alves, M.A., Angelidaki, I. 2010. "Engineered heat treated methanogenic granules: A promising biotechnological approach for extreme thermophilic biohydrogen production", *Bioresource Technology*, 101, 9577–9586.

Adamberg, K., Kask, S., Laht, T.M., Paalme, T. 2003. "The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study", *International Journal of Food Microbiology*, 85, 171-183.

Ahring, K.L., Sandberg, M., Angelidaki, I. 1995. "Volatile fatty acids as indicator of process imbalance in anaerobic digestion", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 559-565.

Akköse, S., Gündüz, U., Yücel, M., Eroğlu, İ. 2009. "Effects of ammonium ion, acetate and aerobic conditions on hydrogen production and expression levels of nitrogenase genes in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001", *International Journal of Hydrogen Energy*, 24, 8818-8827.

Alkaya, E., Demirer, G.N. 2010. "Anaerobic acidification of sugar-beet processing wastes: Effect of operational parameters", *Biomass and Bioenergy*, 1-8, 2010.

Alkaya, E., Demirer, G.N. 2011. "Anaerobic mesophilic co-digestion of sugar-beet processing wastewater and beet-pulp in batch reactors", *Renewable Energy*, 36, 971-975.

Alkaya, E., Erguder T.H., Demirer G.N., 2010. "Effect of operational parameters on anaerobic co-digestion of dairy cattle manure and agricultural residues: A case study for the Kahramanmaraş region in Turkey", *Engineering in Life Sciences*, 10(6), 552-559.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olsen, R.J., Chrisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A. 1990. "Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed populations", *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1919-1925.

Ammary, B.Y. 2005. "Treatment of olive mill wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor", *Desalination*, 177, 157-165.

Androga, D.D., Özgür, E., Eroğlu, İ., Gündüz, U., Yücel, M. 2011. "Significance of carbon to nitrogen ratio on the long-term stability of continuous photofermentative hydrogen production", *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 15583-15594.

Angenent, L. T., Dague, R. R. 1995. "A laboratory-scale comparison of the UASB and ASBR processes", *Proceedings of the 50th Purdue Industrial Waste Conference*, 365-377.

Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Venetsaneas, N., Kornaros, M., Lyberatos, G. 2008. "Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process", *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 47, 5227–5233.

APHA, AWWA, WEF. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (21.Basım). Washington, DC.

Argun, H., Kargı, F., 2011. 'Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview', *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 7443-7459.

Argun, H., Kargı, F., Kapdan İ.K., Öztekin, R. 2008. "Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: Effects of the initial substrate and biomass concentrations", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 6109-6115.

Argun, H., Kargı, F., Kapdan, I.K. 2008. "Light fermentation of dark fermentation effluent for bio-hydrogen production by different *Rhodobacter* species at different initial volatile fatty acid (VFA) concentrations", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 7405-7412.

Asada, Y., Ohsawa, M., Nagai, Y., Ishimi, K., Fukatsu, M., Hideno, A., Wakayama, T., Miyake, J. 2008. "Re-evaluation of hydrogen productivity from acetate by some photosynthetic bacteria", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 5147-5150.

Azbar, N., Cetinkaya Dokgoz, F.T., 2010. “The effect of dilution and l-malic acid addition on bio-hydrogen production with *Rhodopseudomonas palustris* from effluent of an acidogenic anaerobic reactor”, International Journal of Hydrogen Energy, 35(10), 5028-5033.

Azbar, N., Cetinkaya Dokgöz, F.T., Keskin, T., Eltem, R., Korkmaz, K.S., Gezgin, Y., Akbal, Z., Öncel, S., Dalay, M.C., Gönen Ç., Tutuk, F. 2009b. “Comparative evaluation of bio-hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic and mesophilic anaerobic conditions”, International Journal of Green Energy, 6(2), 192-200.

Azbar, N., Cetinkaya Dokgöz, F.T., Keskin, T., Korkmaz, K.S., Syed, H.M. 2009a. “Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions”, International Journal of Hydrogen Energy, 34, 7441-7447.

Avrupa Birliği. “Communication from the commission to the council and the European Parliament on future steps in bio-waste management in the European Union”, http://www.ab.gov.tr/files/ardb/evt/1_avrupa_birligi/1_6_raporlar/1_3_diger/environment/com_m_future_steps_in_bio_waste_management.pdf,
Son erişim tarihi: 31 Ocak 2012.

Badiei, M., Jahim, J.M., Anuar, N., Abdullah, S.R.S. 2011. “Effect of hydrolic retention time on biohydrogen production from palm oil mill effluent in anaerobic sequencing batch reactor”, International Journal of Hydrogen Energy, 36, 5912-5919.

Barbosa, M.J., Rocha, J.M.S., Tramper, J., Wijffels, R.H. 2001. “Acetate as a carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria”, Journal of Biotechnology, 85, 25–33.

Başçetinçelik, A., Öztürk, H.H., Karaca, C., Kaçıra, M., Ekinci, K., Kaya, D., Baban, A., Güneş, K., Komıttı, N., Barnes, I., Nieminen, M., “A Guide on Exploitation of Agricultural Residues in Turkey”, European Commission, ANNEX XIV Guide. http://ec.europa.eu/environment/life/project/Projects/index.cfm?fuseaction=home.showFile&rep=file&fil=AgroWaste_Guide.pdf
Son erişim tarihi: 10 Temmuz 2015.

Bergey, D.H., Holt, J.G. 1994. Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology (9.Basım). Philedelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Bialek, K., Kim, J., Lee, C., Collins, G., Mahony, T., O'Flaherty, V. 2011. "Quantitative and qualitative analyses of methanogenic community development in high-rate anaerobic bioreactors", *Water Research*, 45, 1298-1303.

Boran, E., Ozgür, E., van der Burg J, Yücel, M., Gunduz, U., Eroglu, I. 2010. "Biological hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* in solar tubular photo bioreactor", *Journal of Cleaner Production*, 18, 529-535.

Brito, A.G., Rodrigues, A.C., Melo, F.L. 1997. "Feasibility of a pulsed sequencing batch reactor with anaerobic aggregated biomass for the treatment of low strength wastewater", *Water Science and Technology*, 35, 193-198.

Bryers, J.D. 1984. "Structured modeling of the anaerobic digestion of biomass particulates", *Biotechnology and Bioengineering*, 27(5), 638-649.

Bull, M.A., Sterritt, R.M., Lestert, J.N. 1984. "An evaluation of single- and separated- phase anaerobic Industrial wastewater treatment in fluidized bed reactors", *Biotechnology and Bioengineering*, 26(9), 1054-1065.

Chaganti, S., Lalman, J., Heath, D. 2006. "16S rRNA gene based analysis of the microbial diversity and hydrogen production in three mixed anaerobic cultures", *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 9002-9007.

Chang, J.J., Chen, W.E., Shih, S.Y., Yu S.J., Lay, J.J., Wen, F.S, Huang, C.C. 2006. "Molecular detection of the clostridia in an anaerobic biohydrogen fermentation system by hydrogenase mRNA-targeted reverse transcription-PCR", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 598-604.

Chen, C.Y., Yang, M.H., Yeh, K.L., Liu, C.H., Chang, J.S. 2008. "Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4755-4762.

Chen, W.H., Sung, S., Chen, S.Y. 2009. "Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects", *International Journal of Hydrogen Energy*, 4 , 227-234.

Chen, Y., Jiang, S., Yuan, H., Zhou, Q., Gu, G. 2007. "Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs", *Water Research*, 41(3), 683-689.

Cheong, D.Y., Hansen, C. L. 2008. "Effect of feeding strategy on the stability of anaerobic sequencing batch reactor responses to organic loading conditions", *Bioresource Technology*, 99(11), 5058-5068.

Chu, C.F., Li, Y.Y., Xu, K.Q., Ebie, Y., Inamori, Y., Kong, H.N. 2008. "A pH- and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(18), 4739–4746.

Conklin, A., Stensel, H. D., and Ferguson, J. F. 2006. "Growth kinetics and competition between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in mesophilic anaerobic digestion", *Water Environment Research*, 78(5), 486-496.

Çevre ve Orman Bakanlığı. "Atık Yönetimi Eylem Planı (2008-2012)", <http://www.cygm.gov.tr/CYGM/Files/EylemPlan/atikeylemplani.pdf>,
Son erişim tarihi: 10 Temmuz 2015.

Çevre ve Şehircilik Bakanlığı. "Türkiye Cumhuriyeti İklim Değişikliği Ulusal Eylem Planı 2011–2023". <http://www.csb.gov.tr/db/iklim/banner/banner591.pdf>,
Son erişim tarihi: 20 Temmuz 2011.

Damasceno, L. H. S., Rodrigues, J. D., Ratusznei, S. M., Zaiat, M., Foresti, E. 2007. "Effects of feeding time and organic loading in an anaerobic sequencing batch biofilm reactor (ASBBR) treating diluted whey", *Journal of Environmental Management*, 85(4), 927–935.

Dareioti, M. A., Kornaros M. 2014. "Effect of hydraulic retention time (HRT) on the anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes in a two-stage CSTR system", *Bioresource Technology*, 167, 407–415.

Das, D., Veziroglu, T.N. 2008. "Advances in biological hydrogen production processes", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 6046-6057.

Demirel, B., Scherer, P., Yenigün, O., Onay, T. 2010. "Production of methane and hydrogen from biomass through conventional and high-rate anaerobic digestion processes", *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 40, 116–146.

Demirer, G.N., Duran, M., Erguder, T.H., Guven, E., Ugurlu, O., Tezel, U. 2000. "Anaerobic treatability and biogas production potential studies of different agro-industrial wastewaters in Turkey", *Biodegradation*, 11(6), 401-405.

Demirer, GN., Chen, S. 2004. "Effect of retention time and organic loading rate on anaerobic acidification and biogasification of dairy manure", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 1381-1387.

Dinamarca, C., Bakke, R. 2009. "Apparent hydrogen consumption in acid reactors: observations and implications", *Water Science and Technology*, 59, 1441-1447.

DiStefano, T.D., Palomar, A. 2010. "Effect of anaerobic reactor process configuration on useful energy production", *Water Research*, 44, 2583-2591.

Donna, E., Gossett, F., Gossett, J.M. 1997. "Comparison of butyric acid, ethanol, lactic acid, and propionic acid as hydrogen donors for the reductive dechlorination of tetrachloroethene", *Environmental Science and Technology*, 31, 918-926.

Duangmanee, T., Padmasiri, S.I., Simmons, J.J., Raskin, L., Sung, S. 2007. "Hydrogen production by anaerobic microbial communities exposed to repeated heat treatments", *Water Environment Research*, 79(9), 975-983.

Dünya Enerji Konseyi Türkiye Milli Komitesi. "Enerji Raporu 2010".

http://www.dektmk.org.tr/upresimler/Enerji_Raporu_20106.pdf,

Son erişim tarihi: 23 Aralık 2010.

Ekiel, I., Smith, I.P.C., Sprott, G.D. 1983. "Biosynthetic pathways in *Methanospirillum hungatei* as determined by ¹³C nuclear magnetic resonance", *Journal of Bacteriology*, 156, 316-326.

El-Mashad, H.M., Zhang, R. 2010. "Biogas production from co-digestion of dairy manure and food waste", *Bioresource Technology*, 101, 4021–4028.

Erguder, T.H., Guven, E., Demirer, G.N. 2000. "Anaerobic treatment of olive mill wastes in batch reactors", *Process Biochemistry*, 36(3), 243-248.



Erguder, T.H., Tezel, U., Güven, E., Demirer, G.N. 2001. "Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors", *Waste Management*, 21(7), 643-650.

Eroğlu, E., Gündüz, U., Yücel, M., Turker, L., Eroğlu, I. 2004. "Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source", *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 163-171.

Eroğlu, İ., Tabanoğlu, A., Gündüz, U., Eroğlu, E., Yücel, M. 2008. "Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in a flat plate solar bioreactor", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 531-541.

Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı. "Dünya ve Ülkemizin Enerji Talepleri, ve Ülkemizin Enerji Kaynakları". <http://www.enerji.gov.tr>,
Son erişim tarihi: 31 Ocak 2012.

Fascetti, E., D'addario, E., Todini, O., Robertiello, A. 1998. "Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes", *International Journal of Hydrogen Energy*, 23, 753-760.

Fascetti, E., Todini, O. 1995. "*Rhodobacter sphaeroides* RV cultivation and hydrogen production in a one-and two stage chemostat", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 300-305.

Ferry, J.G., Smith, P.H., Wolfe, R.S. 1974. "Methanospirillum, a new genus of methanogenic bacteria, and characterization of *Methanospirillum hungatii* sp.nov.", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 24, 465-469.

Fox, P., Pohland, F.G. 1994. "Anaerobic treatment applications and fundamentals: substrate specificity during phase separation", *Water Environment Research*, 66, 716-724.

Fukuzaki, S., Nishio, N., Nagai, S. 1990. "Kinetics of the methanogenic fermentation of acetate", *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3158-3163.

Gadov, S.I., Li, Y.Y., Liu, Y. 2012. "Effect of temperature on continuous hydrogen production of cellulose", *International Journal of Hydrogen Energy* 37, 15465-15472.

Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Ahring, B.K., Lyberatos, G. 2005. "Potential for biohydrogen and methane production from olive pulp", *Water Science and Technology*, 52, 209-215.

Georgia, A., Kateria, S., Nikolaos, V., Michael, K., Gerasimos, L. 2008. "Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process", *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 47, 5227-5233.

Giordano, A., Cantù, C., Spagni, A. 2010. "Monitoring the biochemical hydrogen and methane potential of the two-stage dark-fermentative process", *Bioresource Technology*, 102, 4474–4479.

Göblös, S., Portörő, P., Bordás, D., Kálmán, M., Kiss, I. 2008. "Comparison of the effectivities of two-phase and single-phase anaerobic sequencing batch reactors during dairy wastewater treatment", *Renewable Energy*, 33(5), 960–965.

Guo, X.M, Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., Steyer, J.P. 2010. "Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review", *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 10660-10673.

Guo, Y.C., Dai, Y., Bai, Y.X., Li, Y.H., Fan, Y.T., Hou, H.W. 2014. "Co-producing hydrogen and methane from higher-concentration of corn stalk by combining hydrogen fermentation and anaerobic digestion", *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(26), 14204–14211.

Guwy, A.J., Dinsdale, R.M., Kim, J.R., Massanet-Nicolau, J., Premier, G. 2011. "Fermentative biohydrogen production systems integration", *Bioresource Technology*, 102, 8534–8542.

Hach Water Analysis Handbook. 1989. Hach Water Analysis Handbook. Colorado: Hach Company.

Han, A.K., Shin, H. S. 2004. "Performance of an innovative two-stage process converting food waste to hydrogen and methane", *Journal of Air and Waste Management Association*, 54, 242–249.

Han, S.K., Kim, S.H., Shin, H.S. 2005. "Pilot scale two-stage process: a combination of acidogenic hydrogenesis and methanogenesis", *Water Science and Technology*, 52, 131-138.



Hawkes, F.R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., Hawkes, D.L. 2007. "Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress", *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 172-184.

Horiuchi, J., Shimizu, T., Kanno, T., Kobayashi, M. 1999. "Dynamic behavior in response to pH shift during anaerobic acidogenesis with a chemostat culture", *Biotechnology Techniques*, 13(3), 155–157.

Houbron, E., Larrinaga, A., Rustrian, E. 2003. "Liquefaction and methanization of solid and liquid coffee wastes by two phase anaerobic digestion process", *Water Science and Technology*, 48, 252-257.

Hsiao, C.L., Chang, J.J., Wu, J.H., Chin, W.C., Wen, F.S., Huang, C.C., Chen, C.C., Lin, C.Y. 2009. "Clostridium strain co-cultures for biohydrogen production enhancement from condensed molasses fermentation solubles", *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7173-7181.

Hung, C.H., Cheng, C.H., Cheng, L.H., Liang, C.M., Lin, C.Y. 2008. "Application of Clostridium-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(5), 1586-1592.

Hussy, I., Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L. 2003. "Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora", *Biotechnology and Bioengineering*, 84 (6), 619–626.

Inanc, B., Matsui, S., Ide, S. 2005. "Propionic acid accumulation in anaerobic digestion of carbohydrates: An investigation on the role of hydrogen gas", *Water Science and Technology*, 40(1), 93-100.

Jang, H.M., Park, S.K., Ha, J.H., Park, J.M. 2013. "Microbial community structure in a thermophilic aerobic digester used as a sludge pretreatment process for the mesophilic anaerobic digestion and the enhancement of methane production", *Bioresource Technology*, 145, 80-89.

Jarrell, K.F., Saulnier, M., Ley, A. 1987. "Inhibition of methanogenesis in pure cultures by ammonia, fatty acids, and heavy metals, and protection against heavy metal toxicity by sewage sludge", *Canadian Journal of Microbiology*, 33, 551–555.

Jimenez, M.A., Borja, R., Marfin, A. 2003. "Aerobic–anaerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation wastewater", *Process Biochemistry*, 38, 1275-1284.

Johnson, L.D., Young, J.C. 1983. "Inhibition of anaerobic digestion by organic priority pollutants", *Journal of Water Pollution Control Federation*, 55(12), 1441-1447.

Kalia, V.C., Sonakya, V., Raizada, N. 2000. "Anaerobic digestion of banana stem waste", *Bioresource Technology*, 73, 191-193.

Kalyuzhnyi, S. V., Sklyar, V.I., Davlyatshina, M., Parshina, S.N., Simankova, M.V., Kostrikina N., Nozhevnikova N. 1996. "Organic removal and microbiological features of UASB-reactor under various organic loading rates", *Bioresource Technology*, 55(1), 47–54.

Kapdan, I.K., Kargi, F. 2006. "Bio-hydrogen production from waste materials", *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 569–582.

Kapdan, I.K., Kargi, F., Oztekin, R., Argun, H. 2009. "Bio-hydrogen production from acid hydrolyzed wheat starch by photo-fermentation using different *Rhodobacter* sp.", *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 2201-2207.

Kargi, F., Pamukoglu, M.Y. 2008. "Dark fermentation of ground wheat starch for bio-hydrogen production by fed-batch operation", *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 2940-2946.

Kawagoshi, Y., Hino, N., Fujimoto, A., Nakao, M., Fujita, Y., Sugimura, S., Furukawa, K. 2005. "Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 524–530.

Kennedy, K.J., Sanches, W.A., Hamoda, M.F., Droste, R.L. 1991. "Performance of anaerobic sludge blanket sequencing batch reactors", *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*, 63, 75–83.

Keskin, T., Giusti, L., Azbar, N. 2012. "Continuous biohydrogen production in immobilized biofilm system versus suspended cell culture", *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(23), 1418-1424.

Kim, D., Kim, S., Kim, K., Shin, H. 2010. “Experience of pilot-scale hydrogen producing anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) treating food waste”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 1590-1594.

Kim, M.S., Baek, J.S., Lee, J.K. 2006b. “Comparison of H₂ accumulation by *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and its uptake hydrogenase and PHB synthase deficient mutant”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 121-127.

Kim, S.H., Han, S.K., Shin, H.S. 2006a. “Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter”, *Process Biochemistry*, 41(1), 199–207.

Kim, S.H., Han, S.K., Shin, H.S. 2008. “Optimization of continuous hydrogen fermentation of food waste as a function of solids retention time independent of hydraulic retention time”, *Process Biochemistry*, 43, 213-218.

Klingler, B. 2015. “Environmental Aspects of Biogas Technology”. German Biogas Association. http://agrienvarchive.ca/bioenergy/download/biogas_tech.pdf
Son erişim tarihi: 10 Temmuz 2015.

Koku, H., Eroğlu, İ., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, M. 2002. “Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1315–1329.

Koutrouli, C.E., Kalfas, H., Gavala, N.H., Skiadas, V.I., Stamatelous, K., Lyberatos, G. 2009. “Hydrogen and methane production through two-stage mesophilic anaerobic digestion of olive pulp”, *Second International Conference on Engineering for Waste Valorisation Proceedings*, 100(15), 3718-3723.

Kraemer, J.T., Bagley, D.M. 2008. “Measurement of H₂ consumption and its role in continuous fermentative hydrogen production”, *Water Science and Technology*, 57(5), 681-685.

Krich, K., Augenstein, D., Batmale, J.P., Rutledge, B., Salour, D. “Biomethane from dairy waste: A sourcebook for the production and use of renewable natural gas in California”.



USDA Rural Development.

<https://www.americanbiogascouncil.org/pdf/biomethaneFromDairyWaste.pdf>,

Son erişim tarihi: 10 Temmuz 2015.

Kyazze, G., Dinsdale, R., Guwy, A.J., Hawkes, F.R., Premier, G.C., Hawkes, D.L. 2007. "Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously", *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 759-770.

Lam, M.K., Lee, K.T. 2011. "Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): Win-win strategies toward better environmental protection", *Biotechnology Advances*, 29, 124-141.

Laurinavichene, T.V., Belokopytov, B.F., Laurinavichius, K.S., Tekucheva, D.N., Seibert, M., Tsygankov, A.A. 2010. "Towards the integration of dark- and photo-fermentative waste treatment. 3. Potato as substrate for sequential dark fermentation and light-driven H₂ production", *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 8536-8543.

Lay, C.H., Wu, J.H., Hsiao, C.L., Chang, J.J., Chen, C.C., Lin, C.Y. 2010. "Biohydrogen production from soluble condensed molasses fermentation using anaerobic fermentation", *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), 13445-13451.

Lee, C., Kim, J.S., SeungGu, O., Vincent, H.S. 2010. "Quantitative and qualitative transitions of methanogen community structure during the batch anaerobic digestion of cheese-processing wastewater", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1963-1973.

Lee, I.S., Parameswaran, P., Ritmann, E.B. 2011. "Effects of solids retention time on methanogenesis in anaerobic digestion of thickened mixed sludge", *Bioresource Technology*, 102, 10266-10272.

Lee, Y., Chung, J. 2010. "Bioproduction of hydrogen from food waste by pilot-scale combined hydrogen/methane fermentation", *International Journal of Hydrogen Energy*, 35 (21), 11746-11755.

Levin, D.B., Chahine, R. 2010. "Challenges for renewable hydrogen production from biomass", *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 4962-4969.



Lewandowski, A.D. 1999. Design of Thermal Oxidation Systems for Volatile Organic Compounds. Florida: CRC Press, sayfa: 58-59.

Li, R.Y., Zhang, T., Fang, H.H.P. 2011. "Application of molecular techniques on heterotrophic hydrogen production research", *Bioresource Technology*, 102, 8445–8456.

Liang, Y.C. 2009. Two-phase Bioenergy Fermentation Using Condensed Molasses Fermentation Soluables. Taiwan: Feng Chia University, Yüksek Lisans Tezi.

Liu, B.F., Ren, N.Q., Ding, F.X.J., Zheng, G.X., Guo, W.Q., Xu, J.F., Xie, G.J. 2009. "Hydrogen production by immobilized *R. faecalis* RLD-53 using soluble metabolites from ethanol fermentation bacteria *E. harbinense* B49", *Bioresource Technology*, 100, 2719-2723.

Liu, Y., Zhang, Y., Quan, X., Chen S., Zhao, H. 2011. "Applying an electric field in a built-in zero valent iron--anaerobic reactor for enhancement of sludge granulation", *Water Research*, 45(3), 1258–1266.

Lo, Y., Chen, C., Lee, C., Chang, J. 2011. "Photo fermentative hydrogen production using dominant components (acetate, lactate, and butyrate) in dark fermentation effluents", *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 14059-14068.

Luo, G., Xie, L., Zhou, Q., Angelidaki, I. 2011. "Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process", *Bioresource Technology*, 102(18), 8700–8706.

Madigon, M.T., Martinko, J.M., 2006. Brock Biology of Microorganisms (11.Basım). USA: Pearson Prentice Hall.

Mars, A.E., Özgür, E., Peksel, B., Louwerse, A., Yucel, M., Gunduz, U., Claassen, P.A.M., Eroğlu, İ. 2010. "Biohydrogen production from beet molasses by sequential dark and photofermentation", *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 511-517.

Mayburg, C., Britz, T.J. 1993. "Influence of higher organic loading rates on the efficiency on an anaerobic hybrid digester while treating landfill leachate", *Water SA*, 19(4), 319-324.

McCarthy, P.L. 1982. "One Hundred Years of Anaerobic Treatment". Sayfa 3-22. Anaerobic Digestion 1981. Editörler: Hughes, D.E., Stafford, D.A., Wheatley, B.I., Baader, W., Lettinga, G., Nyns, E.J., Verstraere, W., Wentworth, R.L. Amsterdam: Elsevier Biomedical.

McHugh, S., Carton, M., Flaherty, M.V.O. 2003. "Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors", FEMS Microbiology Letters, 219, 297-304.

Meng, X., Zhang, Y., Li Q., Quan, X. 2013. "Adding Fe-0 powder to enhance the anaerobic conversion of propionate to acetate", Biochemical Engineering Journal, 73, 80–85.

Michael, C., Nathan, M., Christopher, C., John, B.2007. "Two-phase anaerobic digestion for production of hydrogen-methane mixtures", Bioresource Technology, 98, 2641-2651.

Michael, J., Bryant, M., Bryant, M.P. 1981. "Anaerobic degradation of lactate by syntrophic associations of *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio* Species and effect of H₂ on acetate degradation", Applied and Environmental Microbiology, 32, 346-354.

Misi, S.N., Forster, C.F. 2001. "Batch co-digestion of multi-component agro-wastes", Bioresource Technology, 80, 19-28.

Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. 1993. "Profiling of complex microbial population by DGGE analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA", Applied and Environmental Microbiology, 62, 2676-2680.

Najafpour, G., Younesi, H., Mohamed, A.R. 2003. "Continuous hydrogen production via fermentation of synthesis gas", Petroleum and Coal, 45(3-4), 154-158.

Nakasaki, K., Kwon, H.S., Ikeda, H. 2013. "Identification of microorganisms in the granules generated during methane fermentation of the syrup wastewater produced while canning fruit", Process Biochemistry, 48(5-6), 912-919.

Nasr, N., Elbeshbishy, E., Hafez, H., Nakhla, G., Naggar, M.H.E. 2012. "Comparative assessment of single-stage and two-stage anaerobic digestion for the treatment of thin stillage", Bioresource Technology, 111, 122-126.

Nath, K., Kumar, A., Das, D. 2005. "Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O.U.001 using spent media of *Enterobacter cloacae* DM11", Applied Microbiology and Biotechnology, 68, 533-541.

Nath, K., Muthukumar, M., Kumar, A., Das, D. 2008. "Kinetics of two-stage fermentation process for the production of hydrogen", International Journal of Hydrogen Energy, 33, 1195-1203.

Neimark, H., Kocan, K.M. 1997. "The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a Mycoplasma", FEMS Microbiol Letters, 156, 287-291.

Ni, B.J., Liu, H, Nie, Y.Q., Zeng, R.J., Du, G.C., Chen, J.A, Yu, H.Q. 2011. "Coupling glucose fermentation and homoacetogenesis for elevated acetate production: experimental and mathematical approaches", Biotechnology and Bioengineering, 108, 345-353.

Nielsen, A.T., Liu, W.T., Filipe, C., Grady, L., Molin, S., Stahl, D.A. 1999. "Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor", Applied and Environmental Microbiology, 65, 1251-1258.

Oh, S.E., Iyer, P., Bruns, M.A, Logan, B.E. 2004. "Biological hydrogen production using a membrane bioreactor", Biotechnology and Bioengineering, 87(1), 119-127.

Olbrich, H. "The Molasses", Biotechnologie-Kempe GmbH. Fermentation Technologist, Institut für Zuckerindustrie, http://www.biotechnologie-kempe.de/Molasses_OLBRICH.pdf.
Son erişim tarihi: 10 Temmuz 2015.

Ozkan, E. 2011. Photofermentative Hydrogen Production Using Dark Fermentation Effluent of Sugar Beet Thick Juice By *Rhodobacter capsulatus*. Ankara: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.

Ozkan, L., Erguder, T.H., Demirer, G.N. 2010. "Investigation of the effect of culture type on biological hydrogen production from sugar industry wastes", Waste Management, 30(5), 792-798.

Ozkan, L., Erguder, T.H., Demirer, G.N. 2011. "Effects of pretreatment methods on solubilization of beet-pulp and bio-hydrogen production yield", International Journal of Hydrogen Energy, 36(1), 382-389.

Ozmihci, S., Kargi, F. 2011. "Dark fermentative bio-hydrogen production from waste wheat starch using co-culture with periodic feeding: Effects of substrate loading rate", International Journal of Hydrogen Energy, 36, 7089-7093.

Özgür, E., Mars, A.E., Peksel, B., Louwse, A., Yücel, M., Gündüz, U., Claassen, P.A., Eroglu, I. 2010. "Biohydrogen production from beet molasses by sequential dark and photofermentation", International Journal of Hydrogen Energy, 35(2), 511–517.

Özgür, E., Peksel, B. 2013. "Biohydrogen production from barley straw hydrolysate through sequential dark and photofermentation", Journal of Cleaner Production, 52, 14-20.

Özgür, E., Uyar, B., Öztürk, Y., Yücel, M., Gündüz, U., Eroğlu, İ. 2010. "Biohydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* on acetate at fluctuating temperatures", Resources, Conservation and Recycling, 54, 310-314.

Park, M.J., Jo, J.H., Lee, D.S., Park, J.M. 2010. "Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses", International Journal of Hydrogen Energy, 35, 6194-6202.

Parkin, G., Owen W.F. 1986. "Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges", Journal of Environmental Engineering, 112(5), 867-920.

Pipyn, P., Verstraete, W. 1981. "Lactate and ethanol as intermediates in two-phase anaerobic digestion", Biotechnology and Bioengineering, 23, 1145-1154.

Pullammanappallil, P.C., Chynoweth, D.P., Lyberatos, G., Svoronos, S.A. 2001. "Stable performance of anaerobic digestion in the presence of a high concentration of propionic acid", Bioresource Technology, 78(2), 165-169.

Que´me´neur, M., Hamelin, J., Latrille, E., Steyer, J.F., Trably, E. 2011. "Functional versus phylogenetic fingerprint analyses for monitoring hydrogen-producing bacterial populations in dark fermentation cultures", International Journal of Hydrogen Energy, 36, 3870-3879.

Qui, Y., Sekiguchi, Y., Imachi, H., Kamagata, Y., Tseng, I., Cheng, S., Ohashi, A., Harada, H. 2004. "Identification and isolation of anaerobic, syntrophic phthalate isomer-degrading

microbes from methanogenic sludges treating wastewater from terephthalate manufacturing", *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1617-1626.

Ramakersa, C., Ruijter, J.M., Depreza H.L.R., Moormana, F.M.A. 2003. "Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data", *Neuroscience Letters*, 339(1), 62-66.

Raposo, F., Banks, C.J., Siegart, I., Heaven, S., Borja, R. 2006. "Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests", *Process Biochemistry*, 41(6), 1444-1450.

Redwood, M.D., Peterson-Beedle, M., Macaskie, L.E., 2009. "Integrating dark and light bio-hydrogen production strategies: towards the hydrogen economy", *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 8, 149-185.

Ren, N.Q., Liu, B.F., Zheng, G.X., Xing, D.F., Zhao, X., Guo, W.Q., Ding, J. 2009. "Strategy for enhancing photo-hydrogen production yield by repeated fed-batch cultures", *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7579-7584.

Resmi Gazete. "Dokuzuncu Kalkınma Planı (2007-2013)", 26215 sayılı Resmi Gazete. <https://pbk.tbmm.gov.tr/dokumanlar/kalkinma-plani-9-genel-kurul.pdf>,
Son erişim tarihi: 1 Temmuz 2006.

Resmi Gazete. "Yenilenebilir Enerji Kaynaklarının Elektrik Enerjisi Üretimi Amaçlı Kullanımına İlişkin Kanun". Kanun No: 5346.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2005/05/20050518-1.htm>,
Son erişim tarihi: 10 Mayıs 2005.

Resmi Gazete. "Yenilenebilir Enerji Kaynaklarının Elektrik Enerjisi Üretimi Amaçlı Kullanımına İlişkin Kanunda Değişiklik Yapılmasına Dair Kanun", 27809 sayılı Resmi Gazete.
<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/01/20110108-3.htm>,
Son erişim tarihi: 1 Ocak 2011.

Ripley, L. E., Boyle, W.C., Converse, J.C. 1986. "Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes", *Journal of Water Pollution Control Federation*, 58(5), 406-411.

Saady, N.M.C. 2013. "Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge", International Journal of Hydrogen Energy, 38(30), 13172-13191.

Sagnak, R.,Kapdan, I.K.,Kargi, F. 2010. "Dark fermentation of acid hydrolyzed ground wheat starch for bio-hydrogen production by periodic feeding and effluent removal", International Journal of Hydrogen Energy, 35, 9630-9636.

Sağır, E. 2009. Photobiological Hydrogen Production from Sugar Beet Molasses. Ankara: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.

Salomoni, C., Caputo, A., Bonoli, M., Francioso, O., Rodriguez-Estrada, M.T., Palenzona, D. 2011. "Enhanced methane production in a two-phase anaerobic digestion plant, after CO₂ capture and addition to organic wastes", Bioresource Technology, 102(11), 6443-6448.

Sanz, J.L., Köchling, T. 2007. "Molecular biology techniques used in wastewater treatment: an overview", Process Biochemistry, 42, 119–133.

Saraphirom, P., Reungsang, A. 2011. "Biological hydrogen production from sweet sorghum syrup by mixed cultures using an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR)", International Journal of Hydrogen Energy, 36, 8767-8773.

Sasikala, K., Ramana, C.H., Rao, P.R. 1991. "Environmental regulation for optimal biomass yield and photoproduction of hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001", International Journal of Hydrogen Energy, 16, 597-601.

Seifert, K., Waligorska, M., Laniecki, M. 2010a. "Brewery wastewaters in photobiological hydrogen generation in presence of *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001", International Journal of Hydrogen Energy, 35, 4085-4091.

Seifert, K., Waligorska, M., Laniecki, M. 2010b. "Hydrogen generation in photobiological process from dairy wastewater", International Journal of Hydrogen Energy, 35, 9624-9629.

Sevinç, P. 2010. Kinetic Analyses of the Effects of Temperature and Light Intensity on Growth Hydrogen Production and Organic Acid Utilization by *Rhodobacter Capsulatus*. Ankara: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.

Sevinç, P., Gündüz, U., Eroğlu, İ., Yücel, M. 2012. "Kinetic analysis of photosynthetic growth, hydrogen production and dual substrate utilization by *Rhodobacter capsulatus*", International Journal of Hydrogen Energy, 37, 16430-16436.

Shen, P., Zhang, J.Y., Zhang, J., Jiang, C.J., Tang, X.L., Li, J.F., Zhang, M., Wu, B. 2013. "Changes in microbial community structure in two anaerobic systems to treat bagasse spraying wastewater with and without addition of molasses alcohol wastewater", Bioresource Technology, 131, 333-340.

Shigematsu, T., Tang, Y., Kawaguchi, H., Ninomiya, K., Kijima, J., Kobayashi, T., Morimura, S., Kida, K. 2003. "Effect of dilution rate on structure of a mesophilic acetate-degrading methanogenic community during continuous cultivation", Journal of Bioscience and Bioengineering, 96(6), 547-558.

Shimada, T., Zilles, J., Raskin, L., Morgenroth, E. 2007. "Carbohydrate storage in anaerobic sequencing batch reactors", Water Research, 41(20), 4721–4729.

Shin, S.G., Han, G., Lim, J., Lee, C., Hwang, S. 2010. "A comprehensive microbial insight into two-stage anaerobic digestion of food waste-recycling wastewater", Water Research, 44, 4838–4849.

Shizas, I., Bagley, D.M. 2002. "Improving anaerobic sequencing batch reactor performance by modifying operational parameters", Water Research, 36(1), 363–367.

Speece, R.E., 1996. Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters, USA: Archae Press.

Speece, R.E., Parkin, G.F. 1983. "The response of methane bacteria to toxicity", Proceedings of the 3rd International Symposium on Anaerobic Digestion.

Su, H., Cheng, J., Zhou, J., Song, W., Cen, K. 2009. "Improving hydrogen production from cassava starch by combination of dark and photo fermentation", International Journal of Hydrogen Energy, 34, 1780-1786.

Sung, S., Raskin, L., Duangmanee, T., Padmasiri, S., Simmons, J.J. 2007. "Hydrogen production by anaerobic microbial communities exposed to repeated heat treatments", Water Environ Research, 79(9), 975-983.

Suzuki, M.S., Giovannoni, J. 1996. "Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR", *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 625-630.

Tao, Y., Chen, Y., Wu, Y., He, Y., Zhou, Z. 2007. "High hydrogen yield from a two-step process of dark and photofermentation of sucrose", *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 200-206.

Taşkın, B., Gözen, G.A., Duran, M. 2011. "Selective Quantification of Viable *Escherichia coli* Bacteria in Biosolids by Quantitative PCR with Propidium Monoazide Modification", *Applied and Environmental Microbiology*, 77(13), 4329-4335.

Tezel, U., Guven, E., Erguder, T.H., Demirer, G.N. 2001. "Sequential (Anaerobic/Aerobic) biological treatment of Dalaman SEKA Pulp and Paper Industry effluent", *Waste Management*, 21 (8), 717-724.

Türkiye İstatistik Kurumu. "Seragazi Emisyon Envanteri: 1990-2004".
<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=399>,
Son erişim tarihi: 19 Ocak 2007.

Tzeneva, V.A., Heilig, H., Vliet, W., Akkermans, A., Vos, W., Smidt, H. 2008. "16S rRNA targeted DGGE fingerprinting of microbial communities", *Methods in Molecular Biology*, 410, 335-349.

Ueno, Y., Otauka, S., Morimoto, M. 1996. "Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 194–197.

Uludag-Demirer, S., Taskin, B., Demirer, G.N., Duran, M. 2013. "The effect of managing nutrients in the performance of anaerobic digesters of municipal wastewater treatment plants", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 7899-7907.

Uyar, B., Eroglu, I., Yücel, M., Gündüz, U., Türker, L. 2007. "Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors", *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 4670-4677.

Uyar, B., Eroglu, İ., Yücel, M., Gündüz, U. 2009. "Photofermentative hydrogen production from volatile fatty acids present in dark fermentation effluents", *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 4517-4523.

Van Ginkel, S., Logan, B. 2005a. "Increased biological hydrogen production with reduced organic loading", *Water Research*, 39, 3819–3826.

Van Ginkel, S., Logan, B. 2005b. "Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids", *Environmental Science and Technology*, 39, 9351–9356.

Wang, Y., Zhang, Y., Wang, J., Meng, L. 2009. "Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria", *Biomass and Bioenergy*, 33, 848-853.

Wang, J., Wan, W. 2008. "Optimization of fermentative hydrogen production process by response surface methodology", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 6976-6984.

Wang, L., Zhou, Q., F. Li, F.T. 2006. "Avoiding propionic acid accumulation in the anaerobic process for biohydrogen production", *Biomass and Bioenergy*, 30(2), 177-182.

Wang, X., Hoefel, D., Saint, C.P., Monis, P.T. Jin, B. 2006. "The isolation and microbial community analysis of hydrogen producing bacteria from activated sludge", *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1364-5072.

Weiland, P. 1993. "One- and two-step anaerobic digestion of solid agro-industrial residues", *Water Science and Technology*, 27, 145-151.

Won, S.G., Lau, A.K. 2011. "Effects of key operational parameters on biohydrogen production via anaerobic fermentation in sequencing batch reactor", *Bioresource Technology*, 102, 6876-6883.

Wu, X., Lin, H., Zhu, J. 2013. "Optimization of continuous hydrogen production from co-fermenting molasses with liquid swine manure in an anaerobic sequencing batch reactor", *Bioresource Technology*, 136, 351-359.

Wu, X., Zhu, J., Dong, C., Miller, C., Li, Y., Wang, L., Yao, W.Y. 2009. "Continuous biohydrogen production from liquid swine manure supplemented with glucose using an



anaerobic sequencing batch reactor”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 6636-6645.

Xie, B., Cheng, J., Zhou, J., Song, W., Cen, K. 2008. “Cogeneration of hydrogen and methane from glucose to improve energy conversion efficiency”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 5006-5011.

Xing, D., Ren, N., Rittmann, B. 2008. “Genetic diversity of hydrogen-producing bacteria in an acidophilic ethanol-h₂-coproducing system”, analyzed using the [fe]-hydrogenase gene, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1232–1239.

Xing, Y., Fan, S., Zhang, J., Fan, Y., Hou, H. 2011. “Enhanced bio-hydrogen production from corn stalk by anaerobic fermentation using response surface methodology”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 12770-12779.

Yeoh, B.G. 1997. “Two-phase anaerobic treatment of cane-molasses alcohol stillage”, *Water Science and Technology*, 36(6–7), 441–448.

Yılmaz, V., Demirer, G.N. 2006. “Improved anaerobic acidification of unscreened dairy manure”, *Environmental Engineering Science*, 25, 309-317.

Yokoi, H., Maki, R., Hirose, J., Hayashi, S. 2002. “Microbial production of hydrogen from starch manufacturing wastes”, *Biomass and Bioenergy*, 22, 389-395.

Zhang, B., Wei, C., He, P. 2007. “Influence of lactic acid on the two-phase anaerobic digestion of kitchen wastes”, *Journal of Environmental Sciences*, 19, 244-249.

Zhang, P., Chen, Y., Zhou, Q. 2009. “Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under mesophilic and thermophilic conditions: effect of pH”, *Water Research*, 43(15), 3735–3742.

Zhu, H., Stadnyk, A., Beland, M., Seto, P. 2008. “Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process”, *Bioresource Technology*, 99, 5078–5084.

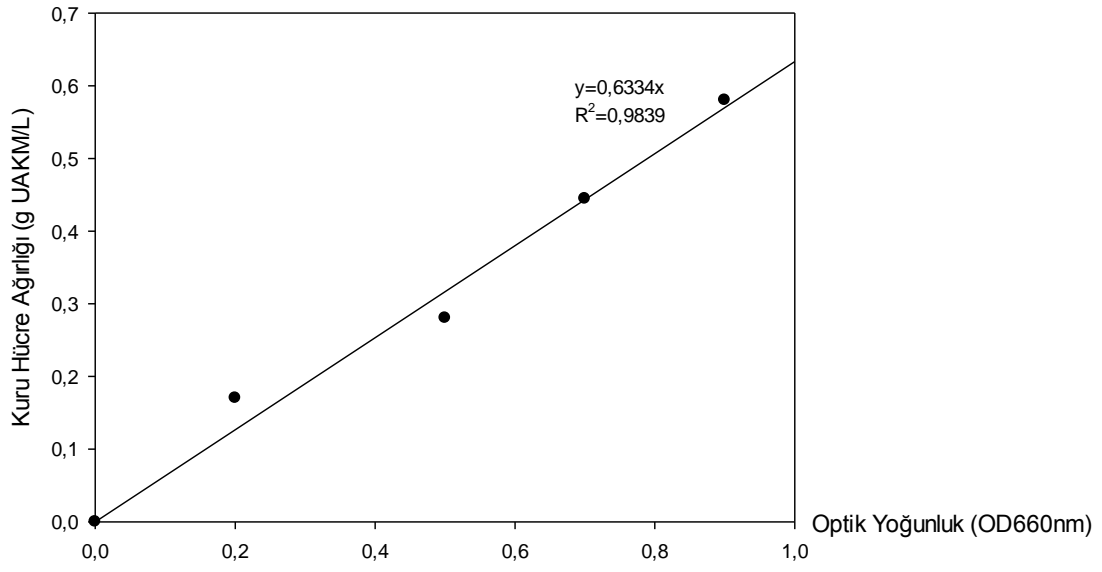


Zong, W., Yu, R., Zhang, P., Fan, M., Zhou, Z. 2009. "Efficient hydrogen gas production from cassava and foodwaste by a two-step process of dark fermentation and photo-fermentation", *Biomass and Bioenergy*, 33, 1458-1463.

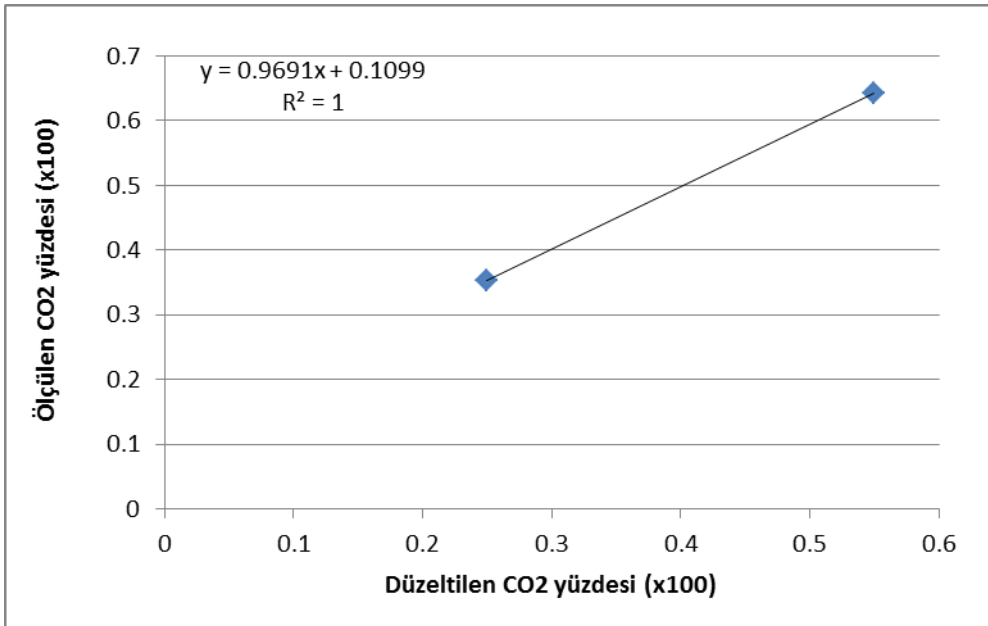
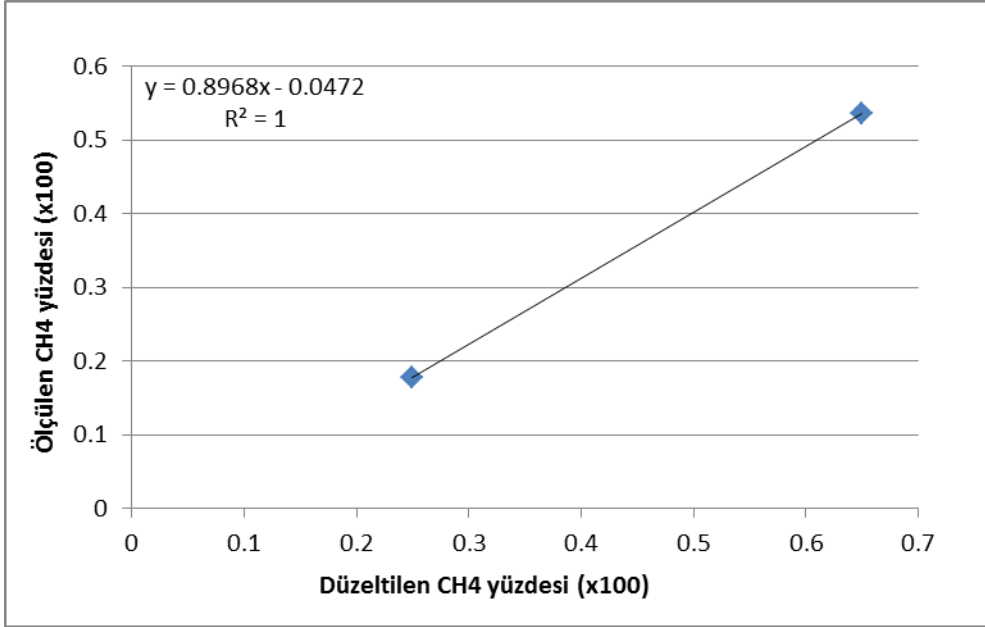
EK-A

Tablo EK-A1. Karanlık fermantasyon deneyleri-SET 3'de Tepki Yüzeyi Metoduna göre kurulan reaktör çeşitleri ve içerikleri

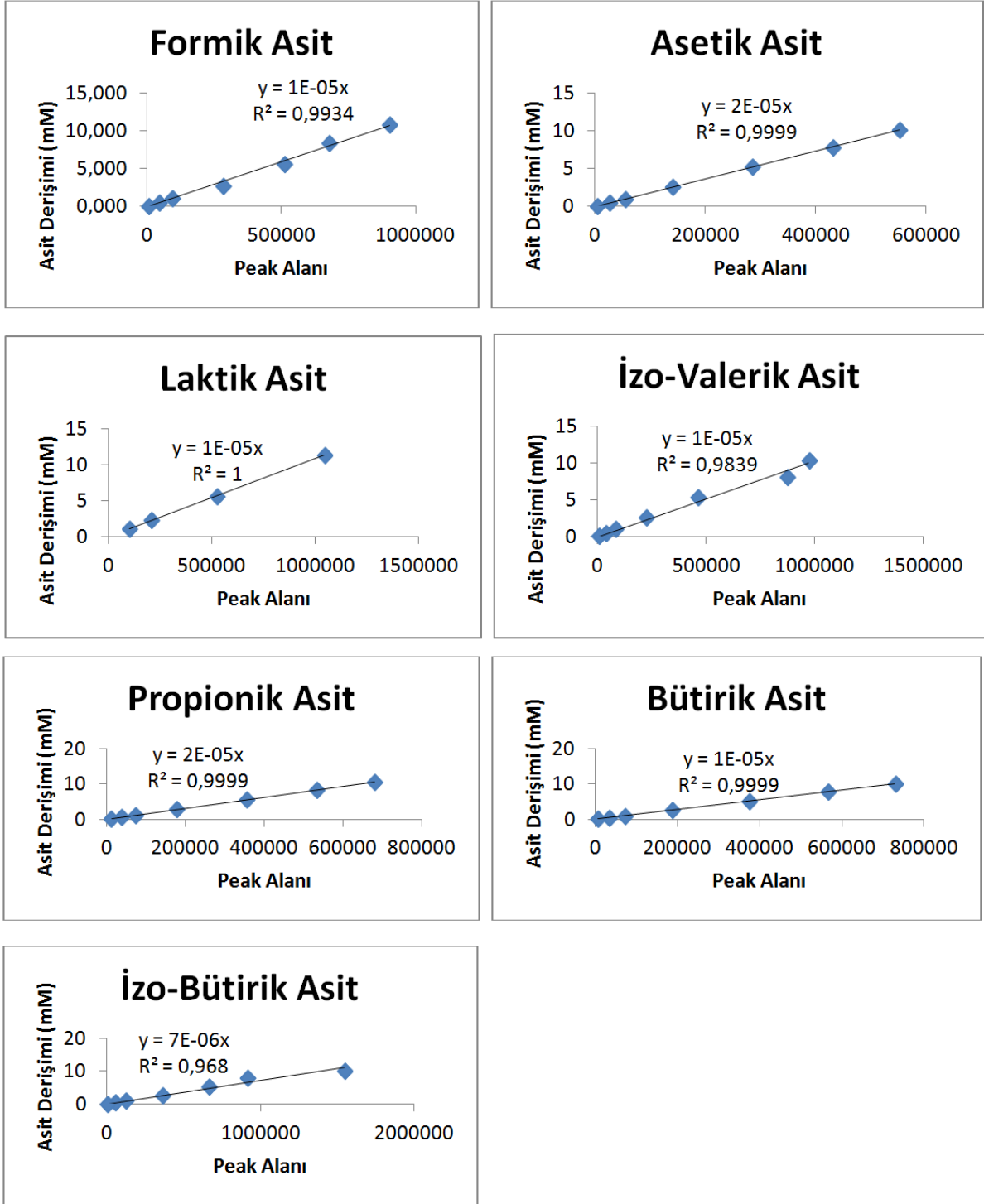
Reaktör no	Başlangıç KOİ (g/L)	S/X _o	pH	Kod
1	30	20	4	S1
2	30	20	7	S2
3	30	12	5,5	S3
4	10	12	4	S4
5	10	4	5,5	S5
6	50	4	5,5	S6
7	30	4	4	S7
8	50	12	7	S8
9	50	12	4	S9
10	10	12	7	S10
11	30	4	7	S11
12	10	4	5,5	S12
13	30	12	5,5	S13
14	50	4	5,5	S14
15	30	12	5,5	S15
16	30	12	5,5	S16
17	30	12	5,5	S17
18	30	12	5,5	S18
19	10	20	5,5	S19
20	30	20	7	S20
21	30	4	7	S21
22	30	20	4	S22
23	30	4	4	S23
24	10	12	4	S24
25	50	12	4	S25
26	50	12	7	S26
27	10	20	5,5	S27
28	10	12	7	S28
29	50	20	5,5	S29
30	50	20	5,5	S30



Şekil EK-A1. Fotofermantasyon deneylerinde kullanılan optik yoğunluk (OD) - UAKM kalibrasyon eğrisi



Şekil EK-A2. GC (Agilent)-TCD sistemi ile gaz kompozisyonlarını belirlemek için kullanılan kalibrasyon grafikleri



Şekil EK-A3. HPLC ile UYA derişimlerini belirlemek için kullanılan kalibrasyon grafikleri

EK-B

Reaktörlere eklenen glikoz miktarı esas alınarak hidrojen üretim verimi ($\text{mol H}_2 / \text{mol glikoz}_{\text{eklenen}}$) hesaplanmış ve hesap yöntemi aşağıda sunulan bir örnekle gösterilmiştir.

Set-1: Karanlık fermantasyon çalışması,

Başlangıç pH değeri: 6

Başlangıç KOİ derişimi: 10 g/L

Reaktör etkin hacmi = 60 mL

Başlangıç glikoz derişimi = 9,4 g/L

Başlangıç glikoz miktarı = 0,564 g

$\text{MW}_{\text{Glikoz}} = 180 \text{ g/mol}$

$\text{Mol}_{\text{Glikoz, reaktör içi}} = 3,13 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$

V = maksimum hidrojen gazı üretimi (92,4 mL)

PV = n R T kullanılarak

R = 0,082 L.Atm /K.mol

T = 37°C (= 310 K)

P = 1 atm

$n_{\text{H}_2} = 3,635 \times 10^{-3} \text{ mol}$

$$\text{Verim} = \frac{\text{Mol } H_2 \text{ üretilen(mol)}}{\text{Mol}_{\text{Glikoz eklenen}}}$$

$$\text{Verim} = \frac{3,635 \cdot 10^{-3} \text{ mol } H_2}{3,13 \cdot 10^{-3} \text{ mol glikoz}_{\text{eklenen}}} = 1,16 \text{ mol } H_2 / \text{mol glikoz}_{\text{eklenen}}$$

Tablo EK-B1. Karanlık fermantasyon SET 3'de kurulan her bir reaktöre ait hidrojen üretim verimi ve prodüktivite değerleri

Başlangıç			Toplam H ₂ üretimi (mL) ^a	Prodüktivite (mL H ₂ / (L _{reaktör} ·saat) ^b	Verim (mol H ₂ /mol sükrözeklener)
KOİ (g/L)	S/X _o	pH			
30	20	4	26,8	3,52	0,26
30	20	7	64,2	8,43	0,61
30	12	5,5	85,3	11,19	0,89
10	12	4	22,5	2,95	0,64
10	4	5,5	46,7	6,13	1,34
50	4	5,5	47,5	6,24	0,27
30	4	4	22,7	2,98	0,22
50	12	7	56,4	7,4	0,32
50	12	4	30	3,94	0,17
10	12	7	80,3	10,54	2,58
30	4	7	69,3	9,1	0,66
10	4	5,5	60	7,87	2,12
30	12	5,5	77	10,1	0,73
50	4	5,5	59,8	7,85	0,34
30	12	5,5	59,3	7,79	0,57
30	12	5,5	67,4	8,84	0,64
30	12	5,5	66	8,66	0,63
30	12	5,5	71,1	9,33	0,68
10	20	5,5	64,1	8,41	1,83
30	20	7	75,7	9,93	0,72
30	4	7	80,7	10,59	0,77
30	20	4	28,4	3,72	0,27
30	4	4	19,7	2,58	0,19
10	12	4	18,2	2,39	0,52
50	12	4	7,6	0,99	0,04
50	12	7	71	9,32	0,49
10	20	5,5	56,8	7,46	1,63
10	12	7	70,6	9,26	2,02
50	20	5,5	42,3	5,55	0,24
50	20	5,5	42,3	5,55	0,24

^a 35 C'deki değerlerdir

^b STP koşullarına (0°C, 1 atm) göre hesaplanmıştır.

Tablo EK-B2a. Hidrojen üretim verimi modelinin ANOVA incelemesi

Estimated Regression Coefficients for yield (molH ₂ /molsucrose-added)				
Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,6665	0,05160	12,917	0,000*
pH	0,3431	0,03798	9,035	0,000*
COD	-0,6244	0,03798	-16,441	0,000*
pH*pH	-0,1864	0,05574	-3,345	0,003*
COD*COD	0,3036	0,05574	5,446	0,000*
pH*COD	-0,3312	0,05371	-6,168	0,000*
R-Sq = 94,76% R-Sq(pred) = 90,99% R-Sq(adj) = 93,66%				

Tablo EK-B2a'da takip edilebileceği gibi modelin uyumluluğu yüksek derece anlamlıdır; tüm p değerleri $p < 0,05$ bulunmuştur. Modelin grafik verilerini açıklayıcılığı (R-Sq) % 94,76 oranında tutarlı çıkmıştır.

Tablo EK-B2b. Hidrojen üretim verimi modeli parametrelerinin ANOVA incelemesi

Analysis of Variance for yield (molH ₂ /molsucrose-added)						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	5	10,0070	10,0070	2,00140	86,73	0,000
Linear	2	8,1213	8,1213	4,06063	175,96	0,000
pH	1	1,8838	1,8838	1,88376	81,63	0,000
COD	1	6,2375	6,2375	6,23751	270,29	0,000
Square	2	1,0079	1,0079	0,50397	21,84	0,000
pH*pH	1	0,3234	0,2582	0,25822	11,19	0,003
COD*COD	1	0,6845	0,6845	0,68452	29,66	0,000
Interaction	1	0,8778	0,8778	0,87781	38,04	0,000
pH*COD	1	0,8778	0,8778	0,87781	38,04	0,000
Residual Error	24	0,5538	0,5538	0,02308		
Lack-of-Fit	3	0,2741	0,2741	0,09138	6,86	0,002
Pure Error	21	0,2797	0,2797	0,01332		
Total	29	10,5609				

DF-Degrees of Freedom

Seq SS-Sums of Squares

Adj MS-Mean Square

Tablo EK-B2b'de de takip edilebileceği gibi modeldeki parametrelerin tümü için p değerleri 0,05'in altında çıkmış; parametrelerin anlamlılığı kanıtlanmıştır.

Tablo EK-B3. MathCad programıyla hesaplanan hidrojen üretim verimi denklemi ve bilgileri

Hidrojen üretim verimi denklemi ^a :																							
$F1(x, c) := c_0 + c_1 \cdot x_0 + c_2 \cdot x_1 + c_3 \cdot x_2 + c_4 \cdot (x_0)^2 + c_5 \cdot (x_1)^2 + c_6 \cdot (x_2)^2 + c_7 \cdot x_0 \cdot x_1 + c_8 \cdot x_0 \cdot x_2 + c_9 \cdot x_1 \cdot x_2$																							
Denklem Sabitleri ^b :																							
C1:= multidf(X, Y, G, F1)	<table border="1"><tr><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>0</td><td>-3.655</td></tr><tr><td>1</td><td>-0.019</td></tr><tr><td>2</td><td>0.029</td></tr><tr><td>3</td><td>1.559</td></tr><tr><td>4</td><td>$8.703 \cdot 10^{-4}$</td></tr><tr><td>5</td><td>$-5.762 \cdot 10^{-4}$</td></tr><tr><td>6</td><td>-0.085</td></tr><tr><td>7</td><td>$-1.016 \cdot 10^{-4}$</td></tr><tr><td>8</td><td>-0.012</td></tr><tr><td>9</td><td>$-2.292 \cdot 10^{-3}$</td></tr></table>	0	0	0	-3.655	1	-0.019	2	0.029	3	1.559	4	$8.703 \cdot 10^{-4}$	5	$-5.762 \cdot 10^{-4}$	6	-0.085	7	$-1.016 \cdot 10^{-4}$	8	-0.012	9	$-2.292 \cdot 10^{-3}$
	0	0																					
	0	-3.655																					
	1	-0.019																					
	2	0.029																					
	3	1.559																					
	4	$8.703 \cdot 10^{-4}$																					
	5	$-5.762 \cdot 10^{-4}$																					
	6	-0.085																					
	7	$-1.016 \cdot 10^{-4}$																					
8	-0.012																						
9	$-2.292 \cdot 10^{-3}$																						
^a F1 fonksiyonu verim tepkisini ifade ederken, X0, X1 ve X2 sırasıyla KOİ, pH ve S/X değerlerini sembolize etmektedir.																							
^b Denklem sabitleri, X0= KOİ, X1=pH, X2= S/X iken sırasıyla C0, C1 olarak ilerlemektedir. Sabitler, MathCad ile sırasıyla hesaplanmıştır.																							

Tablo EK-B4a. Hidrojen üretimi modelinin ANOVA incelemesi

Estimated Regression Coefficients for mL H ₂ /mL rxn vol*sa				
Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-0,033995	0,005284	-6,434	0,000**
iCOD	0,000195	0,000059	3,301	0,003**
S/X	0,000355	0,000148	2,402	0,025**
pH	0,011916	0,001890	6,304	0,000**
iCOD*iCOD	-0,000004	0,000001	-3,827	0,001**
S/X*S/X	-0,000015	0,000006	-2,505	0,020**
pH*pH	-0,000888	0,000171	-5,191	0,000**
R-Sq = 89,58% R-Sq(pred) = 82,47% R-Sq(adj) = 86,86%				

Tablo EK-B4a'da takip edilebileceği gibi modelin uyumluluğu yüksek derece anlamlıdır (tüm p değerleri p<0,05). Modelin grafik verilerini açıklayıcılığı (R-Sq) % 89,58 oranında doğru çıkmıştır.

Tablo EK-B4b. Hidrojen üretimi modeli parametrelerinin ANOVA incelemesi

Analysis of Variance for mL H ₂ /mL rxn vol*sa						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	6	0,000216	0,000216	0,000036	32,94	0,000
Linear	3	0,000170	0,000056	0,000019	16,95	0,000
iCOD	1	0,000004	0,000012	0,000012	10,90	0,003
S/X	1	0,000000	0,000006	0,000006	5,77	0,025
pH	1	0,000166	0,000043	0,000043	39,74	0,000
Square	3	0,000046	0,000046	0,000015	14,09	0,000
iCOD*iCOD	1	0,000012	0,000016	0,000016	14,65	0,001
S/X*S/X	1	0,000005	0,000007	0,000007	6,27	0,020
pH*pH	1	0,000029	0,000029	0,000029	26,95	0,000
Residual Error	23	0,000025	0,000025	0,000001		
Lack-of-Fit	6	0,000005	0,000005	0,000001	0,75	0,619
Pure Error	17	0,000020	0,000020	0,000001		
Total	29	0,000241				

Tablo EK-B4b'den takip edilebileceği gibi modeldeki parametrelerin tüm için p değerleri 0,05'in altında çıkmış ve parametrelerin anlamlılığı kanıtlanmıştır.

Tablo EK-B5. MathCad programıyla hesaplanan hidrojen prodüktivitesi denklemi ve bilgileri

Hidrojen üretim prodüktivitesi denklemi ^a:

$$F1(x,c) := c_0 + c_1 \cdot x_0 + c_2 \cdot x_1 + c_3 \cdot x_2 + c_4 \cdot (x_0)^2 + c_5 \cdot (x_1)^2 + c_6 \cdot (x_2)^2 + c_7 \cdot x_0 \cdot x_1 + c_8 \cdot x_0 \cdot x_2 + c_9 \cdot x_1 \cdot x_2$$

Denklem Sabitleri ^b :

	0
0	-0.039
1	$3.024 \cdot 10^{-4}$
2	$6.413 \cdot 10^{-4}$
3	0.013
4	$-3.683 \cdot 10^{-6}$
5	$-1.506 \cdot 10^{-5}$
6	$-8.881 \cdot 10^{-4}$
7	$-3.795 \cdot 10^{-6}$
8	$-1.118 \cdot 10^{-5}$
9	$-3.128 \cdot 10^{-5}$

C1 := multidfi(X, Y, G, F1) =

^a F1 fonksiyonu verim tepkisini ifade ederken, X0, X1 ve X2 sırasıyla KOİ, pH ve S/X değerlerini sembolize etmektedir.

^b Denklem sabitleri, X0= KOİ, X1=pH, X2= S/X iken sırasıyla C0, C1 olarak ilerlemektedir. Sabitler, MathCad ile sırasıyla hesaplanmıştır.

EK-C

FOTOFERMANTASYON DENEYLERİNDE KULLANILAN DENKLEMLER VE ÖRNEK ÇÖZÜMLERİ

Fotofermantasyon deneylerinde verim hesapları için kullanılan formüller, SET-2'deki Reaktör 27 için örnek çözümleriyle aşağıda sunulmuştur. Tüm kesikli fotofermantasyon reaktörleri için benzer hesaplar yapılmıştır.

SET-2'de Reaktör 27 için örnek hesaplamalar

Hidrojen üretim hızı (H_2 productivity), [1]

$$\text{Üretim hızı (mg H}_2\text{/Lc.saat)} = y(L/Lc.saat) \times 0,082(g/Lc) \times 1000(mg/g) \quad [1]$$

$$0,082 = \text{Hidrojenin özkütlesi } \left(\frac{g}{L}\right) (30^\circ C)$$

L = Üretilen H_2 hacmi

L_c = Reaktör etkin hacmi = 50 mL

Tablo EK-C1. Reaktör 27'ye ait H_2 üretim değerleri (mL, 30°C)

Zaman (saat)	0	24	48	72	96	120	144	168
H_2 üretim miktarları (mL)	0	24,84	52,44	59,8	62,1	66,7	67,62	67,62

24.Saatteki L/L_c oranı;

$$L/L_c = 24,84 \text{ mL} / 50 \text{ mL} = \mathbf{0,497}$$

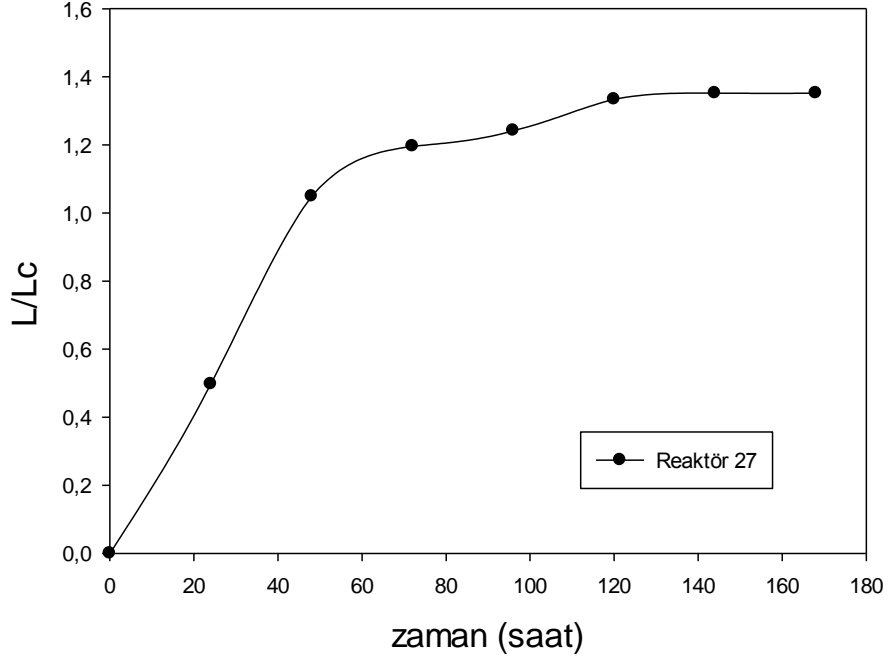
Tablo EK-C2. Reaktör 27'de üretilen ortalama H_2 hacminin etkin hacme oranı (L/L_c) ve zamana karşı değişimi

Zaman (saat)	0	24	48	72	96	120	144	168
L/L_c	0	0,497	1,049	1,196	1,242	1,334	1,352	1,352

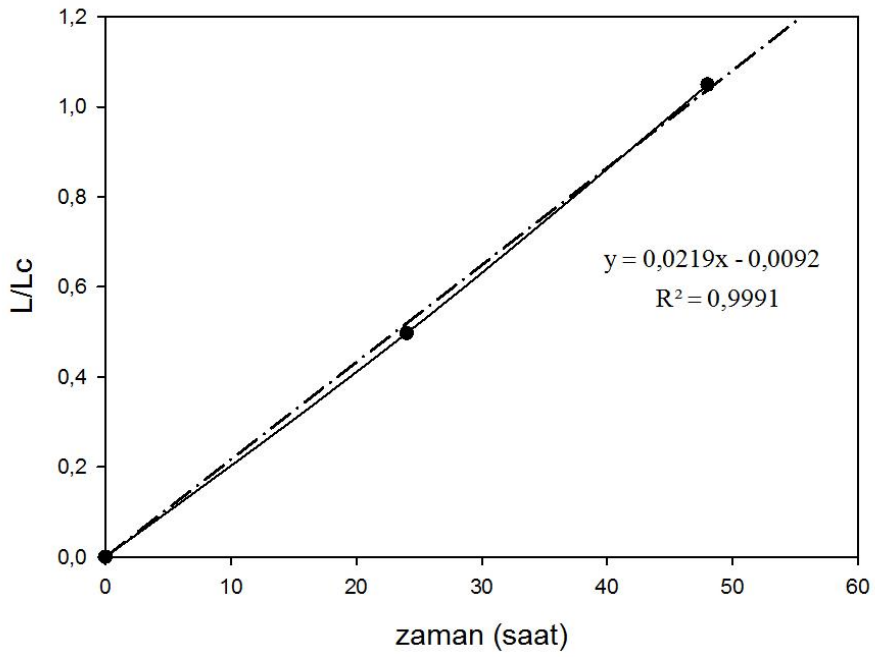
Şekil EK-C1 ve Şekil EK-C2 kullanılarak, y değeri hesaplanmıştır;

$$y = 0,0219$$

Üretim hız ($\text{mg } H_2 / L_c \cdot \text{saat}$) = $0,0219 \times 0,082 \times 1000 = 1,8 \text{ mg } H_2 / L_c \cdot \text{saat}$



Şekil EK-C1. L/Lc oranlarının zamana göre değişimi



Şekil EK-C2. L/Lc oranlarının zamana göre değişiminin lineer kısmının eğimi

Hidrojen üretim verimi (H_2 production yield), [2]

$$\text{Verim} \left(\frac{g H_2}{g \text{ Asetat}} \right) = \frac{\text{üretilen hidrojen kütlesi}}{\text{kullanılan toplam asetat kütlesi}} \quad [2]$$

$$\text{Kullanılan asetat kütlesi} = \text{Asetat derişimi (M)} \times \text{sıvı hacmi (L)} \times \text{MW(asetat)}$$

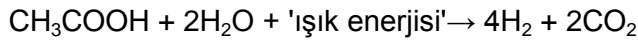
$$\text{Üretilen } H_2 \text{ kütlesi} = 0,0676(L) \times 0,082 \left(\frac{g}{L} \right) = 0,0055 g$$

$$\text{Kullanılan asetat kütlesi} = 0,02 (M) \times 0,05 (L) \times 60,05 \left(\frac{g}{mol} \right) = 0,06 g$$

$$\text{Verim} (g H_2 / \text{asetat}) = \frac{0,0055 g H_2}{0,06 g \text{ asetat}} = 0,092 g H_2 / g \text{ asetat}$$

Besin dönüştürme verimi (substrate conversion efficiency), [3]

$$\text{Besin dönüştürme verimi} = \frac{\text{üretilen hidrojen (mol)}}{\text{teorik olarak üretilmesi gereken hidrojen (mol)}} \times 100 \quad [3]$$



20 mM (0,001 mol) asetattan teorik olarak üretilmesi beklenen H_2 miktarı 0,004 mol olarak hesaplanmaktadır.

$$MW_{H_2} = 2 g/mol$$

$$\text{Besin dönüştürme verimi} = \frac{0,00555 g H_2 / 2 g / mol}{0,004 mol} \times 100 = 69,3 \%$$

Işık dönüştürme verimi (light conversion efficiency), [4]

$$\text{Işık dönüştürme verimi} = \frac{33,6 \times \rho_{H_2} \times \text{üretilen } H_2 \text{ hacmi}}{I \times A \times t} \quad [4]$$

$$33,6 = \text{hidrojenin enerji yoğunluğu} \left(\text{Watt} \cdot \frac{h}{g} \right)$$

$$I = \text{işık yoğunluğu} = 4500 \text{ lux} = 300 \text{ Watt/m}^2$$

$$A = 0,002 \text{ m}^2 \text{ (55 mL'lik cam reaktörler için)}$$

$$t = \text{hidrojen üretim süresi} = 144 \text{ saat}$$

$$\text{Işık dönüştürme verimi} = \frac{(33,6 \times 0,082 \times 67,62) / 1000}{300 \times 0,002 \times 144} \times 100 = 0,22 \%$$

Hidrojen üretim hızı (H_2 molar productivity) [5]

$$\text{Üretim hızı} = \frac{H_2 \text{ Üretim hızı (mg } H_2 / L_c \cdot \text{saat)}}{2 \text{ mg / mmol}} = H_2 \text{ Üretim hızı (mmol } H_2 / L_c \cdot \text{saat)} \quad [5]$$

$$\text{Üretim hızı} = \frac{1,8 \text{ mg } H_2 / L_c \cdot \text{saat}}{2 \text{ mg / mmol}} = 0,9 \text{ mmol } H_2 / L_c \cdot \text{saat}$$

EK-D

Tablo EK-D1. TYM ile kurulan SET-2 fotofermantasyon deneylerinde her bir reaktörde elde edilen verim değerleri

Reaktör no.	H ₂ üretim hızı (mg H ₂ /L.saat)	H ₂ üretim hızı (mmol H ₂ /L.saat) ^b	Besin dönüştürme verimi (%) ^c	Verim (g H ₂ /g asetat) ^d	Işık dönüştürme verimi (%) ^e	Toplam üretilen H ₂ (mmol)
1	0,52	0,26	35,1	0,05	0,39	2,8
2	0,57	0,28	34,7	0,05	0,43	2,8
3	0,64	0,32	37,0	0,05	0,41	3,0
4	0,64	0,32	37,7	0,05	0,38	3,0
5	0,72	0,36	50,9	0,07	0,41	2,0
8	0,75	0,38	55,6	0,07	0,45	2,2
6	0,63	0,32	30,8	0,04	0,37	3,7
7	0,65	0,32	29,2	0,04	0,35	3,5
9	0,91	0,46	46,2	0,06	0,16	1,8
14	0,75	0,38	39,6	0,05	0,16	1,6
10 ^a	1,32	0,89	53,0	0,07	0,30	4,2
13 ^a	1,40	0,70	51,4	0,07	0,32	4,1
16 ^a	1,87	0,93	57,3	0,08	0,40	4,6
18 ^a	1,77	0,89	58,7	0,08	0,41	4,7
19 ^a	2,14	1,07	63,7	0,08	0,45	5,1
21 ^a	1,94	0,97	58,2	0,08	0,41	4,7
11	1,38	0,69	40,7	0,05	0,26	4,9
20	1,56	0,78	58,0	0,08	0,44	7,0
12	0,48	0,24	13,2	0,02	0,07	1,6
17	0,64	0,32	23,1	0,03	0,14	2,8
15	1,65	0,82	81,1	0,11	0,38	3,2
22	1,79	0,89	84,9	0,11	0,40	3,4
23	1,44	0,72	35,7	0,05	0,14	4,3
29	1,29	0,64	37,6	0,05	0,19	4,5
24	1,76	0,88	54,1	0,07	0,29	4,3
28	1,77	0,89	58,9	0,08	0,24	4,7
25	1,32	0,66	35,8	0,05	0,13	2,9
30	1,09	0,55	32,8	0,04	0,14	2,6
26	1,84	0,92	67,0	0,09	0,21	2,7
27	1,80	0,90	69,3	0,09	0,22	2,8

^a Yalnızca S/X₀=14,7 değeri TYM tasarımına göre 6 tekrarlı çalışılmıştır. Bu reaktörlere ait standart sapma ve varyasyon katsayıları (hesaplanan verim / hız değerleri bazında) şöyledir:

^b Standard sapma 0,16 ve varyasyon katsayısı %18,3

^c Standard sapma 4,4 ve varyasyon katsayısı %7,7

^d Standard sapma 0,006 ve varyasyon katsayısı %7,7

^e Standard sapma 0,06 ve varyasyon katsayısı %15,3

Tablo EK-D2a. Hidrojen produktivite modeli parametrelerinin ANOVA incelemesi

Analysis of Variance for Productivity						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	7	1,85853	1,85853	0,265504	26,26	0,000
Linear	3	1,19676	1,19676	0,398922	39,46	0,000
X	1	0,31897	0,31897	0,318971	31,55	0,000
S	1	0,07157	0,07157	0,071570	7,08	0,014
I	1	0,80622	0,80622	0,806224	79,74	0,000
Square	3	0,60797	0,60797	0,202657	20,04	0,000
X*X	1	0,21014	0,27151	0,271512	26,85	0,000
S*S	1	0,11902	0,14790	0,147905	14,63	0,001
I*I	1	0,27882	0,27882	0,278818	27,58	0,000
Interaction	1	0,05379	0,05379	0,053792	5,32	0,031
X*I	1	0,05379	0,05379	0,053792	5,32	0,031
Residual Error	22	0,22243	0,22243	0,010111		
Lack-of-Fit	5	0,12527	0,12527	0,025054	4,38	0,010
Pure Error	17	0,09716	0,09716	0,005715		
Total	29	2,08096				

Tablo EK-D2b. Hidrojen produktivite modelinin ANOVA incelemesi

Estimated Regression Coefficients for Productivity				
Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,90573	0,04105	22,064	0,000
X	0,14119	0,02514	5,617	0,000
S	-0,06688	0,02514	-2,661	0,014
I	0,22447	0,02514	8,930	0,000
X*X	-0,19175	0,03700	-5,182	0,000
S*S	-0,14152	0,03700	-3,825	0,001
I*I	-0,19431	0,03700	-5,251	0,000
X*I	0,08200	0,03555	2,307	0,031
R-Sq = 89,31% R-Sq(pred) = 79,89% R-Sq(adj) = 85,91%				

EK-E

FOTOFERMANTATİF H₂ ÜRETİMİNDE ÖN-ARITIM İÇİN ARAŞTIRILAN AMONYUM GİDERİMİ ÇALIŞMALARI

İş Paketi 3 kapsamında, üç-aşamalı sistemin 3. aşaması olan kesikli fotofermantasyon deneyleri için kullanılacak giriş suyunun (kesikli anaerobik reaktör çıkış suları) amonyum iyonu derişiminin, fotofermantasyon için inhibisyona yol açacak derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda, proje önerisinde amonyak derişimini azaltmak için B planı olarak sunulan yöntemler araştırılmıştır; Bu plan dâhilinde ilk olarak pH arttırılarak hava sıyırma yöntemiyle amonyak uçurulması için kinetik çalışmaları yapılmıştır. Bunun yanı sıra proje önerisinde yer alan bir diğer yöntem olan klinoptilolitle adsorpsiyon yöntemi de araştırılmıştır. Bu iki yöntemin de eş zamanlı yapılmasının amacı hangisinde daha etkili amonyum iyonu gideriminin olacağını gözlemlemek ve iki yöntemi karşılaştırmaktır.

EK-E1 Deneysel Yöntem

EK-E1.1 Hava Sıyırma Yöntemiyle Amonyak Uçurulması

Yüksek amonyum iyon derişiminin limit değerler (< 36 mg/L NH₄) altına indirilmesi için en çok kullanılan arıtım yöntemlerinden birisi hava sıyırma yöntemidir. Hava sıyırma yöntemindeki en önemli adım pH arttırımıdır (Lei vd., 2007). Gustin vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada pH değerinin 10'a kadar arttırılmasının amonyum gideriminin artmasını sağladığı; ancak bu değerden sonra pH değerinin arttırılmasının bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Hava sıyırma yöntemini etkileyen bir diğer etken sıcaklıktır (Gustin vd., 2011). Aynı çalışmada, çalışılan 30°C-70°C sıcaklık aralığında amonyum gideriminin ciddi bir değişim göstermediği gözlenmiştir. Son olarak amonyum sıyırma metodu havalandırma hızına bağlıdır (Lei vd., 2007). Lei vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada optimum hava akış hızının 1 L atık su için 5 L/dakika olduğu belirtilmiştir. Literatürde yer alan bu bilgiler doğrultusunda hava sıyırma yönteminde uygulanacak pH, sıcaklık ve hava akış hızı değerleri sırasıyla 10, 35 °C ve 5 L/dakika.L olarak belirlenmiştir. Giriş suyu olarak Ardışık kesikli reaktör (AKR)-Metanojenesis sisteminden (İş Paketi 4 kapsamında işletilen ve benzer çıkış suyu karakteristiğine sahip olan reaktörden) alınan numuneler kullanılmıştır. Bunun için iki gün arka arkaya numune alınmış ve amonyum iyonu değerlerine bakılmıştır. Bu numunelerin amonyum iyonu derişimleri 148,4 ve 170,8 mg/L NH₄ olarak ölçülmüştür. İş Paketi 3 kapsamında kullanılacak olan kesikli anaerobik reaktör çıkış sularının daha yüksek amonyum değerine (221±4 mg/L

NH₄-N; 284±5 NH₄ mg/L ve 232±4 mg/L NH₄-N; 298±5 NH₄ mg/L) sahip olması nedeniyle, AKR-Metanojenesis sisteminden alınan numunelerin bir kısmına sentetik amonyum iyonu eklenerek yüksek amonyum derişiminde giderimin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda çalışılan 4 örneğin amonyum iyonu değerleri Tablo EK-E1'de verilmiştir. Deneyler 250 mL'lik erlenmeyer şişelerde 200 mL etkin sıvı hacminde gerçekleştirilmiştir.

Tablo EK-E1. Havayla sıyırma yöntemi deneyi için kullanılan giriş sularının amonyum iyonu derişimleri (AKR-metanojenesis çıkış suyuna, sentetik amonyum eklemesi ile birlikte)

	NH ₄ -N (mg/L)
Örnek 1	170,8
Örnek 2	246,4
Örnek 3	148,4
Örnek 4	215,6

EK-E1.2 Klinoptilolitle Adsorpsiyon Yöntemiyle Amonyum Giderimi

Yüksek amonyum iyon derişiminin limit değerler altına indirilmesi için en çok kullanılan arıtım yöntemlerinden bir diğeri ise klinoptilolitle adsorpsiyon yöntemidir. Bu yöntem zeolit yüzeyinde bulunan Na⁺,K⁺,Ca⁺²,Mg⁺² gibi katyonların amonyum iyonu ile yer değıştirmesine dayanır (Karadağ vd., 2007). Ancak, Karadağ vd. (2008) tarafından yapılan çalışmada zeolitın NaCl çözeltisi ile ön-arıtmadan geçirilmesinin arıtım verimini arttırdığı belirtilmiştir. Başlangıç amonyum derişimi, klinoptilolit dozu, karıştırma hızı, parçacık boyutu ve sıcaklık bu yöntemi etkileyen önemli parametrelerdir (Erdoğan vd., 2011). Erdoğan vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada yüksek amonyum derişiminin ve yüksek karıştırma hızının adsorpsiyon hızını arttırdığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada, 25°C-40°C sıcaklık aralığında sıcaklığın artırılmasının adsorpsiyon hızını azalttığı belirtilmiştir. Parçacık boyutunun ise 1mm'nin altında olması adsorpsiyon hızını arttırmaktadır. Bu bilgiler ışığında, klinoptilolitle adsorpsiyon yöntemi araştırmasında karıştırma hızı ve sıcaklık sırasıyla 170 rpm ve 25 °C olarak belirlenmiş; parçacık boyutunun ise 1 mm'nin altında olmasına karar verilmiştir. Giriş suyu olarak, yukarıda da belirtildiği gibi, İş Paketi 3'de gözlendiği şekilde yüksek amonyum derişimi elde etmek için, sentetik amonyum iyonu eklenen AKR-Metanojenesis sisteminden alınan numuneler (207,2 mg/L NH₄-N derişimine sahiptir) kullanılmıştır. Adsorpsiyonun düşük derişimlerdeki akibetini gözlemlmek için, sentetik amonyumun eklenmediği direk reaktör çıkış suları da (74,2 mg/L NH₄-N derişimine sahiptir) kullanılmıştır. Deneyde çalışılan iki farklı amonyum iyonu derişimi (74,2 ve 207,2 mg/L NH₄-N) için 4 farklı miktarda klinoptilolit ile çalışılarak uygun klinoptilolit dozunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda her bir amonyum derişimi için 0,5-1-1,5-2 mg klinoptilolit/50 mL atıksu dozu kullanılmıştır. Deneyler

250 mL'lik erlenmeyer şişelerde 100 mL etkin sıvı hacminde gerçekleştirilmiştir. Deneyde Manisa-Gördes bölgesinden temin edilen klinoptilolit kullanılmıştır. Klinoptilolit numunesi ilk olarak 1 mm parça boyutunun altına indirilmiş, daha sonra da 1 M NaCl çözeltisi ile ön-arıtıma tabi tutulmuştur.

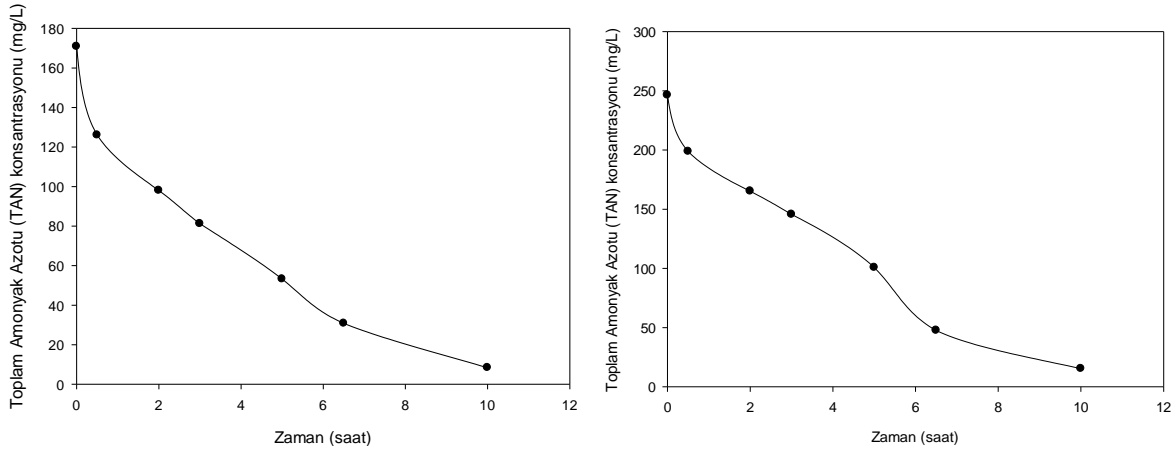
EK-E2 Bulgular ve Tartışma

EK-E2.1 Hava Sıyırma Yöntemiyle Amonyak Uçurulması Deneyinin Sonuçları

Bu çalışmada, hava sıyırma yöntemi ile ciddi bir amonyum iyonu giderimi olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada 10 saat sonunda elde edilen arıtım verimleri Tablo EK-E2'de sunulmuş; giriş suyundaki amonyum iyonu derişiminin zamana bağlı değişimi Şekil EK-E1 ve Şekil EK-E2'de gösterilmiştir.

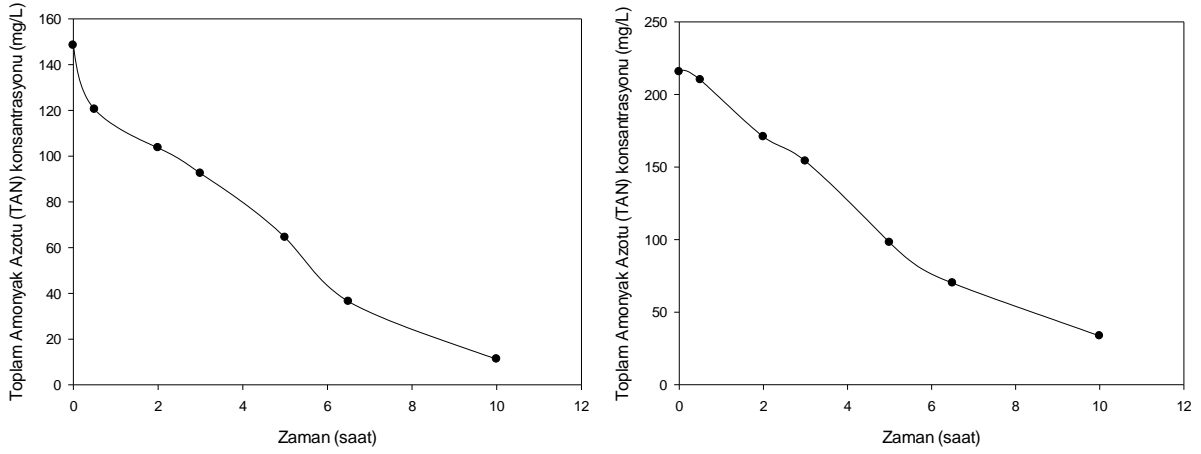
Tablo EK-E2. Havayla sıyırma yöntemiyle elde edilen arıtım verimleri

Arıtım verimi (%)	
Örnek 1	95
Örnek 2	94
Örnek 3	93
Örnek 4	85

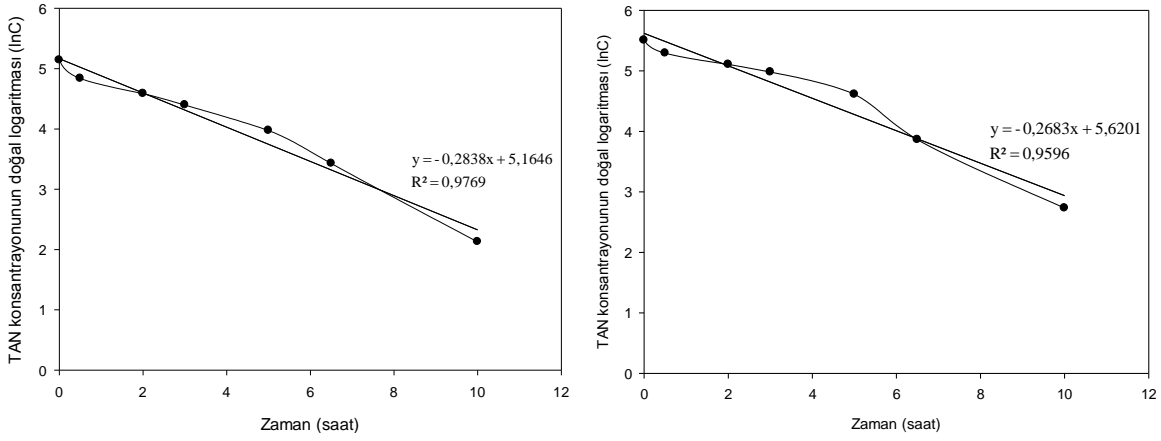


Şekil EK-E1. Örnek 1 (sol) ve örnek 2 (sağ) için amonyum iyonu derişiminin zamana göre değişimi

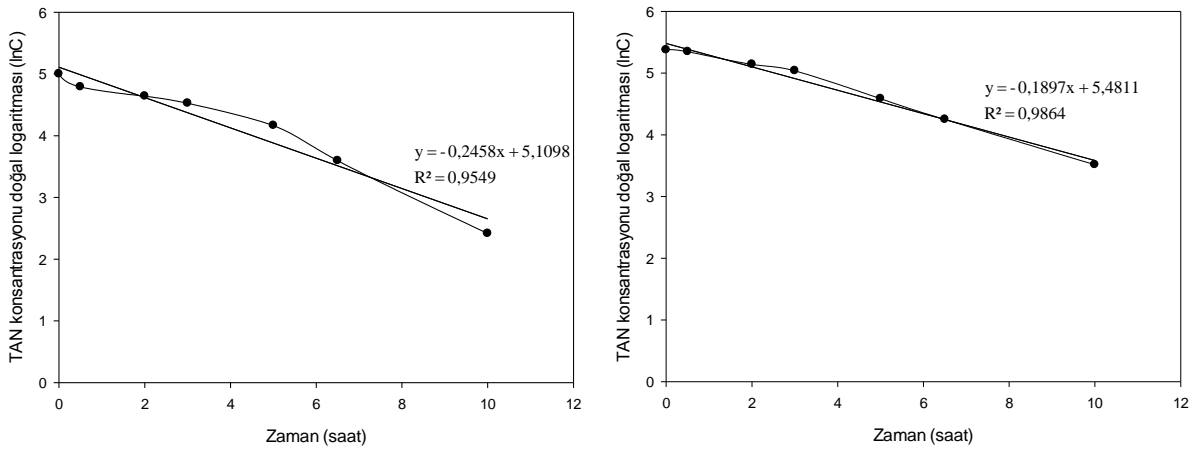
Şekil EK-E1 ve EK-E2'de görüldüğü üzere, amonyum iyonunun arıtımı sıfırıncı dereceden bir reaksiyona benzememektedir. Reaksiyon kinetiğini belirlemek amacıyla Şekil EK-E3 ve Şekil EK-E4'de amonyum iyonu derişiminin doğal logaritmasının ($\ln C$) zamana bağlı değişimi gösterilmiştir.



Şekil EK-E2. Örnek 3 (sol) ve örnek 4 (sağ) için amonyum iyonu derişiminin zamana göre değişimi



Şekil EK-E3. Örnek 1 (sol) ve örnek 2 (sağ) için amonyum iyonunun doğal logaritmasının zamana göre değişimi



Şekil EK-E4. Örnek 3 (sol) ve örnek 4 (sağ) için amonyum iyonunun doğal logaritmasının zamana göre değişimi

Amonyum iyonu derişiminin logaritmasının zamana bağlı grafiğinin regresyon hesapları yapıldığında elde edilen doğru denklemleri Şekil EK-E3 ve Şekil EK-E4 üzerinde görülmektedir. Yapılan bu analizler arıtım kinetiğinin birinci dereceden bir reaksiyon olduğunu göstermektedir. Buna göre, reaksiyon hızı (arıtımın zamana karşı değişimi, örnek 1 için) Denklem EK-E1’de ifade edildiği gibidir; reaksiyon hızı sabiti 0,2838 /saat’tir.

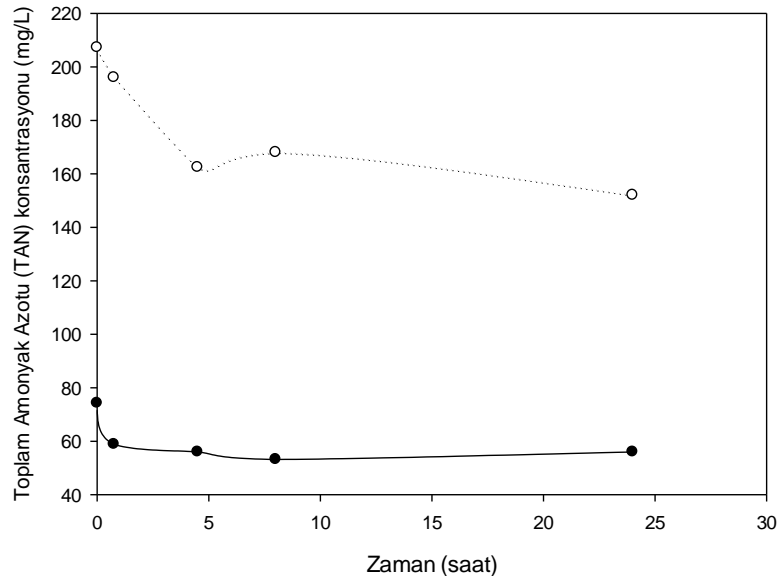
$$\ln Ct = 5,1646 - 0,2838 t$$

(Denklem EK-E1)

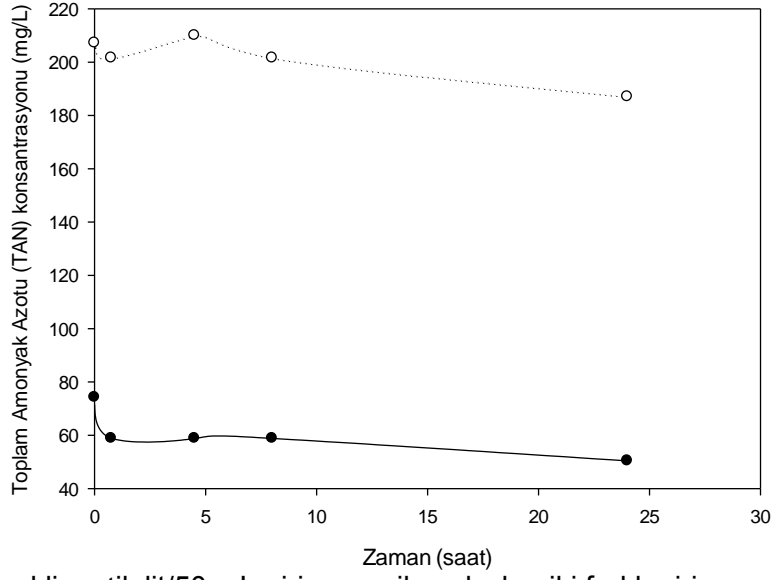
Şekil EK-E1, Şekil EK-E2 ve Tablo EK-E1’de görüleceği gibi havayla sıyrma yöntemi amonyum iyonu derişimini fotofermantasyon için istenen limit değerin altına düşürmektedir.

EK-E2.2 Klinoptilolitle Adsorpsiyon Yöntemiyle Amonyum Giderimi Deneyinin Sonuçları

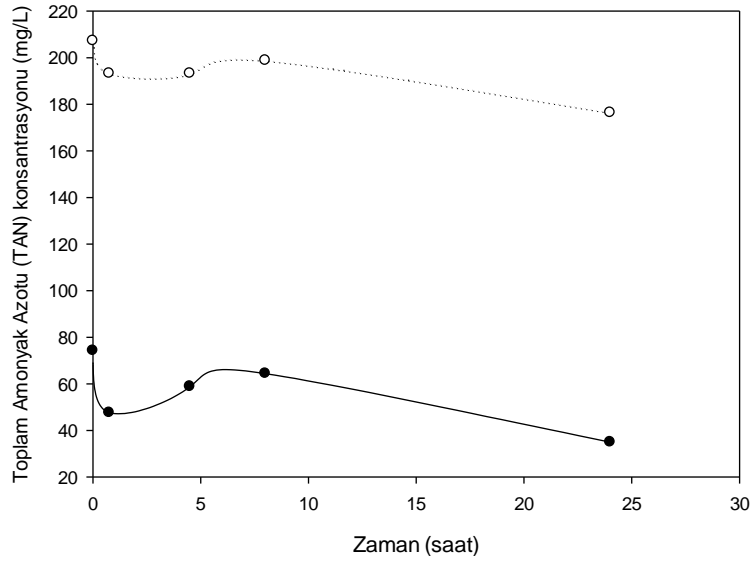
Bu çalışmada, klinoptilolit adsorpsiyon yöntemi ile yeteri kadar amonyum iyonu arıtımı gözlemlenmemiştir. Deneylerde, 24 saatlik arıtım süresi sonunda elde edilen değerlerin fotofermantasyon için istenen limit değerin üzerinde olduğu görülmüştür. Çalışılan 4 farklı klinoptilolit dozu için giriş suyundaki amonyum iyonu derişiminin zamana bağlı değişimi Şekil EK-E5 – Şekil EK-E8’de gösterilmiştir.



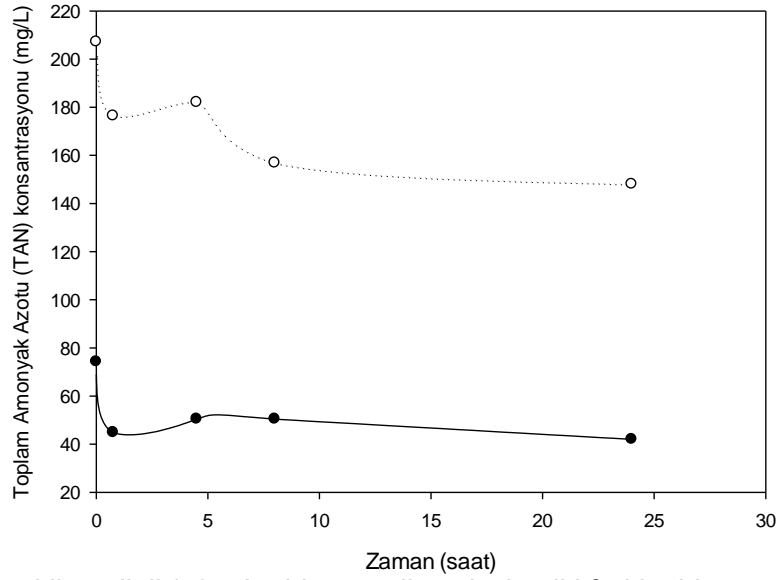
Şekil EK-E5. 0,5 g klinoptilolit/50 mL giriş suyu ile çalışılan iki farklı giriş suyundaki amonyum iyonu derişiminin zamana göre değişimi



Şekil EK-E6. 1 g klinoptilolit/50 mL giriş suyu ile çalışılan iki farklı giriş suyundaki amonyum iyonu derişiminin zamana göre değişimi



Şekil EK-E7. 1,5 g klinoptilolit/50 mL giriş suyu ile çalışılan iki farklı giriş suyundaki amonyum iyonu derişiminin zamana göre değişimi



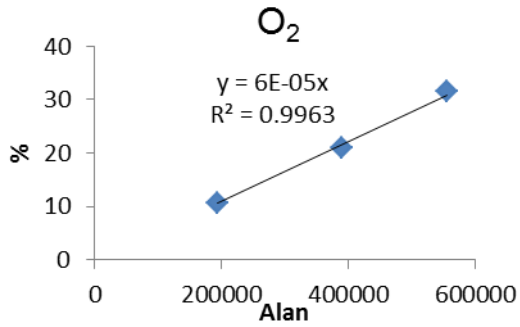
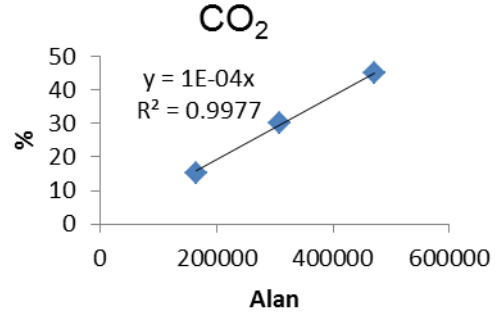
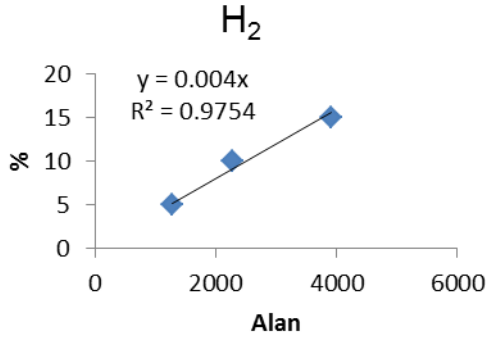
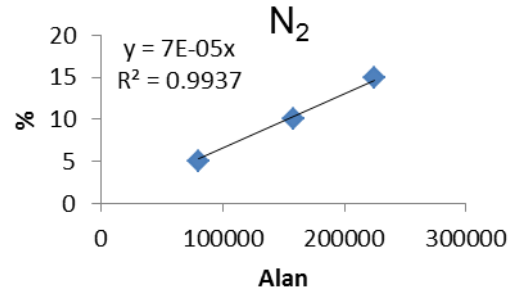
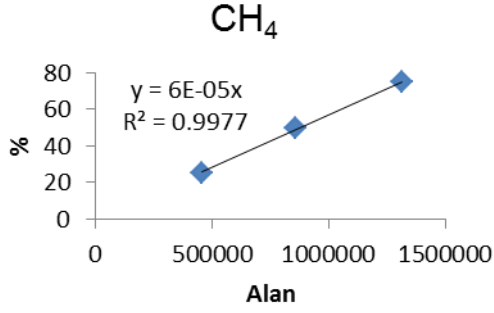
Şekil EK-E8. 2 g klinoptilolit/50 mL giriş suyu ile çalışılan iki farklı giriş suyundaki amonyum iyonu derişiminin zamana göre değişimi

Şekil EK-E5 - Şekil EK-E8'de görüldüğü üzere klinoptilolit ile yapılan araştırmada etkili bir arıtım gözlenmemiştir. Klinoptilolit adsorpsiyon yöntemini etkileyen birçok parametre olduğu için bunun nedeninin hangi parametreden veya hangi parametrelerden kaynaklandığı tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, kullanılan Manisa-Gördes Klinoptilolitinin temin edilmesinin üzerinden belirli bir süre geçmiş ve süre zarfında saklama koşulları kaynaklı bir sorun olabileceği öngörülmüştür. Bu çalışma sonucunda uygun klinoptilolit dozunun ne kadar olduğu gözlemlenememiştir.

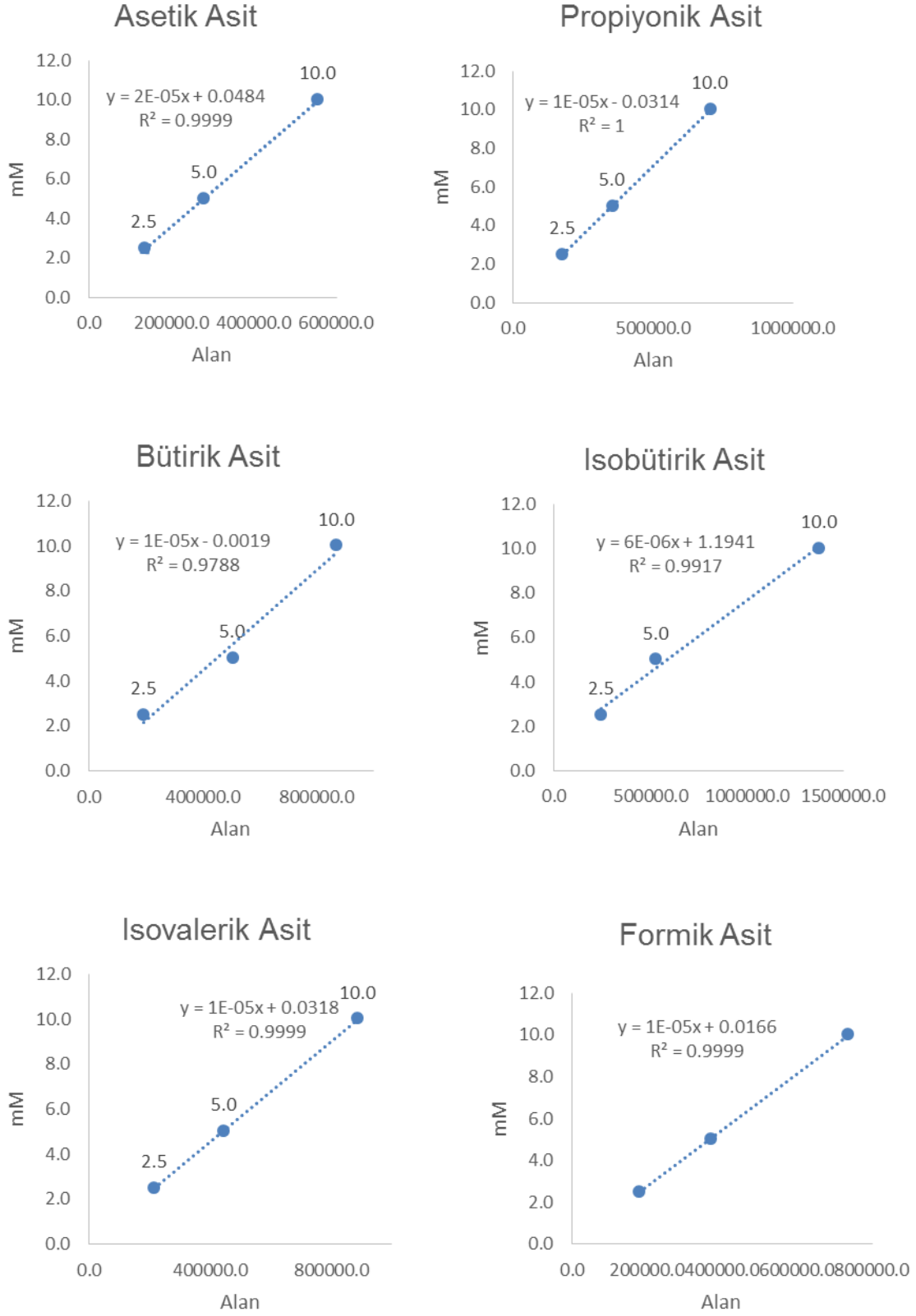
EK-E2.3 İki Yöntemin Karşılaştırılması

Klinoptilolit ile yapılan çalışmada yeterli arıtım gözlemlenmiş olsaydı, havayla sıyırma yöntemi ve klinoptilolit çalışmalarının hangisinin seçileceğine karar verilmesi için bu iki çalışmanın maliyet açısından da karşılaştırılması planlanmıştı. Bunun için deneyler sırasında kullanılan kimyasal miktarları, deney süresince harcanan enerji miktarı gibi değerler göz önünde bulundurulmuş ve kaydedilmiştir. Ancak klinoptilolit adsorpsiyonu yönteminde elde edilen arıtım verimlerinin beklenenden çok düşük olması sonucu maliyet karşılaştırması yapılmamıştır. Sonuç olarak, anaerobik reaktör çıkış sularındaki amonyak derişiminin fotofermantasyon için inhibisyona yol açmayacak düşük değerlere (24 saat içinde) indirilmesi için havayla sıyırma yönteminin uygun olduğu belirlenmiştir.

EK-F

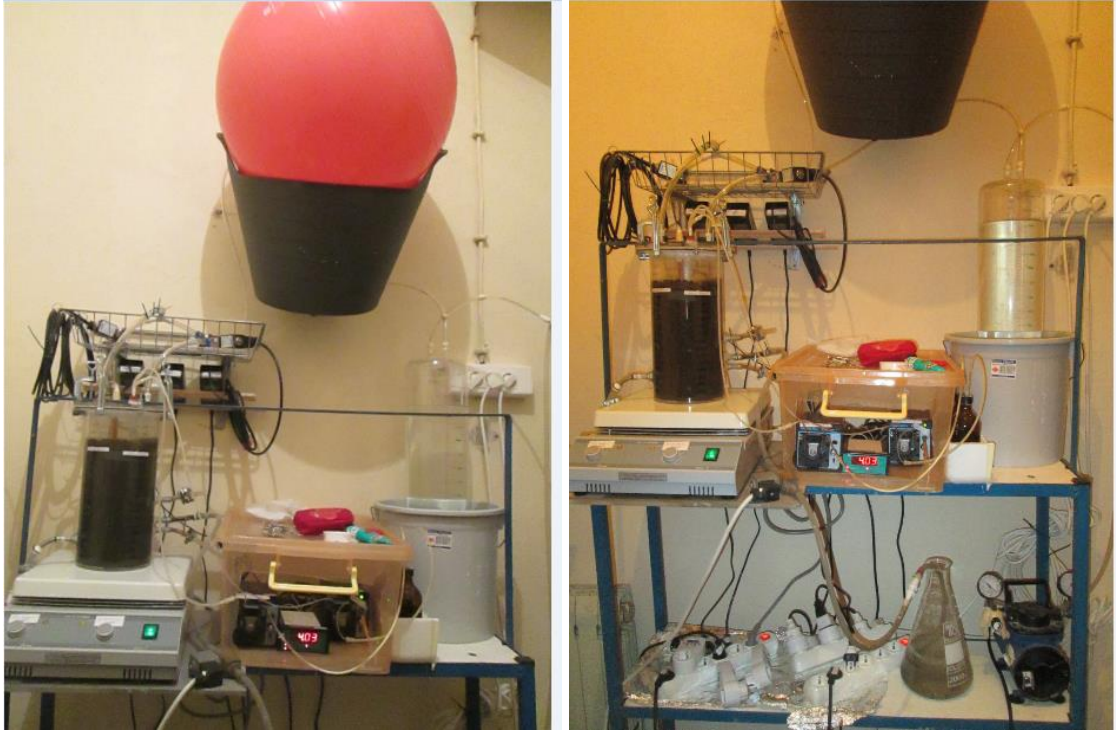


Şekil EK-F1. GC (Thermo)-TCD sistemi ile gaz kompozisyonlarını belirlemek için kullanılan kalibrasyon grafikleri



Şekil EK-F2. GC-FID ile UYA derişimlerini belirlemek için kullanılan kalibrasyon grafikleri

EK-G



Şekil EK-G1. AKR-Karanlık fermentasyon deneylerinde kullanılan AKR düzeneğinin fotoğrafları

EK-H

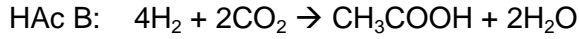
HOMOASETOJENESİS MİKTARININ HESAPLANMASINDA KULLANILAN DENKLEMLER

Homoasetojenik aktivitenin etkinlik derecesini belirlemek amacıyla, üretilen asetik asit miktarlarının ve oranlarının hesaplanması yoluyla bir yaklaşım uygulanmıştır (Arooj vd., 2008). Bu yaklaşımda kullanılan denklemler, örnek bir çözüm ve ikinci işletim süresince homoasetojenesinin ne kadar etkin olduğunu gösterir Tablo EK-H1 aşağıda sunulmuştur.

Asidojenik asetik asit üretimi:



Homoasetojenik asit asit üretimi:



$$\text{Verim (mol H}_2\text{/mol heksoz)} = 2 \text{ HBu} - \text{HPr} + 2 \text{ HAc A} - 4 \text{ HAc B}$$

$$\text{Toplam HAc} = \text{HAc A} + \text{HAc B}$$

HBu = Bütirik asit miktarı (mM)

HPr = Propionik asit miktarı (mM)

Toplam HAc = Asetik asit miktarı (mM) (reaktörde ölçülen değer)

HAc A = H₂ üretiminden elde edilen asetik asit miktarı

HAc B = H₂ tüketiminden elde edilen asetik asit miktarı

Varsayımlar;

- Glükozdan direk asetik asit elde edilen ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 3\text{CH}_3\text{COOH}$) reaksiyon asetik asetik miktarı üzerinde değişim yaratacak etkinlikte değildir.
- Laktik asit, valerik asit, kaproik asit derişimleri H₂ üretimine önemli ölçüde etki etmemektedir.
- Hesaplanan H₂ verimi değerleri teorik değer yerine kullanılacak deneysel doğrulukta ve kesinliktedir.

Örnek Hesap (Birinci işletim günü için);

$$\text{HBu} = 28,54 \text{ mM}$$

$$\text{HPr} = 0,16 \text{ mM}$$

$$\text{Toplam HAc} = 16,62 \text{ mM}$$

Verim = 1,88 mol H₂/mol heksoz

$$\text{HAc A} = (\text{Verim} - 2 \text{ HBU} + \text{HPr} + 4 \text{ HAc B}) / 2 \quad (1)$$

$$\text{HAc B} = \text{Aranan} = \text{Toplam HAc} - \text{HAc A} \quad (2)$$

Denklemler 1 ve 2 birlikte çözüldüğünde HAc A ve HAc B'nin değerlerine ulaşılır.

$$\text{HAc A} = (\text{Verim} - 2 * 28,54 + 0,16 + 4 \text{ HAc B}) / 2 \quad (3)$$

$$\text{HAc B} = \text{Aranan} = 16,62 - \text{HAc A} \quad (4)$$

$$\text{HAc A} = (\text{Verim} - 2 * 28,54 + 0,16 + 4 (16,62 - \text{HAc A})) / 2$$

$$\text{HAc A} = 1,9 \text{ mM}$$

$$\text{HAc B} = 16,62 - 1,9 = 14,71 \text{ mM}$$

HAc B değeri toplam HAc'a oranlandığında ise üretilen asetik asitin kaçta kaçının homoasetojenik aktivite kaynaklı olduğu bulunabilir. Bu örnek için;

$$\text{HAc B} / \text{Toplam HAc} = 14,1/16,62 = 0,89 \text{ oranı elde edilir.}$$

HAc B değeri, diğer bir deyişle, homoasetojenik kaynaklı üretilen asetik asit miktarı, toplam HAc değerine ulaştığında HAc B / Toplam HAc derişimi oranları 1,0'a yaklaşmaktadır; bu durum karanlık fermentasyonda homoasetojenik baskın hale geldiğini göstermektedir. Örneğin, 0,50 oran değeri, asetik asidin %50'sinin hidrojen üretimi sırasında oluştuğunu, diğer %50'sinin ise homoasetojenik kaynaklı oluştuğunu göstermektedir. Dolayısıyla, üretilen H₂'nin ciddi şekilde homoasetojenik yoluyla tüketildiği anlaşılmaktadır.

Tablo EK-H1. AKR-2. işletim süreci için homoasetojenik miktarları hesap tablosu

Gün	Verim (mol H ₂ /mol heksoz) ^a	Butirik Asit (mM)	Propiyonik Asit (mM)	HAc A (H ₂ üretimden)	HAc B (H ₂ tüketimden)	Toplam HAc (mM)	HAc B /Toplam HAc
1	1,88	28,54	0,16	1,90	14,71	16,62	0,89
2	0,42	18,40	1,01	-	-	-	-
3	0,29	9,96	8,89	2,86	4,11	6,97	0,59
4	0,11	7,33	34,86	14,48	2,17	16,65	0,13
5	0,16	11,08	21,01	9,83	5,16	14,99	0,34
6	0,14	13,12	21,39	9,82	6,09	15,90	0,38
7	0,29	12,52	1,63	-	-	-	-
8	0,06	15,15	2,18	16,82	15,42	32,25	0,48
9	0,01	5,38	1,04	21,88	13,37	35,24	0,38
10	0,00	1,92	0,53	13,87	7,77	21,64	0,36
11	0,00	0,62	0,28	7,53	4,01	11,54	0,35

Gün	Verim (mol H ₂ /mol heksoz) ^a	Butirik Asit (mM)	Propiyonik Asit (mM)	HAc A (H ₂ üretimden)	HAc B (H ₂ tüketimden)	Toplam HAc (mM)	HAc B /Toplam HAc
12	0,00	2,42	0,33	8,60	5,42	14,02	0,39
13	0,92	9,44	0,53	14,65	11,68	26,33	0,44
14	1,15	8,99	0,26	14,89	11,59	26,48	0,44
15	1,40	4,22	0,31	16,24	9,80	26,04	0,38
16	1,45	5,99	0,16	19,23	12,21	31,44	0,39
17	1,16	1,89	0,75	14,97	7,95	22,92	0,35
18	1,34	1,29	2,21	17,51	8,51	26,02	0,33
19	1,18	1,98	1,32	15,18	7,96	23,14	0,34
20	1,67	4,86	8,19	16,64	8,29	24,93	0,33
21	2,10	10,52	7,41	-	-	-	-
22	0,54	12,33	6,58	16,29	12,53	28,82	0,43
23	0,56	19,21	4,00	9,12	13,02	22,14	0,59
24	0,40	8,58	4,55	14,10	10,10	24,20	0,42
25	0,40	6,35	3,45	17,10	10,76	27,86	0,39
26	0,38	10,63	3,21	23,81	16,32	40,13	0,41
27	0,36	7,11	1,72	17,36	11,72	29,08	0,40
28	0,22	9,58	1,55	20,91	14,80	35,72	0,41
29	0,35	13,57	1,63	26,55	19,56	46,11	0,42
30	0,11	14,95	1,97	26,54	20,22	46,76	0,43
31	1,41	13,06	1,18	23,30	17,53	40,83	0,43
32	1,58	12,50	1,37	7,92	9,47	17,38	0,54
33	1,24	22,81	3,54	7,34	13,88	21,22	0,65
34	1,01	24,57	3,10	7,68	15,10	22,78	0,66
35	0,84	21,85	3,00	3,19	11,56	14,76	0,78
36	0,13	22,13	2,89	1,71	11,17	12,88	0,87
37	0,01	18,07	6,70	3,82	9,27	13,08	0,71
38	0,12	0,00	0,00	0,02	-0,02	0,00	
39	0,06	7,59	5,68	4,39	4,56	8,94	0,51
40	0,06	11,71	6,28	3,64	6,09	9,72	0,63
41	0,00	11,30	5,09	2,21	5,48	7,68	0,71
42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
43	0,00	18,76	5,65	3,45	9,69	13,14	0,74
44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
45	0,00	8,99	0,26	14,70	11,78	26,48	0,44
46	0,00	20,41	0,81	3,11	11,56	14,67	0,79
47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
48		17,46	0,80	18,68	17,87	36,55	0,49

EK-I

İKİ-AŞAMALI SİSTEMDE, KESİKLİ FOTOFERMANTASYON EK DENEY SONUÇLARI

İki-aşamalı sistemde sukrozla işletilen AKR-karanlık fermentasyon sisteminin AKR-2.İşletim süreci 31.-35.günlere ait (en yüksek H₂ üretim veriminin elde edildiği günler) çıkış suları (Tablo EK-I1) ile de kesikli fotofermantasyon reaktörleri kurulmuş ve 15 gün (360 saat) boyunca işletilmiştir. Çalıştırılan 3 eş (tekrarlı) reaktörde elde edilen verimler Tablo EK-I2 ve EK-I3'de sunulmuştur. Deney süresince gözlenen kümülatif hidrojen gazı miktarı Şekil EK-I1, UAKM ve asit derişiminin zamana göre değişimi Şekil EK-I2 ve Şekil EK-I3'de verilmiştir.

Tablo EK-I1. İki-aşamalı sistemde, kesikli fotofermantasyon reaktör deneyinde besin olarak kullanılan AKR-karanlık fermentasyon sisteminin çıkış suyu özellikleri

Parametre	Değer	UYA tipi	Derişim (mM)
Toplam KOİ (mg/L)	10800±1720	Laktik asit	0,8±0,1
çKOİ (mg/L)	9487±340	Formik asit	4,1±0,4
AKM (mg/L)	1028±178	Asetik asit	24,0±0,9
UAKM (mg/L)	630±238	Propionik asit	3,0±0,1
TAN (mg/L)	8±1	Bütirik asit	22,6±0,4
pH	6,4	İso-bütirik asit	0,6±0,2
NO ₃ (mg/L)	113±8	tUYA (HAc)	48,2±15
SO ₄ (mg/L)	980±22		
Cl (mg/L)	960±1		
F (mg/L)	13±1		

Tablo EK-12. İki-aşamalı sistemde, kesikli fotofermentasyon reaktör deneyinde elde edilen üretim hızları ve dönüştürme verimleri

Üç tekrarlı reaktörler	H ₂ üretim hızı (mg H ₂ /L.saatt)	H ₂ üretim hızı (mmol H ₂ /L.saatt)	Besin dönüştürme verimi (%)	Işık dönüştürme verimi (%)	Toplam üretilen H ₂ (mmol)
Reaktör 1	1,01	0,50	20,9	0,32	2,93
Reaktör 2	0,95	0,48	21,2	0,32	2,97
Reaktör 3	0,98	0,49	21,0	0,33	2,98
Ortalama	0,98±0,03	0,49±0,01	21,2±0,22	0,32±0,00	2,96±0,03

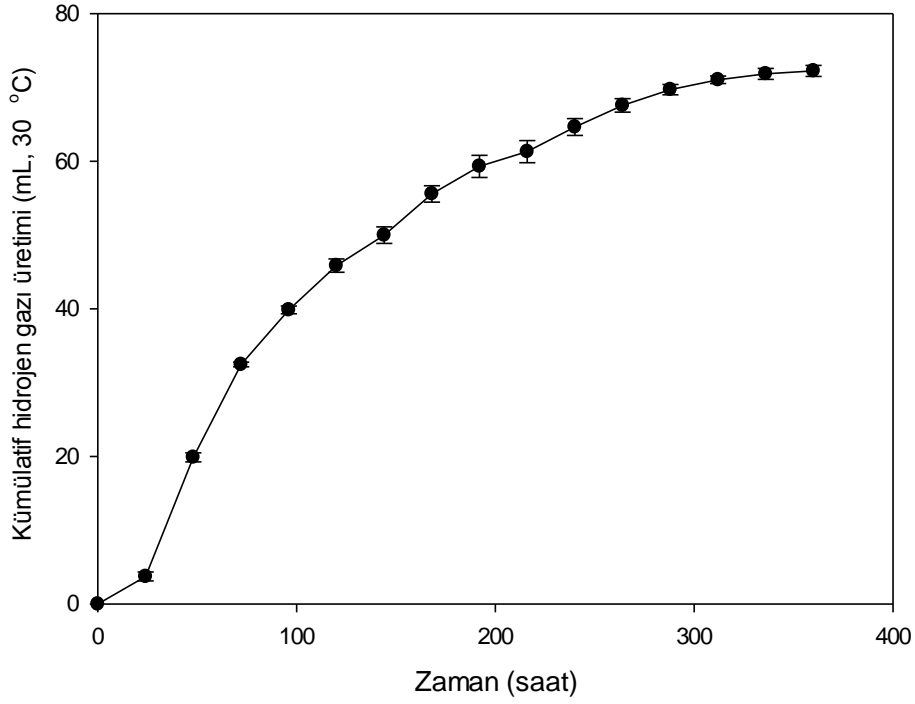
Tablo EK-13. İki-aşamalı sistemde, kesikli fotofermentasyon reaktör deneyinde elde edilen verim değerleri ^a

	Verim (mol H ₂ /mol HAc)	Verim (mol H ₂ /mol HAc+HBu)	Verim (mol H ₂ /mol HAc+HBu+HPr)
Reaktör 1	2,4	1,5	1,4
Reaktör 2	2,5	1,5	1,4
Reaktör 3	2,5	1,5	1,4
Ortalama ^b	2,5±0,03	1,5±0,02	1,4±0,01

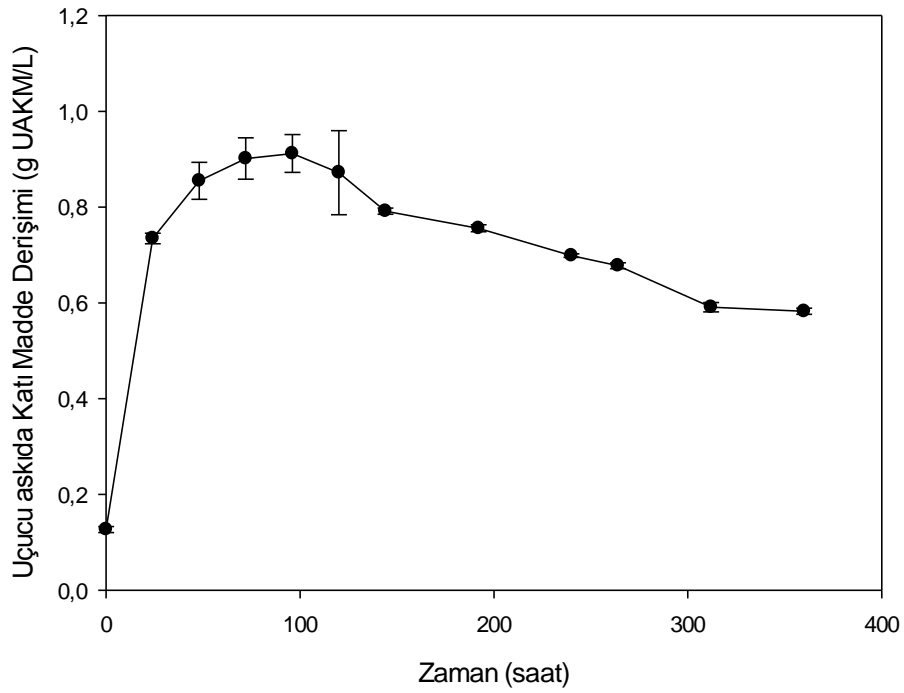
^a Verimler hesaplanırken, belirtilen asitler HAc (asetik asit) eşdeğer derişimi bazında hesaplanmıştır; tüm verim değerlerinin birimi mol H₂/mol HAc_{eklenen} bazındadır.

^b çKOİ bazında verimler, eklenen HAc ve diğer asitlerin tümünün tüketildiği esas alındığında, 0,044 – 0,078 g H₂ /g KOİ (0,047-0,083 g H₂ /g asetat) arasında değişmektedir. 1 g asetik asidin KOİ eşleniği 1,067 g KOİ'dir.

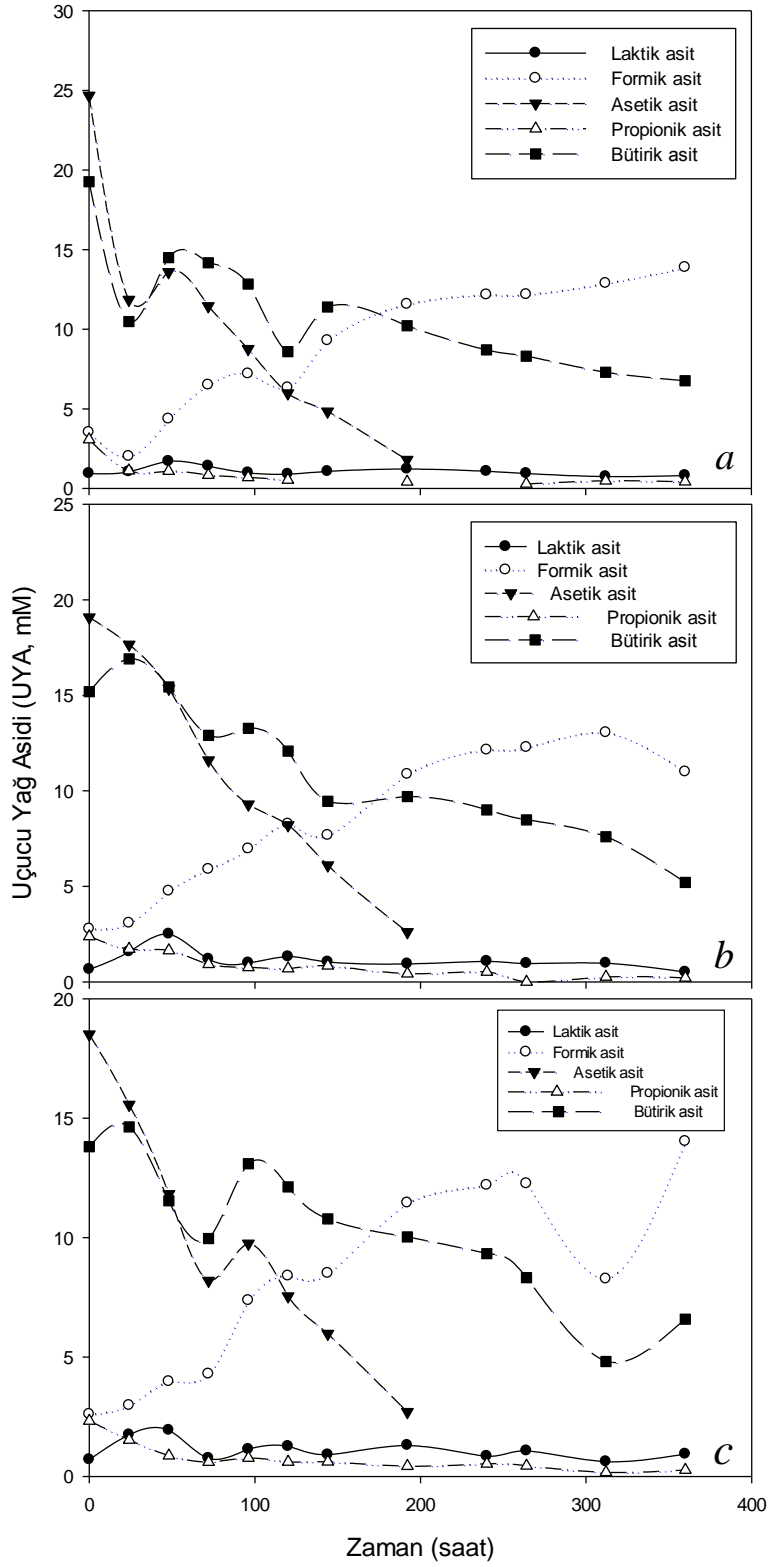
Bu çalışma sonuçları, herhangi bir seyreltme yapılmadan ve 2.işletme sürecinin en yüksek verim gözlenen günlerindeki AKR çıkış suyu ile kurulan fotofermentasyon reaktörlerinde 0,49±0,01 mmol H₂/L.saatt hidrojen üretim hızının ve 0,083 g H₂/g asetat (0,078 g H₂/g KOİ-HAc veya 2,5±0,03 mol H₂/mol asetat) veriminin elde edildiğini göstermektedir. Elde edilen fotofermantatif hidrojen üretimi verimi (0,078 g H₂/g KOİ-HAc), İş Paketi 2'de direk asetik asitle kurulan en yüksek verim değerine (0,10 g H₂/g KOİ-HAc) yakındır.



Şekil EK-I1. İki-aşamalı sistemde, kesikli fotofermentasyon reaktörlerinde üretilen ortalama toplam hidrojen gazı üretimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)



Şekil EK-I2. İki-aşamalı sistemde, kesikli fotofermentasyon reaktörlerinde *R.Capsulatus* derişiminin zamana karşı değişimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)



Şekil EK-13. Üç tekrarlı çalışılan fotofermantasyon reaktörlerinde (a. Reaktör 1, b. Reaktör 2, c. Reaktör 3) UYA derişimlerinin zamana karşı değişimi (30°C, S/X₀: 9,4 g KOİ/g UAKM, 3955 lux)

EK-J

MELASLA KURULAN KESİKLİ KARANLIK FERMANTASYON REAKTÖR DENEYLERİ EK BİLGİLERİ

Tablo EK-J1. Vakum yapan reaktörlerin, vakuma başlama sırası

Başlangıç KOİ (g/L)	Başlangıç X_0 (mg/L UAKM)	Başlangıç pH	Kod	Reaktörlerde vakumun ilk olarak gözleendiği inkübasyon süresi (saat)	Çıkış pH
10	7500	5,5	M21	60	5,26
10	7500	5,5	M25	60	5,26
10	5000	7	M28	85	5,59
10	5000	7	M10	109	5,6
10	5000	4	M13	109	4,85
10	2500	5,5	M18	133	4,9
10	2500	5,5	M15	157	4,77
10	5000	4	M27	205	4,74
30	7500	7	M5	282	5,24
50	5000	4	M24	282	4,49
50	5000	7	M26	282	3,93
30	5000	5,5	M8	323	3,95
30	2500	7	M12	323	3,95
30	7500	7	M20	323	5,39
50	5000	7	M9	369	3,85
30	5000	5,5	M3	441	4,74
50	2500	5,5	M4	441	3,84

Tablo EK-J1’de görüldüğü üzere, vakum yapan reaktörler düşük başlangıç KOİ derişimine sahip reaktörlerdir ve vakum ilk olarak 60.saat itibari ile başlamıştır. KOİ değeri arttıkça, vakumun gözleendiği inkübasyon süresinin de genellikle paralel olarak arttığı gözlenmektedir.

Tablo EK-J2.a. Hidrojen üretim verimi modelinin ANOVA incelemesi

The analysis was done using uncoded units.				
Estimated Regression Coefficients for V (mol H ₂ /g KOİeklenen)				
Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	3669,96	439,740	8,346	0,000
KOİ	-156,81	32,831	-4,776	0,000
KOİ*KOİ	1,89	0,534	3,538	0,001
S = 583,147 PRESS = 11633867				
R-Sq = 64,11% R-Sq(pred) = 54,52% R-Sq(adj) = 61,45%				

Tablo EK-J2.b. Hidrojen üretim verimi modeli parametrelerinin ANOVA incelemesi

Analysis of Variance for V (mol H ₂ /g KOİeklenen)						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	2	16400738	16400738	8200369	24,11	0,000
Linear	1	12144807	7757611	7757611	22,81	0,000
KOİ	1	12144807	7757611	7757611	22,81	0,000
Square	1	4255931	4255931	4255931	12,52	0,001
KOİ*KOİ	1	4255931	4255931	4255931	12,52	0,001
Residual Error	27	9181636	9181636	340061		
Pure Error	27	9181636	9181636	340061		
Total	29	25582374				

Tablo EK-J3.a. Hidrojen üretimi modelinin ANOVA incelemesi

The analysis was done using uncoded units.				
Estimated Regression Coefficients for P (mL H ₂ / mL rxn vol*sa)				
Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	8723,87	1623,34	5,374	0,000
KOİ	-387,84	121,20	-3,200	0,003
KOİ*KOİ	5,00	1,97	2,540	0,017
S = 2152,74 PRESS = 160019460				
R-Sq = 38,73% R-Sq(pred) = 21,65% R-Sq(adj) = 34,20%				

Tablo EK-J3.b. Hidrojen üretimi modeli parametrelerinin ANOVA incelemesi

Analysis of Variance for P (mL H ₂ / mL rxn vol*sa)						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	2	79108960	79108960	39554480	8,54	0,001
Linear	1	49213050	47455637	47455637	10,24	0,003
KOİ	1	49213050	47455637	47455637	10,24	0,003
Square	1	29895910	29895910	29895910	6,45	0,017
KOİ*KOİ	1	29895910	29895910	29895910	6,45	0,017
Residual Error	27	125126014	125126014	4634297		
Pure Error	27	125126014	125126014	4634297		
Total	29	204234974				

Tablo EK-J4. Melas ile kurulan karanlık fermantasyon deneylerinde reaktör çıkış UAKM, AKM ve çKOİ derişimleri

Kod	Giriş		Çıkış		
	KOİ (g/L)	UAKM (mg/L)	AKM (mg/L)	UAKM (mg/L)	çKOİ (g/L)
M1	30	5000	11642±620	7575±218	18,7±0,7
M2	30	7500	14175±860	8108±1017	17,2±1,5
M3	30	5000	9558±625	5750±303	18,3±0,2
M4	50	2500	6500±205	4650±25	32±2,6
M5	30	7500	12900±591	8008±505	23,9±1,9
M6	30	7500	13817±485	8050±1339	19,5±4,7
M7	30	2500	6092±265	4275±229	17,6±5,5
M8	30	5000	9725±412	6258±181	14,4±1,4
M9	50	5000	11892±975	8050±733	20,1±1,2
M10	10	5000	9483±1207	5225±715	12,9±1,1
M11	50	2500	6025±109	4142±38	14,5±3,5
M12	30	2500	6042±813	4017±213	17,7±1,1
M13	10	5000	9400±1498	5408±813	10,8±1,7
M14	50	7500	15233±993	9708±600	32,2±2,3
M15	10	2500	4833±208	3075±50	11,5±1,0
M16	30	2500	5592±338	3817±163	21,7±2,6
M17	30	2500	5175±43	3575±66	18,5±1,4
M18	10	2500	4300±354	2717±118	11,3±1,7
M19	30	5000	8608±374	5833±338	19,5±1,6
M20	30	7500	11675±438	6983±326	20,5±0,8
M21	10	7500	9667±743	5367±496	14,3±0,8
M22	30	5000	8825±742	3483±354	19,7±2,0
M23	50	7500	13442±1114	8625±393	32,8±3,0
M24	50	5000	7575±100	4708±414	10,3±1,1
M25	10	7500	10817±1165	5892±389	19±4,5
M26	50	5000	9442±1411	6775±631	26,4±2,6
M27	10	5000	7000±463	4183±118	17,3±2,0
M28	10	5000	10508±6988	3833±491	11,9±2,5
M29	30	5000	9225±90	5717±336	21,2±1,6
M30	50	5000	11389±945	7372±626	33,7±0,5

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	TUBA HANDE ERGÜDER
Proje No:	112M252
Proje Başlığı:	Üç-Aşamalı (Karanlık-Fermentasyon, Metanojenesis Ve Foto-Fermentasyon) Sistemlerde Organik Atıklardan Entegre Biyohidrojen Ve Metan Üretiminin Araştırılması
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	İNCI EROĞLU, UFUK GÜNDÜZ
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. MÜHENDİSLİK F. ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/10/2012 - 01/04/2015
Onaylanan Bütçe:	292149.0
Harcanan Bütçe:	262163.54
Öz:	<p>Bu projenin amacı, birim organik maddeden elde edilen enerjiyi, diğer bir deyişle, toplam hidrojen ve metan üretimini arttırmak için, üç-aşamalı karanlık fermentasyon, metanojenesis ve foto-fermentasyon konfigürasyonunun geliştirilmesi ve enerji veriminin maksimizasyonu amacıyla üçlü sistemin uygun işletim koşullarının belirlenmesidir. Önerilen üç-aşamalı konfigürasyon bugüne kadar çalışılmamış, özgün bir sistemdir. Bu teknolojinin geliştirilmesi için her aşama, kesikli işletilen ve (ya) ardışık-kesikli modda sürekli işletilen reaktörlerle kademeli olarak entegre edilmiştir. Üç-aşamalı konfigürasyon, sentetik atıksu ve uygulama olarak şeker fabrikası atığı / yan ürünü melas ile çalıştırılmıştır. Farklı işletim koşullarında baskın olan popülasyon dinamiğinin belirlenmesi ve olası proseslerin daha iyi tanımlanması için moleküler analizler gerçekleştirilmiştir.</p> <p>Proje çıktıları, önerilen üç-aşamalı konfigürasyonlardan (kesikli veya ardışık-kesikli reaktör - AKR- entegrasyonlarından) elde edilen maksimum toplam (brüt) ısı enerji değerinin 13,47-16,11 kJ/g çKOİ'lenen, H₂ bazında maksimum verim ise 9,18-10,80 mol H₂ /mol heksoz aralığında olduğunu göstermiştir. Bu değerler, iki-aşamalı karanlık fermentasyon + fotofermentasyon sistemlerinde bugüne kadar elde edilen en yüksek verimden (7,2 mol H₂/mol heksoz) %27-50; iki-aşamalı hidrojen sistemlerinin kurulumu için ekonomik değer sınırını oluşturan 8 mol H₂/mol heksoz veriminden de %14-37 fazladır.</p> <p>Önerilen üç-aşamalı sistem konfigürasyonları, iki-aşamalı karanlık fermentasyon + metanojenesis sistemlerinden elde edilen enerjiye (13,15-14,64 kJ/g çKOİ) benzer ölçüde enerji üretmektedir. Bulgular, üç-aşamalı konfigürasyondan elde edilen enerjinin, iki-aşamalı karanlık fermentasyon + metanojenesis sistemlerinden elde edilebilecek teorik değere oldukça yakın (%89-96) olması açısından da önemlidir. Maksimum enerji ve verim eldesi (16,11 kJ/g çKOİ ve 10,80 mol H₂ /mol heksoz), AKR-Karanlık fermentasyon + AKR-Metanojenesis + Kesikli fotofermentasyon entegre sisteminde sağlanmıştır.</p> <p>Bu projede önerilen konfigürasyonla, ülkemiz hedefleri içerisinde yer alan, yenilenebilir enerji üretimi, atıkların kontrolsüz bertarafı ve olası sera-gazı salınımının azaltımına bir alternatif teknoloji, ve sürdürülebilir kalkınma hedefi gerçekleştirilebilmiştir. Ayrıca, yeşil teknolojide gereken iki önemli ham madde metan ve hidrojen aynı konfigürasyonla ve önemli bir verim eldesiyle üretilmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Enerji, fotofermentasyon, hidrojen, homoasetojenesis, fermentasyon, metan, metanojenesis, PCR-DGGE
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

Proje Yapılan Yayınlar:	<p>1- Investigation of the effects of initial substrate and biomass concentrations and light intensity on photofermentative hydrogen gas production by Response Surface Methodology (Makale - Diğer Hakemli Makale),</p> <p>2- Investigation of the effects of initial substrate and biomass concentrations and light intensity on photofermentative hydrogen gas production (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),</p> <p>3- Investigating the effect of initial COD, VSS and pH to improve dark fermentative hydrogen production from sucrose and molasses (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),</p> <p>4- Single-phase and two-phase anaerobic digestion of molasses: investigating the effect of phase-digestion on energy production (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),</p>
-------------------------	--

TÜBİTAK