

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MAYA FABRİKASI ATIK ARITMA SUYUNDAN
İZOLE EDİLEREK ÜRETİLEN MİKROALGAL
BİYOKÜTLENİN BİYOGAZ ÜRETİMİNE ÖN
İŞLEMLERİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Hande ERMİŞ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Meltem CONK DALAY

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 612.01.00

Sunuş Tarihi : 17.09.2014

Bornova-İZMİR

2014

Hande Ermiş tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Maya Fabrikası Atık Arıtma Suyundan İzole Edilerek retilen Algal Biyokütlenin Biyogaz üretimine n İşlemlerin Etkisinin İncelenmesi” başlıklı bu alışma E.. Lisansüstü Eēitim ve ēretim Ynetmeliēi ile E.. Fen Bilimleri Enstitüsü Eēitim ve ēretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan deēerlendirilerek savunmaya deēer bulunmuş ve 17.09.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliēi/oyokluēu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri yeleri:

İmza

Jüri Bařkanı : Prof. Dr. Meltem CONK DALAY

ye : Prof. Dr. Nuri AZBAR

ye : Prof. Dr. Atakan SUKATAR

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLAR UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Maya Fabrikası Atık Arıtma Suyundan İzole Edilerek Üretilen Algal Biyokütlenin Biyogaz Üretimine Ön İşlemlerin Etkisinin İncelenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.... / / 20..

İmzası

Adı-Soyadı

ÖZET**MAYA FABRİKASI ATIK ARITMA SUYUNDAN İZOLE EDİLEREK
ÜRETİLEN MİKROALGAL BİYOKÜTLENİN BİYOGAZ ÜRETİMİNE
ÖN İŞLEMLERİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

ERMİŞ, Hande

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Meltem CONK DALAY

Eylül,2014, 80 sayfa

Aşırı sera gazı emisyonları ve küresel ısınma üzerindeki eş zamanlı etkisi, dünya üzerinde çevresel, sosyal ve ekonomik bir tehdit oluşturmaktadır. Bu durum alternatif yenilenebilir enerji kaynaklarına yönelimi kaçınılmaz kılmaktadır. Bu çalışma ile maya fabrikası atık çamuruna substrat olarak eklenen çeşitli ön işlemlere maruz kalmış mikroalgallı biyokütlenin toplam biyogaz miktarına olan etkisi incelenmiştir. *Chlorella sp.*, *Oscillatoria acuminata*, ve *Scenedesmus armatus* türlerinden oluşan karışık mikroalg kültürü, maya fabrikası atıksu arıtma tesisinin son havuzundan toplanarak izole edilmiştir. Ön işlem olarak mikrodalga, otoklav ve sonikasyon yöntemleri öncelikle *Spirulina platensis*'e uygulanmış ve yüksek verim veren ön işlem seçilmiştir. Biyogaz deney dizaynı olarak, 1 litrelik karıştırmalı anaerobik reaktör 1/10 seyreltilmiş metajonik maya çamuruyla inoküle edilmiş, sıcaklık 35 °C ye sabitlenerek, reaktörlere 30 gün işletim süresi olacak şekilde günlük çıkartılan miktarda mikroalgallı biyokütle beslemesi yapılarak, biyogaza olan etkisi incelenmiştir. Ön çalışma olarak *Spirulina platensis* biyokütlesine uygulanan mikrodalga, otoklav ve sonikasyon yöntemleri sonucunda, metan miktarında sırasıyla % 23.6, % 18 ve % 16, ve biyogaz miktarlarında ise sırasıyla %58, %57 ve %38 'lik bir artış gözlenmiştir. Aynı prosedürde mikrodalga ön işlemine maruz bırakılan karışık mikroalg kültürünün içerdiği kalın hücre duvarlı türlerden dolayı, işlem süresi yetersiz kalarak bir artış gözlenememiştir.

Anahtar sözcükler: Anaerobik parçalama, Biyogaz, Mikroalg, Yenilenebilir enerji, Ön işlem

.

ABSTRACT**THE EFFECT OF PRE-TREATED MICROALGAE BIOMASS
ISOLATED FROM YEAST FACTORY WASTE WATER ON
THE TOTAL AMOUNT OF THE BIOGAS**

ERMIŞ,Hande

Msc in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Meltem CONK DALAY

September 2014, 80 pages

Due to decreased fossil fuel reserves and increased prices of petrochemical fuels, and the simultaneous effect of fossil fuels on excessive greenhouse gas emissions leading global warming, the world is trying to find an alternative renewable energy sources. Due to not requiring arable land, their higher productivity and higher biofuel yield compared to terrestrial plants, microalgae has the highest attention in the field of bioenergy. In this study, it is aimed to determine the effect on the total amount of the biogas by adding differently pretreated algal biomass as a substrate in yeast factory sludge. Mixed culture, including *Chlorella* sp., *Oscillatoria acuminata*, and *Scenedesmus armatus*, were collected and isolated from last settling tank grown in yeast waste water treatment system. As a pretreatment, physical processes were carried out which were microwave, sonication, and autoclaving on *Spirulina platensis* as a pre-study. For biogas experiments, the reactors (1L) were inoculated with a methanogenic yeast sludge. The CSTRs were operated by each daily feeding event being initiated by the removal of an appropriate volume at a hydraulic residence of 30 d at 35 °C. As a pre-study with *Spirulina platensis*, the methane content were increased % 23.6, % 18 ve % 16 and the biogas amount were increased %58, %57 and %38 with microwave, sonication, and autoclaving, respectively. Due to the strong cell wall of the species presenting in the mixed culture, pre treatment time was not efficient enough to increase biogas amount.

Key words: Anaerobic digestion, Biogas, Microalgal biomass, Renewable energy, Pretreatment

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek engin fikirleriyle gelişmeye katkıda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Meltem CONK DALAY'a,

Araştırmalarım boyunca birlikte çalıştığım ve büyük bir sabırla bilgisini benimle paylaşan Dr. Zeliha DEMİREL'e ve tüm bölüm arkadaşlarıma,

Deneylerim aşamasında laboratuvar imkanlarını kullanmama izin veren ve benimle bilgisini paylaşan sayın Prof. Dr. Nuri AZBAR'a , Dr. Tugba Keskin Gündoğdu'ya ve tüm Çevre Biyoteknoloji ve Biyoenerji Araştırma Laboratuvarı öğrencilerine,

Pakmaya'daki çalışmalarım sırasında ihtiyacım olan her türü desteği, güler yüzlülük ve yardımseverlikleriyle benden esirgemeyen sayın Seval Gaye KARADAĞ'a ve tüm Pakmaya çalışanlarına,

Bugüne kadar hep yanımda olan, beni hiç yalnız bırakmayan canım dostum Meryem SULTUYBEK'e ve tüm arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi desteğini hiç bir zaman eksik etmeyen, bana hep inanan ve hayallerimi her zaman gerçek yapan mucizevi ailem; canım anneme, biricik babama, ve idolüm ablama teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1.GİRİŞ	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1 Biyogaz ve Anaerobik parçalama	2
2.1.2 Anaerobik parçalamayı etkileyen başlıca faktörler	5
2.2 Mikroalgler	8
2.3 Mikroalgler ve Biyoyakıt	8
2.4 Mikroalgler ve Anaerobik Parçalama	11
2.4.1 Mikroalglerin anaerobik parçalanmasını etkileyen başlıca faktörler	13

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.5 Atıksu Akımında Yetişen Mikroalgler	19
3.MATERYAL ve METOT	22
3.1 Biyokütle tayini	22
3.1.1 <i>Spirulina platensis</i>	22
3.1.2 <i>Oscillatoria sp.</i>	23
3.1.3 <i>Scenedesmus sp.</i>	24
3.1.4 <i>Chlorella sp.</i>	24
3.2 Kültür Ortamları	25
3.3 Kültürlerin Hazırlanması	26
3.4 Gen Analizi.....	27
3.5 Mikroalglerin hasat edilmesi	29
3.6 Büyüme Grafiklerinin Elde Edilmesi	29
3.6.1 Optik yoğunluk ölçümü	29
3.6.2 Klorofil- a tayini	29
3.6.3 Mikroskobik hücre sayımı	30

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.7 Saflaştırılan Mikroalg Türlerinin Biyokimyasal Kompozisyonunu Belirleme	31
3.7.1 Modifiye Bligh and Dyer yöntemiyle yağ analizi	31
3.7.2 Toplam şeker analizi.....	32
3.7.3 Modifiye Lowry protein analizi.....	34
3.8 Anaerobik Parçalama.....	35
3.8.1 Ön işlem.....	35
3.8.2 Deneysel dizayn.....	36
3.8.3 Analitik yöntemler	37
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	41
ÖNERİLER.....	68
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	70
ÖZGEÇMİŞ	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Anaerobik parçalamanın aşamaları ve rol oynayan bakteri grupları	3
3.1 <i>Spirulina platensis</i> , ışık mikroskobu görüntüsü, 40x	23
3.2 <i>Oscillatoria sp.</i> , ışık mikroskobu görüntüsü, 63x	23
3.3 <i>Scenedesmus sp.</i> , ışık mikroskobu görüntüsü, 63x.....	24
3.4 <i>Chlorella sp.</i> , ışık mikroskobu görüntüsü, 63x	25
3.4 Karışık mikroalg aşı kültürlerinin hazırlanması: 1.BG-11 agara ekim, 2. Cam tüplere ekim, 3. 300mL erlenlerde inkübasyon 4. 5L şişelere hacim arttırılması, 5. 10L şişelerde üretim, 6. Torba üretim (30L).....	27
3.6 Agaroz jel elektroforezi	28
3.7 Çanak tipi separatör.....	29
3.8 0,45 µmlik filtre kağıdından vakum pompası yardımı ile filtrasyon.....	30
3.9 Neubauer sayım kamarası (9×10^{-4} ml).....	31
3.10 Ultra saf su eklendikten sonra oluşan metanol-yağ fazı	31
3.11 Modifiye Bligh and Dyer Yağ Tayini prosedürü: 1. Oluşan yağ-su fazı, 2- Balon jojeye aktarılan yağ fazı, 3-Stuart, RE300 dönen buharlaştırıcı kullanılarak su banyosunda (30°C) buharlaştırma	32
3.12 Toplam Şeker Analizi Standart Grafiği ve denklemi	33
3.13 Protein analizi standart grafiği ve denklemi	34

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

3.14	Deneyssel dizayn.....	37
3.15	Şırınga ile örnek alınımı	37
3.16	Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Tayini. 1-KOİ kitleri, 2- Seyreltme işleminden sonra kitlerin renk değişimi, 3- 148°C de 2 saat termostatta bekletme, 4- Spektrofotometrede ölçüm	38
3.17	0,45 µm cam fiber membran filtreden örneklerin filtrasyonu	39
3.18	Uçucu yağ asidi (VFA) analizi. 1- Santrifujlenmiş ependorf tüpler, 2. Filtreden geçirilmiş örnek içeren viyaller, 3.Gaz kromatografisine yerleştirilmiş örnekler, 4. Gaz Kromatografisi.....	40
4.1	DNA jel fotoğrafı. 1. <i>Oscillatoria sp.</i> 2. <i>Scenedesmus sp</i> 3. <i>Chlorella sp</i>	42
4.2	<i>Scenedesmus armatus</i> ışık mikroskobu görüntüsü, 63x	43
4.3	<i>Oscillatoria acuminata</i> ışık mikroskobu görüntüsü, 63x.....	44
4.4	<i>Scenedesmus sp.</i> ve <i>Chlorella sp.</i> Optik yoğunluk - Zaman grafiği	45
4.5	<i>Scenedesmus sp.</i> ve <i>Chlorella sp.</i> Klorofil a - Zaman grafiği	46
4.6	<i>Scenedesmus sp.</i> ve <i>Chlorella sp.</i> Hücre sayım - Zaman grafiği	47
4.7	Mikroalg türlerinin şeker içeriği yüzdeleri.....	49
4.8	Mikroalg türlerinin protein içeriği yüzdeleri.....	50
4.9	Mikroalg türlerinin yağ içeriği yüzdeleri	51

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

4.10	<i>Spirulina platensis</i> 'e uygulanan ön işlemler. A. Ön işlemsiz, B. Mikrodalga ön işlemi, C. Sonikasyon ön işlemi, D. Otoklav ön işlemi	52
4.11	Karışık mikroalgal biyokütleye uygulanan ön işlem. A. Ön işlemsiz, B. Mikrodalga ön işlemi.....	53
4.12	Reaktör 1 ve 2, Günlük biyogaz miktarı (mL)	54
4.13	Reaktör 3 ve 4, Günlük biyogaz miktarı (mL)	55
4.14	Reaktör 5 ve 6, Günlük biyogaz miktarı (mL)	55
4.15	Reaktörlere göre KOİ- zaman grafiği	59
4.16	Reaktör1. VFA-zaman grafiği	59
4.17	Reaktör 2. VFA-zaman grafiği	60
4.18	Reaktör 3. VFA-zaman grafiği	61
4.19	Reaktör 4. VFA-zaman grafiği	61
4.20	Reaktör 5. VFA-zaman grafiği	62
4.21	Reaktör 6. VFA-zaman grafiği	62

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)Sayfa

4.22	Tüm reaktörlerin askıda katı madde-zaman grafiği.....	64
4.23	NH ₄ -N - zaman grafiği (Reaktör 1-4).....	65
4.24	NH ₄ -N - zaman grafiği (Reaktör 5-6).....	66
4.24	Tüm reaktörlerin günlük pH sonuçları.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Biyogaz kaynakları - Biyogaz verimi ve Metan oranı.....	11
2.2 Literatürde rapor edilmiş mikroalgal biyokütleden anaerobik parçalama ile metan üretimi.....	12
2.3 Literatürde mikroalg üretimi için kullanılan atıksu türleri ve teorik algal biyokütle miktarları (Christenson, 2011).....	20
3.1 <i>Spirulina plantesis</i> organik hücre içeriği (Tornabene, 1985).....	22
3.2 <i>Oscillatoria sp.</i> 'nin organik hücre içeriği (Nagle, 2010).....	23
3.3 <i>Scenedesmus sp.</i> organik hücre içeriği (Tadros, 1985).....	24
3.4 <i>Chlorella sp.</i> organik hücre içeriği(Tadros, 1985)	25
3.5 BG-11 ortamının kompozisyonu	26
3.6 Toplam Şeker analizi için kullanılan kimyasallar ve hacimleri.....	33
4.1 <i>Scenedesmus armatus</i> 'un bilimsel sınıflandırılması	42
4.2 <i>Oscillatoria acuminata</i> 'nın bilimsel sınıflandırılması	43
4.3 <i>Chlorella sp.</i> ' nün bilimsel sınıflandırılması.....	44
4.4 Kültürlerin başlangış ve bitiş kuru ağırlık miktarları	48
4.5 Kültürlerin maksimum spesifik büyüme hızı (MSBH- hücre sayısı. g ⁻¹), ikilenme süresi (İS-gün), klorofil a miktarı (mg/mL), toplam şeker miktarı (TŞM-µg/mL).....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ(Devam)

Sayfa

4.6	Toplam 30 L hacmindeki cam şişelerden elde edilen karışık mikroalgal biyokütle miktarı ve verimi.....	48
4.7	Ön işlemlili ve ön işlemsiz mikroalgal biyokütlelerin analiz sonuçları.....	53
4.8	Reaktörlere göre kümülatif gaz miktarı.....	57
4.9	Reaktörlere göre kümülatif metan miktarı.....	57
4.10	Tüm reaktörlerden beklenen teorik $KOI_{giderimi}$	58
4.11	Besleme yapılan algal biyokütlenin VFA içerikleri ve miktarları.....	63
4.12	Besleme yapılan biyokütlenin AKM ve UAKM değerleri.....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
AKM	Askıda Katı Madde
C/N	Karbon/Azot oranı
HRT	Hidrolik Alıkonma Zamanı (Hydroulic Retention Time)
KOİ	Kimyasal Oksijen İhtiyacı
L	Litre
OLR	Organik Yükleme Hızı (Organic Loading Rate)
T	Sıcaklık (°C)
VFA	Uçucu Yağ Asidi (Volatile Fatty Acid)

1.GİRİŞ

Fosil yakıtların sürekli tükenmesi, alternatif yenilenebilir enerji kaynakları bulma yönünde yapılan çabaları arttırmaktadır. Mikroalgler, karasal bitkilere oranla daha yüksek büyüme hızları ve biyoyakıt verimlerine sahip olmalarından dolayı biyoenerji alanında önem kazanmıştır. Karasal bitkilere kıyasla bir diğer avantajı ise, alglerin yağ veriminin 1000-6500 galon/dönüm/yıl 'e kadar çıkabilmesidir. Bu verim, yağ içeriği fazla olan soya fasülyesi, palmiye yağı ve ayçiçeği gibi toprak bitkilerinden 20 kat daha fazladır (Chisti, 2007; Wigmosta et al., 2011). Ancak lipid ekstraksiyonunun yüksek maliyeti ve algal biyoyakıtlarda bulunan yüksek miktardaki doymamış yağ asitleri, alglerin biyoyakıt üretimi için büyük ölçekli uygulanmasını engellemiştir (Sialve et al., 2009).

Anaerobik parçalama, yetiştirilen algal biyokütleden enerji geri kazanımı için kullanılan başka bir yoldur. Anaerobik parçalama ile enerji korunurken, hem ekolojik hem de ekonomik faydalar sağlayan ‘biyogaz’ enerjisi üretilir. Fakat bazı çalışmalar, alglerin güçlü ve kalın hücre duvarlarının anaerobik parçalamayı sınırlandırarak, düşük biyogaz verimlerine neden olduğunu göstermiştir. Alg hücrelerinin parçalanabilirliği için, olası yöntemlerden biri olarak, ön işlem yöntemi önerilmiştir. Sonikasyon, ısı işlemi, alkalik işlemler, mikrodalga, otoklav yada bu işlemlerin kombinasyonları gibi farklı fiziksel ve kimyasal ön işlemler, substratın anaerobik mikroorganizmalar tarafından daha kolay erişilebilir hale gelmesini sağlamaktadır (Chu et al., 2002).

Bu amaç doğrultusunda, bu çalışmada, *Spirulina platensis* ön çalışma olarak kullanılmış ve sırasıyla sonikasyon, mikrodalga ve otoklav ön işleme maruz bırakılmıştır. Maksimum miktarda biyogaz verimi gözlenen mikrodalga ön işlemi, maya atıksu arıtma havuzundan izole edilen karışık mikroalg biyokütlesine uygulanmıştır. Reaktörlerde inokulum olarak 1:10 seyreltilmiş metanojenik maya çamuru kullanılmış ve her gün reaktörden çıkartılan miktarda algal biyokütle beslenerek, biyogaz miktarına olan etkisi incelenmiştir.

2.LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Biyogaz ve Anaerobik parçalama

Biyogaz, anaerobik (oksijensiz) şartlarda organik maddenin bakteriyel dekompozisyonu sonucu ortaya çıkan metan ve karbondioksit karışımı enerji içeriği yüksek, yanabilir bir gazdır. Bileşenleri ise;

%50 -70 *Metan, CH₄*,

%30-40 *Karbon dioksit, CO₂*,

%5-10 Hidrojen, H₂,

%1-2 *Azot, N₂*

ve eser miktarda Hidrojen sülfürdür, H₂S (Öztürk, 2005).

Bu proste bir çok bakteri birbirleriyle etkileşim içinde olup, bir grup bakterinin varlığı, başka bir grup bakteri tarafından üretilen ürüne bağlıdır (Şekil 2.1).

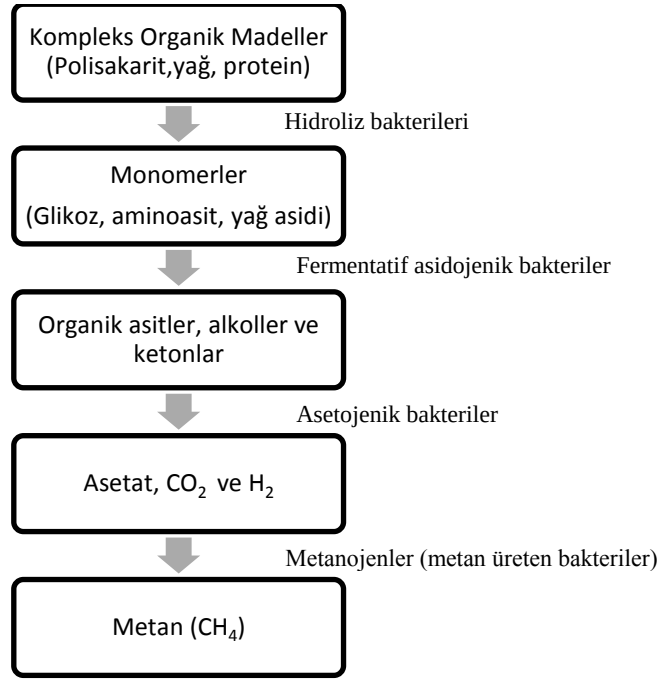
Proses 4 temel aşamadan oluşmaktadır:

1) Hidroliz: Karbonhidrat, lipid, protein ve anorganik maddelerden oluşan atıkların kompleks yapı taşlarının fermentasyon ve hidroliz işlemlerinde gerçekleştirilen mikroorganizmalar yardımıyla basit parçalara ayrılması,

2) Asidojenik reaksiyonlar: Glükoz gibi monomerlerin oluşturulduğu birinci basamak ürünlerinden, oksijensiz ortamda hidrojen üreten asetojenik mikroorganizmalar tarafından asetik asit, propiyonik asit, butirik asit ve etanole dönüştürülmesi,

3) Asetojenik reaksiyonlar: Uçucu yağ asitlerinin asetatlara dönüştürülmesi,

4) Metanojenik reaksiyonlar: Oluşan temel asitlerin metajenik mikroorganizmalar yardımıyla metana çevrilmesi.



Şekil 2.1 Anaerobik parçalamanın aşamaları ve rol oynayan bakteri grupları (Parkin et al., 1986)

Bu reaksiyonların yerine getirilmesi, esas olarak altı bakteri grubunun ortaklaşa faaliyetleri sonucu olmaktadır:

Hidrolitik bakteriler (hidrolizden sorumlu bakteriler),

Hidrojen üreten asidojenik bakteriler,

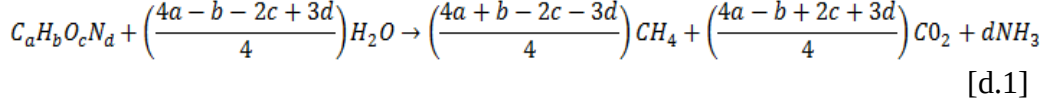
Hidrojen üreten asetojenik bakteriler,

Hidrojen tüketen asetojenik bakteriler ,

Karbondioksit indirgeyen metanojenler,

Asetoklastik metanojenler.

Biyokütlenin kompozisyonu anaerobik parçalamada en önemli verilerden biridir. Angelidaki ve Sanders (2004)' a göre, organik maddenin bileşiminin bilinmesi ile, anaerobik çürümeden beklenen teorik metan ve amonyum verimlerinin hesaplanması mümkün olmaktadır. Bu verimler, Symons ve Buswell (1933) 'dan uyarlanan aşağıdaki formülle hesaplanabilir.



Bu denklemde, organik madde stokiyometrik olarak metan, karbondioksit ve amonyağa dönüşmektedir. Böylece spesifik metan üretimi, uçucu katı madde (VS) gramı başına CH₄ litre olarak aşağıdaki gibi hesaplanabilir:

$$\text{Metan verimi (L/g(VS)parçalanan)} = \frac{4a + b - 2c - 3d}{12a + b + 16c + 14d} * V_m \quad [d.2]$$

V_m, metanın normal molar birimidir ya da 0 °C ve 1 atmde 22.14 L'dir. Çürütücüdeki amonyum üretim verimi ise aşağıdaki denklem kullanılarak değerlendirilebilir:

$$Y_{N-NH_3}(mg \text{ gVS}^{-1}) = \frac{d * 17 * 1000}{12a + b + 16c + 14d} \quad [d.3]$$

Ancak bu denklem uçucu katıların %100 olarak biyogaza dönüştüğünü farz etmekte, ayrıca bakteriyel hücre gelişmesi ve anabolizması için gerekli ihtiyaçları göz önüne almamaktadır.

Teorik metan miktarı, enerji miktarı yüksek olan yağ oranının artması ile artmaktadır. Angelidaki ve Sanders'ın protein, şeker ve yağlarla yaptığı teorik metan verimi çalışmasında, sırasıyla 0.50, 0.42 and 1.01 L/g VS sonuçları elde edilmiştir (Angelidaki ve Sanders, 2004). Ancak, yağ oranının yüksek olması anaerobik proseslerde bazı dezavantajlar getirmektedir. Yağın hidrolizi, protein ve karbonhidratla karşılaştırıldığında daha yavaş olmasından dolayı, proses yavaşlamaktadır. Pavlostathis and Giraldo-Gomez (1991) yaptıkları çalışmada bu süreyi, karbonhidrat için 0.18 gün, protein için 0.43 gün ve yağ için 3.2 gün olarak hesaplamıştır. Hidroliz süresi dışında, yağların düşük alkalinite ve tamponlama kapasiteleri ile, uzun zincirli yağlı asitleri (LCFAs) ve uçucu yağ asitleri (VFA) gibi ara ürünlerden kaynaklanan inhibasyona karşı daha yüksek hassasiyete sahip olmaları da bir başka dezavantajdır (Sialve et.al. 2009).

2.1.2. Anaerobik Parçalamayı Etkileyen Başlıca Faktörler

Anaerobik tepkimeleri birden çok bakteri grubunun meydana getirmesi, sistemi hassaslaştırmakta ve belirli faktörler tarafından etkilenmesine neden olmaktadır. Bu parametreler aşağıda sıralanmıştır:

Hidrojen miktarı

Hidrojen, asit oluşturan bakterilerin çoğu üzerinde toksik etki yaratabilmektedir, bu nedenle süratle sistemden uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu noktada, hidrojenin metanojenik bakterilerce, karbondioksitin metana indirgenmesi sırasında enerji kaynağı olarak kullanılabilir olması, sistemden çabucak uzaklaştırılmasını kolaylaştırmaktadır. Hidrojen kısmi basıncının 10^{-4} atm değeri aşması durumunda, propiyonik ve butirik asit gibi bazı organik asit konsantrasyonlarında artış olmakta ve metan dönüşümü engellenebilmektedir. Dolayısıyla, reaktör içinde hidrojen seviyesinin belli bir aralıkta tutulması gerekmektedir.

Sıcaklık

Sıcaklık, diğer çevresel etkenlere göre, anaerobik parçalama prosesinin en önemli parametrelerinden biridir. Bunun nedeni, mikroorganizmaların metabolik aktivitelerinin büyük oranda sıcaklığa bağlı olmasıdır. Sıcaklık değişimlerine karşı oldukça hassas olan metanojenik bakteriler, çok yüksek ve çok düşük sıcaklık değerlerinde aktif olamamaktadır. Bu durum biyogazın üretimine veya hızına doğrudan etki etmektedir. Sıcaklığın düzeyine göre sınıflandırılması üç şekilde yapılabilir:

1. Psikrofilik sıcaklık aralığı = 12-20 Derece
2. Mesofilik sıcaklık aralığı = 20-40 Derece
3. Termofilik sıcaklık aralığı = 40-65 Derece

Yapılan araştırmalar, termofilik koşullarının metan miktarını arttırdığını göstermektedir. Örneğin sıcaklığın 15 °C den 52 °C ye çıkması, *Spirulina maxima* türünde metan miktarını arttırmıştır (Sialve et al., 2009). Ayrıca karışık

mikroalgal biyokütlelerde ısının 35 °C den 50 °C ye çıkması da, alglerin parçalanma hızını % 5 den % 10' a çıkarmıştır (Sialve et al., 2009).

Tchobanoglous'a göre mezofilik koşullarda anaerobik parçalanma için 20 °C in altındaki psikrofilik çevre koşullarında mikroorganizma verimi düşmekte ve bu sebeple anerobik reaktörün işletmeye alma ve başlangıç evresi gecikmektedir. Yaptıkları çalışmada, reaktör sıcaklığının 25-35 °C arasında tutulması, optimum biyolojik reaksiyon hızının sağlanmasına ve reaktörde denge koşullarının yaratılmasına yardımcı olmuştur (Tchobanoglous et al, 2003).

Artan sıcaklıkların amonyak üretimine neden olarak inhibasyon yaratması, mezofilik ısıların algler için en uygun ısı aralığı olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Chen'in yaptığı çalışmada, 40 °C maksimum metan miktarını vermiştir (Chen, 1998).

Karıştırma

Karıştırma, oluşan gazın sıvı üzerinde meydana gelen köpüğü geçip yüzeye çıkmasını sağladığı gibi sıvıdaki malzemelerin dibe çökmesini önlemekte ve bakterilerin organik maddelerle homojen bir şekilde temas etmesini sağlamaktadır (Gülen, 2005). Karim et al. yaptıkları çalışmada, % 5, % 10 ve % 15 'lik konsantrasyona sahip gübre içeren çürütücülerde karıştırmanın etkisini incelemiştir. %5 konsantrasyonda gübre içeren çürütücüde karıştırıcının bir etkisi gözlenmemişken, konsantrasyonun artmasıyla, karıştırılmalı reaktörlerde %10-30 miktarında biyogaz artışı gözlenmiştir.

Alıkonma Süresi (HRT)

Alıkonma süresi (HRT), atıkların üreteç içinde kaldığı süreyi ifade eder ve mikrobiyal metabolizma hızına bağlı parçalanma derecesini belirten bir parametredir (Speece, 1996). Organik maddelerin parçalanarak gaz açığa çıkarması ve bu işlemleri gerçekleştiren bakterilerin üreme hızları alıkonma süresine bağlıdır. Kullanılan atığın türüne ve üreteç çeşidine göre değişmektedir (Tuluk, 2007). Kısaca HRT, sindirici içinde, organik maddelerin bakteriler tarafından çürütülmesi sonucu biyogaz üretmesi için gerekli olan süre olarak tarif edilir.

$$HRT = \frac{V_{\text{Islak}}}{Q_{\text{giriş}}}$$

[d.4]

Organik yükleme hızı (OLR)

Anaerobik parçalanma prosesi esasen yüksek organik yükleme hızları ile karakterize edilmektedir. Yüksek OLR, birim reaktör hacmi başına daha çok parçalanması gereken atık su olduğunu ifade eden bir parametredir.

Organik yükleme hızı gıda-mikroorganizma (F/M) oranına etki eder. Gıda substratları ve mikroorganizma içeriği dengede iken sistem dengeye ulaşır. Dengesizlik baş gösterdiği zaman, ortamda çok fazla substrat ya da çok az substrat, belki de çok fazla organizma ya da çok az organizma bulunabilir. Bunlardan herhangi biri F/M oran parametresindeki dengeye etkiyerek prosesin istikrarını bozar (Hilkieh Igoni et al., 2008).

$$OLR = \frac{C_i Q}{V}$$

[d.5]

C_i atık sudaki biyobozunur KOİ konsantrasyonu (mg/L), Q atık suyun debisi ($m^3/gün$), V ise anaerobik reaktör hacmi olarak ifade edilir.

pH

Biyogaz üretiminde pH derecesinin, reaksiyon hızı ve diğer parametrelere önemli bir etkisi vardır. Anaerobik parçalama için ideal pH 6-8 arasındadır. Asit üreten bakteriler metan üreten bakterilerden daha hızlı çoğaldıklarından, asit üretimi sistemde artarak metan üreten bakterilerin aktivitesini düşürebilir (Tuluk, 2007).

pH'ın düşmesiyle sülfür salınımı ve iyonize olmamış uçucu yağ asitlerinin konsantrasyonları artar ve metan üretimi durur. Artan pH ise amonyak salınımına neden olarak yine toksik etki yaratır ve inhibasyona neden olur. Bu sebeple sistemin pH' ı sürekli kontrol altında tutulmalıdır.

Alkalinite

Alkalinite suyun asit nötrale etme kapasitesidir. Anaerobik sistemlerde, tamponlama kapasitesi olarak da bilinen alkalinite, uçucu yağ asitlerinden dolayı oluşan ani pH düşüşlerine karşı veya pH dalgalanmalarına karşı tampon görevi görerek sistemi korur.

2.2. Mikroalgler

Mikroalgler; farklı sıcaklık, pH ve besin koşulları altında, tatlı su ya da deniz sistemlerinde bulunabilen, fotosentetik tek hücreli prokaryotlar (siyanobakteriler) ve ökaryot mikroorganizmalar grubudur (Meng et al., 2009). Fotosentetik organizmalar olarak, zengin biyolojik çeşitliliğe sahip sucul ekosistemlerin üyeleri içerisinde önemli bir grubu temsil etmektedirler. Bunun nedeni, mikroalglerin mikroskobik canlılardan balıklara ve oradan da insana kadar uzanan besin zincirinde, başta klorofil olmak üzere sahip oldukları fotosentetik pigmentler yoluyla birincil üretimi gerçekleştirmeleri ve zincirin ilk halkasını oluşturmalarıdır. Bitkilerin aksine, kök ve yaprak yapıları yoktur. Atmosferik oksijenin yaklaşık yarısını üreten mikroalgler, aynı anda sera gazı karbondioksitini kullanarak fotoototrofik olarak büyümektedir (Starck,2012)

Mikroalgler çok geniş bir biyoçeşitliliğe sahiptir. Yaklaşık 200,000-800,000 türün olduğu var sayılmakta, fakat yalnız 50,000 türü açıklanabilmiştir. Bu mikroalg türlerinin bir çoğu kendine özgü ürünler üretebilmektedir, örneğin karotenoidler, antoksidanlar, yağ asitleri, enzimler, polimerler, toksinler ve steroller gibi (Cardozo et al., 2006).

2.3. Mikroalgler ve Biyoyakıt

Artan küresel nüfus ile fosil yakıt kullanımına artan talep, biyokütle dönüşümlü yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ilgiyi arttırmıştır. Tarımsal kaynaklı biyokütleden biyoyakıt üretimi ivme kazanmış fakat bu ilgi beraberinde kaynakların azalması, ve mevcut tarım uygulamalarından dolayı biyoçeşitliliğin azalması gibi bazı sorunları da beraberinde getirmiştir (Fenton and Ohuallachain, 2012). Mikroalgler, bu durumda biyoyakıt üretimi için ilginç bir alternatif kaynak haline gelmektedir. Mikroalgler yüksek verimde ekim alanına ihtiyaç duymadan büyüyebilir ve gıda üretimi için uygun olmayan arazilerde yetiştirilebilirler (Collet, 2011). Yıllık olarak bölgelere göre 1200-2000 kWh/m²

güneş enerjisi alan Türkiye’de bu enerjiden faydalanılarak mikroalgal fotosentez ile biyokütle üretimi, yalnızca yeşil enerji kullanımı ile çevreye verilen zararı azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda proses sırasında algler tarafından hammadde olarak kullanılan CO₂ sayesinde de ülkemizin karbon ayak izini de büyük oranda küçülteceği düşünülmektedir (Say, 2010). Mikroalgler CO₂ emisyonunu kullanma potansiyeline sahip olarak karbon nötr biyoyakıt üretimi sağlamaktadır. Biyogazın içinde bulunan karbon "biyojenik karbon"dur (Yusuf, 2007). Bu dünyanın doğal karbon döngüsünün bir parçasıdır. Yanan biyogazdan çıkan CO₂, bitkilerin büyümesi esnasında kullanılan CO₂ miktarı kadardır ve bitkiler tarafından kullanılır. Bu yüzden biyogazın yanması, CO₂ emisyonunu azaltarak küresel ısınmanın önlenmesine yardımcı olmaktadır. Fosil yakıtlardaki karbon ise yeryüzünde milyon yıllar boyunca saklanmış bir karbondur ve bu karbonun yakılması atmosfer içindeki CO₂ seviyesini arttırmaktadır. 1 MWh doğal gazın yanması sonucunda atmosfere 0,6 ton CO₂ salınımı yapılmaktadır. Bu verilere göre doğal gazla çalışan termik santrallerimizden bir yılda salınan CO₂ miktarı 57144000 ton dolayındadır. Bu miktar Türkiye’nin CO₂ salınımının yaklaşık % 20’ sini oluşturmaktadır (Ulukardeşler, 2012). Algler bu durumda büyük bir rol oynamaktadır çünkü 1 ton algin büyüyebilmesi için 1,8 ton CO₂ 'e ihtiyaç duyulmaktadır bu da mikroalgleri büyük bir CO₂ absorplayıcısı yapmaktadır (Sudhakar, 2011).

Biyoenerji üretim amacı ile mikroalg yetiştiriciliğine ilgi 1950' lerde doğmuştur. Küresel petrol kaynağının 1970' lerde kesintiye uğraması ile birlikte, biyoenerji üretimi için yüksek verime sahip makroalglerin yetiştiriciliğine ilgi artmaya başlamıştır. Ötrofik sahil kıyılarında yüksek büyüme hızları sayesinde makroalgler biyoyakıt hammedesi olarak büyük bir ilgi görmüştür. Biyogaz üretimi için makroalgler anaerobik parçalanmaya maruz bırakılmak istenmiş ve gerekli biyokütle eldesi için kapsamlı deniz çiftlikleri planları yapılmıştır. Fakat ekonomik ve jeopolitik iklim koşulları, bu planların başarısız olmasına neden olmuştur. Deniz makroalglerinin anaerobik parçalanmasıyla ilgili sorunlarından bir diğeri ise polifenol, selülozik fiber ve lignin gibi bakterilerin parçalayamadığı, anaerobik parçalanmayı ve gaz üretimini limitleyen, dirençli bileşenleri içermesidir. Ayrıca, yüksek sülfid içeren bazı makroalg türlerinin de anaerobik parçalama prosesini inhibe ettiği de tespit edilmiştir. Makroalglerden biyoyakıt üretimi ile ilgili bir diğer sorun ise makroalglerin, türlerine göre mevsimsel olarak büyümelerindeki değişimdir (Golueke et al., 1957)

Mikroalgal biyokütleden biyoyakıt üretimi, diğer yakıtlarla rekabet edebilecek fiyatta ve kalitede üretim yapan ana endüstri haline gelebilmesi için önce bazı zorlukların üstesinden gelinmesi lazımdır. Mikroalglerin kullanması için gerekli olan nutrientler, hasat ve susuzlaştırma için gerekli yüksek enerji gereksinimi ve lipid ekstraksiyonu gibi biyoyakıt dönüşümünde gerekli olan enerji ihtiyacı, sanayinin karşılaştığı sorunların başında gelmektedir. Anaerobik çürütme, elde edilen biyogazın elektrik üretimi veya termal enerji üretiminde kullanımı ile üretim döngüsünün giderlerinin bazılarını ortadan kaldırmak için ikinci bir yol sunmaktadır. Buna ek olarak, anaerobik çürütme yoluyla biyokütleden değerli ürünleri kurtarma, algal biyoyakıt endüstrisinin sürdürülebilirliği için esastır.

Algal biyodizel operasyonlarının üretim verimliliği, içerdikleri lipid miktarına ve alglerin hücre büyüme oranına bağlıdır. Yapılan araştırmalar, alglerdeki yağ oranının % 2 den % 75' e kadar değişebileceğini göstermektedir (Mata et al., 2010). Fakat yüksek oranlarda bulunan lipidin gelişimi sınırlı besin durumunda, özellikle nitrat eksikliğinde, tetiklendiği görülmektedir. Stres zamanlarında, algler biyosentetik yollarını değiştirerek enerji ve karbon depolama amacıyla, sitoplazma içinde biriken bir yağ üretmektedirler. Buna triaçilgliserol denmektedir. Ancak, özel olarak stres koşullarında yetiştirilen alglerde hücre bölünmesi durmakta ve toplam yağ verimini azaltmaktadır. Algal biyodizelin aksine, anaerobik parçalama prosesleri lipid içeriğinden bağımsız bir şekilde metan açısından zengin biyogaz üretme yeteneğine sahiptir. Sialve ve arkadaşları (2009) anaerobik olarak parçalanan algal biyokütlelerin %2 ile 22 arasında değişen yağ oranının, teorik olarak 0.47 ile 0.80 m³ CH₄/kg VS arasında değişen metan verimine sahip olduğunu göstermiştir. Ancak, deneysel sonuçlar bu aralığın 0.17 ve 0.45 m³ CH₄/kg VS arasında değiştiğini göstermektedir. Deneysel veriler ve teorik hesaplamaların arasındaki farka rağmen, alglerden elde edilen metan verimliliğinin deneysel sonuçları domuz atıkları (0.19 m³ CH₄/kg VS), şeker pancarı (0.21 m³ CH₄/kg VS), atık su çamurları (0.23 m³ CH₄/kg VS) ve yonca otu (0.34 m³ CH₄/kg VS) ile karşılaştırılabilecek yeterliliktedir. Ayrıca anaerobik parçalama için geçerli substrat bileşenlerinin geniş aralığı, algal biyodizele kıyasla, algal biyogaza daha fazla işlevsel esneklik sağlamaktadır (Wiley, 2011).

2.4. Mikroalgler ve Anaerobik Parçalama

Makroalg, mikroalg ve siyanobakterilerin anaerobik parçalanması, geleceğin enerji üretim teknolojisi olarak tanımlanmaktadır. Türkiye gibi enerji üretimi pahalı ithal benzin ve kömüre bağlı olan ülkelerde, anaerobik proseslerle elde edilen yenilebilir enerji geri kazanımı büyük önem taşımaktadır. 1 m³ biyogazın sağladığı ısı miktarı 4700-5700 kcal/m³'dir. 1 m³ biyogaz; 0,62 litre gazyağı, 1,46 kg odun kömürü, 3,47 kg odun, 0,43 kg bütan gazı, 12,3 kg tezek ve 4,70 kWh elektrik enerjisi eşdeğerindedir. 1 m³ biyogaza 0,66 litre motorin, 0,75 litre benzin ve 0,25 m³ propan eşdeğer yakıt miktarlarıdır. Elektrik işleri etüt idaresi genel müdürlüğünün yaptığı hesaplamalarda, algler büyük miktarda biyogaz verimine sahiptir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Biyogaz kaynakları - Biyogaz verimi ve Metan oranı (Elektrik işleri etüt idaresi genel müdürlüğü, 2005)

Kaynak	Biyogaz Verimi (litre/kg UKM)	Metan Oranı (Hacim %si)
Sığır Gübresi	90-310	65
Kanatlı Gübresi	310-620	60
Domuz Gübresi	340-550	65-70
Buğday Samanı	200-300	50-60
Çavdar Samanı	200-300	59
Arpa Samanı	290-310	59
Mısır sapları ve atıkları	380-460	59
Keten ve Kenevir	360	59
Çimen	280-550	70
Sebze atıkları	330-360	Değişken
Ziraat atıkları	310-430	60-70
Dökülmüş ağaç yaprakları	210-290	58
Algler	420-500	63
Atık su çamuru	310-800	65-80

Mikroalgler büyük bir CO₂ absorplayicisi olmasının yanı sıra karasal bitkilerle kıyaslandığında, ekim alanlarına ihtiyaç yoktur; tüm yıla yayılabilen bir üretim olanağına sahiptirler, ve logaritmik üreme fazındaki ikiye katlanma süreleri 3,5 saate kadar kısalabilmektedir. Alan verimliliği olarak, mikroalgler

karasal bitkilerle kıyaslandığında, yıllık hektar başına 36.5 ile 183 ton gibi bir miktar vermektedir. Literatürde en yüksek mikroalgal biyokütle verimliliği 358 ton hektar yıl olarak belirtilmiştir (Pulz 2007). Karşılaştırma olarak, mısır, tatlı sorgum, ve şeker kamışı için sırasıyla hektar başına yıllık 13–24, 44 and 73–87 ton olarak rapor edilmiştir (Huber et al., 2006). Bu sonuçlar, anaerobik enerji üretimi için mikroalglerin rekabet gücünü göstermektedir.

Mikroalgal biyokütleden anaerobik parçalamayla ilgili ilk çalışma Golueke ve arkadaşları tarafından 1959 yılında yayınlanmıştır. Atıksu arıtma sürecinin bir parçası olarak yetişen *Chlorella vulgaris* ve *Scenedesmus sp.* türlerine anaerobik parçalama prosesi uygulamıştır. Literatürde bugüne kadar kaydedilen en yüksek metan üretimi, karışık tatlı su mikroalg karışımından elde edilmiştir. De Schamphelaire ve Verstraete (2009) tarafından yapılan bu çalışmada elde edilen biyogaz miktarı 600 mL g⁻¹ VS olarak saptanmıştır. (De Schamphelaire and Verstraete, 2009)

Çizelge 2.2 'de gösterilen veriler, bugüne kadar çeşitli mikroalg türleri üzerinde yapılan ve biyogaz üretimi için uygun bir işlem olarak görülen mikroalglerden gaz potansiyelini gösteren araştırmaların bir özetidir.

Çizelge 2.2 Bilimsel literatürde rapor edilmiş mikroalgal biyokütleden anaerobik parçalama ile metan üretimi.

Mikroalg türleri	Metan verimi	Referans
<i>Arthrospira maxima</i>	173 mL g ⁻¹ UKM	Inglesby, et al., 2012
<i>Arthrospira platensis</i>	481 mL g ⁻¹ UKM	Mussgnung et al., 2010
Mavi- yeşil algler	366 mL g ⁻¹ UKM	Rui, et al., 2009
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	587 mL g ⁻¹ UKM	Mussgnung et al., 2010
<i>Chlorella kessleri</i>	335 mL g ⁻¹ UKM	Mussgnung et al., 2010
<i>Chlorella sp.</i> , <i>Pseudokirchneriella sp.</i> ve <i>Chlamydomonas sp.</i>	0,28-0,60 m ³ /kg/UKM	De Schamphelaire ve Verstraete, 2009
<i>Chlorella sp.</i> , <i>Scenedesmus</i> , <i>Euglena</i> ve <i>Oscillatoria</i>	300-800 mL g ⁻¹ UKM	Golueke et al., 1959
<i>Chlorella sp.</i> , <i>Scenedesmus</i>	170-320 mL g ⁻¹ UKM	Golueke et al., 1957
<i>Chlorella sorokiniana</i>	212 mL g ⁻¹ UKM	Polakovičová et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	240 mL g ⁻¹ UKM	Ras et. al., 2011
<i>Chlorella vulgaris</i>	189 mL g ⁻¹ UKM	Polakovičová et

		al., 2012
<i>Dunaliella sp.</i>	440 mL g ⁻¹ UKM	Chen et al., 1987
<i>Dunaliella salina</i>	505 mL g ⁻¹ UKM	Mussgnung et al., 2010
<i>Durvillea antarctica</i>	492 mL g ⁻¹ UKM	Vergara-Fernandez et al., 2011
<i>Euglena gracilis</i>	485 mL g ⁻¹ UKM	Mussgnung et al., 2010
<i>Microcystis sp.</i>	70,33- 153,51 ml	Zeng, S.J. et al., 2010
<i>Nannochloropsis oculata</i>	204 mL g ⁻¹ UKM	Buxy,S et al., 2013
<i>Nannochloropsis salina</i> (yağ ekstraksiyonu yapılmış)	130 mL g ⁻¹ UKM	Park, S., Li, Y., 2012
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0,35 L g ⁻¹ KOİ	Zamalloa,C. et al., 2012
<i>Scenedesmus obliquus</i>	287 mL g ⁻¹ UKM	Mussgnung et al., 2010
<i>Scenedesmus obliquus</i>	240 mL g ⁻¹ UKM	Zamalloa,C. et al., 2012
<i>Scenedesmus sp.</i>	170 mL g ⁻¹ UKM	Gonzalez-Fernandez C.,et al.,2012
<i>Scenedesmus sp. ve Chlorella sp.</i>	143 mL g ⁻¹ UKM	Yen, H.W. , D.E. Brune, 2007
<i>Spirulina maxima</i>	320 mL g ⁻¹ UKM	Chen et al., 1987
<i>Spirulina platensis</i> UTEX1926	0,40 m ³ kg	Converti,A. et al., 2009,
Atıksuda büyümüş mikroalgal topluluk	497 mL g ⁻¹ TKM	Salerno, M. et al., 2009

2.4.1. Mikroalglerin Anaerobik Parçalanmasını Etkileyen Başlıca Faktörler

2.4.1.1 Hücre duvarı parçalanabilirliği

Selüloz, hemiselüloz ve pektinden oluşan karmaşık mikroalg hücre duvarı, bakteriler tarafından zor parçalanmakta, bu durum anaerobik parçalamanın fizibilitesi için biyokütle ön işlemini önemli bir adım yapmaktadır. Substratlara uygulanan fiziksel, kimyasal ve biyolojik ön işlemler, biyokütlenin anaerobik parçalanabilirliğini artırmaktadır.

Golueke et al. mikroalglerin anaerobik çürütücüde bozulmadan kalma yeteneğini göstermiştir (Golueke, 1957). Araştırmacılar mikroalg hücrelerinin etkili bir şekilde bakteri saldırılarına karşı direnç gösterdiğini ve çürütücüde 30 günlük hidrolik bekleme zamanının ardından çürütücü içerisinde zarar görmemiş mikroalg hücrelerinin bulunduğunu belirtmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada ise,

45 gün sonra çürütücünün içinde halen zarar görmemiş hücreler bulmuştur (Zhou, 2009). Anaerobik çürütücü içerisinde zarar görmeden en uzun süre kalan mikroalg hücreleri Mussnng et al tarafından bildirilmiştir. Çalışmalarında, 6 ayın ardından mikzotrofik çoğalmaya dönüşmüş olan canlı *Scenedesmus* hücreleri gözlenmiştir (Mussnng, et al., 2010)

Mussnng et al. tarafından yapılan çalışmada, anaerobik parçalama işlemindeki hücre duvarının rolü vurgulanmıştır (Mussnng, 2010). Elde ettikleri sonuçlar, yüksek miktarda gaz üretiminin, ya hücre duvarı olmayan ya da proteinden oluşan hücre duvarına sahip mikroalg türlerinden meydana geldiğini göstermektedir. Gaz üretiminin, yarı selüloz içeren karbonhidrat bazlı hücre duvarına sahip mikroalg türleri için azaldığı gözlenmiştir. En düşük gaz üretimi biyopolimer içeren sert hücre duvarına sahip *S. obliquus* türünden elde edilmiştir. *S.obliquus* 'ta hücre duvarı parçalanmasına hiç veya çok az rastlanmış ve substrat tarafından çok az bir gaz üretilmiştir. Yazarlar hücre duvarı parçalanmasının anaerobik parçalanma süresince üretilen gaz miktarıyla kuvvetli bir ilişkisinin olduğu yönünde bir sonuca varmıştır (Mussnng, et al.,2010).

Golueke ve Oswald, mikroalgal türlerinin termal limitlerinin üzerine çıkılarak hücre parçalanmasına neden olan bir ısı ön işlemi çalışmıştır (Golueke and Oswald, 1959). Daha sonra Chen ve Oswald, bu ön işleme ek olarak mikroalgal biyokütleyi farklı uzunluklarda sodyum hidroksit'e maruz bırakarak kimyasal ön işlem ile kombinlemişlerdir. Bütün sonuçlarda, ön işlemsiz biyokütlenin en düşük biyogaz verime sahip olduğu gözlenmiştir (Chen and Oswald, 1998). Mikroalgal biyokütleden en iyi sonuç, pH'ın sodyum hidroksit ile yükseltilmeden, 100 °C de 8 saat ısıya maruz bırakılmasıyla elde edilmiştir. Bu ön işlem, gaz verimini , ön işlemsiz mikroalgal biyokütleye kıyasla, %33 arttırmıştır. Bu çalışmada ayrıca çürütücüye eklenen ön işlemsiz mikroalgal biyokütlenin %60'nın, hücre duvarlarının parçalanabilirliğinin zorluğundan dolayı, parçalanmadan kaldığı belirtilmiştir (Chen and Oswald, 1998). Gonzalez-Fernandez et al.'ın yaptığı daha güncel bir çalışmada, *Scenedesmus* türüne uygulanan termal ön işlemin metan potansiyelini arttırdığı belirtilmiştir (Gonzalez et al., 2012a). Ön işlemsiz mikroalgal biyokütleye kıyasla, 70 °C de, %9'luk bir artış gözlenirken; 90 °C de %57'lik bir artış gözlemlenmiştir. Gonzalez-Fernandez et al.'ın yaptığı bir diğer çalışmada, organik yükleme hızının ve 90 °C de 1 saatlik termal ön işlemin etkisi incelenmiş, ve sırasıyla 1 ve 2.5 kg COD m⁻³ organik yükleme hızında 2.0 ve 3.4 kat metan üretiminde artış görülmüştür (Gonzalez et al.,2013). Yapılan bir diğer çalışmada ise, termal

hidroliz ile, metan veriminde %46 dan %62 ye kadar bir artış gözlenmiştir (Alzate et al., 2012). Bu verilere rağmen, De Schamphelaire ve Verstraete yaptıkları çalışmada, 80 °C de 2.5 saatlik termal ön işleme bırakılan *Chlorella*, *Pseudokirchneriella* ve *Chlamydomonas* karışık mikroalg türlerinden gaz artışı alamamışlardır (De Schamphelaire and Verstraete, 2009). Bu durum, yapılan her çalışmanın sonucunun türden türe farklılık gösterdiğini ispatlamaktadır.

Samson ve Leduy, ısı ve sodyum hidroksit ilaveli termo-kimyasal, mekanik ve ultrasonik parçalamalı ön işlem yöntemleri incelemiştir. Yazarlar, 50 °C de %20 substrat çözünürlüğü elde ederken, 150 °C de bu oranı %43 e çıkarmışlardır. Yaptıkları deneylerin sonuçları, ultrasonik ön işlemin 150 °C lik termal ön işlem ile benzer sonuçlar verdiğini göstermiştir. Ultrasonik ön işlem için harcanan zaman (10 dk), termal ön işlem ile harcanan zamanla (1 saat) kıyaslandığında, ultrasonik ön işleminin kısa uygulama süresinden dolayı daha avantajlı olduğu savunulmuştur. Hem Paris ve Oswald hem de Samson ve Leduy, eklenen sodyum hidroksitin mikroalgal biyokütlenin anaerobik parçalanması için verimsiz olduğunu belirtmiştir. (Samson and Leduy, 1983)

Gonzalez-Fernandez et al. mikroalgal biyokütle üzerinde sonikasyon ön işleminin etkisini incelemiştir. Farklı güç seviyelerinde 20 Hzlik frekanslarda ön işleme maruz bırakmış tüm mikroalglerin metan üretiminde artış gözlemlenmiştir. Ön işlemsiz mikroalgal biyokütleyle kıyasla, toplamda biyoparçalanabilirlikte %44 lük bir artış rapor edilmiştir (Gonzalez-Fernandez, 2012b).

Samson ve Leduy, alternatif bir ön işlem olan, biyokütlenin dondurulmasının mikroalgler üzerinde etkisini incelemiştir. Bu çalışma ile çözünürlükte %26 lık bir artış olduğunu belirtmiştir (Samson and Leduy, 1983). Bu durum, mikroalglerin hücre duvarlarının buz kristalleri tarafından zarar görmesinden kaynaklanmaktadır.

Keymer et al., yüksek basınçta termal hidroliz ön işlemi uygulamıştır (160 °C de 6 bar basınç). 20-30 dakikalık prosesin sonunda, basınç yavaşça düşürülmüş ve basınç farkı hücrelerin parçalanarak hücre içeriklerini bırakmasına neden olmuştur (Keymer et al., 2013)

Silva (2014)'de yaptığı bir çalışmada; mikrodalga, sonikasyon, ve otoklav ile ön işlemlere maruz bırakılmış mikroalglerin biyoenerji verimini

kıyaslanmış ve en yüksek verimin sırası ile mikrodalga, otoklav ve sonikasyon ön işleminden sağlandığını belirtmiştir.

Mikroalglerin metan potansiyelini artırmak için kullanılan çeşitli mekanik, fiziksel, termal ve kimyasal yöntemler yüksek enerji gereksinimlerine sahiptir. Bazı yazarlar, mikroalg biyokütlesine yapılan ön işlem için harcanan enerji tüketiminin, mikroalgal biyokütleden elde edilen enerjiye eşit ya da daha yüksek olduğunu belirtmiştir (Lakaniemi et al., 2013; Lee et al., 2012)

Yen ve Brune, yaptığı araştırmalarda ön işlem ile kullanılan enerjinin, CH₄ artışından gelecek enerjiden daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Kullanılan ön işlemin aslında 0 faydaya sahip olduğunu belirterek, algal biyokütleden biyogaz eldesi için kalın hücre duvarı içermeyen mikroalglerin kullanılmasını önermiştir (Yen and Brune, 2007).

2.4.1.2 Karbon / Azot oranı (C/N)

Anaerobik bakteriler karbonu enerji elde edebilmek için kullanmaktadır. Azot ise bakterilerin büyümesi ve çoğalması için gerekli olan diğer bir maddedir. Ortamdaki C/N yüksek ise, hızla tüketilerek bakterilerin verimini düşürmekte ,ve gaz çıkışını yavaşlatmaktadır. C/N düşük ise, azot amonyak olarak açığa çıkarak pH'ı yükseltmekte ve toksik etki yaratmaktadır. C/N oranının 20'nin altında olması durumunda, anaerobik bakteri topluluğunda karbon ve azot gereksinimleri açısından bir dengesizlik oluşmaktadır (Sialve et al., 2009). Bu dengesizlik, parçalanma sırasında amonyak forumunda azot salınımına neden olmakta, bu durum ise metajonik bakteriler için engelleyici bir ortam yaratarak uçucu yağ asitlerinin çürütücü içerisinde birikimine neden olmaktadır (Sialve et al., 2009).

Düşük C/N oranlarının yarattığı sorunu aşmak için, bazı araştırmacılar birlikte-sindirme (co-digestion) yöntemini kullanmaktadır. Bu yöntem ile, mikroalgal biyokütle çürütücüye bazı diğer atık sular veya biyokütleler ile eklenerek, C/N oranını arttırmaktadır. Saxena et al., yeşil ipliksi mikroalg biyokütlesi ile inek gübresi takviyeli su sümbülünün birlikte-sindirilmesi ile metan üretiminde artış gözlemiştir (Saxena et al., 1984).

Ramamoorthy ve Sulochana (1989), *Zygogonium* türüne çeşitli miktarlarda eklenen inek gübresinin etkisini incelemiştir. Shuchuan et al , mavi yeşil alg ile mısır sapının birlikte parçalanması ile metan miktarında önemli bir

artış olduğunu belirtmiştir. Samson ve Leduy, kanalizasyon çamuru ile *Spirulina maxima*'nın yarı yarıya karıştırılması ile 2 kat gaz artışı gözlemlemiştir (Samson ve Leduy , 1983). Yaun et al. kentsel atıksu katıları ile sırasıyla *Chlorella sp.* ve *Spirulina platensis* türlerini birlikte-sindirme yapmış ve metan potansiyelinde artış olduğunu belirtmiştir (Yuan et al., 2012).

Salerno et al. tarafından yapılan başka bir çalışmada, kentsel atıksuda büyümüş mikroalg ile soya yağının birlikte-sindirilmesi gaz miktarında artış sağlamıştır (Salerno et al., 2009).

Yen ve Brune (2007), *Scenedesmus* ve *Chlorella* türlerinin karışımının C/N oranını arttırmak için kağıt atığının eklenmesinin başarılı bir yöntem olduğunu belirtmiştir. Yaptıkları çalışmada, kağıt atığının eklenmesiyle C/N oranının 6.7 den 36.4 e çıkmaktadır. Bu deneyde en iyi sonuç %50 kağıt atığı, %50 mikroalgal biyokütle karışımından elde edilmiştir. Bu kombinasyonun C/N oranı 18 iken, günlük biyogaz üretimi 1170 ± 75 mL/gün olarak gözlenmiştir. Sadece mikroalg içeren anaerobik parçalamadan elde edilen 573 ± 28 mL/gün sonucuna kıyasla, atık kağıt eklenmesi, gaz üretiminde %50 bir artış sağlamıştır. Yen ve Brune, anaerobik parçalama için en iyi C/N oranının 20:1 ve 25:1 arasında değiştiği sonucuna varmıştır (Yen and Brune, 2007). Bu sonuçlar Parkin ve Owen'nin en iyi C/N oranının 20:1 ile 30:1 arasında değiştiğini belirttiği çalışma ile de uyumaktadır (Parkin and Owen, 1986).

Yen ve Brune artan C/N oranının, toplam amonyak-azot inhibasyonunun azalttığını belirtmiştir (Yen and Brune, 2007). Ehimen et al., C/N oranının 15 ve altında olması durumunda serbest amonyak-azot birikmesine neden olarak anaerobik parçalama prosesine olumsuz etki yapabileceğini belirtmiştir (Ehimen et al. 2009). Deneyde kullanılan aşırı yüksek C/N oranı (36,4:1) ise yüksek uçucu yağ asit konsantrasyonlarına neden olarak anaerobik parçalamayı durdurabilmektedir. Yüksek C/N oranında, toplam amonyak-azot konsantrasyonu, anaerobik mikroorganizmaların ihtiyaçları için çok az kalmaktadır. Amonyak formunda nitrojenin minimum konsantrasyonunun, anaerobik parçalamada bakteri topluluğunun gereksinimleri için 50 ile 200 mg/L arasında değişmesi gerektiği belirtilmiştir (Parkin and Owen, 1986; Chen et al.,2008).

2.4.1.3 Amonyak- azot Toksisitesi

Amonyak-azot daha çok protein ve üre şeklinde, azotlu maddenin biyolojik parçalanması ile elde edilir (Chen, et al., 2008). Mikroalglerde bulunan yüksek azot ve protein düzeyleri, anaerobik parçalanma sırasında amonyak-azotunun açığa çıkmasına yol açabilir. İyonize olmamış amonyak ($\text{NH}_3\text{-N}$) ve amonyak ($\text{NH}_4\text{-N}$)-azot arasındaki denge, anaerobik çürütücü içindeki pH yada sıcaklık değişiminden etkilenebilir. Sıcaklık ya da artışı, dengenin daha toksik olan iyonize olmamış amonyum-azotuna kaymasıyla ($\text{NH}_3\text{-N}$) bakteri konsorsiyumuna zarar verebilir (Sialve et al., 2009). Amonyak toksisitesi metan bakterilerini 2 yolla etkilediği belirtilmiştir:

Amonyum iyonu doğrudan metan sentezleme enzimini inhibe edebilir veya hidrofobik amonyak azotu molekülü proton dengesizliği veya potasyum eksikliğine neden olarak pasif olarak hücre içine nüfuz edebilir (Sialve et al., 2009).

Amonyak azotu yüksek seviyelerde toksiktir ve 1500-3000 mg / L arasında orta derecede inhibe bir etkiye sahiptir. 3000 mg / L üstünde, amonyum azotunun yarattığı inhibasyon etkisiye gaz üretiminde bir düşüşe yol açabilir (Parkin, and Owen, 1986). Çürütücüde bulunan metajonik suşlar arasında (örneğin: *Methanospirillum hungatei*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, ve *Methanobacterium formicicum*), *M. hungatei* türü amonyak-azot miktarına en hassas suş olarak belirtilmiştir. Bu türde inhibasyon 4200 mg/L de gözlemlenirken, diğer 3 suшта inhibasyon 10,000 mg/L'ye kadar gözlemlenmemiştir (Jarrell et al., 1987).

Metanojenler tarafından uçucu yağ asitlerinin kullanımı, sindirim stabilitesini korumak için hidrolitik ve asetojenik bakterilerinin ürettiği uçucu yağlı asitleri ile dengelenmek zorundadır. Bu nedenle verimli çürütücü performansı, amonyak-azot konsantrasyonunun, birbiriyle ilişkili bakterilerin parçalama yapabilmesi için inhibasyon limitlerinin altında kalmasına bağlıdır (Kayhaniyan, 1994).

2.4.1.4. Sülfür Toksisitesi

Tatlı su mikroalgleri düşük seviyede kükürtlenmiş amino asit içerdiği için, parçalanmaları sırasında diğer substratlara kıyasla daha düşük hidrojen

sülfid salınımı olur (Sialve et al., 2009). Biyogazın içinde bulunan hidrojen sülfid, korozyon etki yaratarak, gaz motorunun güç jeneratörleri ve boruları gibi yerlerine zarar verebilmektedir. Sülfid dışında, sülfür bileşikleri yüksek konsantrasyonlarda olmadıkları sürece anaerobik bakterilere zararlı değildir. Sülfid ise, bakterilerin hücre metabolizması için düşük konsantrasyonlarda gereklidir, ancak 200 mg/L ve daha yüksek konsantrasyonlarda metan bakteri için son derece zehirli olmaktadır (Parkin and Owen, 1986). Ayrıca, iyonize olmamış amonyak-azot gibi, iyonize olmamış sülfid de, iyonize olmuş sülfitten çok daha fazla toksiktir. İki bileşiğin arasındaki bağ, pH ve sıcaklığa bağlıdır (Parkin and Owen, 1986).

Sülfat indirgeyici bakteriler, ortamdaki asetat ve hidrojen için metan bakterileri ile rekabet halindedir. Sülfat indirgeyici bakteriler, asetat için metanojenlerden daha yüksek afiniteye sahiptir ve düşük asetat konsantrasyonlarında üstün gelmektedirler (Bitton, 1994). Sülfat indirgeyiciler ve metanojenler COD/SO₄ oranının 1,7 ile 2,7 arasında olduğunda rekabet haline girerler. Bu oranın artışı, metanojenlere bir avantaj sağlarken; düşüşü ise sülfat indirgeyicilerine avantaj sağlamaktadır (Bitton, 1994). Aspe ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma, metan fermentasyon inhibasyonun COD/SO₄ oranın 0,5 ten az olduğu zamanlarda olduğunu göstermiştir (Aspe et al., 1997).

2.5 Atıksu Akımında Yetişen Mikroalgler

Mikroalglerin büyümesi için ihtiyaç duyduğu besinler, mikroalgal biyokütle üretimi için en pahalı etkidir. Mikroalgal biyokütle üretimi için yüksek miktarda azot ve fosfora ihtiyaç vardır. Lyovo ve arkadaşları (Lyovo, 2010), CO_{0.48}H_{1.83}N_{0.11}P_{0.01} kompozisyonuna sahip mikroalg biyokütlesinin 1 tona ulaşması için 45 kg azota ihtiyacı olduğunu belirtmiştir. Bu stokiometrik ilişki analiz edildiğinde, fosfor azot oranı 11:1 olarak tespit edilmektedir. Bu orana göre, her ton algal biyokütle için fosfor ihtiyacının yaklaşık 4 kg olduğu ortaya çıkmaktadır. Bugüne kadar algal biyoyakıt ham maddeleri üretmek için tasarlanmış çok sayıda alg yetiştirme sistemleri önerilmiştir. Örneğin açık havuzlar, çeşitli fotobiyoreaktörler, ve raceway havuzları gibi, fakat günümüzde, biyoyakıt elde etmek için minimum çevresel etki ile algal biyokütle üretmenin en ekonomik yolunun atık su arıtma havuzları olduğu belirtilmiştir (Dalrymple et al., 2013).

Woertz et al. (2009), çeşitli mikroalg cinslerinin doğal karışık kültürünün atıksu arıtma işlemleri sırasında meydana gelebileceğini belirtmiş ve

atıksu arıtma sistemlerinde en baskın cinslerin *Chlorella*, *Micractinium* ve *Actinastrum* olduğunu rapor etmiştir.

Algal biyokütlenin üretimi için ucuz besin kaynakları olarak atıksular kullanılsa da, en yüksek verimde mikroalg üretimi atık suyun karakteri, alglerin orjinal yaşam alanları ya da yetiştirme ortam koşulları gibi şartlara göre değişmektedir. Algler, kanalizasyon, hayvancılık atıkları, tarımsal-endüstriyel atıklar ve endüstriyel atıkları gibi bir çok atıkta çoğalabilmektedir. Bunlara ek olarak, domuz atıkları, gıda proses fabrikaları atıkları ve diğer tarımsal atıklarında da alg sistemleri ile çalışılmıştır (Raouf, 2008).

Çizelge 2.3 Literatürde mikroalg üretimi için kullanılan atıksu türleri ve teorik algal biyokütle miktarları (Christenson, 2011).

Atıksu türü	Azot ^a (mg l ⁻¹)	Fosfor ^b (mg l ⁻¹)	Teorik algal biyokütle miktarı (g) ^{c,d}
Evsel atıksu (Zayıf)	20 ^e	4	0.3
Evsel atıksu (Orta)	40 ^e	8	0.6
Evsel atıksu (Güçlü)	85 ^e	15	1.4
Sığır besi (feedlot) atıksuyu	63	14	1.0
Süt ürünleri atıksuyu	185	30	2.9
Kümes hayvanları besi atıksuyu	802	50	5.7
Kahve üretimi atıksuyu	85	38 ^f	1.3
Kola fabrikası atıksuyu	757	0.5 ^f	0.1
Damıtım atıksuyu	2700 ^e	680 ^f	42.8
Kağıt fabrikası atıksuyu	11 ^e	0.6	0.1
Dericilik atıksuyu	273	21 ^f	2.4
Tekstil atıksuyu	90	18	1.4
Şarapçılık atıksuyu	110	52	1.7

^aToplam Kjeldahl azot, ^bToplam fosfor, ^c C₁₀₆H₁₈₁O₄₅N₁₆P formulu baz alınarak

^d 1 litre atıksudaki azot ve fosfor baz alınarak, ^e Toplam azot,

^f Fosfat formunda (PO₄-P)

About-Shanab et al. (2013), yaptıkları çalışmada, 6 farklı mikroalg türünün büyümesine domuz ahır atıksuyunun etkisini incelemiş, ve bu atıksuyun düşük azot ve fosfor içeriğine rağmen, mikroalgal biyoküttelede bir artış

gözlemlemiştir. Wang et.al yaptığı çalışmada ise, aynı atıksuyun farklı işlemler yerlerinden alınan bölgelerin mikroalg büyümesine olan önemini göstermiştir. Bu çalışmada, yerel atıksuların dört farklı noktasından alınan atıksu örneklerinde *Chlorella sp.*'nin büyümeye olan etkisi incelenmiştir. Sonuçlar, besin açısından zengin konsantre (centrate) atıksuyunun mikroalg yetiştirilmesi için en uygun atıksu alım noktası olduğu belirlenmiştir (Wang, 2010). Lee et.al (2012) yaptığı çalışmada ise konsantre atıksuya otoklav ön işlemi yaparak, ön işlemsiz atıksu ve sentetik ortam ile karşılaştırma yapmıştır. 14 günlük çalışmanın sonucunda, algal büyüme veriminin, ön işlemlili ve ön işlemsiz atıksuda, sentetik ortama kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Franchino et al. (2013), sığır çamur ve ham peynir altı suyunun anaerobik çürütülmesinden sonra oluşan sıvıda, 3 farklı alg türünün büyümesini incelemiştir. Atıksular belirli oranlarda seyreltilerek, mikroalgler için büyüme ortamı olarak kullanılmıştır. Sonuçlar, tüm türlerde 1:10 seyreltmenin en yüksek büyüme hızına neden olduğunu göstermiştir (Franchino et al., 2013).

Atıksuda büyüyen türler, atık suyun karakteri, alglerin orijinal yaşam alanları ya da arıtma sisteminin iklim koşulları gibi değişik faktörlere göre değişmektedir . Bazı durumlarda, çeşitli mikroalg kültürlerinin kendiliğinden meydana gelmektedir. Bu nedenle, çeşitli atıksu akımlarından izole edilebilecek mikroalgler/siyanobakteriler, yeni suşlar seçmek için ya da az bilinen türler ile ilgili araştırma yapmak için çok faydalı bir alandır.

Sonuç olarak, yapılan çalışmalar baz alındığında, mikroalgal biyokütleden biyogaz üretiminin, diğer hammaddelerle rekabet edebilecek potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Bu amaçla, bu çalışmada, maya atıksuyunda ötrofikasyon ile üreyen mikroalgal biyokütlenin aynı fabrikanın maya çamuruna katılmasıyla, biyogaz miktarına olan etkisi incelenmiştir.

3.MATERYAL VE METOT

3.1. Biyokütle tayini

Çalışmanın başlangıç aşamasında ön denemelerde Ege Üniversitesi Mikroalg Kültür Koleksiyonu EGEMACC38 no' lu *Spirulina platensis* örnekleri kullanılmıştır. *S. platensis* kültürleri, (Ege-MACC) Ege üniversitesi – özel sektör işbirliği ile kurulmuş bir şirket olan EGERT pilot tesislerinde üretilmiş ve kurutularak toz haline getirilmiştir. Karışık mikroalg türleri ise, Pakmaya maya fabrikasının son arıtma havuzunda ötrofikasyon sonucu üreyen doğal karışık kültürden toplanmış ve izole edilmiştir. Mikroalgin izole edildiği maya atıksuyunun KOİ'si 7000-8000 mg/l, pH'ı 5,5-6,5 , VFA'sı 2000-3000 mg/l, sülfatı 500-1000 mg/l, toplam Kjeldahl azotu 300-500 mg/l, ve toplam amonyak azotu total (TAN) 100-300 mg/l 'dir.

Işık mikroskopunda morfolojik analizlere dayanarak türler; *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. ve *Oscillatoria* sp. olarak belirlenmiştir. Biyokütle arttırımı için, karışık mikroalgler BG-11 ortamında üretilmiş ve atıksudan izole edilen mikroalgler laboratuvar ortamına uyumlu suşlar haline getirilerek sabit bir karakterizasyon kazandırılmıştır.

3.1.1 *Spirulina platensis*

Spirulina platensis ipliksi, spiral yapıya sahip, sodalı göl ve göletlerde yetişebilen siyanobakterilerdir. %50 den fazla protein içeriği, *Spirulina platensis'* i (= *Arthrospira*), en fazla kültürü yapılan, kozmetikte, tıpta, insan ve hayvan gıdası olarak çeşitli sanayi alanlarında yaygın olarak kullanılan bir tür yapmıştır. Hücre duvarının % 86'sı sindirilebilir polisakkaritten oluşması, anaerobik sistemler için de bir avantaj yaratmaktadır (Yılmaz ve Duru, 2011).

Çizelge 3.1 *Spirulina platensis* organik hücre içeriği (Tornabene, 1985)

Protein (%)	Yağ (%)	Karbonhidrat (%)
50	16.6	8.8



Şekil 3.1 *Spirulina platensis*, ışık mikroskobu görüntüsü, 40x

3.1.2. *Oscillatoria sp.*

Mavi-yeşil algler içerisinde bulunan *Spirulina sp.* gibi, *Oscillatoria sp.* de hızlı gelişen siyanobakteriyel cinslerden biridir, ve ismini yaptığı osilasyon hareketinden alır. İçerdiği pigmentler, yağ asitleri, karbonhidratlar, proteinler ve diğer birçok değerli bileşikler üretilmeleri nedeniyle çeşitli çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır (Yılmaz ve Duru, 2011).

Çizelge 3.2 *Oscillatoria sp.*'nin organik hücre içeriği (Nagle et al., 2010)

Protein (%)	Yağ (%)	Karbonhidrat (%)
50.96	11.3	28.82



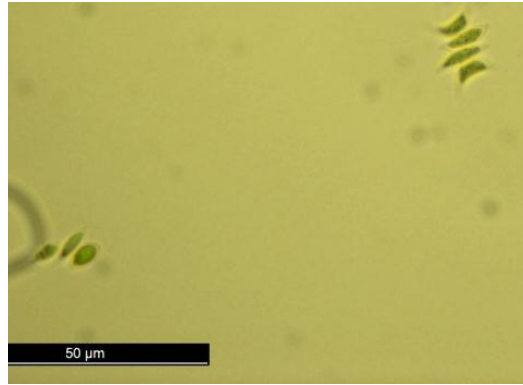
Şekil 3.2 *Oscillatoria sp.*, ışık mikroskobu görüntüsü, 63x

3.1.3. *Scenedesmus sp.*

Scenedesmus sp. , tatlı su alglerinin en sık görülen cinslerinden biridir. 2' nin katlarında koloni oluşturabilen, mikroskobik, yeşil alg cinsidir. *Scenedesmus sp.*' nin yağ içeriği, genellikle biyodizel hammaddesi olarak kullanılmasını sağlamıştır (Violeta Makarevičienė, V. 2011).

Çizelge 3.3 *Scenedesmus sp.* organik hücre içeriği (Yeterli azot varlığında, tatlı suda) (Tadros, G.M. 1985)

Protein (%)	Yağ (%)	Karbonhidrat (%)
30.2	20.3	29.8



Şekil 3.3 *Scenedesmus sp.*, ışık mikroskobu görüntüsü, 63x

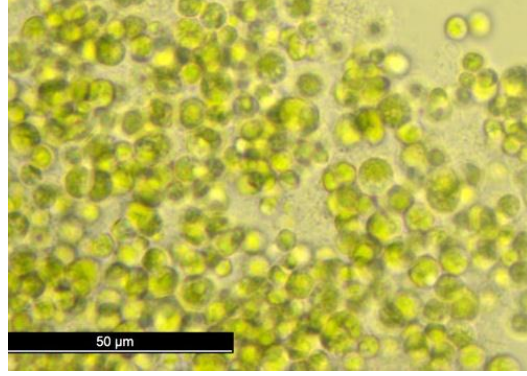
3.1.4. *Chlorella sp.*

Chlorella sp., tek hücreli bir yeşil alg cinsidir. Küresel şekilde, 2-10 µm çapa sahip, flagellasız bir türdür. *Chlorella sp.*, kloroplastlarında yeşil fotosentetik pigmentler içermektedir (klorofil-a ve -b). Biyokimyasal hücre içeriği ve fotosentez verimliliğinden dolayı (teorik olarak % 8), şeker kamışı gibi diğer yüksek verimli bitkiler ile karşılaştırılabilir bir potansiyele sahiptir. Bu durum *Chlorella sp.*'yi alternatif bir gıda ve enerji kaynağı olarak dikkat çeken bir tür yapmaktadır (Zelitch, I. 1971). Ancak, 1960 yıllarında bilim adamları tarafından yapılan çalışmalarda, *Chlorella sp.*' nin barındırdıkları sert hücre

duvarlarından dolayı insanlar ve diğer hayvanlar tarafından sindirilmesinin neredeyse imkansız olduğu belirtilmiştir (Belasco, W. 1997)

Çizelge 3.4 *Chlorella* sp. içeriği (Yeterli azot varlığında, tatlı suda) (Tadros, M. 1985)

Protein (%)	Yağ (%)	Karbonhidrat (%)
51.2	15.3	12.3



Şekil 3.4 *Chlorella* sp., ışık mikroskobu görüntüsü, 63x

3.2.Kültür Ortamları

Karışık mikroalg kültürleri için Blue-Green algae (BG-11) kültür ortamları distile su ile hazırlanarak otoklavda 121 °C' de 20 dakika boyunca steril edilmiştir. İstenilen biyokütle elde edilene kadar karışık kültür BG-11 de saklanmıştır.

Çizelge 3.5 BG-11 ortamının kompozisyonu

	Kimyasalın adı	g/1000 mL distile su
1	NaNO ₃	150
2	K ₂ HPO ₄	4
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,5
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	3,6
5	Sitrik asit	0,6
6	Ferrik Amonyum Sülfat	0,6
7	EDTA (disodyum tuzu)	0,1
8	NaCO ₃	2
9	İz Metal Çözeltisi (A5+ Co)	g/1000 mL distile su
	H ₃ BO ₃	2,86
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,222
	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,39
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,079
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,0494

3.3 Kültürlerin hazırlanması

BG-11 kültür ortamları cam şişelerde otoklavlanarak steril edilmiştir. Maya atık su arıtma tesisinin son havuzundan alınan karışık kültürler önce BG-11 agara ekilerek 1 hafta boyunca beklenmiştir. Türler agar üzerinde kolonileştikten sonra, saflaştırılmak üzere, cam tüplerde inkübasyona bırakılmıştır. 7 gün sonunda 300 mL' lik erlenlere ekim yapılarak, hacim arttırılmış, ve 1 L' lik şişelerde *Scenedesmus* sp. ve *Chlorella* sp. üretimi için aşı kültürü hazırlanmıştır. *Oscillatoria* sp. türü ipliksi bir yapıya sahip olduğu için, homojen hücre süspansiyonu sağlanamamaktadır. Bu yüzden optik yoğunluk ve hücre sayımına uygun olmamasından dolayı, büyüme eğrisi belirlenememiş, 5 ve 10 litrelik cam şişelere alınarak biyokütle üretimi için büyümeye bırakılmıştır (Şekil 3.5)



Şekil 3.5 Karışık mikroalg aşı kültürlerinin hazırlanması: 1-BG-11 agara ekim, 2- Cam tüplere ekim, 3- 300 mL erlenlerde inkübasyon, 4- 5L şişelere hacim arttırılması, 5- 10L şişelerde üretim, 6- Torba üretim (30L)

Aşı kültürleri ve karışık mikroalg biyokütlesi üretimleri $24 \pm 2^\circ \text{C}$ inkübasyon kabinlerinde sürekli ışık (24 saat aydınlık) ve sıcaklık ayarları sürekli kontrol altında inkübe edilmiştir. Işık kaynağı olarak Philips marka (18W/54) floresan lambalar kullanılmış ve ışık miktarı $27 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sn}$ olacak şekilde şişelerin etrafına yerleştirilmiştir.

Scenedesmus sp. ve *Chlorella* sp. türlerinin büyüme eğrilerinin belirlenmesi için 1' lik havalandırılmalı şişelerin ağzı, oluşabilecek kontaminasyon ve buharlaşmayı önlemek amacıyla pamuk ile kapatılarak alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Şişeler 121°C ' de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra, 7 gün inokulasyona bırakılmış aşı kültürlerinden, 1' lik hacimde üretim şişelerine 1:5 (h/h) oranında ekim yapılmıştır. 21 gün boyunca, büyüme eğrisi oluşturma için optik yoğunluk, hücre sayımı, ve klorofil-a tayini analizleri yapılmıştır. *Scenedesmus* sp. ve *Chlorella* sp. için oluşturulmuş aşı kültürleri, 5 ve 10 litrelik şişelere alınarak biyokütle eldesi için büyümeye bırakılmıştır.

3.4. Gen Analizi

İzole edilen mikroalg türlerinden, ZRFungal/Bacterial DNA kiti ile genomik DNA izolasyonu yapılmıştır.

50- 100 mg (yaş örnek) mikroalg hücresi, 200 μl su veya izotonik tampon (örneğin; PBS) ZR BashingBead™ Lysis Tube içerisine içerisinde çözülerek, üzerine 750 μl Lizis Solusyonu eklenmiştir. Tüpler maksimum hızda 5 dak. vorteksenerek , hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. ZR BashingBead™

Lysis Tüpü $\geq 10,000 \times g$ 1 dak. santrifüjlenmiştir. Daha sonra 400 μ l süpernatant Zymo-Spin™ IV Spin Filter (turuncu kapaklı) kolletör tüpe aktararak 7,000 rpm 1 dak santrifüj yapılarak, kolektör tübe ilave edilmiştir. Zymo-Spin™ IIC Column kolektör tüpü içerisine yerleştirilerek, 800 μ l karışımdan ilave edilmiştir. 10,000 $\times g$ 1 dak. santrifüj edildikten sonra, kolektör tüpündeki sıvı uzaklaştırılarak, işlem tekrar edilmiştir.

Zymo-Spin™ IIC Column yeni kolektör tüpü içerisine yerleştirilerek, filtre üzerine 200 μ l DNA Pre-Wash Tamponu ilave edilmiştir ve 10,000 $\times g$ 1 dak santrifüjlendikten sonra 500 μ l Fungal/Bacterial DNA Wash Tamponu ilave edilerek, tekrar aynı şekilde santrifüjlenmiştir. Daha sonra Zymo-Spin™ IIC Column 1,5 ml ependorf içerisine dikkatlice yerleştirilerek, üzerine 100 μ l DNA Elution Tamponu ilave edilmiştir ve 10,000 $\times g$ 30 saniye santrifüjlenerek filtrede tutulan DNA toplanmıştır.

Bu üç yöntem ile elde edilen DNA'lar agaroz jel elektroforezi yöntemiyle (Yatay Elektroforezi (Scie-Plas), Güç Kaynağı (Consort EV265) gözlenmiştir. Jel elektroforezi için %1 'lik agaroz jel hazırlanmış ve örnekler 80 V, 35 mA ve 3 W'da 1 saat yürütülmüştür (Şekil 3.4).

Daha sonra syber safe ile boyanan jel UV transiliminatör yardımıyla görüntülenmiştir (Şekil 3.5).

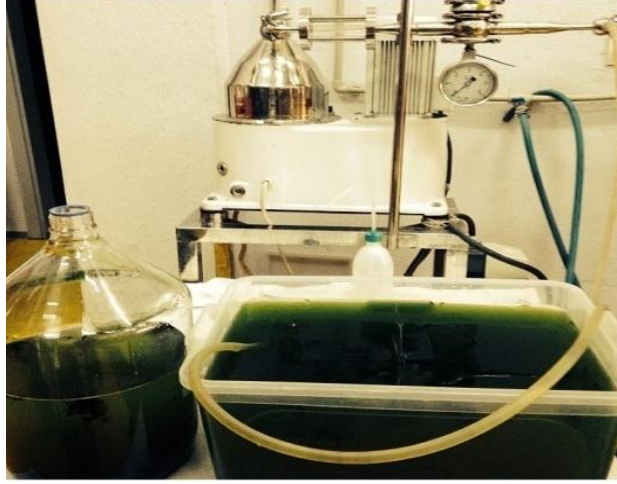


Şekil 3.6 Agaroz jel elektroforezi

PCR sonuçlarının dizi analizi REF-GEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti tarafından yapılmıştır. Sonuçlar NCBI-Blast programı yardımıyla değerlendirilmiştir.

3.5 Mikroalglerin hasat edilmesi

5 ve 10 litrelik cam şişelerde üretilen karışık mikroalgler, çanak tipi separatör ile 10 000 rpm de santrifüj edilmiştir. Elde edilen mikroalg biyokütlesi -20 °C' de dondurularak liyofilizatörde kurutulmuş, ön işlem için +4 °C' de saklanmıştır.



Şekil 3.7 Çanak tipi separatör

3.6 Büyüme Grafiklerinin Elde Edilmesi

Tüm analizler 2 tekrarlı olarak yapılacak şekilde 21 gün boyunca *Chlorella* sp. ve *Scenedesmus* sp. kültürlerinden 5 mL örnek alınarak optik yoğunluk ölçümü, klorofil-a tayini, ve hücre sayımı yapılarak kültürlerin canlılığı kontrol edilerek büyüme grafikleri hazırlanmıştır.

3.6.1. Optik yoğunluk ölçümü

Mikroalglerin hücre yoğunluklarının ölçümü Ultrospec pro 1100 UV/Visible spektrofotometre cihazı kullanılarak yapılmıştır. 18 gün boyunca mikroalg kültürlerinden alınan örnekler 680 nm'de optik yoğunlukları ölçülmüştür.

3.6.2. Klorofil-a tayini

Optik yoğunluğa dayalı yöntemlerle hücre sayısının belirlenmesinde pek çok hata kaynağı olabilmektedir. Kültürün aksenik olmaması ya da sterilliğin

bozulması gibi etkenler optik yoğunluğun farklı değerlerde ölçülmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle optik yoğunluk analizinin doğrulanması için klorofil-a tayini yapılmıştır.

Scenedesmus sp. ve *Chlorella* sp.'den 2,5 mL alınan örnek 0,45 µm' lik filtre kağıdından vakum pompası yardımı ile filtre edildikten sonra (Şekil 3.8), 15 mL' lik santrifüj tüpüne alınmıştır. Üzerlerine 2,5 mL %100'lük metanol eklenerek 5 dakika boyunca 80 °C'de su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilen tüplerden alınan sıvı, spektrofotometre küvetine dökülerek 665 nm ve 750 nm' deki absorbanları ölçülmüştür.

Klorofil-a miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

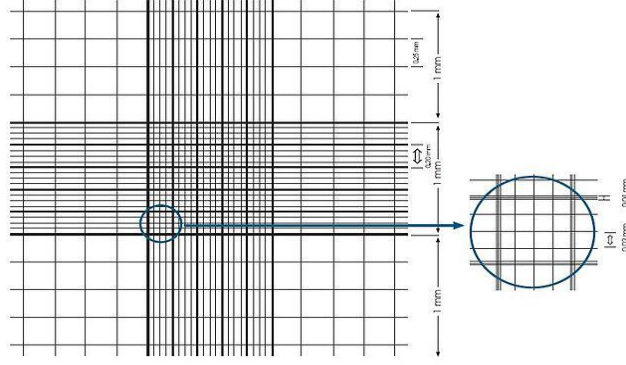
$$\text{Klorofil-a miktarı (mg/mL)} = (\text{Absorbans}_{665} - \text{Absorbans}_{750}) \times 13,9$$



Şekil 3.8 0,45 µm' lik filtre kağıdından vakum pompası yardımı ile filtrasyon

3.6.3. Mikroskopik hücre sayımı

Mikroskopik hücre sayımı Neubauer kamarası kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.9). 200 µL örnek pipet yardımıyla alınarak, kamaraya doldurulmuştur. İlerleyen günlerde artan hücre yoğunluğu ile, örnek belirli oranlarda seyreltilerek sayım gerçekleştirilmiştir. Kamarada belirlenen 16 küçük karenin oluşturduğu 1 büyük karedeki hücreler sayılıp, çıkan sayının 10^{-4} ile çarpılmasıyla mL'deki hücre sayısı hesaplanmıştır (h/mL).



Şekil 3.9 Neubauer Sayım kamarası (9×10^{-4} ml)

3.7. Safılaştırılan mikroalg türlerinin biyokimyasal kompozisyonunu belirlenmesi

Atık su arıtma tesisinden izole edilen türlerin, BG-11 kültür suşuna dönüştürüldükten sonra yağ- şeker- protein içeriklerine bakılmıştır.

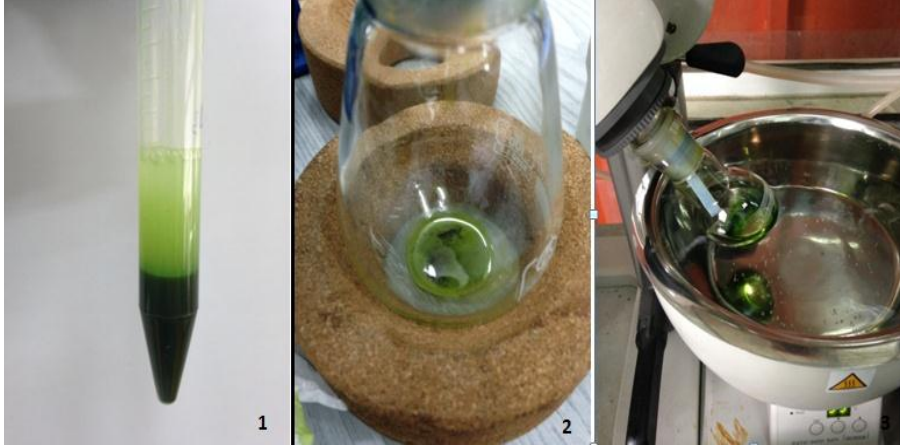
3.7.1. Modifiye Bligh and Dyer yöntemiyle yağ analizi

Toplam yağ, liyofilize edilmiş mikroalg biyokütlesinden modifiye Bligh and Dyer methodu ile ekstre edilmiştir (Bligh,1959). Dondurulup kurutulmuş hücreler (100 mg) 15 mL lik santrifüj tüplerinde tartıldıktan sonra, ekstraksiyon için, 4 mL kloroform: metanol (2:1), ve 0.4 mg/mL butile hidroksitolüen (BHT) tüpüne eklenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında gece boyunca hafif çalkalanmaya bırakılmıştır. Daha sonra tüpler 1500 xg de 15 dakika santrifüj edildikten sonra, ekstre edilmiş yağ içeren süpernatanta 3 mL ultra saf su eklenerek 1 dakika boyunca yavaşça çalkalanmış ve metanolden ayrıştırılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 Ultra saf su eklendikten sonra oluşan metanol-yağ fazı

Oluşan 2 faz dikkatli bir şekilde ayrıldıktan sonra, altta kalan yağ ve diğer çözücülerini içeren faz, 0,20 µm enjektör filtreden geçirilerek balon jojeye aktarılmıştır. Daraları alınmış balon jojeye aktarılan çözgenli sıvı, dönen buharlaştırıcı (Stuart, RE300, UK) kullanılarak su banyosunda (30 °C) çözgenin uzaklaştırılması sağlanmıştır (Şekil 3.11). Lipid konsantrasyonu, gravimetrik olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.11 Modifiye Bligh and Dyer yöntemiyle yağ miktarının belirlenmesi: 1. Oluşan yağ-su fazı, 2. Balon jojeye aktarılan yağ fazı, 3. Stuart, RE300 dönen buharlaştırıcı kullanılarak su banyosunda (30°C) buharlaştırma.

Türlerde bulunan mikroalgal yağ yüzdesi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$\frac{B - A}{C} * 100$$

[d.6]

A: Boş balon joje (g)

B: Buharlandırmadan sonraki balon jojenin ağırlığı (g)

C: Proseste kullanılan hücre miktarı (g)

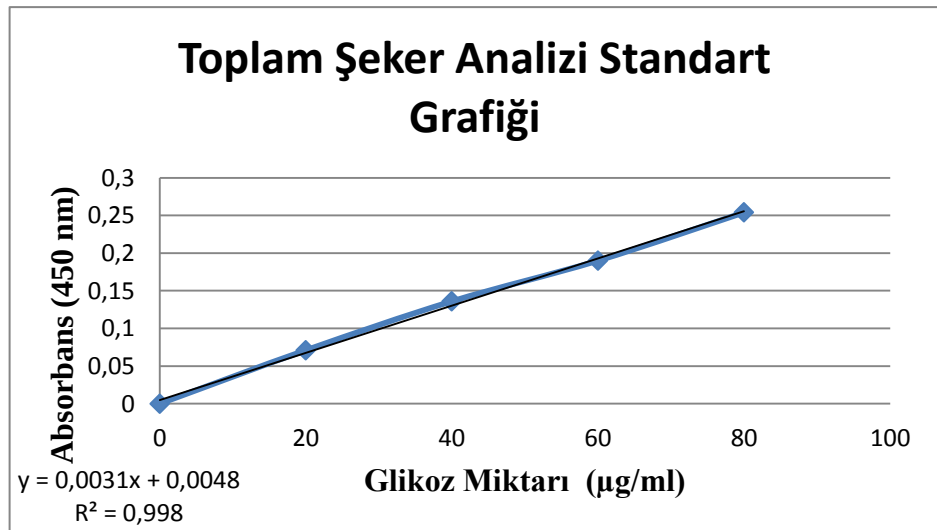
3.7.2. Toplam şeker analizi

İzole edilen kültürlerin şeker içeriğini belirlemek için toplam şeker analizi yapılmıştır (Ammar et al., 2013).

Çizelge 3.6 Toplam şeker analizi için kullanılan kimyasallar ve hacimleri.

		Standartlar (mL)					
Kimyasal	Kör	1	2	3	4	5	Örnek
% 0,1'lik glikoz	-	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1
Distile su	1	0,8	0,6	0,4	0,2	-	-
% 5' lik fenol	1	1	1	1	1	1	1
% 96' lık Sülfirik asit	5	5	5	5	5	5	5

% 0,1' lik glikoz çözeltisi ve % 5' lik fenol çözeltisi hazırlanmıştır. 7 adet cam deney tüpü, (kullanılarak yukardaki tabloda belirtilen miktarlarda çözeltiler ilave edilmiştir.)birincisi kör, 2-6 arası tüpler standart ve 7. tüp örnek olacak şekilde dizilmiş, ve sırasıyla 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 ve 1 mL % 0,1'lik glikoz çözeltisi eklenmiştir. Tüm tüpler distile su ile 1 mL ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüm tüplere 1 mL % 5 'lik fenol çözeltisi ve 5 mL derişik sülfirik asit eklenerek vortekslenmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında ve 10 dakika oda sıcaklığındaki suda bekletildikten sonra reaksiyon tamamlanırılmış ve örneklerin absorbensları spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Standart grafiği ve denklemini elde edildikten sonra, izole edilen türlerin içerdiği toplam şeker miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.12 Toplam Şeker Analizi Standart Grafiği ve denklemini.

3.7.3 Modifiye Lowry protein analizi

Modifiye Lowry yöntemi kullanılarak, türlerin protein miktarları incelenmiştir (Experimental Bioscience, 2014).

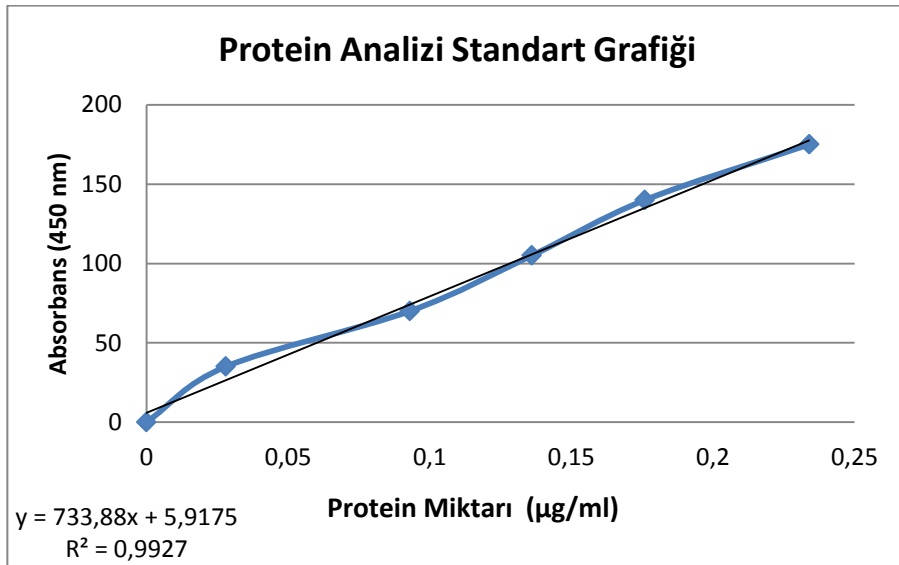
Protein analizi için öncelikle 3 farklı reaktif hazırlanmıştır.

Reaktif A: Ultra saf su ile çözünmüş 50 mL % 5' lik Na_2CO_3

Reaktif B: 1:1 oranında %1 ' lik $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve %5 'lik CuSO_4 çözeltileri karışımı

Reaktif C: 25:1 oranında Reaktif A ve Reaktif B çözeltileri karışımı

Toplam şeker analizinde olduğu gibi , birincisi kör, 2-6. tüpler standart ve 7.tüp örnek olacak şekilde dizilmiş, ve sırasıyla 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,5 olacak şekilde bovine serum albumin (75 mg/100 mL BSA) proteininden eklenmiştir. Bütün tüplere 0.5 mL 1 N NaOH eklenerek 100°C'deki su banyosundan 5 dakika inkübe edilmiştir. 2,5 mL Reaktif C ve 0.5 mL folin reaktifi eklenerek, oda sıcaklığında 30 dakika beklenmiştir. Daha sonra spektrometre ile 750 nm de absorbanları ölçülmüş ve standart grafiği elde edilmiştir ve protein miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.13 Protein analizi standart grafiği ve denklemini

3.8 Anaerobik parçalanma

3.8.1. Ön işlem

Anaerobik parçalama öncesi substrata uygulanan ön işlem, biyobozunabilirliği önemli ölçüde arttırmaktadır. Bu adım, organik maddeyi anaerobik mikroflorada daha uygun hale getirerek, parçalanmayı hızlandırmaktadır. Anna Silva ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; mikrodalga, sonikasyon, ve otoklav ile ön işlemlere maruz bırakılmış mikroalglerin biyoenerji verimini kıyaslanmış ve en yüksek verimin sırası ile mikrodalga, otoklav ve sonikasyon ön işleminden sağlandığını belirtmiştir (Silva, A. 2014).

Bu çalışma baz alınarak; ön çalışma olarak kullanılan *Spirulina platensis* (5% k/h) biyokütlesine, ilk olarak ultrasonik homojenizatör (Bandelin sonopulus) kullanılmıştır. Ultrasonik ön işlem mikrobiyal hücre duvarını kavitasyon ile kırarak hücre içi malzemenin dışa çıkmasını sağlamaktadır. 10 mL % 5 kuru ağırlıkta *Spirulina platensis* 15 mL' lik santrifüj tüpüne alınmış, sonikasyondan kaynaklanan sıcaklığın etkisinin ortadan kalkması için buzun içersine yerleştirilmiş, 1' er dakikalık setler halinde, toplamda 3 dakika olacak şekilde, 9 döngü % 75 güçte sonikasyon uygulaması gerçekleştirilmiştir.

Mikrodalgalar, suyun kaynaması için kinetik enerjisini arttıran, 300 MHz ile 300 GHz frekansları arasında değişen kısa elektromanyetik enerji dalgalarıdır. Mikrodalga ışımasıyla uygulanan kuantum enerjisi, kimyasal bağları parçalayamamakta, ancak hidrojen bağlarını kırabilmektedir. İndüksiyonlu ısıtma ve dielektrik polarizasyon sonucu proteinlerin ikincil ve üçüncül yapısı değiştirilerek, hücre hidrolizine neden olmaktadır (Kaatze, U. 1995). İkinci yöntem olarak, % 5 lik *Spirulina platensis* 100 mL olacak şekilde erlenlere konularak, Regal marka ev türü mikrodalgada 3 dakika boyunca mikrodalga uygulaması yapılmıştır.

Son olarak otoklav ön işlemi yapılarak, mikroalg üzerinde basınç ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. 1 L' lik cam şişeye konulan % 5 lik *Spirulina platensis* , 120 °C 30 dakika boyunca 1.2 bar basınçta otoklav ön işlemine maruz bırakılmıştır.

Spirulina platensis ile yapılan ön çalışmadan alınan en iyi sonuca göre, karışık mikroalg biyokütlesine aynı prosedürde aynı ön işlem uygulanmıştır.

Ön işlemin sonundaki hücre parçalanması, ışık mikroskopunda gözlemlenmiştir

3.8.2. Deneysel dizayn:

1 Litrelik sürekli karıştırılmalı reaktörlere, 1/10 seyreltilmiş metajonik maya çamuru eklenmiştir. Hidrolik bekleme süresi aşağıdaki formül baz alınarak 30 gün olarak belirlenmiştir:

$$\theta = \frac{V_r}{Q}$$

[d.7]

Q = Giriş debisi

V_r = Reaktör hacmi

Her bir besleme, 60 mL' lik plastik şırınganın bağlı olduğu silikon bir tüp yardımıyla, 35 ml çamurun çıkarılmasından sonra aynı hacimde eklenmiştir (Şekil 3.17) (Reaktör hacmi/ HRT). pH , pH probu ile günlük olarak çıkarılan miktardan ölçülmüştür. Reaktör sıcaklığı su banyosu yardımıyla 35 °C ye sabitlenmiştir. Organik yükleme hızı 1.67 kg/OLR gün olarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar, OLR değerlerinin 3'ün altında tutmanın uygun olduğunu belirtmiştir.

Devamlı karıştırılmalı reaktör % 10 luk maya çamuruyla başlatılmıştır. Reaktör inokulumu olarak Pak Gıda Üretim ve Pazarlama A.Ş.' nin Kemalpaşa/İzmir fabrikasının atıksu arıtma tesisinde bulunan tam ölçekli anaerobik çürütücüden alınan mezofilik çamur kullanılmıştır. Reaktör kararlı bir duruma ulaştığında, ön işlem yapılmış mikroalgal biyokütle ile beslenmiştir. Biyogaz miktarı, gaz ölçerlerdeki su değişimi ile ölçülmüştür (0,7 mm = 10 ml gaz). Gaz kompozisyonu ise 2 günde bir Syringe Protocol ile tepe boşluğundan alınan gaz ile analiz edilmiştir. Şırınga esnek bir tüpe tutturulmuştur ve çekilen gaz seyreltik potasyum hidroksit (KOH) (% 20) solüsyonuna enjekte edilerek

kolayca metan miktarı belirlenmiştir. Bu süreçte, KOH içine enjekte edilen gaz ile kısa bir çalkalamayla CO₂ absorbe ederek, metanı geri vermektedir.



Şekil 3.14 Deneyel dizayn



Şekil 3.15 Şırınga ile örnek alınımı

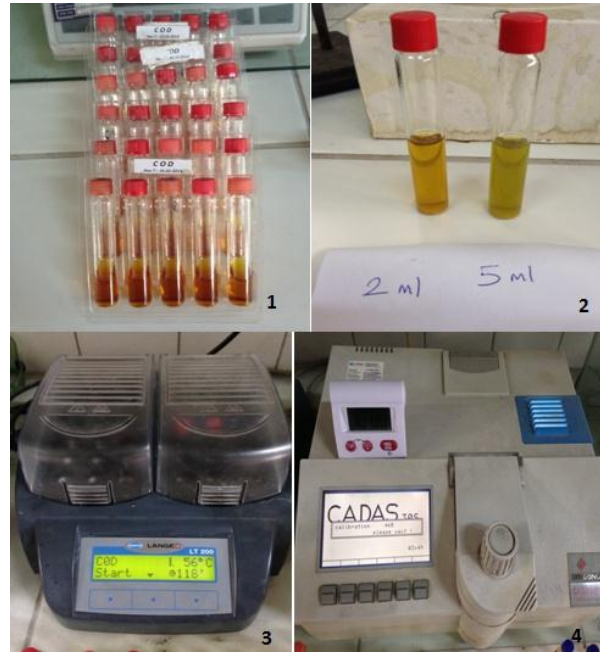
3.8.3. Analitik yöntemler

3.8.3.1. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) tayini- hazır kit ile.

Kimyasal oksijen ihtiyacı, su ve atıksuların içerisinde bulunan asidik ortamda kuvvetli bir kimyasal oksitleyiciyle oksitlenebilen organik madde miktarının oksijen değeri cinsinden ifadesidir. Kısaca, sulardaki karbonlu

maddelerin karbondioksite dönüşene kadar ilave edilecek oksijeni ifade etmektedir. Analizde, oksijen yerine yüksek oksitleyici özellikte oksidant kimyasal kullanılır. Sonucunda, sudaki kirletici maddedeki karbonu gidermek için harcanan oksidant miktarı belirlenir ve harcanan oksidant miktarı, oksijen ihtiyacı yani oksijen olarak ifade edilir. Böylelikle oksijen ihtiyacı, atıksuyun içindeki karbon konsantrasyonunun dolaylı bir ölçüsü olur. Oksidasyon ortamında karbonlu organik maddeler CO_2 ve H_2O ; azotlu organik maddeler ise NH_3 formuna dönüşmektedir.

KOİ analiz kiti olarak Hach Lange LCK 014 kullanılmıştır ve bu kit ile 1.000-10.000 mg/ L O_2 aralığında oksijen ihtiyacı ölçülmüştür. Santrifüj edilen örneklerden 0,5 mL alınarak kitin içine aktarılmıştır. Kit, birkaç defa aşağı yukarı çevrilerek hızlı bir şekilde karışması sağlanmıştır. Hazırlanan kit 148 °C de 2 saat termostatta tutulmuştur. 2 saatin sonunda, örnekler tekrar karıştırılarak oda sıcaklığına gelene kadar soğutulmuştur. Soğutulan tüpler, spektrofotometrede mg/L cinsinden KOİ değerleri okutulmuştur.



Şekil. 3.16 Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) tayini. 1-KOİ kitleri, 2- Seyreltme işleminden sonra kitlerin renk değişimi, 3- 148°C de 2 saat termostatta bekletme, 4- Spektrofotometrede ölçüm

3.8.3.2. $\text{NH}_4\text{-N}$ Tayini

Toplam azot, anaerobik sistemlerde dengeleme ve dışarıya akış kontrolleri için önemli bir parametredir. Amonyak Azotu ($\text{NH}_3\text{-N}$), çözünmüş amonyağı (NH_3) ve amonyum iyonunu (NH_4^+) gösterir ve litredeki mg azot ($\text{mg NH}_3\text{-N/L}$) olarak ifade edilir. Anaerobik sistemlerde en büyük kirlilik potansiyeli amonyak azotundan kaynaklanmaktadır. $\text{NH}_4\text{-N}$ tayini MERCK markasına sahip 5-150 mg/L $\text{NH}_4\text{-N}$ aralığına sahip kitlerle yapılarak, fotometre ile ölçülmüştür.

3.8.3.3. Askıda Katı Madde Tayini (AKM):

Askıda katı madde (AKM), su veya atıksudaki askıda veya çözünmüş haldeki katıların belirlenmesiyle elde edilmektedir.

0,45 μm cam fiber membran filtre, 1 saat boyunca 105 °C de ya da bir gece boyunca 65 °C de etüvde tutulduktan sonra, desikatörde soğutularak nem giderimi sağlanmıştır. Daha sonra cam fiber membran filtre tartılarak darası alınmış ve karıştırılarak homojen hale getirilen örnekler kaydedilen hacimde vakum pompası yardımı ile filtre edilmiştir.



Şekil 3.17 0,45 μm cam fiber membran filtreden örneklerin filtrasyonu

Örnekler süzildükten sonra, filtreler yeniden 105 °C'de 1 saat etüvde kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutulan filtre desikatörde soğutularak tartılmıştır. Askıda katı madde konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Askıda Katı Madde} = \frac{(A - B) * 10^6}{C}$$

[d.8]

A: Filtre kağıdı ağırlığı + süzülen örnek hacmi (g)

B: Filtre kağıdı ağırlığı (g)

C: Filtre edilen örnek hacmi (mL)

3.8.2.5. Uçucu yağ asidi (VFA) analizi :

Anaerobik çürütme prosesinde kompleks maddeler belirli bakteriler tarafından hidroliz edilerek, daha basit bileşiklere dönüştürülürler. Oluşan bu bileşiklere kısa zincirli yağ asitleri denir. Bu asitlerin sistemde artışı, pH düşmelerine böylece anaerobik prosesin durmasına yol açmaktadır (Bernard,O. 2001). Bu nedenle uçucu yağ asidi birikiminin olup olmadığını incelemek için VFA analizi yapılmıştır.

Atıksu örnekleri ependorf tüplerine doldurularak, 10000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan alınan çözelti 0,45 ve 0,22’ lik mikronluk şırınga filtresinden, viyal içine süzölmüştür. Viyaller işaretlenerek , gaz kromatografisine (6890N Agilent Technologies Network GC System) yerleştirilmiştir.



Şekil 3.18 Uçucu yağ asidi (VFA) analizi. 1- Santrifujlenmiş ependorf tüpler, 2. Filtreden geçirilmiş örnek içeren viyaller, 3.Gaz kromatografisine yerleştirilmiş örnekler, 4. Gaz Kromatografisi - 6890N Agilent Technologies Network GC System

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

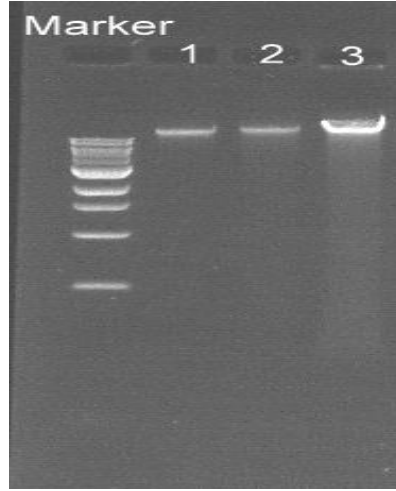
Son 20 yıl içinde algler üzerinde yapılan araştırmalar, alglerin ham madde olarak enerji dönüşümünde kullanılmasındaki yüksek potansiyelini ortaya koymuştur. Petrol fiyatlarındaki artış, ve enerjiye olan bağımlılığın yarattığı endişeler, biyoyakıt üretimi için mikroalgal hammaddelerin kullanılmasına olan ilgiyi arttırmıştır. Mikroalgler, besin olarak CO₂ tüketmeleri, diğer karasal biyokütle ham maddelerine kıyasla çok daha yüksek verim potansiyeline sahip oluşları, yüksek değerli tarım arazisi ihtiyacı olmadan çeşitli su kaynaklarında (tatlı, sodalı su, tuzlu su, ve atıksu) yetiştirilebilirlikleri, gıda dışı bazı ham madde oluşları, günlük hasat edilebilirlikleri ve hem biyoyakıt hem de değerli biyoürünler üretebilirliği ile gelecek nesiller için sürdürülebilir biyoyakıt haline gelebilecek potansiyele sahiptir (Miranda, 2012).

Bu çalışmada, maya fabrikası atık çamuruna substrat olarak eklenen, çeşitli ön işlemlere maruz bırakılmış mikroalgal biyokütlenin, toplam biyogaz miktarına olan etkisi incelenmiştir. Karışık mikroalg kültürü, maya fabrikası atıksu arıtma tesisinin son havuzunda ötrofikasyon sonucunda üreyen mikroalglerden izole edilmiştir. İzole edilen karışık mikroalg kültürü istenilen biyokütleyle (100 gr) ulaştığında, *Spirulina platensis* ile yapılan ön çalışmada en iyi sonuç veren mikrodalga ön işlemine maruz bırakılmıştır.

Biyogaz deney dizaynı olarak, 1 litrelik karıştırmalı reaktörler 1/10 seyreltilmiş metajonik maya çamuruyla inoküle edilmiş, sıcaklık 35 °C ye sabitlenerek, 30 gün boyunca, reaktörlere içerisinden alınan miktarda (35 mL) mikroalg beslemesi yapılmıştır. Çıkarılan örnekler ileriki analizler için +4 °C de saklanmıştır.

4.1. Gen Analizi:

PCR sonuçlarının dizi analizi, REF-GEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti tarafından yapılarak, aşağıdaki türler bulunmuştur.



Şekil 4.1. DNA jel fotoğrafı. 1.Oscillatoria sp. 2. Scenedesmus sp 3. Chlorella sp.

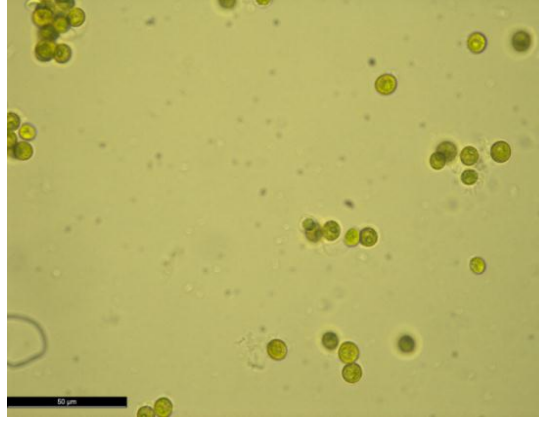
4.1.1 *Scenedesmus armatus*

Türün özellikleri aşağıdaki gibidir:

4 lü (ya da 2, 8, 16 lı) hücrelerin yan yana tutunmasıyla oluşmuş doğrusal yada hafif zigzag düzenlenmiş koloniler, yuvarlak oval veya uzamış elips şeklinde hücre gövdesi, 10-20 µm uzunluğunda, 3.5-8 µm genişliğinde, her hücrenin iki tarafında da uzunlamasına çıkıntılar bulunmaktadır (Illustrations of The Japanese Fresh-water Algae, 1977).

Çizelge 4.1 *Scenedesmus armatus*' un bilimsel sınıflandırılması

Âlem	Plantae (Bitkiler)
Şube	Chlorophyta
Sınıf	Chlorophyceae
Takım	Sphaeropleales
Familiya	Scenedesmaceae
Cins	Scenedesmus
Tür	<i>S. armatus</i>



Şekil 4.2 *Scenedesmus armatus* ışık mikroskobu görüntüsü, 63x

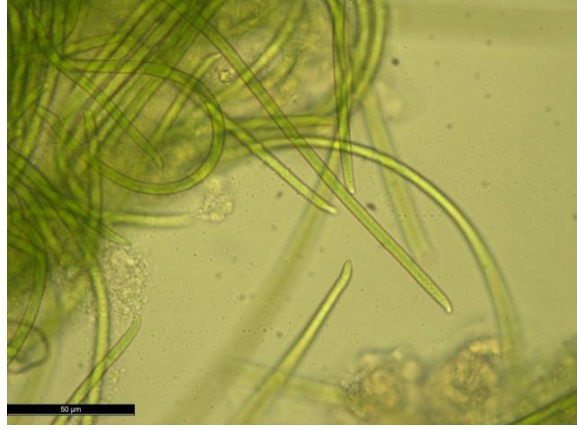
4.1.2. *Oscillatoria acuminata*

Türün özellikleri aşağıdaki gibidir:

Mavi-yeşil tallus, 4-5µm genişliğinde, uçlara doğru sivrilen, sivri burunlu keskin hücreler, 6-8µm uzunluğunda, bazen hücre duvarları arasında granüllü yapılar bulunmakta.

Çizelge 4.2 *Oscillatoria acuminata* 'nın bilimsel sınıflandırılması

Âlem	Bakteriler
Şube	Cyanobacteria
Sınıf	Cyanophyceae
Takım	Oscillatoriales
Familya	Oscillatoriaceae
Cins	<i>Oscillatoria</i>
Tür	<i>O. acuminata</i>



Şekil 4.3 *Oscillatoria acuminata* ışık mikroskobu görüntüsü, 63x

4.1.3. *Chlorella* sp.

Saflaştırılmasının da zorluk yaşadığı için genetik olarak tanımlanamamakla beraber, morfolojik olarak tanımlanmıştır.

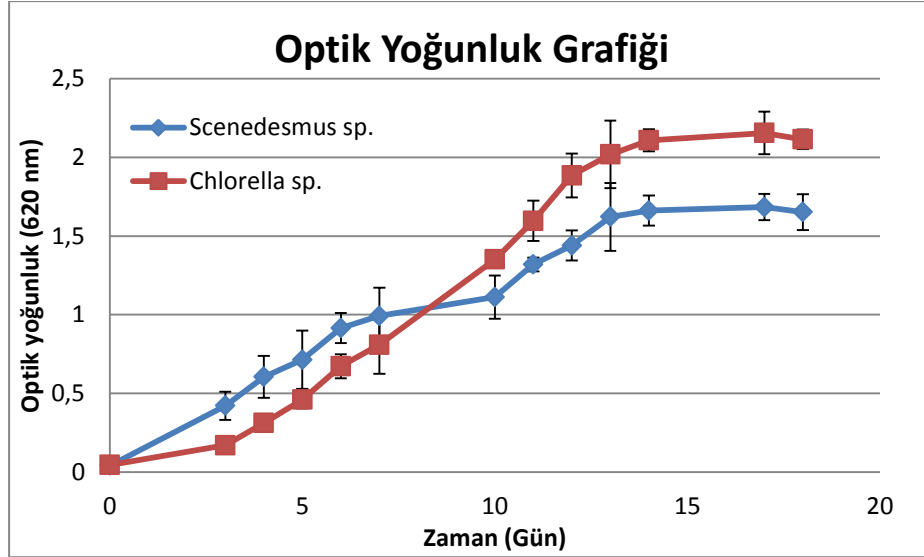
Çizelge 4.3 *Chlorella* sp. ' nün bilimsel sınıflandırılması

Âlem:	Plantae
Bölüm:	Chlorophyta
Sınıf:	Chlorophyceae(<i>Trebouxiophyceae</i>)
Takım:	Chlorococcales(<i>Chlorellales</i>)
Familiya:	Oocystaceae(<i>Chlorellaceae</i>)

4.2. Büyüme Grafiklerinin Elde Edilmesi

4.2.1. Optik yoğunluk ölçümü

Scenedesmus armatus ve *Chlorella* sp. 2 tekrarlı olarak kültüre edilmiş, ve 1 L' lik üretim şişelerindeki kültürlerden her gün örnek alınarak mikroalg hücrelerinin büyüme grafikleri elde edilmiştir.



Şekil 4.4 *S. armatus* ve *Chlorella* sp. Optik yoğunluk - zaman grafiği

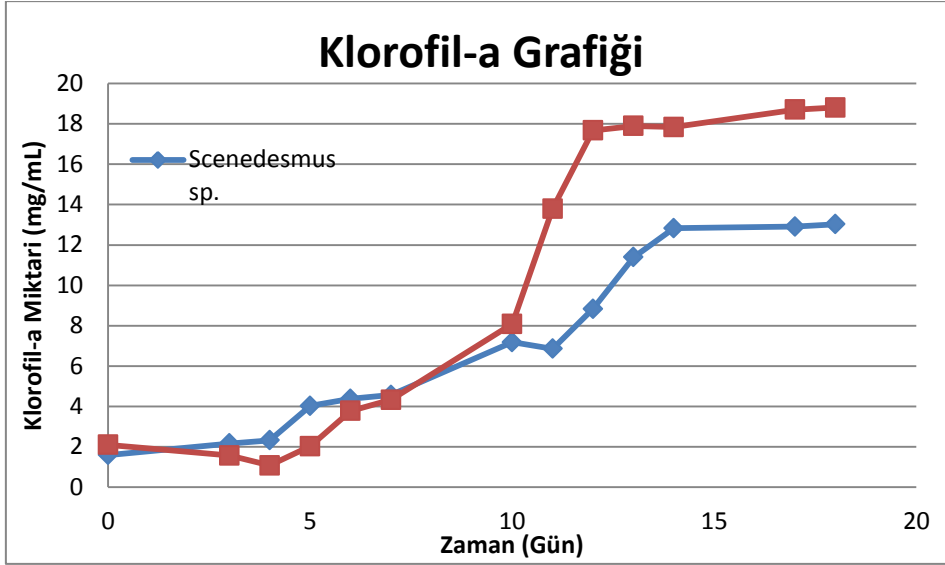
Şekil 4.4' de 18 gün boyunca kültüre edilen mikroalglerin zaman karşı 620 nm'de ölçümü yapılan optik yoğunluk grafiği verilmiştir. 0. günde aynı optik yoğunluğa sahip olan *Chlorella* sp. ve *Scenedesmus armatus*, lag faza girmeyerek, 0. günden 13. güne kadar logaritmik artış göstermiştir. 8. güne kadar *S. armatus* un büyüme hızı, *Chlorella* sp. den yüksekken, 9. günde *Chlorella* sp. nin çoğalma hızı artmıştır.

13. günden itibaren iki türün hücrelerinin de büyüme oranı ölüm oranına eşitlenerek, durgun faza girmiştir. 18. günde en yüksek optik yoğunluğa sahip *Chlorella* sp. olarak gözlemlenmiştir.

4.2.2. Klorofil- a analizi

Şekil 4.5'de mikroalglerin klorofil-a miktarının zamana göre değişimi gösterilmiştir. Mikroalglerin klorofil miktarları günlük olarak 665 nm ve 750 nm dalga boylarında ölçülerek, (formülde yerine konarak mL deki mg cinsinden klorofil-a miktarı bulunmuştur.)

$(665 \text{ nm} - 750 \text{ nm}) \times 13.9$ formülü ile mL deki mg cinsinden klorofil-a miktarı bulunmuştur.



Şekil 4.5 *Scenedesmus armatus* ve *Chlorella sp.* Klorofil-a - zaman grafiği.

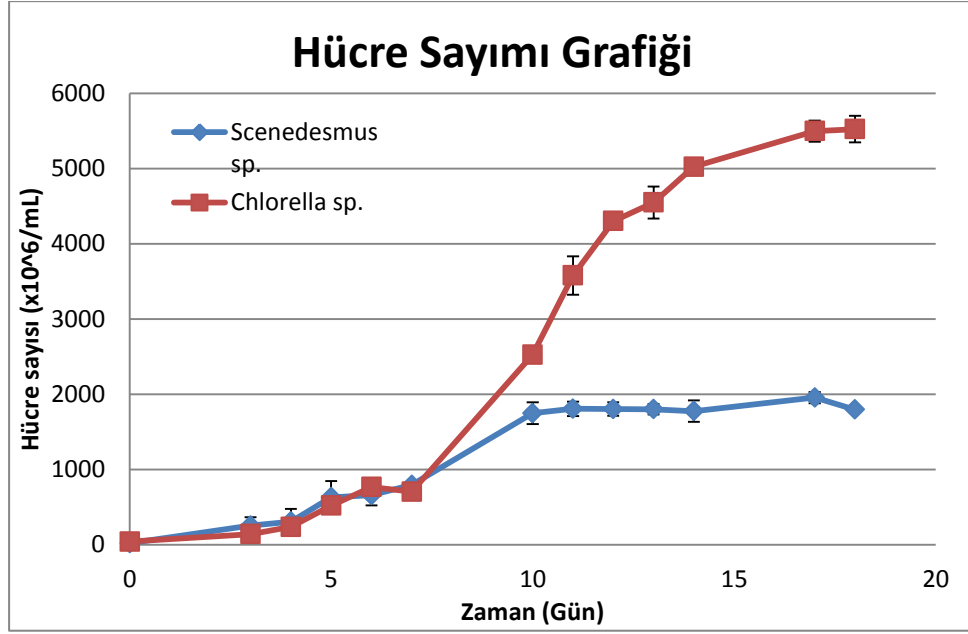
Optik yoğunluk grafiğinde lag fazı gözlemlenmemiş olsa da, klorofil-a üretiminde 3 günlük bir lag fazı gözlemlenmiş, iki türde de klorofil-a üretimi olmamıştır.

Chlorella sp. nin optik yoğunluk grafiğinde 9. günde artan büyüme hızı, klorofil- a miktarına yansımış, aynı şekilde klorofil-a üretim miktarı da hızla artmıştır. İki grafikte de gözlemlenen bu ani artış, 10. günden itibaren buharlaşmadan dolayı artan hücre yoğunluğundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

İki türde, optik yoğunluk grafiklerine uygun olarak, 13. günde klorofil-a miktarı üretim hızı bakımından durgun faza geçmiştir. Optik yoğunlukta gözlemlenen durgun faz, ve aynı sonucun klorofil-a grafiğinde gözlemlenmesi, hücre ölümünün artması ve bundan dolayı klorofil-a üretiminin durmasından kaynaklanmaktadır. 18. günün sonunda en yüksek klorofil-a miktarına sahip tür *Chlorella sp.*' dir.

4.2.3. Mikroskobik hücre sayımı

Şekil 4.6'da zamana göre hücre sayısındaki değişim gösterilmiştir.



Şekil 4.6 *Scenedesmus armatus* ve *Chlorella sp.* Hücre sayım - zaman grafiği.

Optik yoğunluk grafiğinde olduğu gibi iki türde de lag fazı gözlemlenmemiş, ve 0. günde log fazı başlamıştır.

Chlorella sp. türünün optik yoğunluk ve klorofil-a grafiklerinde gözlemlenen 8. günün sonundaki ani artış, hücre sayım grafiğinde 7. gün olarak görülmüştür. Hücre sayısında ani bir artışa başlayan *Chlorella sp.* klorofil-a miktarına yansımaları bir kaç gün almıştır.

Optik yoğunluk ve klorofil-a grafiğinde 13. günde durgun faza giren türler, hücre sayım grafiğinde farklı durgun faz zamanları göstermektedir. *Chlorella sp.*'nin durgun faza geçmesi 17 günü alırken, *Scenedesmus armatus* 10. günde durgun faza geçmiştir. *S. armatus* türünün, *Chlorella sp.*'ye oranla hücre hacmi bakımından daha büyük olması, optik yoğunluk-zaman grafiğinde yüksek veriler gösterse de, hücre sayımı grafiğinde daha düşük sonuçlar göstermiştir.

Çizelge 4.3' te *Chlorella sp.* ve *S. armatus*'un başlangıç ve bitiş kuru ağırlık miktarları verilmiştir. Daha düşük başlangıç kuru ağırlığına sahip olan *Chlorella sp.*, 18. günün sonunda *S. armatus* tan daha yüksek kuru ağırlığa sahip olmuştur. Türlerin spesifik büyüme hızları ve ikilenme sürelerine bakıldığında (Çizelge 4.4), bu durumun *Chlorella sp.*'nin daha yüksek büyüme hızı ve daha kısa ikilenme süresinden kaynaklandığı görülebilmektedir.

Çizelge 4.4 Kültürlerin başlangıç ve bitiş kuru ağırlık miktarları

Mikroalg türü	Başlangıç kuru ağırlığı (mg/mL)	Bitiş kuru ağırlık (mg/mL)
<i>Chlorella sp.</i>	0,34±0,135	1,86±0,058
<i>Scenedesmus armatus</i>	0,42±0,121	1,63±0,062

Çizelge 4.5 Mikroalglerin maksimum spesifik büyüme hızı (MSBH- hücre sayısı. g⁻¹), ikilenme süresi (İS-gün), klorofil a miktarı (mg/mL), toplam şeker miktarı (TŞM-µg/mL).

Mikroalg/Siyanobakteri	MSBF (hücre sayısı. g ⁻¹)	İS (gün)	Klorofil a miktarı (mg/L)
<i>Chlorella sp.</i>	0,107±0,032	6,46±0,45	9,82±0,68
<i>Scenedesmus armatus</i>	0,093±0,018	7,44±0,54	7,26±0,91

2 ay boyunca, toplam 30 L 'lik hacimlerde karışık olarak yetiştirilen mikroalgler, 15 günlük aralıklarla hasat edilmiştir. *Oscillatoria acuminata* ' nın iplikli yapısından dolayı gerçekleştirilemeyen optik yoğunluk ve hücre sayımı, elde edilen hasattaki verimi spesifik olarak verememiştir. Çizelge 4.5' de *Scenedesmus armatus*, *Chlorella sp.*, ve *Oscillatoria acuminata* dan oluşan karışık kültürün 2 ayda elde edilen biyokütle miktarları ve verimi verilmiştir.

Çizelge 4.6 Toplam 30 L hacmindeki cam şişelerden elde edilen biyokütle miktarları ve verimleri.

Mikroalg	1. üretim	2.üreti m	3. üretim	4. üretim	Topla m (g)	Ortala ma (g)	Veri m (g/L)
<i>Karışık mikroalg kültürü</i>	17,28	21,12	36,33	26,51	101,24	25,31	0,84

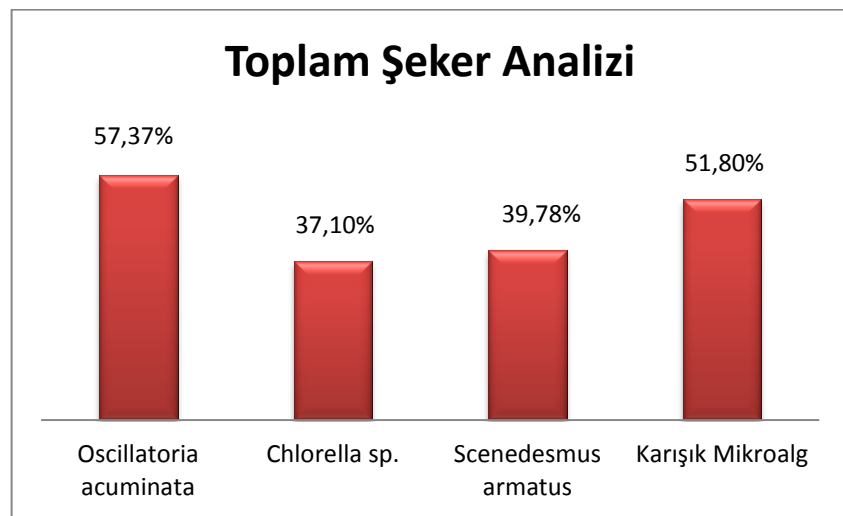
4.3 Biyokimyasal Kompozisyon Analizleri

Metan miktarı, mikroalglerin kompozisyonuna göre değişiklik göstermektedir, bu yüzden anaerobik sistemlerde mikroalglerin biyokimyasal kompozisyonu biyogaz verimi açısından büyük önem taşımaktadır. Bundan dolayı, atıksudan izole edilen mikroalg kültürlerine, şeker, protein ve yağ miktarları ve yüzdelikleri ölçülmüştür.

Karışık olarak kullanılan mikroalgal biyokütlenin içerisinde bulunan türlerin ayrı ayrı oranlarının, ipliksi alglerin yarattığı karışıklıktan dolayı hesaplanamaması nedeniyle, biyokimyasal verilerden faydalanılarak bir varsayıma ulaşılması amaçlanmıştır. Bu yüzden saf türlerin şeker, protein ve yağ analizlerine ek olarak; karışık mikroalgal kütleye de aynı tayinler yapılmıştır. Böylelikle karışık mikroalgal biyokütlerde bulunan türlerin yoğunlukları tahmin edilmiştir.

4.3.1 Toplam Şeker Analizi

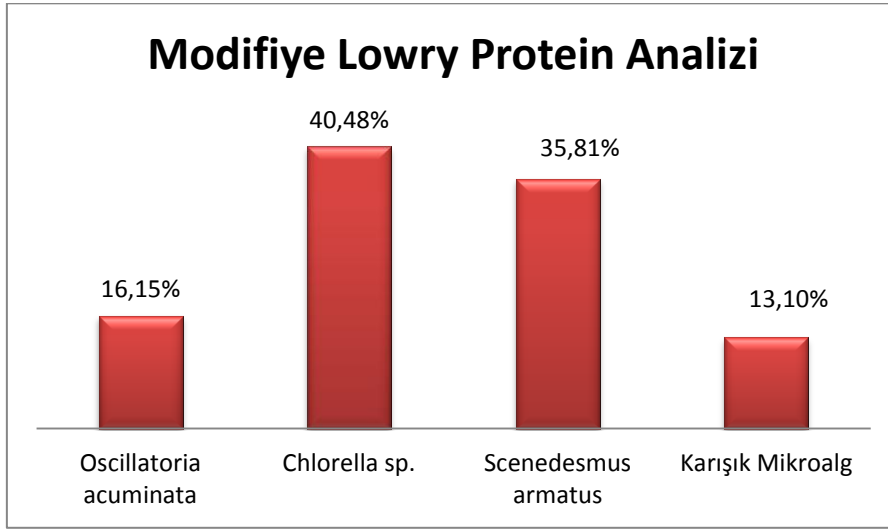
İzole edilen kültürlerin şeker içeriğini belirlemek için toplam şeker analizi yapılmıştır. *Oscillatoria acuminata*, *Chlorella* sp., ve *Scenedesmus armatus* 'ta sırasıyla % 57,3, % 37,1 ve % 39,78 şeker miktarı hesaplanmıştır. Karışık mikroalg biyokütlesinde yapılan şeker analizinden ise % 51,80 içeriğinde şeker bulunmuştur. Bu yüzdeliklere bakılarak, karışık mikroalg biyokütlesindeki *O.acuminata* 'nin türünün daha ağırlıkta olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.7 Mikroalg türlerinin şeker içeriği yüzdeleri

4.3.2. Modifiye Lowry Protein Analizi

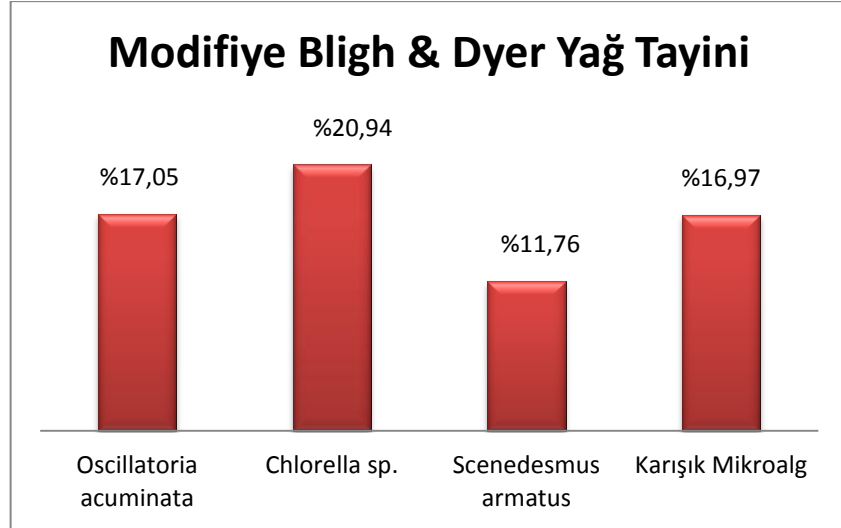
İzole edilen saf türlerin ve karışık mikroalg biyokütlesinin protein miktarı, Modifiye Lowry yöntemi ile ölçülmüştür. *Oscillatoria acuminata*, *Chlorella* sp., ve *Scenedesmus armatus* da sırası ile %16,15, % 40,48, ve % 35,81 protein miktarı hesaplanmıştır. Bu türlerin karışımından oluşan mikroalg kütlesinin protein içeriği ise % 13,10 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlardan da, karışık mikroalgal biyokütlenin *Oscillatoria acuminata* tarafından yoğunlukta olduğu anlaşılabilmektedir.



Şekil 4.8 Mikroalg türlerinin protein içeriği yüzdeleri

4.3.3. Modifiye Bligh & Dyer Yağ Tayini

Son olarak saflaştırılan türlerin yağ miktarları modifiye Bligh & Dyer metodu ile ölçülmüştür. Sonuçlara göre, *Oscillatoria acuminata*, *Chlorella* sp., ve *Scenedesmus armatus* ta sırasıyla % 17,05, % 20,94 ve % 11,76 yağ miktarı hesaplanmıştır. Karışık mikroalg biyokütlesinde ise % 16,97 yağ miktarı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.9 Mikroalg türlerinin yağ içeriği yüzdeleri

Hücre yağ içeriği % 40 'ı aşmıyorsa, anaerobik proses, enerji dengeleme bazında, biyokütleden enerji geri kazanımı için uygun bir strateji olduğu, Sialve et al. (2009) tarafından belirtilmiştir. Buna göre, bu çalışmada kullanılan türlerin hepsi, enerji dengesi açısından çalışmaya uygun türlerdir.

4.4. Mikroalglerin Anaerobik Parçalanması:

1L lik reaktörler mezofilik koşullar altında (35 °C) çalıştırılarak toplam KOİ, AKM, toplam azot, amonyum azotu, VFA, kuru madde ve uçucu kuru madde giderimi, metan içeriği, günlük gaz miktarı gibi performans parametreleri incelenmiştir.

Tüm analizler standart metotlara göre yapılmıştır (APHA, 2001).

Kullanılan reaktörler aşağıdaki gibi numaralandırılmıştır:

Reaktör 1: Ön işlemsiz Spirulina Beslemeli Reaktör

Reaktör 2: Sonikasyon ön işlemlili Spirulina Beslemeli Reaktör

Reaktör 3: Otoklav ön işlemlili Spirulina Beslemeli Reaktör

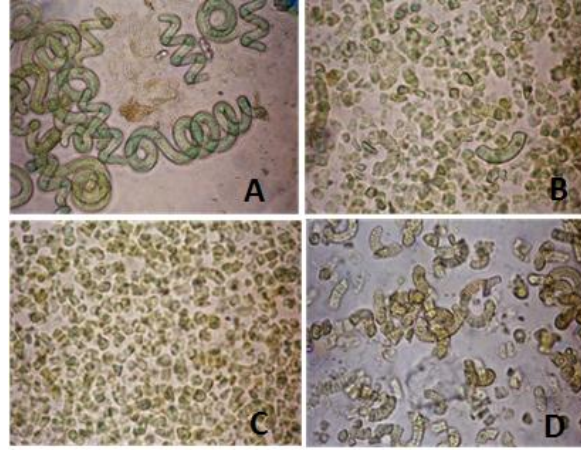
Reaktör 4: Mikrodalga ön işlemlili Spirulina Beslemeli Reaktör

Reaktör 5: Ön işlemsiz karışık mikroalg beslemeli Reaktör

Reaktör 6: Mikrodalga Ön işlemlili Karışık mikroalg beslemeli Reaktör

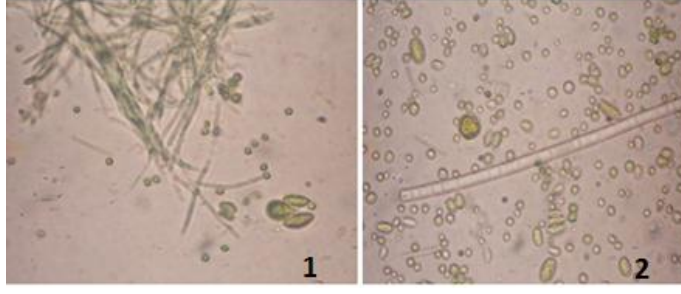
4.4.1 Ön işlem

Ön işlemin sonundaki hücre parçalanması, ışık mikroskopunda gözlenmiştir. *Spirulina platensis*'e uygulanan ön işlemler şekil 4.10' da gösterilmiştir. Hücre parçalanmasının en çok sonikasyon ön işleminde gerçekleştiği görülmüştür. Fakat, biyogaz miktarına etkisi incelendiğinde, en iyi sonuç mikrodalga ön işleminden elde edilmiş ve karışık mikroalg kültürüne de aynı ön işlem aynı sürede uygulanmıştır.



Şekil 4.10 *Spirulina platensis*'e uygulanan ön işlemler. A. Ön işlemsiz, B. Mikrodalga ön işlemi, C. Sonikasyon ön işlemi, D. Otoklav ön işlemi

Karışık mikroalg kültürünün, mikrodalga ön işlemine maruz bırakıldıktan sonraki mikroskopik görüntüsü şekil 4.11' de gösterilmiştir. Ön işlem etkisinin *Spirulina platensis* ile karşılaştırılabilmesi için, karışık mikroalg kültürüne, aynı sürede ön işlem yapılmıştır. Şekil 4.11'de görüldüğü üzere, *Scenedesmus armatus* ve *Chlorella sp.*'nin içerdikleri kalın hücre duvarlarına ön işlem bir etki yaratmamıştır. Ancak, 3 dakikalık mikrodalga ön işleminin *Oscillatoria acuminata*'nın hücre içeriğini dışarıya çıkarmakta yeterli olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.11 Karışık mikroalgal biyokütleye uygulanan ön işlem. A. Ön işlemsiz, B. Mikrodalga ön işlemli

4.4.1 Karakterizasyon Çalışmaları

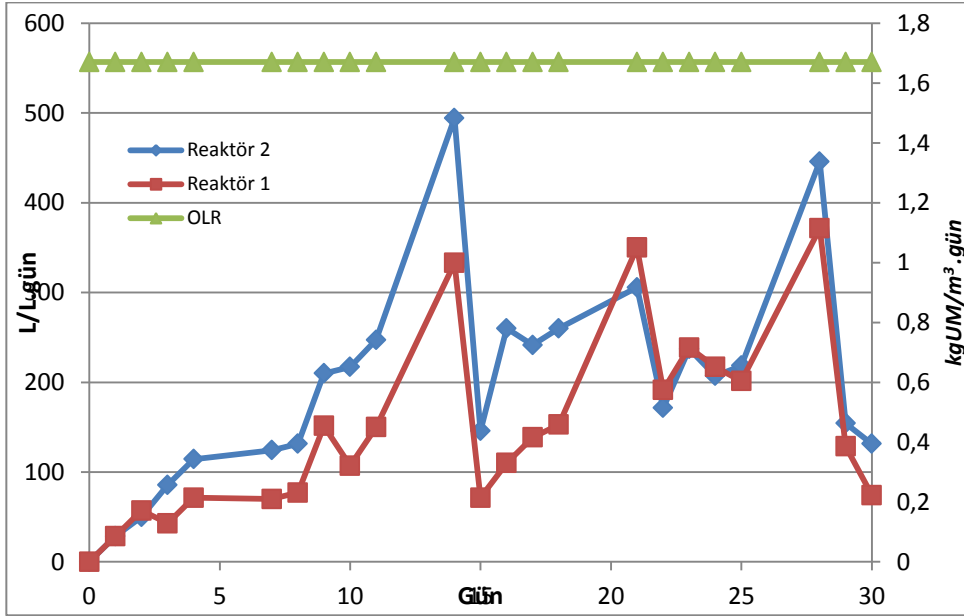
Öncelikle, reaktörlere besleme yapılan %5 lik kuru mikroalg biyokütleleri karakterize edilmiştir. Besleme yapılan hammaddenin içeriğinin anaerobik prosese etkisinin öneminden dolayı, ön işlemsiz *Spirulina platensis*, sonikasyon ön işlemli *Spirulina platensis*, otoklav ön işlemli *Spirulina platensis*, mikrodalga ön işlemli *Spirulina platensis*, ön işlemsiz karışık mikroalg, ve mikrodalga ön işlemli karışık mikroalg biyokütlelerine pH, AKM, KOİ, NH₄-N ve VFA analizleri yapılmıştır.

Çizelge 4.7 Ön işlemli ve ön işlemsiz mikroalgal biyokütlelerin analiz sonuçları

Algal biyokütle örnekleri	Yapılan Analizler				
	pH	AKM (mg/L)	KOİ (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	VFA (Toplam) (mg/L)
Ön işlemsiz <i>Spirulina platensis</i>	7.9	33600	17028	1320	1600,3
Sonikasyon ön işlemli <i>Spirulina platensis</i> .	7.8	23300	14880	960	1758,2
Otoklav ön işlemli <i>Spirulina platensis</i>	7.8	40000	28213	1320	1582,24
Mikrodalga ön işlemli <i>Spirulina platensis</i>	7.9	23100	12209	2010	3003
Ön işlemsiz karışık mikroalg	7.4	31900	14473	330	134,41
Mikrodalga ön işlemli karışık mikroalg	7.5	40800	19262	600	146,23

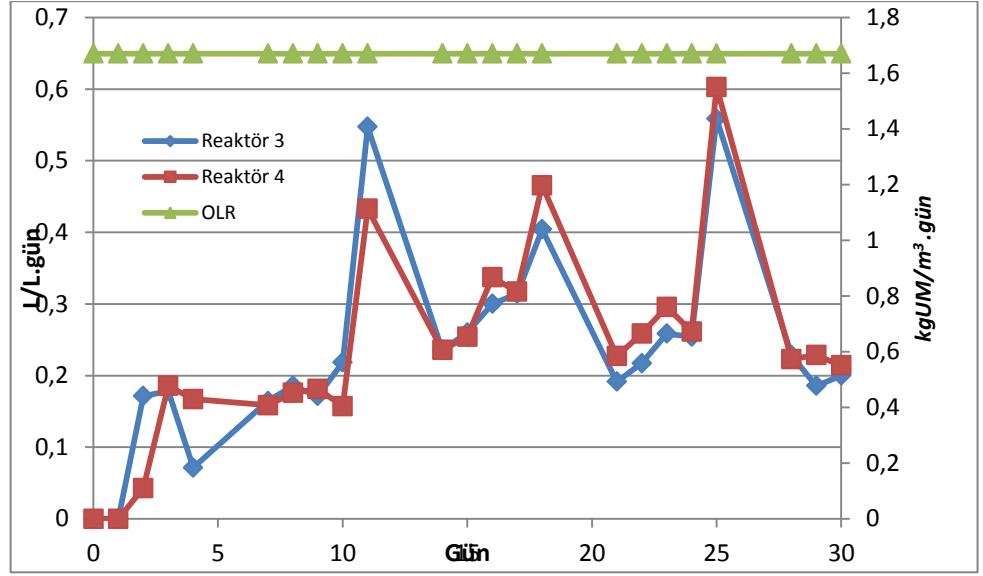
4.4.2. Günlük Gaz Miktarı ve Metan içeriği:

1 litrelik çalışma hacminde 35 °C sıcaklıkta işletilen 6 adet reaktöre, yukarıda belirtilen çeşitli ön işlemlili ve ön işlemsiz mikroalgal biyokütleler ile % 5 kuru madde olacak ve HRT'si 30 gün olacak şekilde günde 35 mL' lik beslemeler yapılmıştır. Çizelge 4.4 'de reaktörlere göre kümülatif metan miktarları görülmektedir. Mikroalgal biyokütle ile beslemeler 5. gün başlamıştır. Haftasonları besleme yapılmamasından dolayı, haftasonu boyunca biriken biyogaz miktarından dolayı grafikte pikler gözlenmiştir. Veriler, pikler göz önüne alınmadan incelendiğinde, reaktör 1 de 14. güne kadar gaz artışı gözlenmiş, daha sonra 15. günde ani bir düşüş olmuştur. Daha sonra sistem 23. güne kadar gaz üretiminde artış göstererek, 24. günden itibaren tekrar düşüşe geçmiştir (Şekil 4.10).



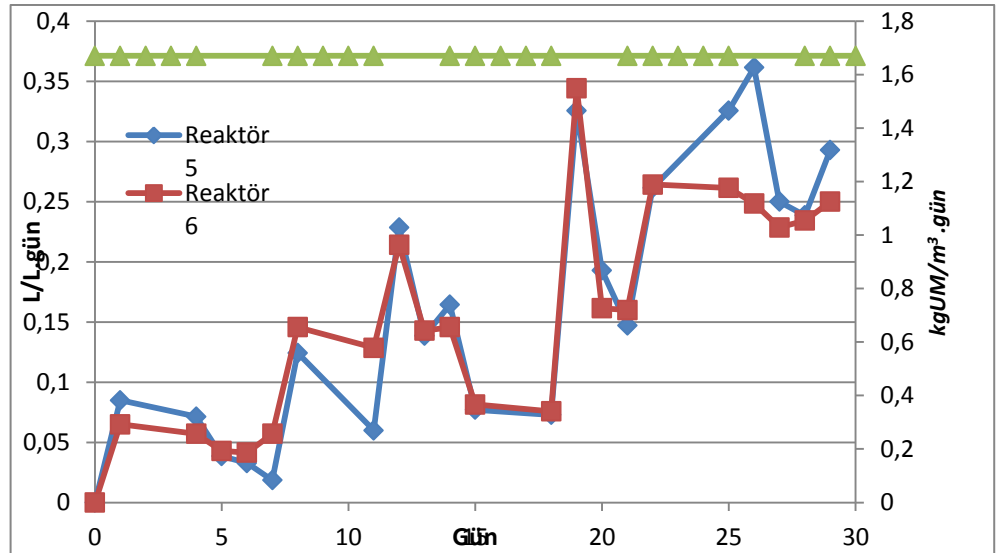
Şekil 4.12 Reaktör 1 (Ön işlemsiz Spirulina Beslemeli Reaktör) ve Reaktör 2 (Sonikasyon ön işlemlili Spirulina Beslemeli Reaktör), Günlük biyogaz miktarı (mL)

Reaktör 2' de 22. güne kadar gözlemlenen gaz artışı, daha sonra yavaşça düşüşe geçmiştir. Reaktör 3 te ilk günlerde ani bir gaz çıkışı gözlemlendikten sonra, bu artış 17. güne kadar devam etmiş, daha sonra ise düşüşe geçmiştir. Reaktör 4 te gaz çıkışında 16. güne kadar hızlı bir artış gözlemlenirken, 16. günden itibaren düşüş başlamıştır (Şekil 4.11)



Şekil 4.13. Reaktör 3 (Otoklav ön işlemlili Spirulina Beslemeli Reaktör) ve Reaktör 4 (Mikrodalga ön işlemlili Spirulina Beslemeli Reaktör), Günlük biyogaz miktarı (mL)

Reaktör 5 ve 6 da, ani bir gaz çıkışı gözlemlenmiş fakat daha sonra 2 reaktörde de 15. günde ani bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu düşüşten sonra , 20. günden itibaren gaz çıkış miktarı hızlı bir şekilde artmaya devam etmiştir. 2 reaktörde de gaz çıkışının azalmamış olmaması, 30 gün işletim süresinin yeterli gelmediğini; prosesin daha devam ettiğini göstermektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4. 14. Reaktör 5 (Ön işlemsiz karışık mikroalg beslemeli Reaktör) ve Reaktör 6 (Mikrodalga Ön işlemlili Karışık mikroalg beslemeli Reaktör), Günlük biyogaz miktarı (mL)

Bu çalışmada, reaktör 1-2-3-4'de, ön deneme olarak *Spirulina platensis* farklı ön işlemlerine maruz bırakılarak, biyogaz miktarına olan etkisi incelenmiştir. Bu sonuçlara göre, en iyi ön işlem olarak mikrodalga yöntemi seçilmiş, ve atıksudan izole edilen karışık mikroalg biyokütlesine de aynı ön işlem yapılmıştır. Yapılan ön işleminin etkilerinin incelenebilmesi için, *S. platensis* ve karışık mikroalg biyokütlesine ön işlem süresi aynı tutulmuştur. Buna göre, Reaktör 5 ve reaktör 6'dan elde edilen biyogaz miktarlarına bakıldığında (Çizelge 4.12), ön işleminin karışık mikroalg üzerinde bir etki yaratmadığı görülmektedir. Bunun nedeninin, uygulanan mikrodalga ön işlem süresinin yeterli olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Reaktör 4 (Mikrodalga ön işlemlili *S. platensis* beslemeli) ve reaktör 6 (mikrodalga ön işlemlili karışık mikroalg beslemeli) kıyaslandığında, sonuçlar *S. platensis* üzerinde mikrodalga ön işleminin daha etkili olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.12). *S. platensis* ve karışık mikroalg biyokütlesinde ağırlıklı olan *Oscillatoria acuminata* aynı alemden (siyanobakteri) olsalar da, karışık türün içerdiği *Scenedesmus armatus* ve *Chlorella sp.*' nin hücre duvarlarının parçalanmasına, mikrodalga ön işlem süresinin yeterli olmadığı düşünülmektedir. İleri ki çalışmalarda bu süre daha uzun tutulmalıdır.

Reaktör 1 (ön işlemsiz *S. platensis* beslemeli) ve Reaktör 5 (ön işlemsiz karışık mikroalg beslemeli) karşılaştırıldığında ise, birbirine çok yakın biyogaz miktarları elde edilmiştir. Bu sonucun 2 nedeni olabilir:

1- Karışık mikroalg biyokütledaki *O. acuminata* 'nın yoğunlukta olması; ve *S. platensis* ile aynı aleme sahip türler olmaları (Siyanobakteri), kolay parçalanabilir hücre duvarlarından dolayı benzer sonuçlar vermiştir.

2- Aynı alemden gelen (Yeşil algler) *Chlorella sp.* ve *Scenedesmus armatus* 'un sert hücre duvarlarının parçalanmasında ön işleminin yeterince etkili olmaması, çürütücüde parçalanamamış algal biyokütle birikimine sebep olmuştur.

Reaktör 5 ve 6 nin günlük gaz çıkışlarına bakıldığında, sonlara doğru azalma beklenen gaz çıkış miktarı, artmaya devam etmiştir. Bu durum, 2. nedenin daha geçerli olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.8 Reaktörlere göre kümülatif gaz miktarı

	Kümülatif Gaz Miktarı (ml)
Reaktör 1	3408,28
Reaktör 2	4725,85
Reaktör 3	5386,71
Reaktör 4	5399,71
Reaktör 5	3541
Reaktör 6	3358,57

Ham madde içeriği ve aşı özellikleri, metan yüzdesini etkileyen iki ana etkindir ve bazı hammadde birleşimleri mikroorganizma sayısında dengesizliğe yol açarak, reaktör performansının düşüşüne neden olabilir. Bu yüzden organik madde miktarı ile ilgili olarak üretilen metanın miktarı olan metan yüzdesi önemli bir değerdir. Sonuçlara bakıldığında (Çizelge 4.5), CH₄ metan % 72 ile % 89 arasında değiştiği görülmektedir. Ön deneme olarak kullanılan *Spirulina platensis* ile yapılan çalışmalarda (Reaktör 1-2-3-4), mikrodalga, otoklav ve sonikasyon ön işlemlerinin metan miktarını sırasıyla % 23,6, % 18 ve % 16 arttırdığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.9 Reaktörlere göre kümülatif metan miktarı

	Kümülatif Gaz Miktarı (mL)	% CH ₄	Metan miktarı (mL)
Reaktör 1	3408,28	72%	2453,96
Reaktör 2	4725,85	83,5%	3946,09
Reaktör 3	5386,71	85%	4578,70
Reaktör 4	5399,71	89%	4805,74
Reaktör 5	3541	76%	2691,16
Reaktör 6	3358,57	78%	2619,68

Karışık mikroalg biyokütlesiyle çalışılan reaktör 5 ve reaktör 6 da ise, ön işlemin metan miktarında bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeninin, yukarıda da belirtildiği gibi, ön işlem süresinin yetersizliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Metan enerji jenerasyonu stokiometrik olarak; 1 kg KOİ giderimi metan gazının standart sıcaklık ve basınç altında (1 atm, 25°C -STP) 0.35 m³ tür. Bu miktar, 35 °C sıcaklık ve 1 atm basınçta 0,395 L CH₄/gr KOİ_{giderimi} demektir (Khanal, 2008). Bu bilgi baz alınarak, elde edilen metan miktarlarına göre, reaktörlerden beklenen teorik KOİ_{giderimi} hesaplanmıştır (Çizelge 4.9).

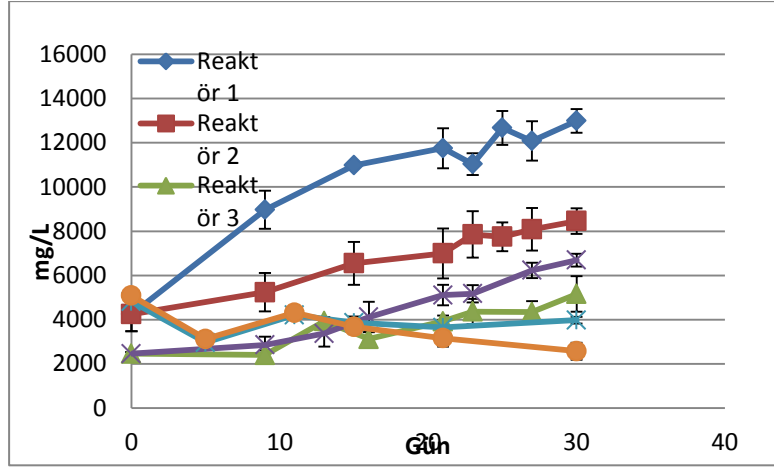
Çizelge 4.10 Tüm reaktörlerden beklenen teorik KOİ_{giderimi}

	Teorik KOİ _{giderimi}
Reaktör 1	6,21 gr
Reaktör 2	9,99 g
Reaktör 3	11,59 g
Reaktör 4	12,16 g
Reaktör 5	6,81 g
Reaktör 6	6,63 g

4.2.3. KOİ analizi:

Kimyasal oksijen ihtiyacı, suyun içindeki tüm organik maddelerin ve oksitlenebilir inorganik maddelerin karbondioksit ve suya oksitlenmesi için gereken toplam oksijen miktarının ölçüsüdür. Kimyasalların tüketilmesi, organik madde içeriğinin ve buna göre gerekli olan oksijen miktarının dolaylı bir göstergesini verir. Bu çalışmada, başlangıç çamurunun 1/10 seyreltilmesiyle girilen KOİ değerlerinin çıkış değerinde düşüş beklense de, her gün yapılan organik substrat beslemesinden kaynaklanan bir artış gözlenmiştir.

Reaktör 1 ve 2 ye giren KOİ değeri 4250 mg/L iken, çıkış değerleri sırasıyla 1289 mg/L ve 8460 mg/L' ye yükselmiştir. Reaktör 3 ve 4' de , giriş KOİ değeri 2456 mg/L iken, çıkış suyunda bu değer sırasıyla 5159 mg/L ve 6695 mg/L'ye yükselmiştir. Reaktör 5 ve 6' da, KOİ giriş değerleri 5000 mg/L değerindeyken, çıkış değeri sırasıyla 4000 mg/L ve 2574 mg/L ye düşmüştür. Bu değişken verilerden dolayı, KOİ_{giderimi} hesaplanamamıştır.

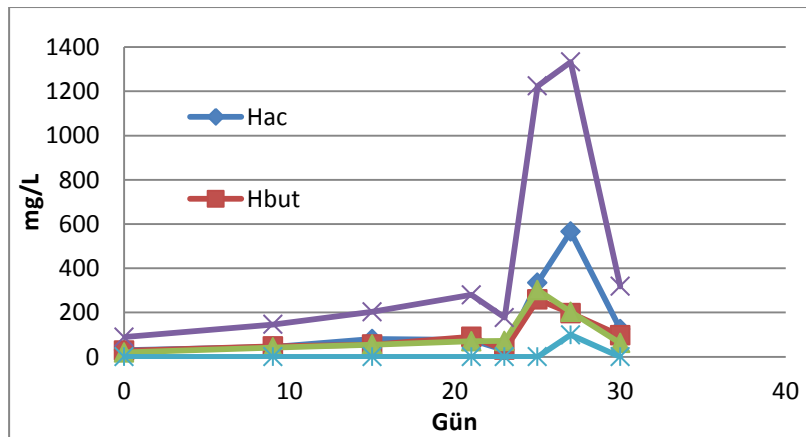


Şekil 4.15 Reaktörlere göre KOİ- zaman grafiği

4.2.4. Uçucu yağ asitleri (VFA) analizi:

VFA' lar kısa ve uzun zincirli organik asitlerdir ve kompleks organik maddelerin anaerobik fermentasyonu boyunca ara ürün formunda bulunurlar. Normal bir anaerobik sistemde, VFA konsantrasyon içeriği 50-250 mg/L aralığında olmalıdır (Sawyer, 2003).

Şekil 4.2.4' de Reaktör 1' in zamana bağlı uçucu yağ asitleri içeriği gösterilmiştir. Asetik asit (Hac), Bütirik asit (HBut), İzovaleik asit (IsoVal) konsantrasyonları başlangıçta sırasıyla 40, 30, 20 mg/L iken giderek artarak 85, 195, 205 değerlerine ulaşmış, fakat çıkış suyunda sırasıyla 124, 95 ve 60 mg/L değerlerine düşmüştür. Literatüre göre azalması beklenen bu konsantrasyonlar, her gün yapılan beslemeden dolayı reaktör içinde birikme neden olmuştur.

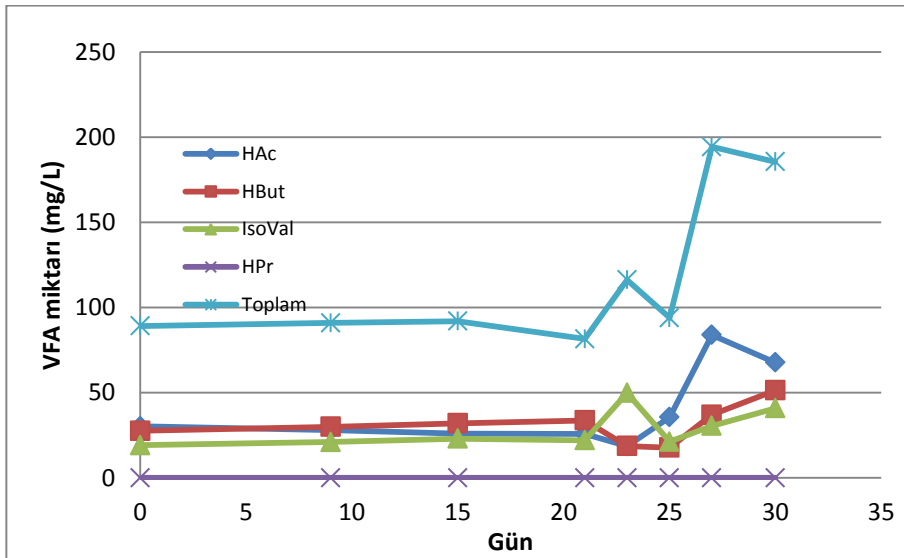


Şekil 4.16 Reaktör1 (Ön işlemsiz Spirulina Beslemeli Reaktör) VFA-zaman grafiği

Metan oluşumu gözlenmeden önce tüm uçucu yağ asitleri önce asetik aside, sonra sırayla etanol, bütirik asit ve propiyonik asite dönüşmektedir. Propiyonik asit birikimi ise metanojenlerin inhibasyonuna yol açarak sistemin inhibasyonuna neden olmaktadır. Reaktör 1 dışında hiç bir reaktörde Propiyonik asit (HPr) değeri görülmemiştir. Reaktör 1 de ise 26. günde 89.91 mg/L değerinde HPr gözlemlenmiştir. Fakat bu miktar metanojenik bakterilerin aktivitesini inhibe edebilecek kadar yüksek değildir. Propiyonik asit (HPr) değerinin 900 mg/L'den yüksek değerlere ulaştığı, asetik asidin ise >2000 mg/L HAc olduğu noktada metanojenik bakteri aktivitesi inhibe olabilmektedir (Lee et al, 2012)

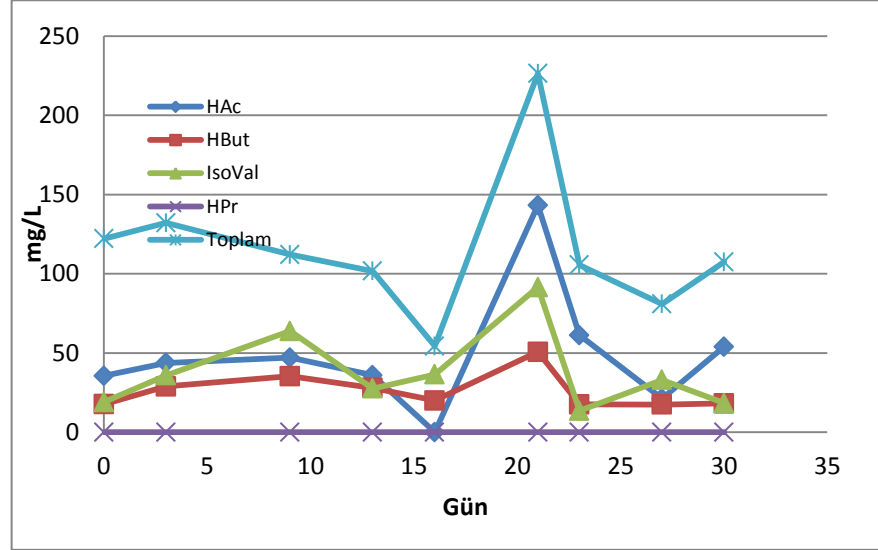
Reaktör 1 de gözlenen toplam VFA konsantrasyonu 27. gün 1330 mg/L' e kadar yükselmiştir. Son gün çıkış suyunda ise bu veri 350 mg/L kadar düşmüştür. Bu veriler, Öztürk'ün belirttiği toksisite sınırları içerisinde. Öztürk'e göre anaerobik parçalanma için VFA konsantrasyonunun 1000-1500 mg/L aşmaması gerekmektedir (Öztürk, 2007). Buna göre, reaktör 1 de VFA konsantrasyonu toksik aralığa girmiş olsa da, sınırı geçmemiştir.

Şekil 4.15' de Reaktör 2' nin zamana karşı VFA içeriği gösterilmektedir. Reaktör 2 de, reaktör 1'e benzer şekilde zamana karşı bir artış gözlenmiştir. Girişte 90 mg/L ile başlayan sistem, 30. günün sonunda 185 mg/L' ye yükselmiştir. Fakat tüm veriler toksisite sınırlarının altındadır.

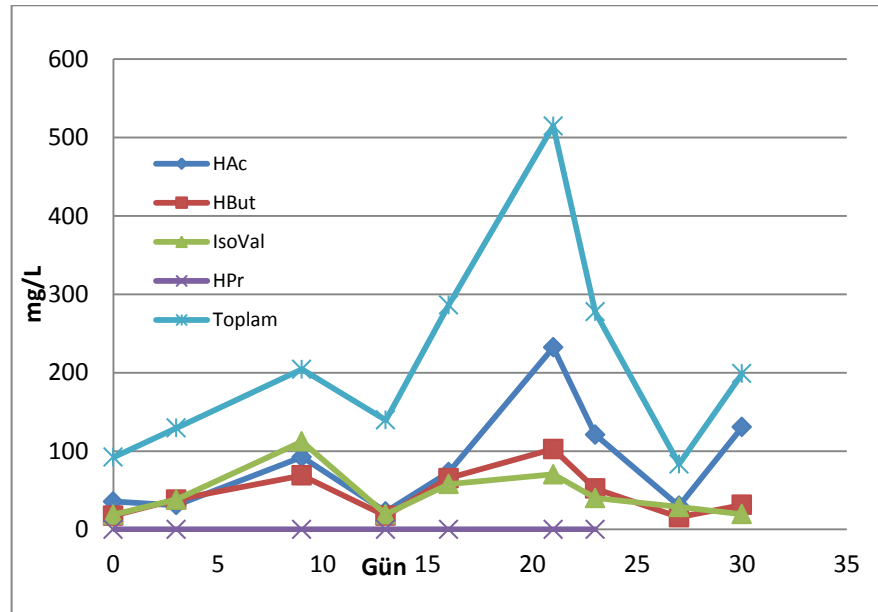


Şekil 4.17 Reaktör 2: (Sonikasyon ön işlemlili Spirulina Beslemeli Reaktör) VFA-zaman grafiği

Şekil 4.16' te Reaktör 3' ün zamana karşı VFA içeriği gösterilmektedir. Hac, HBut, IsoVal konsantrasyonları başlangıçta sırayla 36, 17,67, 18,93 mg/L iken giderek artarak 143, 50, 60 değerlerine ulaşmış, fakat çıkış suyunda sırasıyla 50, 18,12 ve 18,97 mg/l değerlerine düşmüştür. Giriş suyu ile çıkış suyundaki benzer veriler, her gün beslenen organik substrattan kaynaklanmaktadır. Benzer veriler reaktör 4 te de gözlemlenmiştir (Şekil 4.17).

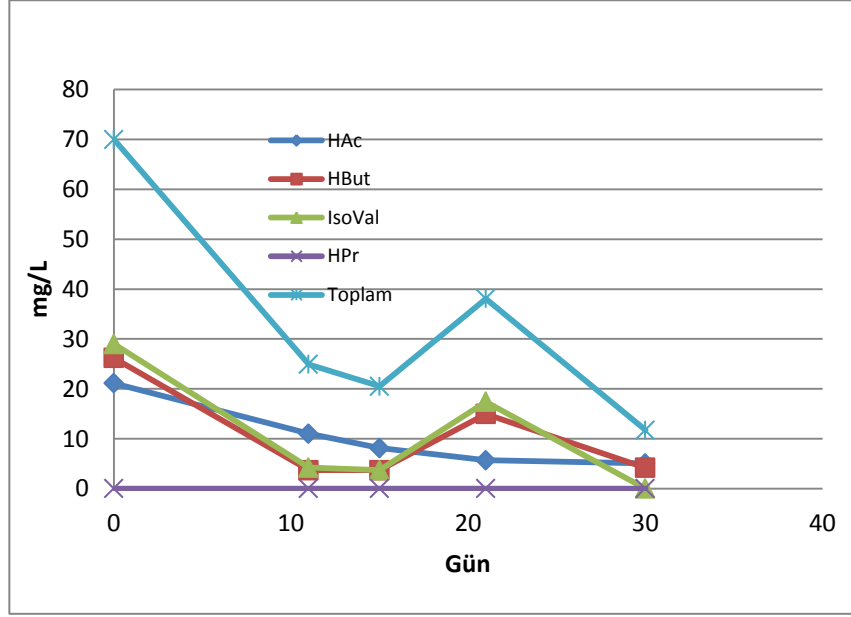


Şekil 4.18. Reaktör 3: (Otoklav ön işlemlili Spirulina Beslemeli Reaktör) VFA-zaman grafiği

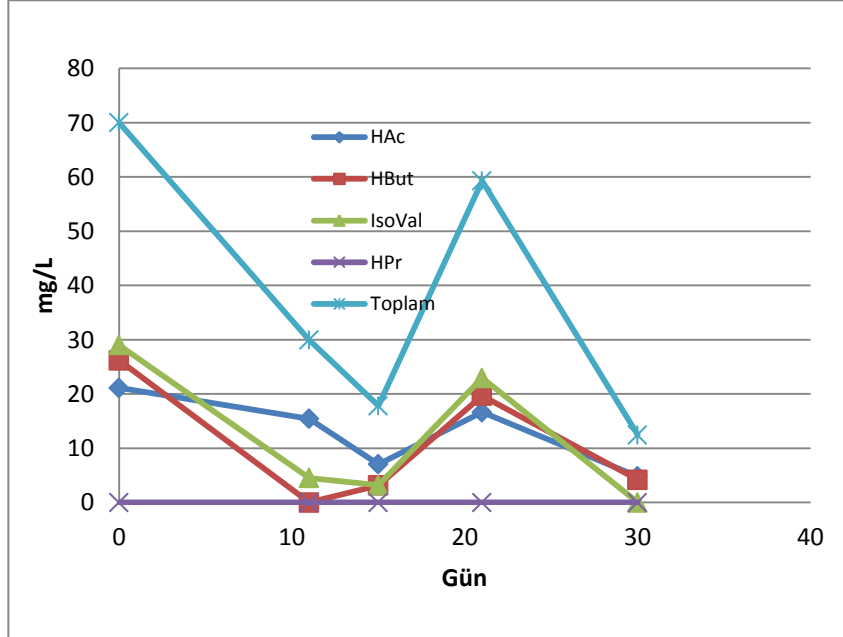


Şekil 4.19 Reaktör 4: (Mikrodalga ön işlemlili Spirulina Beslemeli Reaktör) VFA-zamanbgrafiği

Şekil 4.18' te Reaktör 5' in zamana karşı VFA içeriği gösterilmektedir. Çok düşük miktardaki başlangıç Hac, HBut, IsoVal konsantrasyonları, 30 günün sonunda neredeyse sıfırlanmıştır. Bu durum üretilen organik asitlerin de kullanıldığını ve 30 günlük işletim süresinin sonunda halen prosesin devam ettiğini göstermektedir. Aynı sonuçlar, reaktör 6da da gözlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.20. Reaktör 5: (Ön işlemsiz karışık mikroalg beslemeli Reaktör) VFA-zaman grafiği



Şekil 4.21. Reaktör 6 (Mikroalg Ön işlemleri Karışık mikroalg beslemeli Reaktör) VFA-zaman grafiği

Yukarıda belirtildiği gibi, anaerobik proseslerde besleme yapılan hammaddenin içeriği en önemli verilerden biridir. Çizelge 4.7 de besleme yapılan algal biyokütlenin VFA içerikleri ve miktarları verilmiştir.

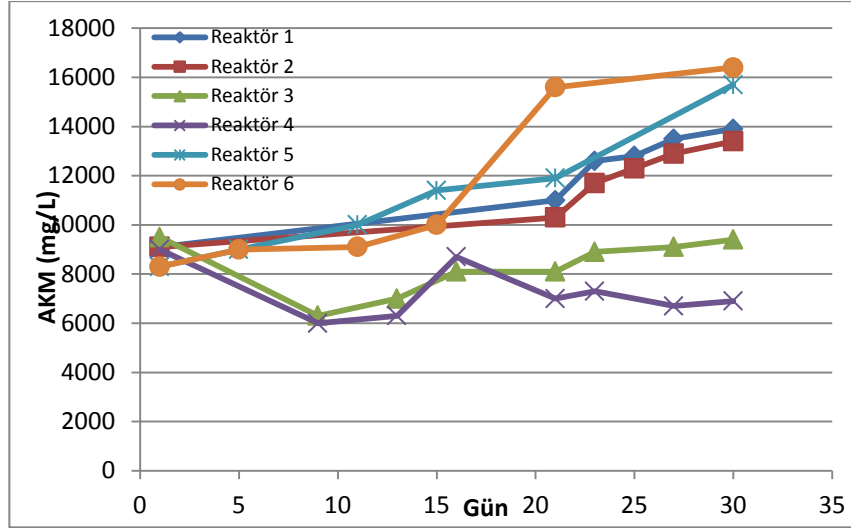
Çizelge 4.11 Besleme yapılan algal biyokütlenin VFA içerikleri ve miktarları.

Besleme yapılan biyokütle	HAc	HBut	Iso Val	HPr	Toplam
<i>Spirulina platensis</i> Ön işlemsiz	659,13	198,8	320,99	0	1600,3
<i>Spirulina platensis</i> Sonikasyon Ön işlemli	866,72	387,43	220,08	0	1758,24
<i>Spirulina platensis</i> Otoklav Ön işlemli	739,78	273,06	243,31	0	1582,24
<i>Spirulina platensis</i> Mikrodalga Ön işlemli	1219,35	446,17	499,65	8,35	3003
Karışık Mikroalg Ön işlemsiz	81,55	16,29	22,8	0	134,31
Karışık Mikroalg- Mikrodalga Ön işlemli	124,66	15,56	0	0	146,23

Bu verilere göre, besleme yapılan substratın VFA konsantrasyonunun yüksekliği, reaktör içindeki VFA miktarını arttığı anlaşılmıştır.

4.2.5. Askıda katı madde tayini

Reaktör 1 ve 2 ye giren AKM değerleri 9100 mg/L değerindeyken, çıkış akışında reaktör 1 ve reaktör 2 de sırasıyla 13900 mg/L ve 13400 mg/L miktarı gözlemlenmiştir (Şekil 4.20). Bu artış reaktör içerisinde substrat birikiminin olduğunu göstermektedir. Reaktör 3 ve reaktör 4 girişlerindeki AKM miktarı sırasıyla 9500 mg/L ve 9000 mg/L iken, çıkış akışında sırasıyla 9400 mg/L ve 6900 mg/L 'ye düşmüştür . Reaktör 5 ve reaktör 6 girişlerinde AKM değeri 8300 mg/L iken, çıkış akışında sırasıyla 15700 ve 16400 mg/L 'ye kadar yükselmiştir. Bu durum yukarıda da belirtildiği gibi, mikroorganizmaların karışık algal biyokütleyi parçalayamadığı için substrat birikimine neden olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.22 Tüm reaktörlerin AKM-Zaman grafiği

Çizelge 4.12'de besleme yapılan algal biyokütlenin askıda katı madde(AKM) ve uçucu askıda katı madde (UAKM) miktarları verilmiştir.

Çizelge 4.12 Besleme yapılan biyokütlenin AKM ve UAKM değerleri

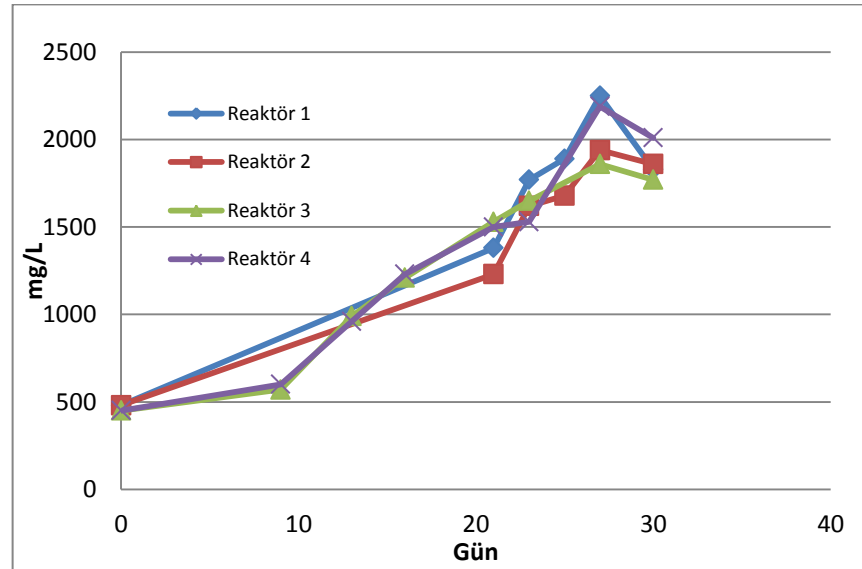
Algal biyokütle	AKM(mg/L)	UAKM (mg/L)
Ön işlemsiz <i>Spirulina platensis</i>	33600	33100
Sonikasyon ön işlemlili <i>Spirulina platensis</i>	23300	23100
Otoklav ön işlemlili <i>Spirulina platensis</i>	40000	38500
Mikroalg ön işlemlili <i>Spirulina platensis</i>	23100	20100
Ön işlemsiz karışık mikroalg biyokütlesi	31900	31300
Mikroalg ön işlemlili mikroalg biyokütlesi	40800	39400

4.2.6. Amonyum-nitrojen (NH₄-N) testi

Rao et al. yaptığı araştırmalarda bakteriler için 200- 1500 mg/L NH₄-N konsantrasyonun, metanojenler üzerinde olumsuz etki yarattığı ve 6.5- 8.5 pH değerleri aralığında NH₄-N konsantrasyonundaki artışın, metanojenik aktiviteyi düşürdüğü belirtilmiştir (Rao et al, 2008).

Besleme yapılmadan önce 450-480 mg/L ($\text{NH}_4\text{-N}$) ile başlatılan *Spirulina sp.* ile ön deneme yapılan reaktörler (Reaktör 1-2-3-4), 27. güne kadar artış göstermiştir (Şekil 4.21). Reaktör 1 de ulaşılan maksimum değer 2250 mg/L iken, Reaktör 2 de 1840 mg/L, Reaktör 3 de 1860 mg/L ve Reaktör 4 te 2190 mg/L'dir. Bu değerler dört reaktörde de toksik sınırın aşıldığını göstermektedir. Daha sonra reaktör 1-2-3-4'in çıkış suyundaki $\text{NH}_4\text{-N}$ miktarları sırasıyla 1830mg/L, 1860 mg/L, 1770 mg/L, ve 2010 mg/L olarak minimal bir düşüş gösterse de, toksisite devam etmiştir. Karşılaşılan toksik sınırı aşan toplam azot ve buna bağlı serbest amonyak azotu ve amonyum azotu değerleri, sebebiyle biyogaz üretimi de düşürmüştür (Şekil 4.21).

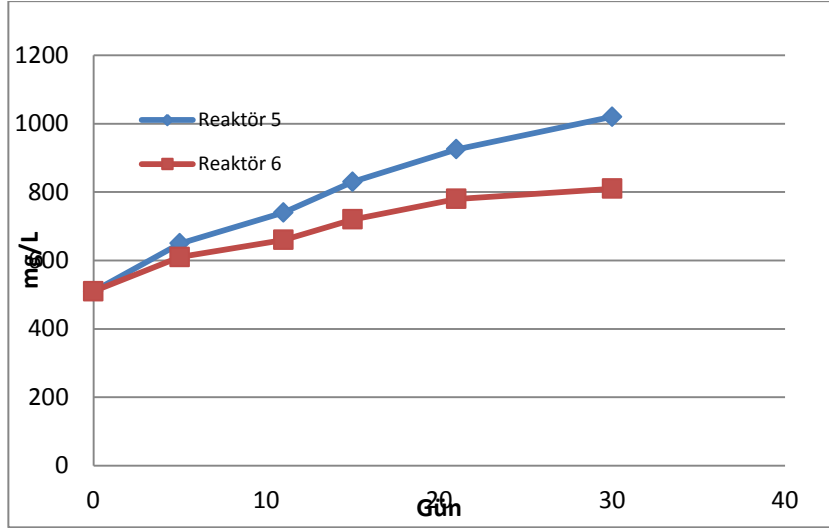
Veriler, ön işlemin, $\text{NH}_4\text{-N}$ miktarını azaltarak toksisiteyi az da olsa azaltmaya yaradığını göstermiştir.



Şekil 4.23. $\text{NH}_4\text{-N}$ - zaman grafiği (reaktör 1-4 için)

Karışık mikroalgal biyokütleyle çalışılan reaktör 5 ve 6 ya bakıldığında ise (Şekil 4.22), 510 mg/L ile başlatılan iki reaktörde de, son güne kadar devamlı bir artış gözlenmiştir. Reaktör 5 ve reaktör 6 da sırasıyla çıkış suyunda 1020 mg/L ve 810 mg/L $\text{NH}_4\text{-N}$ değeri bulunmuştur. Bu değerler toksisite yaratmayan aralıkta olup, devamlı artış günlük beslemeyle bağdaştırılmıştır.

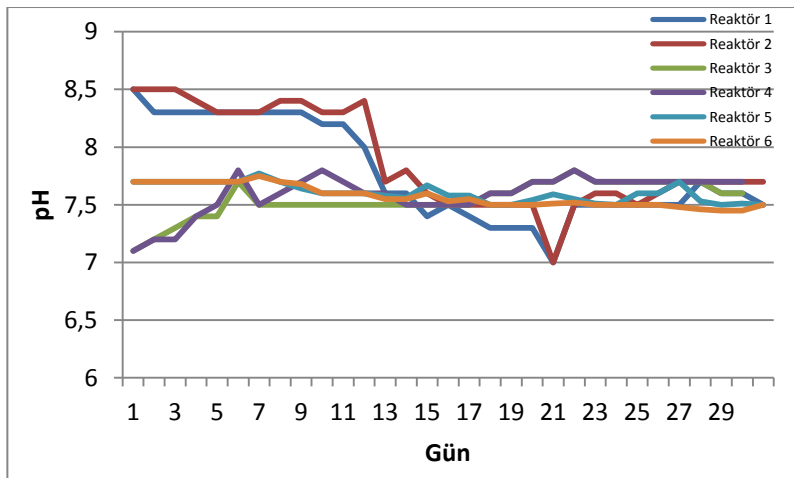
Reaktör 5'in reaktör 6'dan daha yüksek oluşu, diğer reaktörlerde olduğu gibi, ön-uygulamanın $\text{NH}_4\text{-N}$ değerlerini düşürerek, toksik etkiyi azaltmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.24 $\text{NH}_4\text{-N}$ - zaman grafiği (reaktör 5-6 için)

4.2.7. pH ölçümleri

Asetik asit oluşturan bakteriler ve metanojenik bakteriler mutlaka 6.5 ile 8 arasında nötral alanda bulunan pH değerine ihtiyaç duymaktadır. Çalışılan tüm reaktörlerin giriş pH değerleri reaktör 1 ve 2 için 8.5 iken reaktör 3-4 için 7.1 ve reaktör 5-6 için 7.7 dir. Çıkış değerleri ise hepsinde 7.5 olarak ölçülmüştür. Günlük olarak ölçülen pH değerlerinde ani bir düşüş/artış olmaması, sistemde bir düzensizlik olmadığını göstermekte, fakat günlük yapılan beslemeler VFA, kuru ağırlık, ve toplam azot gibi verileri beklenilenin aksinde ölçülmesine neden olmuştur. Alkalinite, uçucu yağ asitlerinden dolayı oluşan ani pH düşüşlerine karşı veya pH dalgalanmalarına karşı tampon görevi görerek sistemi korumuştur.



Şekil 4.25 Tüm reaktörlerin günlük pH sonuçları

Yapılan literatür araştırmaları neticesinde gaz üretimi veya proses akışı engellenmiş ise, bunun çeşitli nedenleri olabilmektedir. İşletme tekniğine bağlı nedenlerin yanı sıra proste çeşitli zararlı maddelerin inhibe edici konsantrasyonlara ulaşması da etken olabilmektedir. Bu durumun çok sayıda faktöre bağlı olması, sabit sınır değerlerinin belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Ayrıca reaktör içinde inokuluma alışamamış bakteri varlığı, mezofilik şartlar altında proses stabilitesi, organik yükleme hızları da önemli oranda proses inhibasyonundan sorumludur. Organik yükleme hızı gıda-mikroorganizma (F/M) oranına da etki eder. Sistemde dengesizliğin gözlenmesi, ortamda çok fazla substrat ya da çok az substrat (belki de çok fazla organizma ya da çok az organizma) bulunmasından kaynaklı olabilmektedir. Bunlardan herhangi biri F/M oran parametresindeki dengeye etkiyerek prosesi destabilize edebilmektedir (Hilkiah Igoni et al, 2008).

5.ÖNERİLER

Günümüzde fosil yakıt rezervlerindeki azalma ve petrokimyasal yakıtların fiyatlarındaki artış nedeniyle, biyokütleden elde edilen biyoyakıtların enerji potansiyeline artan bir ilgi vardır. Mikroalgler, ekim alanlarına ihtiyaç duyulmaması, karasal bitkilere kıyasla daha yüksek büyüme hızları ve biyoyakıt verimliliği ile gelecekteki sıvı ve gaz biyoyakıtların yenilenebilir kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Ancak, literatüre göre, biyoenerji üretmek amacıyla yetiştirilen mikroalglerin maliyet arttıran bir dizi gereksinimleri vardır. Mikroalgal biyokütle eldesi için gerekli ek besin maddelerinin maliyeti mikroalg yetiştiriciliğini ekonomik açıdan yetersiz hale getirmektedir. Buna karşılık, eğer mikroalgal biyokütle, atık su kullanılarak üretilirse, bu ikili süreç maliyeti düşürerek büyük ölçekli mikroalg üretimini ekonomik hale getirebilecektir (Angelidaki I, 2004).

Bu araştırmada ön çalışma olarak kullanılan *Spirulina platensis* türünde en iyi biyogaz verimi mikrodalga ön işlemi ile elde edilmiş, atıksudan izole edilmiş karışık tür mikroalgal biyokütleden ise uygulamanın süresinin yetersizliğinden dolayı bir etki gözlemlenememiştir. Mikrodalga ön işlemi mikroalg parçalanmasını arttırarak anaerobik parçalanma hızını ve metan üretim potansiyelini arttırsa da, pozitif enerji dengesi kurulamamaktadır. Bu yüzden daha az enerji tüketen ön-uygulama teknikleri araştırılmalıdır (Passos, et al., 2013). Buna ek olarak, bu çalışmada, geleneksel tam karıştırmalı reaktör kullanımlarında devamlı beslemeden kaynaklı organik substratın biyometan üretiminde kullanımı tam gerçekleşmeyip çıkış suyunda halen biyoenerji açısından zengin bir organik içerik kalmaktadır. Bu yüzden ileri ki çalışmalarda farklı reaktör düzenekleri ve besleme yöntemleri denenerek, daha fazla enerji kazanımı sağlanmalıdır. Ayrıca ipliksi yapıdaki türün ağırlıklı olduğu karışık mikroalgal biyokütleden elde edilen biyogaz miktarının ve metan içeriğinin azlığı, mikrodalga ön işleminin yetersizliğinden kaynaklanmıştır. Karışık mikroalgal biyokütlenin içerdiği kalın hücre duvarlı yeşil algler anaerobik parçalanmayı zorlaştırmıştır. İleri ki çalışmalarda, bu durum dikkate alınmalıdır. Son olarak, yapılacak analizler için +4 °C de 2 aydan uzun süre beklemeye alınan örnekler, bazı verileri olumsuz olarak etkilemiştir. Bu yüzden, analizler mümkün olduğunca bekletilmeden yapılmalıdır.

Algal anaerobik parçalama, bir çok tatlı su ve deniz algiyle farklı kombinasyonlarla çalışılmıştır. Birbirinden farklı sıcaklıklar, reaktör

konfigürasyonları, ön-uygulamalar ve eş-sindirim parametreleri uygulanmış, ve anaerobik parçalanabilme miktarları yakın ilişkili türlerde bile farklı sonuçlar vermiştir. Bunun nedeni, mikroalglerde CH_4 veriminin, hücresel protein, karbonhidrat ve lipid içeriğine, ve hücre duvarı yapısına göre değişmesidir. Mikroalglerin kimyasal kompozisyonu türden türe değişmekte, ve hatta bazen aynı türler altında farklı büyüme ortamlarında kompozisyon değişiklikleri gözlemlenmektedir. Bu yüzden , alglerden CH_4 üretimi farklı deney koşulları altında incelenmeli ve en iyi büyüme koşulları bulunmalıdır. Böylece anaerobik parçalama için maksimum biyokütle miktarı elde edilebilecektir (Lakaniemi,et al., 2012). Alg türlerinin karakterizasyonu sonrasında büyüme ve biyolojik özelliklerinin anlaşılması ve uygun koşulların olabilecek en düşük maliyetle sağlanması, algal biyokütleden elde edilen temiz enerjinin sürdürülebilir geleceğinde umut verici bir rol oynayabilecektir.

Türkiye' nin enerji ihtiyacı her geçen gün artmaktadır. Ülkemizde, doğalgazın %98'i, petrolün % 92'si ve kömürün % 30'u ithal edilmektedir. Yerli ve yenilenebilir kaynakların üretimini de dikkate aldığımızda enerji ithal bağımlılığımızın % 72 olduğu görülmektedir. Bunun en önemli nedeni Türkiye' nin petrol ve doğalgaz rezervleri açısından kendine yetersiz olması ve bu kaynakları ithalat yoluyla karşılamasıdır (Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı). Gelecekte ciddi sorunlarla karşılaşmamak için alternatif enerji kaynaklarının kullanımına yönelik çalışmalara hız verilmeli, enerji kaynaklarının kullanımında dışa bağımlılığın azaltılması için yerli kaynak potansiyelinin verimli kullanılmasına dönük çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abou-Shanab, R. A., Ji, M. K., Kim, H. C., Paeng, K. J., and Jeon, B. H.,** 2013, Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. *Journal of environmental management*, 115, 257-264 pp.
- Akiyama, M., Ioriya, T., Imahori, K., Kasaki, H., Kumano, S., Kobayasi, H., and Yamagishi, T.,** 1977, *Illustrations of the Japanese fresh-water algae*. Uchidarokakuho Publishing Company, Limited. 933p.
- Alzate, M. E., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F., and Pérez-Elvira, S. I.** 2012. Biochemical methane potential of microalgae: influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. *Bioresource technology*, 123, 488-494pp.
- Ammar A. Albalasmeh, Asmeret Asefaw Berhe, Teamrat A., and Ghezzehe,** 2013, A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry, *Carbohydrate Polymers* 97:253–261pp.
- Andrulevičiūtė, V., Skorupskaitė, V., and Kasperovičienė, J. ,** 2011, Cultivation of microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. as a potential biofuel feedstock. *Environmental Research, Engineering and Management*, 57(3), 21-27pp.
- Angelidaki I. and Sanders W. ,** 2004, Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 3(2), 117-29, ISSN: 1569-1705pp.
- APHA, AWWA, WPCF,** 2001, *Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater*, American Public Health Association, Ed. Washington, D.C.
- Aspe, E., M. Cristina Marti, and M., Roedel,** 1997, Anaerobic treatment of fishery wastewater using a marine sediment inoculum, *Water Res.* 31 (9) ,2147–2160pp.
- Belasco, W.,** 1997, Algae Burgers for a Hungry World? The Rise and Fall of *Chlorella* Cuisine, *Technology and Culture* 38 (3): 608–34pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bernard, O., Hadj-Sadok, Z., Dochain, D., Genovesi, A., and Steyer J.P.,** 2001, Dynamical Model Development and Parameter Identification for an Anaerobic Wastewater Treatment Process, *Biotechnol. Bioeng.*, 75: 424-438 pp.
- Bitton, G.,** 1994, Wastewater microbiology. 1 ed. Ecological and applied microbiology, Wiley-liss: Florida. 478p.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J.** 1959, A rapid method for total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 , 911–917pp.
- Buxy, S., R. Diltz, and P. Pullammanappallil,** 2013, Biogasification of marine algae *Nannochloropsis oculata*, *Ceram. Trans.* 239 , 56–67pp.
- Cardozo, Karina H.-M.; Thais, Guaratini; Marcelo P., Barros; Vanessa R., Falcão; Angela P., Tonon; Norberto P., Lopes; Sara, Campos; Moacir A., Torres; Anderson O., Souza; Pio, Colepicolo; and Ernani, Pinto,** 2006, Metabolites from algae with economical impact, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* (Elsevier Inc.) 146 (1-2): 60–78pp.
- Chen, P.H.,** 1987, Factors Influencing Methane Fermentation of Micro-algae, University of California, Berkley Berkley, USA.
- Chen, P.H., and Oswald, W.J.,** 1998, Thermochemical treatment for algal fermentation, *Environ. Int.* 24 (8), 889–897pp.
- Chen, Y., Cheng, J.J., and Creamer, K.S.,** 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: a review, *Bioresour. Technol.* 99, 4044–4064pp.
- Chisti, Y.,** 2007, Biodiesel from microalgae., *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306pp.
- Christenson, L., and Sims, R.,** 2011, Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology advances*, 29(6), 686-702pp.
- Chu, C.P., Lee, D.J., Chang, B.V., You, C.S., and Tay, J.H.,** 2002, “Weak” ultrasonic pretreatment on anaerobic digestion of flocculated activated biosolids., *Water Res.* 36, 2681–2688pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Collet, P., Hélias, A., Lardon, L., Ras, M., Goy, R. A., and Steyer, J. P.**, 2011, Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource technology*, 102(1), 207-214pp.
- Converti, A., Oliveira, R. P. S., Torres, B. R., Lodi, A., and Zilli, M.**, 2009, Biogas production and valorization by means of a two-step biological process. *Bioresource technology*, 100(23), 5771-5776pp.
- Dalrymple, O.K., Halfhide, T., Udom, I., Gilles, B., Wolan, J., and Zhang, Q.**, 2013, Wastewater use in algae production for generation of renewable resources: a review and preliminary results. Dalrymple et al. *Aquatic Biosystems*, 9:2pp.
- De Schamphelaire, L., and W. Verstraete**, 2009, Revival of the biological sunlight-to-biogas energy conversion system, *Biotechnol. Bioeng.* 103 (2) , 296–304pp.
- Ehimen, E. A., Connaughton, S., Sun, Z., and Carrington, G. C.**, 2009, Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol codigested microalgae biomass. *GCB Bioenergy*, 1(6), 371-381pp.
- Elektrik İşleri Etüt İdaresi Genel Müdürlüğü**, 2005, Biyogaz [Internet] Available from . www.eie.gov.tr/biyogaz [accessed at 7/2005].
- Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı**. Nükleer Güç Santralleri ve Türkiye. Nükleer Enerji Proje Uygulama Daire Başkanlığı. Yayın No:2.
- Experimental Bioscience**, Hartree-Lowry and Modified Lowry Protein Assays, <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/lowry.html> (Erişim Tarihi: 26 Temmuz 2014)
- Fenton, O., and D. Ohuallachain**, 2012, Agricultural nutrient surplus as potential input sources to grow third generation biomass (microalgae): a review, *Algal Res.* 1, 49–56pp.
- Franchino, M., Comino, E., Bona, F., and Riggio, V. A.**, 2013, Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. *Chemosphere*, 92(6), 738-744pp.
- Golueke, C.G., W.J. Oswald, and H.B. Gotaas**, 1957, Anaerobic digestion of algae, *Appl. Microbiol.* 5 (1) , 47–55pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Golueke, C.G. , and W.J. Oswald**, 1959, Biological conversion of light energy to the chemical energy of methane, *Appl. Microbiol.* 7 (4), 219–227pp.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., and Steyer, J. P. ,** 2012a, Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass and Bioenergy*, 40, 105-111pp.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., and Steyer, J. P.,** 2012b, Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. *Bioresource technology*, 110, 610-616pp.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., and Steyer, J. P. ,** 2013, Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of thermally pretreated *Scenedesmus sp.* biomass. *Bioresource technology*, 129, 219-223pp.
- Gülen, J. ve Arslan, H. ,** 2005, BIOGAS, Journal of Engineering and Natural Sciences Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi
- Hilkiah Igoni, A., Ayotamuno, M. J., Eze, C. L., Ogaji, S. O. T., & Probert, S. D.,** 2008, Designs of anaerobic digesters for producing biogas from municipal solid-waste. *Applied energy*, 85(6), 430-438.
- Huber, G. W., Iborra, S., & Corma, A.,** 2006, Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering. *Chemical reviews*, 106(9), 4044-4098.
- Inglesby, A.E. , and A.C. Fisher,** 2012, Enhanced methane yields from anaerobic digestion of *Arthrospira maxima* biomass in an advanced flow-through reactor with an integrated recirculation loop microbial fuel cell, *Energy Environ. Sci.* 5, 7996–8006pp.
- Jarrell, K.F., M. Saulnier, and A. Ley,** 1987, Inhibition of methanogenesis in pure cultures by ammonia, fatty acids, and heavy metals, and protection against heavy metal toxicity by sewage sludge, *Can. J. Microbiol.* 33 , 551–555pp.
- Kaatze U.,** 1995, Fundamentals of microwaves. *Radiation Phys Chem* 45:539–48pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Karim K., Hoffmann R, Thomas Klasson K, and Al-Dahhan MH.,** 2005, Anaerobic digestion of animal waste: effect of mode of mixing. *Water Res.*, Sep;39(15):3597-606pp.
- Kayhanian, M.,** 1994, Performance of a high solids anaerobic digestion process under various ammonia concentrations, *J. Tech. Biotechnol.* 59 (4) , 349–352pp.
- Keymer, P., Ruffell, I., Pratt, S., and Lant, P. ,** 2013, High pressure thermal hydrolysis as pre-treatment to increase the methane yield during anaerobic digestion of microalgae. *Bioresource technology*, 131, 128-133pp.
- Khanal, S.K.,** 2008, Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications. John Wiley and Sons, Inc. ISBN: 978-0-813-82346-1. Chapter 2. 29-41pp.
- Lakaniemi, A. M., Tuovinen, O. H., and Puhakka, J. A.,** 2013, Anaerobic conversion of microalgal biomass to sustainable energy carriers—a review. *Bioresource technology*, 135, 222-231pp.
- Lee, A.K. , D. Lewis, and P.J. Ashman,** 2012, Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: process and specific energy requirements, *Biomass Bioenergy* 46, 89–101pp.
- Lopez, J.A.S. , M.M. Santos, and A.F.C. Perez,** 2009, Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing, *Bioresour. Technol.* 100 , 5609–5615pp.
- Lu, F. L. Shao, and P. He,** 2013, Bacterial bioaugmentation for improving methane and hydrogen production from microalgae, *Biotechnology for biofuels* 6 (1) ,92p.
- Lyovo,G.D., G. Du, and J. Chen,** 2010, Sustainable bioenergy bioprocessing: boimethane production, digestate as biofertiliser and as supplemental feed in algae cultivation to promote algae biofuel production, *J. Microb. Biochem. Technol.* 2 (4) , 100–106pp.
- MARZANO, C. M. A. D. S., Legros, A., Naveau, H. P., and Nyns, E. J.,** 1982, Biomethanation of the Marine Algae *Tetraselmis*†. *International Journal of Solar Energy*, 1(4), 263-272pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mata, T. M., Martins, A. A., and Caetano, N. S.,** 2010, Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232pp.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q. and Xian, M. ,** 2009, Biodiesel production from oleaginous microorga-nisms. *Renew. Energy*. 34 (1), 1-5pp.
- Miranda, J. R., Passarinho, P. C., and Gouveia, L.,** 2012, Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresource technology*, 104, 342-348pp.
- Mussnug, J. H., Klassen, V., Schlüter, A., and Kruse, O. ,** 2010, Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of biotechnology*, 150(1), 51-56pp.
- Nagle, V. L., Mhalsekar, N. M., and Jagtap, T. G. ,** 2010, Isolation, optimization and characterization of selected Cyanophycean members. *Indian Journal of Marine Sciences*, 39(2), 212-218pp.
- Öztürk, M.,** 2005, Hayvan Gübresinden Biyogaz Üretimi. Çevre ve Orman Bakanlığı.
- Park, S., and Li, Y.,** 2012, Evaluation of methane production and macronutrient degradation in the anaerobic co-digestion of algae residue and lipid waste, *Bioresour. Technol.* 111, 42–48pp.
- Parkin, G.F. , and Owen, W.F.,** 1986, Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges, *J. Environ. Eng.* 112 , 867–920pp.
- Passos, F., Solé, M., García, J., and Ferrer, I.,** 2013, Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. *Applied Energy*, 108, 168-175pp.
- Pavlostathis S.G, and Giraldo-Gomez E.,** 1991, Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. 660 *CRC Crit. Rev. Environ. Control*. 21:411-490pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Peng, S., Hou, C., Wang, J., Chen, T., Liu, X., and Yue, Z. , 2012,** Performance of anaerobic co-digestion of corn straw and algae biomass from lake Chaohu. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 28(15), 173-178pp.
- Polakovičová, G., Kušnír, P., Nagyová, S., and Mikulec, J. , 2012,** Process integration of algae production and anaerobic digestion. *CHEMICAL ENGINEERING*, 29p.
- Qing, Z., ShaoHua, Y., Wei, S., HaiQin, L., JianPing, H., and ShiQun, H., 2009,** Influences of suspended carrier on anaerobic digestion process of blue algae. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 25(6), 1305-1308pp.
- Ramamoorthy,S., and Sulochana N., 1989,** Enhancement of biogas production using algae, *Curr. Sci.* 58 (11), 646–647pp.
- Rao, A.G., Reddy, T.S.K., Prakash, S.S., Vanajakshi, J., Joseph, J., Jetty, A., Reddy, A.R. and Sarma, P.N., 2008,** Biomethanation Of Poultry Litter Leachate In UASB Reactor Coupled With Ammonia Stripper For Enhancement Of Overall Performance, *Bioresource Technology* 99 (2008): 8679–8684pp.
- Ras, M., Lardon, L., Bruno, S., Bernet, N., and Steyer, J. P., 2011,** Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, 102(1), 200-206pp.
- Richmond, A., 2004,** Handbook of microalgal culture: bio-technology and applied phycology. Ames, Iowa, Unites States: Blackwell Science
- Rui, X., Pay, E., Tianrong, G., Fang, Y., and Wudi, Z., 2009,** The potential of blue-green algae for producing methane in biogas fermentation. In *Proceedings of ISES World Congress 2007 (Vol. I–Vol. V)* (pp. 2426-2429). Springer Berlin Heidelberg.
- Salerno, M., Nurdogan,Y., and Lundquist, T.J., 2009,** Biogas production from algae biomass harvested at wastewater treatment ponds, *Bioenergy Engineering Conference*, American Society of Agricultural and biological Engineers, Washington, USA.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Samson, R. and Leduy, A.**, 1983, Improved performance of anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass by addition of carbon rich wastes, *Biotechnol. Lett.* 5 (10) , 677–682pp.
- Saxena, V.K., Tandon, S.M., and Singh, K.K.**, 1984, Anaerobic digestion of green filamentous algae and water hyacinth for methane production, *Natl. Acad. Sci Lett.* 7 (9) , 283–284pp.
- Say, A.N., Keriş, Ü.D., Şen, Ü., Gürol, M.D.**, 2010, Mikroalglerden Biyokütle Enerjisi Üretimi ve Türkiye, VIII. Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu, UTES'10 1-5 Aralık 2010.
- Sawyer, J.E.**, 2003, Natural gas prices impact nitrogen fertilizer costs. *Integrated Crop Management* 490(4), 14 April 2003.
- Scheffler, John.**, 2009, Underwater Habitats, *Illumin9* (4), 1-4pp.
- Sebastian, S.**, 2013, Filamentous Algae of a Hill Stream Of Kerala, India, *Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology (IOSR-JESTFT)* e-ISSN: 2319-2402,p- ISSN: 2319-2399. Volume 4, Issue 3 .PP 35-39pp.
- Sialve B., Bernet N. and Bernard O.**, 2009, Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances* 27(4), pp 409-16, ISSN: 0734-9750
- Silva, A.**, 2014, Comparison of pretreatment methods for total lipids extraction from mixed microalgae, *Renewable Energy* 63. 762-766pp.
- Speece, R.E.**, 1996, *Anaerobic Biotechnology For Industrial Wastewaters*, 3, 6, 36p, Archae Press, USA.
- Sudhakar, K., Suresh, S., and Premalatha, M.**, 2011, An overview of CO2 mitigation using algae cultivation technology. *Int. J. Chem. Res.* 3(3), 110-117pp.
- Symons, G. E., & Buswell, A. M.**, 1933, The methane fermentation of carbohydrates1, 2. *Journal of the american chemical society*, 55(5), 2028-2036.
- Tadros, G.M.** , 1985, Screening and Characterizing Oleaginous Microalgal Species from the Southeastern United States: A Final Subcontract Report." Alabama AandM University, Solar Energy Research Institute.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tchobanoglous, G., Burton F.L. and Stensel, H.D.**, 2003, Waste Water Engineering: Treatment And Reuse. Fourth Ed. New Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, 1819p.
- Thurman, H. V.**, 1997, Introductory Oceanography. New Jersey, USA: Prentice Hall College. ISBN 0-13-262072-3.
- Tornabene, T.G.**, 1985, Lipid and lipopolysaccharide constituents of cyanobacterium *Spirulina platensis* (Cyanophyceae, Nostocales), Marine Ecology- Progress Series. Vol. 22. 121-125pp.
- Tuluk, C.**, 2007, Çeşitli Substratların Anaerobik Şartlar Altında Metan Ve Hidrojene Dönüşüm Potansiyellerinin Belirlenmesi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Ulukardeşler, A.**, 2012, Nesil Biyoyakıt Teknolojisi Olan Alglerin Türkiye’de Üretilebilirlik Potansiyeli, Onuncu Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, Koç Üniversitesi, İstanbul 3.
- Vergara-Fernández, A., Vargas, G., Alarcón, N., and Velasco, A.**, 2008, Evaluation of marine algae as a source of biogas in a two-stage anaerobic reactor system. Biomass and Bioenergy, 32(4), 338-344pp.
- Violeta Makarevičienė, V., Andrulevičiūtė, V., Virginija Skorupskaitė, V., & Kasperovičienė, J.**, 2011, Cultivation of Microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. as a Potential Biofuel Feedstock. Aplinkos tyrimai, inžinerija ir vadyba, (3), 57.
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., and Ruan, R.**, 2010, Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. Applied biochemistry and biotechnology, 162(4), 1174-1186.
- Wigmosta, M.S., Coleman, A.M., Skaggs, R.J., Huesemann, M.H., and Lane, L.J.**, 2011, National microalgae biofuel production potential and resource demand. Water Resour. Res. 47, 1–13pp.
- Wiley, P.E., Campbell, J.E., and McKuin, B.**, 2011, Production of biodiesel and biogas from algae: a review of process train options, Water Environ Res. 2011 Apr;83(4):326-38pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Woertz, I., Feffer, A., Lundquist, T., and Nelson, Y.,** 2009, Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. *Journal of Environmental Engineering*, 135(11), 1115-1122pp.
- Yang, Z., Guo, R., Xu, X., Fan, X., and Luo, S. ,** 2011, Hydrogen and methane production from lipid-extracted microalgal biomass residues. *international journal of hydrogen energy*, 36(5), 3465-3470pp.
- Yılmaz, H.K. ve Duru, M.D. ,**2011, Siyanobakteri *Spirulina platensis*'in Besin Kimyası ve Mikrobiyolojisi, *Derleme Dergisi*, 4(1): 31-43pp.
- Yen, H.W. , and D.E. Brune,** 2007, Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane, *Bioresour. Technol.* 98, 130–134pp.
- Yusuf, C. ,**2007, Biodiesel from microalgae, s.l.: *Biotechnology Advances*, Vol. 25.
- Yuan, X., Wang, M., Park, C., Sahu, A. K., and Ergas, S. J. ,** 2012, Microalgae growth using high-strength wastewater followed by anaerobic co-digestion. *Water Environment Research*, 84(5), 396-404pp.
- Zamalloa, C., J.D. Vrieze, N. Boon, and W. Verstraete,** 2012, Anaerobic digestibility of marine microalgae *Phaeodactylumtricornutum* in a lab-scale anaerobicmembrane bioreactor, *Bioenergy Biofuels* 93, 859–869pp.
- Zelitch, I.,** 1971, *Photosynthesis, Photorespiration and Plant Productivity*. Academic Press. p. 275.
- Zeng, S., Yuan, X., Shi, X., and Qiu, Y. ,**2010, Effect of inoculum/substrate ratio on methane yield and orthophosphate release from anaerobic digestion of *Microcystis* spp. *Journal of hazardous materials*, 178(1), 89-93pp.

ÖZGEÇMİŞ

Hande Ermiş 1989 yılında İstanbul'da doğmuştur. İlk öğretimi Kültür Koleji ve liseyi Cağaloğlu Anadolu Lisesinde tamamlamıştır. İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü (UOLP)' ndeki lisans eğitimine 2007 yılında başlamış ve 2012 yılında mezun olmuştur. Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ndeki yüksek lisans çalışmasına 2012 yılında başlamıştır.