

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEŞİTLİ HİDROLİZ BAKTERİLERİNE KİMYASAL MUTAJEN  
UYGULAMALARININ METAN ÜRETİM VERİMLERİNE  
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Rıfat YILDIRIM**

**Danışman  
Prof. Dr. İsmail TOSUN**

**II. Danışman  
Prof. Dr. Kamil EKİNCİ**

**DOKTORA TEZİ  
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
ISPARTA - 2022**



© 2022 [Rifat YILDIRIM]

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyogaz Üretim Mekanizması.....	4
1.2. Ön İşlemler.....	6
1.2.1. Fiziksel ön işlemler.....	7
1.2.2. Mekanik ön işlemler.....	7
1.2.3. Termal ön işlemler.....	8
1.2.4. Mikrodalga ile ön işlemler.....	9
1.2.5. Kimyasal ön işlemler.....	9
1.2.6. Biyolojik ön işlemler.....	10
1.3. Enzimler.....	13
1.3.1. Endüstriyel enzimler.....	13
1.3.2. Mikrobiyal enzimler.....	14
1.4. Mutasyonlar.....	15
1.4.1. Kimyasal mutajenler.....	16
1.4.2. Nitröz asit (HNO <sub>2</sub> ).....	16
1.4.3. Etil metasülfat (EMS).....	17
1.4.4. N-metil-N'-nitrosoguanidin (MNNG).....	17
1.4.5. Fiziksel mutajenler.....	19
1.4.6. Mutasyon mekanizmaları.....	19
1.5. Biyogaz Prosesine Etki Eden Faktörler.....	21
1.5.1. Uçucu yağ asitleri (VFA).....	22
1.5.2. Hidrolik bekleme süresi (HRT).....	24
1.5.3. pH.....	24
1.5.4. Alkalinite.....	25
1.6. Metagenom analizi.....	26
1.7. Tüm genom analizi.....	26
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	28
3. MATERYAL VE METOD.....	40
3.1. Materyal.....	40
3.2. Metot.....	41
3.2.1. Bakteri izolasyonu, saflaştırılması, tür tespiti, mutajen kimyasal uygulamaları.....	42
3.2.2. Enzim analizleri.....	49
3.2.3. Biyometan potansiyeli (BMP) ünitesi.....	49
3.2.4. Tüm genom analizleri.....	53
3.2.5. Sürekli karıştırmalı tank reaktör (CSTR) sistemi.....	54
3.2.6. Metagenom.....	57
3.3. Analiz Yöntemleri.....	58
3.3.1. Nem analizi.....	58
3.3.2. Organik madde (OM).....	58
3.3.3. Hidrolik bekletme süresi (HRT).....	59
3.3.4. Organik yükleme oranı (OLR).....	59
3.3.5. Hammadde özgül metan üretimi (HÖMÜ).....	60
3.3.6. pH.....	60
3.3.7. Karbon ve azot tayini (C/N).....	60
3.3.8. KOİ Analizi.....	61

3.3.9. VFA analizi.....	62
3.4. İstatistiksel Analizler .....	63
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	64
4.1. İzole Edilen Bakterilerin Tür Tespiti .....	64
4.2. Enzim Analiz Sonuçları .....	64
4.2.1. Proteaz enzimi .....	64
4.2.2. Selülaz enzimi .....	65
4.2.3. Lipaz enzimi.....	66
4.3. BMP Deneme Sonuçları.....	69
4.3.1. BMP ön denemesi .....	69
4.3.2. BMP denemesi .....	71
4.4. Tüm Genom Analizlerinin Sonuçları.....	88
4.5. CSTR Deneme Sonuçları .....	92
4.5.1. CSTR ön denemesi.....	92
4.5.2. Ana CSTR denemesi sonuçları .....	94
4.6. Metagenom Analiz Sonuçları .....	103
4.7. CSTR Sistemine Yüklenen Bakterilerin Sayım Sonuçları .....	107
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	108
KAYNAKLAR .....	112
ÖZGEÇMİŞ .....	131

## ÖZET

**Doktora Tezi**

### **ÇEŞİTLİ HİDROLİZ BAKTERİLERİNE KİMYASAL MUTAJEN UYGULAMALARININ METAN ÜRETİM VERİMLERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Rıfat YILDIRIM**

**Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. İsmail TOSUN**

**II. Danışman: Prof. Dr. Kamil EKİNCİ**

Biyometanol, biyogaz, biyodizel vb. biyoyakıt elde edilme potansiyeli olan organik atıklar, artan enerji taleplerini karşılamak için kullanılan önemli bir yenilenebilir enerji kaynağıdır. Biyogaz, bu biyoyakıtlar arasında yer alan ve biyokütlenin anaerobik madde fermantasyonu sonucunda elektrik üretiminde kullanılabilen bir gaz karışımıdır. Organik içerikli atıklardan enerji üretimi gerçekleştirilmesi ile, katı atık depolama alanlarındaki fazla yük oluşturan organik atıkların miktarı azalmakta ve bu atıklardan ekonomik açıdan gelir sağlanmaktadır. Bu amaçlar doğrultusunda işletilen biyogaz tesislerinin üretim maliyetlerinin düşürülmesi için, proses süresinin kısaltılması ve/veya oluşan biyogaz içindeki özgül metan miktarının artması gereklidir.

Bu çalışmanın amacı, sürekli karıştırılmalı tank reaktör (CSTR) sisteminden izole edilen mikroorganizmaların kimyasal mutajenler yardımıyla enzim üretim verimlerinin artırılması ve enzim üretim verimleri artırılan bu mikroorganizmaların biyogaz sistemine ilavesi ile mevcut biyogaz tesislerinden elde edilen biyogaz hacminin ve metan miktarının artırılmasıdır. Bu kapsamda, izole edilen mikroorganizmalara mutajen olarak MNNG, EtBr, EMS, Nitrik Asit ve Fosforik Asit kimyasalların uygulaması yapılmış ve enzim üretim verimlerinin artışları kıyaslanmıştır. Ardından, 3 Ana bakteri ve 5 ayrı kimyasal (Fosforik Asit, MNNG, EMS, EtBr ve Nitrik Asit) muamelesi sonucunda elde edilen suşlar ile birlikte toplam 18 ayrı bakteri suşu (Ana ve Mutant Bakteriler) kullanılarak BMP ve CSTR sistemlerinde bu bakterilerin biyogaz proseslerine etkileri araştırılmıştır.

Çalışmalar sonucunda; uygulanan mutajen kimyasalların enzim üretimlerine etkisinin olduğu ortaya çıkmıştır. Bazı suşlarda bu etki olumsuzken, bazılarında ise olumlu şekilde kendisini göstermiştir. BMP denemelerine başlamadan önce sistemin güvenilirliği, yapılan ön deneme ile test edilmiştir. Elde edilen veriler, Tukey testi ile analiz edilmiş ve ana denemeye başlanmıştır. Ana BMP

denemelerinden alınan ölçümlerde, Saman-Ana bakterisi %15,95, Saman-MNNG bakterisi %19,35 ve S-EMS bakterisi %16,80 oranlarında artış göstermiştir.

CSTR sisteminde ana denemeye geçilmeden önce (BMP denemesinde olduğu gibi) ön bir deneme yapılmıştır. Ön deneme sonucunda, reaktörlerden elde edilen özgül metan verileri arasında ortalama %0,45 farklılık olduğu tespit edilmiş ve bu verilere Tukey testi uygulanarak CSTR denemeleri başlatılmıştır. Bu bakterilerin etkilerinin görülebilmesi için CSTR sistemi, HRT:20 gün olacak şekilde 3 HRT (60 gün), başlangıçtan itibaren ise aralıksız 153 gün boyunca işletilmiştir.

CSTR denemeleri sonucunda, bakteri ilavesi ile biyogaz hacmi ve özgül metan miktarı artmış olup, bu artış kümülatif metan miktarları bazında Ana Bakterinin ilave edildiği reaktörlerde %6,55 ve Mutant bakterili reaktörlerde %8,48 oranında gerçekleşmiştir. Bu durum, enzim verimleri artırılmış mutant bakterilerin biyogaz sistemine ilave edilmesinin, ana bakteri ilavesinden daha yararlı olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, kimyasal mutajen kullanılarak enzim üretim verimlerinin artırılabilmesinin mümkün olduğu kanıtlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** MNNG, EtBr, EMS, BMP, CSTR Biyogaz, Metan

**2022, 131 sayfa**

## **ABSTRACT**

**Ph. D. Thesis**

### **DETERMINATION OF THE EFFECTS OF CHEMICAL MUTAGEN APPLICATIONS ON METHANE PRODUCTION EFFICIENCIES TO VARIOUS HYDROLYSIS BACTERIA**

**Rıfat YILDIRIM**

**Süleyman Demirel University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Environmental Engineering**

**Supervisor: Prof. Dr. İsmail TOSUN**

**Co-Supervisor: Prof. Dr. Kamil EKİNCİ**

Bioethanol, biogas, biodiesel etc. Organic wastes, which have the potential to obtain biofuels, are an important renewable energy source used to meet increasing energy demands. Biogas is a gas mixture among these biofuels that can be used in electricity production as a result of anaerobic fermentation of biomass. With the realization of energy production from wastes with organic content, the amount of organic wastes that create excess load in solid waste storage areas is reduced and economic income is provided from these wastes. In order to reduce the production costs of biogas plants operated for these purposes, it is necessary to shorten the process time and/or increase the specific methane amount in the biogas generated.

The aim of this study is to increase the enzyme production efficiency of microorganisms isolated from the continuous stirred tank reactor (CSTR) system with the help of chemical mutagens and to increase the biogas volume and methane amount obtained from the existing biogas plants by adding these microorganisms with increased enzyme production efficiency to the biogas system. In this context, MNNG, EtBr, EMS, Nitric Acid and Phosphoric Acid chemicals were applied to the isolated microorganisms as mutagens and the increase in enzyme production efficiency was compared. Then, the effects of these bacteria on biogas processes in BMP and CSTR systems by using a total of 18 different bacterial strains (Main and Mutant Bacteria) together with the strains obtained as a result of the treatment of 3 main bacteria and 5 different chemicals (Phosphoric Acid, MNNG, EMS, EtBr and Nitric Acid). has been researched.

As a result of the studies; It has been revealed that the applied mutagenic chemicals have an effect on enzyme production. While this effect was negative in some strains, it showed itself positively in others. Before starting the BMP trials, the reliability of the system was tested with the preliminary trial. The obtained data were analyzed with the Tukey test and the main experiment was

started. In the measurements taken from the main BMP trials, Straw-Ana bacteria increased by 15.95%, Straw-MNNG bacteria by 19.35% and S-EMS bacteria by 16.80%.

In the CSTR system, a preliminary trial was conducted before the main trial (as in the BMP trial). As a result of the experiment, it was determined that there was an average of 0.45% difference between the data obtained from the reactors and CSTR trials were started as a result of the test by applying the Tukey test. In order to see the effects of these bacteria, the CSTR system was operated for 3 HRT (60 days) as HRT: 20 days, and for 153 days continuously from the beginning.

As a result of the CSTR trials, the biogas volume and specific methane amount increased with the addition of bacteria, and this increase was 6.55% in the reactors where the Mother Bacteria was added and 8.48% in the reactors with mutant bacteria, on the basis of cumulative methane amounts. This situation revealed that the addition of mutant bacteria with increased enzyme yields to the biogas system is more beneficial than the addition of the main bacteria. In addition, it has been proven that it is possible to increase enzyme production efficiencies by using chemical mutagens.

**Keywords:** MNNG, EtBr, EMS, BMP, CSTR Biogas, Methane

**2022, 131 pages**

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması kapsamında çalışmanın yönlendirilmesinde yol gösterici olan, danışman hocalarım Prof. Dr. İsmail TOSUN ve Prof. Dr. Kamil EKİNCİ'ye teşekkürlerimi sunarım. Mikrobiyoloji ve enzim çalışmalarında yapmış olduğu yönlendirmeler ile tezime büyük katkı sağlayan ve yardımcı olan Prof. Dr. Ali COŞKAN'a ve Tüm Genom Analiz sonuçlarının değerlendirilmesindeki değerli katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Yasemin BEKTAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim. Yapılan çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen başta Yüksek Ziraat Mühendisi Emrah GÖDE olmak üzere, Arş. Gör. Mehmet SOLAK'a, Yüksek Ziraat Mühendisi Barbaros Salih KUMBUL'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında göstermiş olduğu ilgi nedeniyle Sütçüler Prof. Dr. Hasan Gürbüz M.Y.O. Müdürü Doç. Dr. Mehmet Güvenç NEGİZ'e, vermiş oldukları bilgi ve paylaştıkları tecrübeleriyle tez çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN ÇAKMAKÇI'ya, Dr. Öğr. Üyesi Ahmet KARAHAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Cihan ÖZGÜR'e, Öğr. Gör. Dr. Serkan ÖZDEMİR'e ve Dr. Öğr. Üyesi Ferdi AKBIYIK'a, çalışmalarda kullanılan CSTR reaktörlerinin yeniden yapılmasında büyük yardımları olan Sistem Makina Sanayi'den Mustafa DUMAN'a ve çalışma arkadaşlarına teşekkür ederim.

FDK-2019-7405 No'lu proje ile araştırmaya maddi olarak destek sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı yönetici ve çalışanlarına teşekkür ederim.

121Y565 No'lu 1002 projesi ile araştırmaya maddi olarak destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Rahmetli babama, hayatımda ve çalışmalarımda maddi ve manevi yardımlarından dolayı anneme, desteklerinden dolayı sevgili eşime ve anlayışından dolayı kızıma, minnet ve sevgi ile teşekkür ederim.

Rifat YILDIRIM  
ISPARTA, 2022

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Biyokütle enerjisine dayalı kurulu gücün yıllara göre değişimi.....	3
Şekil 1.2. Biyokütle enerjisinin, toplam kurulu güç içerisindeki yıllara göre oranı .....	4
Şekil 1.3. Biyogaz üretim aşamaları .....	6
Şekil 1.4. Nitröz asit mutagenesizinin mekanizması.....	17
Şekil 1.5. Baz değişim mekanizması.....	20
Şekil 1.6. Baz inersiyonuyla oluşan değişim .....	21
Şekil 3.1. Bakteriyolojik çalışmaların yapıldığı anaerobik ortam .....	43
Şekil 3.2. EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti (solda), Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazı (Sağda) .....	46
Şekil 3.3. ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Solda), kyratec thermal cyclers (Sağda) .....	47
Şekil 3.4. Tür tespiti çalışmaları akım şeması .....	47
Şekil 3.5. Mutasyon çalışmalarında kullanılan mutajen kimyasallar .....	48
Şekil 3.6. EtBr ilave edilen katı besiyeri.....	48
Şekil 3.7. BMP Ünitesinin görünümü .....	51
Şekil 3.8. BMP Deneme Şeması.....	51
Şekil 3.9. Gaz kompozisyonu belirlenmesi için kullanılan senkronize ünite.....	52
Şekil 3.10. Gaz sayacı.....	52
Şekil 3.11. Tüm Genom analiz çalışmaları akım şeması .....	54
Şekil 3.12. Geneious Prime programı ara yüzü görünümü.....	54
Şekil 3.13. CSTR'ın teknik çizimi ve tamamlanmış hali .....	56
Şekil 3.14. CSTR sistemi teknik çizim görünümü .....	56
Şekil 3.15. Elementar Vario MAX CN elementel analiz cihazı.....	61
Şekil 3.16. KOİ analizi termoreaktörden çıkan numuneler ve Spektrofotometre .....	62
Şekil 3.17. Numunelerin santrifüj işleminden sonraki görünümü .....	62
Şekil 3.18. Distilasyon düzeneği ve titrasyon işlemi .....	63
Şekil 4.1. Y-Ana bakterilerine göre mutant bakterilerin enzim değişimleri (%)	67
Şekil 4.2. P-Ana bakterilerine göre mutant bakterilerin enzim değişimleri (%)	68
Şekil 4.3. S-Ana bakterilerine göre mutant bakterilerin enzim değişimleri (%)	68
Şekil 4.4. Y-EtBr, P-Ana-2, P-Nitrik, Y-Nitrik, S-Ana-1 ve S-MNNG bakterilerin Kontrol'e göre (kümülatif Biyogaz biyogaz değişimi).....	77
Şekil 4.5. Y-EtBr, P-Ana-2, P-Nitrik, Y-Nitrik, S-Ana-1 ve S-MNNG bakterilerin Kontrol'e göre kümülatif metan değişimi.....	77
Şekil 4.6. Bakteri çaplarının tespiti çalışmaları .....	83
Şekil 4.7. S-Ana'ya ait genom ve anotasyonu .....	88
Şekil 4.8. S-Ana ve S-EtBr alignment sonucu elde edilen verilerin ekran görüntüsü.....	89
Şekil 4.9. S-Ana ve S-MNNG alignment sonucu elde edilen verilerin ekran görüntüsü.....	89
Şekil 4.10. Y-Ana'ya ait genom ve anotasyonu .....	90
Şekil 4.11. S-Ana ve S-MNNG alignment sonucu elde edilen verilerin ekran görüntüsü .....	91
Şekil 4.12. Y-Ana ve Y-Fosfor alignment sonucu elde edilen verilerin ekran görüntüsü .....	91

Şekil 4.13. CSTR denemesinde pH'nın zamanın fonksiyonu olarak değişimi .....	95
Şekil 4.14. CSTR prosesinden elde edilen günlük metan miktarları.....	99
Şekil 4.15. CSTR prosesinden elde edilen özül metan miktarları .....	99
Şekil 4.16. Kontrol reaktörlerinden elde edilen özgül metan miktarlarının regresyon analizi sonuçları.....	100
Şekil 4.17. S-Ana bakterili reaktörlerden elde edilen özgül metan miktarlarının regresyon analizi sonuçları.....	100
Şekil 4.18. S-MNNG bakterili reaktörlerden elde edilen özgül metan miktarlarının regresyon analizi sonuçları.....	101
Şekil 4.19. CSTR prosesinden elde edilen kümülatif metan üretim miktarları .	102
Şekil 4.20. Metagenom Analiz Sonuçları.....	106



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Türkiye'deki 2020 yılı enerji kaynakları, atık ve enerji miktarları ..... 3	3
Çizelge 1.2. Biyokütlenin parçalanmasında anaerobik ortamda görev alan mikroorganizmalar .....	10
Çizelge 1.3. Biyogaz üretimde kullanılan güncel ön işlemler .....	12
Çizelge 1.4. Anaerobik proseslerde optimum koşullar .....	22
Çizelge 1.5. En yaygın VFA'lar ve özellikler .....	22
Çizelge 2.1. Biyogaz üretimde kullanılan biyolojik yöntemler (Bakteri ilavesi). 29	29
Çizelge 2.2. Kimyasal ve/veya fiziksel Mutasyon sonucunda enzim miktarında elde edilen artışlar .....	34
Çizelge 3.1. BMP testlerinde kullanılan malzemelerin özellikleri .....	40
Çizelge 3.2. CSTR denemelerinde kullanılan materyallerin ve reaktörlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri .....	41
Çizelge 3.3. Kullanılan primer dizileri ve PCR koşulları .....	46
Çizelge 3.4. V bölgeleri için başlangıç ve bitiş noktaları .....	58
Çizelge 4.1. Proteaz, Selüla ve Lipaz enzimlerinin analiz sonuçları.....	66
Çizelge 4.2. BMP ön deneme sonuçları.....	69
Çizelge 4.3. BMP ön denemesi Tukey test sonucu .....	71
Çizelge 4.4. Kümülatif biyogaz miktarlarının zamanın fonksiyonu olarak değişimi (L) (Deneme-1).....	73
Çizelge 4.5. Kümülatif biyogaz miktarlarının zamanın fonksiyonu olarak değişimi (L) (Deneme-2).....	73
Çizelge 4.6. Kümülatif metan miktarlarının zamanın fonksiyonu olarak değişimi (L) (Deneme-1).....	74
Çizelge 4.7. Kümülatif metan miktarlarının zamanın fonksiyonu olarak değişimi (L) (Deneme-2).....	74
Çizelge 4.8. Kümülatif biyogaz miktarlarının Kontrol'e göre % değişimi (Deneme-1) .....	75
Çizelge 4.9. Kümülatif biyogaz miktarlarının Kontrol'e göre % değişimi (Deneme-2) .....	75
Çizelge 4.10. Kümülatif metan miktarlarının Kontrol'e göre % değişimi-1.....	76
Çizelge 4.11. Kümülatif metan miktarlarının Kontrol'e göre % değişimi-2.....	76
Çizelge 4.12. Özgül biyogaz ve metan üretim miktarları (Deneme-1) .....	78
Çizelge 4.13. Özgül biyogaz ve metan üretim miktarları (Deneme-2) .....	79
Çizelge 4.14. Kümülatif biyogaz ve metan üretim sıralaması.....	80
Çizelge 4.15. BMP denemesindeki paraleller için korelasyon test sonucu .....	81
Çizelge 4.16. OM giderim .....	82
Çizelge 4.17. Bakterilerin petri kaplarındaki çapları.....	82
Çizelge 4.18. Bakteri zon çapları, özgül biyogaz ve metan miktarları kıyaslaması .....	84
Çizelge 4.19. İzole edilen bakterilerin enzim üretim verimlerinin kıyaslanması.....	85
Çizelge 4.20. Min-Max Normalizasyonu (Feature Scaling) Verileri .....	87
Çizelge 4.21. Ham sekansın kalite değerleri.....	88
Çizelge 4.22. Text formatında SNP'lerin örnek gösterimi.....	90
Çizelge 4.23. Mutant bakterilerin ana bakteriye göre DNA nükleotit baz değişimlerinin toplu özeti.....	92

Çizelge 4.24. Reaktörlerin stabilizasyonundan sonraki 36 günlük özgülmetan üretim miktarı (L CH <sub>4</sub> /g OM) .....	93
Çizelge 4.25. CSTR ön denemesi Tukey test sonucu .....	94
Çizelge 4.26. CSTR denemesinde reaktörlerin OM giderim verimlerinin zamanın fonksiyonu olarak değişimi (%).....	96
Çizelge 4.27. CSTR denemesinde VFA'nın zamanın fonksiyonu olarak değişimi (mg/L).....	96
Çizelge 4.28. CSTR denemesinde alkalinitenin zamanın fonksiyonu olarak değişimi .....	97
Çizelge 4.29. CSTR denemesinde VFA/Alkalinite oranının zamanın fonksiyonu olarak değişimi .....	97
Çizelge 4.30. CSTR denemesinde KOİ'nin zamanın fonksiyonu olarak değişimi (mg/L).....	98
Çizelge 4.31. CSTR sisteminden elde edilen kümülatif metan değerleri.....	102
Çizelge 4.32. CSTR sistemine yüklenen bakteri sayıları.....	107



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BMP	Biyometan potansiyeli
Bp	Baz çifti
CSTR	Sürekli karıştırmalı tank reaktör (Continuous stirred tank reactor)
DC	Doğru akım
EMS	Etil metan sülfat
EPDK	Enerji piyasası düzenleme kurumu
HNO <sub>2</sub>	Nitröz asit
HÖMÜ	Hammadde özgül metan üretimi
HRT	Hidrolik bekleme süresi
KM	Katı madde
KOİ	Kimyasal oksijen ihtiyacı
LB	Luria Bertani
MNNG	N-metil-N'-nitrosoguanidin
MTEP	Milyon ton eşdeğer petrol
OLR	Organik yükleme hızı
OM	Organik madde
PCA	Plate Count Agar
PW	Pepton Water
P-Ana	<i>Bacillus halotolerans</i> bakterisi
P-EMS	P-Ana bakterisinin EMS ile mutasyona uğratılmış mutanı
P-EtBr	P-Ana bakterisinin EtBr ile mutasyona uğratılmış mutanı
P-Fosfor	P-Ana bakterisinin Fosforik Asit ile mutasyona uğratılmış mutanı
P-MNNG	P-Ana bakterisinin MNNG ile mutasyona uğratılmış mutanı
P-Nitrik	P-Ana bakterisinin Nitrik Asit ile mutasyona uğratılmış mutanı
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
SB	Sığır gübresi
SM	Su muhtevası
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
S-Ana	<i>Salmonella enterica</i> bakterisi
S-EMS	S-Ana bakterisinin EMS ile mutasyona uğratılmış mutanı
S-EtBr	S-Ana bakterisinin EtBr ile mutasyona uğratılmış mutanı
S-Fosfor	S-Ana bakterisinin Fosforik Asit ile mutasyona uğratılmış mutanı
S-MNNG	S-Ana bakterisinin MNNG ile mutasyona uğratılmış mutanı
S-Nitrik	S-Ana bakterisinin Nitrik Asit ile mutasyona uğratılmış mutanı
Y-Ana	<i>Bacillus licheniformis</i> bakterisi
Y-EMS	Y-Ana bakterisinin EMS ile mutasyona uğratılmış mutanı
Y-EtBr	Y-Ana bakterisinin EtBr ile mutasyona uğratılmış mutanı
Y-Fosfor	Y-Ana bakterisinin Fosforik Asit ile mutasyona uğratılmış mutanı
Y-MNNG	Y-Ana bakterisinin MNNG ile mutasyona uğratılmış mutanı
Y-Nitrik	Y-Ana bakterisinin Nitrik Asit ile mutasyona uğratılmış mutanı

## 1. GİRİŞ

Organik içerikli atıklardan (biyokütle) biyoetanol, biyogaz, biyodizel vb. birçok biyoyakıt elde edilmektedir (Kapluhan, 2014). Biyokütle enerjisi, artan enerji taleplerini karşılamak için kullanılan önemli bir yenilenebilir enerji kaynağıdır (Erensoy ve Çek, 2020).

Bu biyoyakıtlar arasında yer alan biyogaz, biyokütlenin anaerobik madde fermantasyonu sonucunda %60-75 metan ( $CH_4$ ), %23-38 karbondioksit ( $CO_2$ ), eser miktarda hidrojen sülfür ( $H_2S$ ) ve hidrojen ( $H_2$ ) içeren ve elektrik üretiminde kullanılabilen bir gaz karışımıdır (Bukvic vd., 2002; Aybek vd., 2015; Üçok, 2016). Organik içerikli atıklardan biyogaz üretimi ile enerji üretimi gerçekleştirilmekte, katı atık depolama alanlarındaki fazla yük oluşturan organik atıkların miktarı azalmakta ve bu atıklardan ekonomik açıdan gelir sağlanmaktadır. Bu amaçlar doğrultusunda kullanılan biyogaz tesislerinin üretim maliyetlerinin düşürülmesi için, proses süresinin kısaltılması ve/veya oluşan biyogaz içindeki özgül metan miktarının artması gereklidir.

Elektrik üretiminde fosil yakıtların ve biyogaz kullanımının araştırıldığı bir çalışmada, biyogaz kullanılarak üretilen elektrik enerjisi sera gazı emisyonlarını azaltmakta olduğu ve organik atık/artık materyallerin anaerobik fermantasyon ile bertarafını sağladığı bildirilmiştir. Bu avantajlarıyla biyogaz kullanımının daha çevreci olduğu söylenebilir (Koçar vd., 2013).

Biyogaz oluşumunda açığa çıkan metan gazı ideal bir gaz olup sıvılaştırma basıncı 280-350 bar olduğundan LPG gibi kolay sıvılaştırılamamaktadır (ETKB, 2019). Bunun yanında, biyogazın ısı değerini oluşturan  $CH_4$  gazı,  $CO_2$  gazına göre 21 kat (Koyuncu ve Akgün, 2017) - 23 kat (Şenol vd., 2017) daha fazla sera etkisine neden olmaktadır. Bu nedenle, organik maddelerin anaerobik çürümesiyle oluşan biyogazın kontrol altında tutulması, ekonomik getirisinin yanında küresel ısınmanın önüne geçilebilmesi için yapılması gereken önemli çalışmalarındandır (Şenol vd., 2017). Bunun yanı sıra, biyogaz alternatif yakıtlar arasında önemli bir konuma sahiptir (Yılmaz ve Gümüş, 2017).  $CH_4$  gazı içeriği

%55 olan 1 m<sup>3</sup> biyogazın sağladığı 4700-5700 kcal'lık ısı değeri, 0,62 litre gaz yağı, 1,46 kg odun kömürü, 3,47 kg odun, 0,43 kg bütan, 12,3 kg tezek, 4,70 kWh elektrik enerjisi eşdeğerleri ile büyük bir potansiyele sahiptir (Şenol vd., 2017; ETKB, 2019).

Biyogaz çok yönlü bir enerji kaynağı olarak, doğrudan ısıtma ve aydınlatma amacıyla kullanılmasının yanısıra, elektrik enerjisine ve mekanik enerjiye çevrilerek de kullanılmaktadır. Biyogaz sıkıştırıldığında, sıkıştırılmış doğalgaz (CNG) olarak motorlu araçlarda yakıt olarak da kullanılabilir. Ayrıca biyogaz üretimi sonucu ortaya çıkan fermente ürün, toprak iyileştirici olarak kullanılabilir (Şenol vd., 2017).

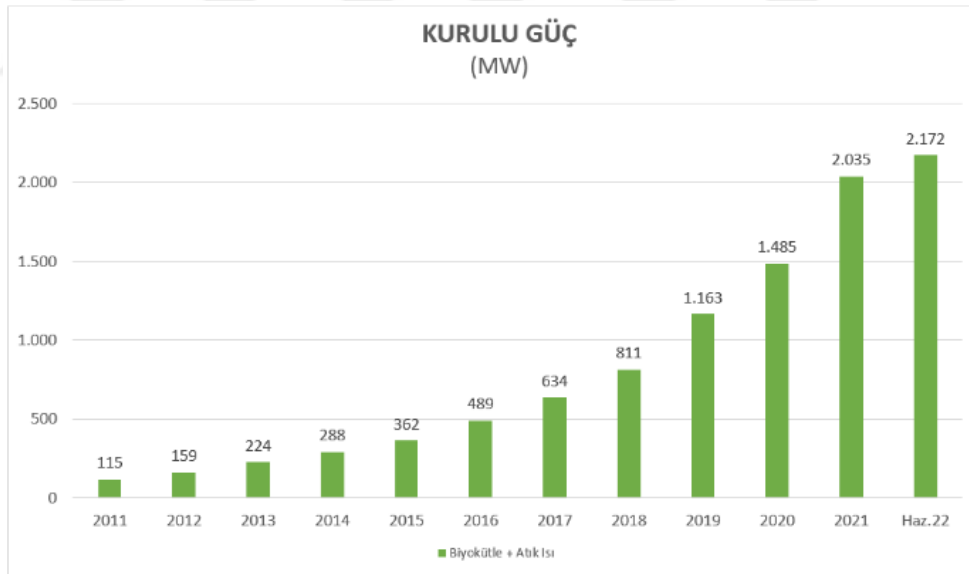
Türkiye için yapılan araştırmalardan elde edilen Çizelge 1.1 verileri incelendiğinde, organik atıkların toplam ekonomik enerji eşdeğeri 3,9 MTEP/yıl, teorik enerji değeri ise 33,1 MTEP/yıl civarına olduğu tahmin edilmektedir (ETKB, 2021). Burada, ekonomik enerji eşdeğeri ve teorik enerji eşdeğeri arasındaki büyük farkın azaltılarak, ekonomik enerji eşdeğerinin artırılması için önemli bir organik atık potansiyelimizin olduğu söylenebilir.

Elektrik üretiminde de yaygın bir şekilde kullanılan biyokütle enerjisine dayalı kurulu güç Haziran 2022 itibarıyla 2.172 MW (Şekil 1.1), biyokütle enerjisinin toplam elektrik üretimi içerisindeki payı %2,14 olup (Şekil 1.2) yıllara göre kurulu güç değişimi ve toplam elektrik üretimi içerisindeki payı Şekil 1.1 ve Şekil 1.2'de yer almaktadır (ETKB, 2022). Şekil 1.1 incelendiğinde biyokütle enerjisine dayalı kurulu gücün yıllara göre değişiminin sürekli artışta olduğu görülmektedir. Ancak Şekil 1.2 incelendiğinde bu artışın yeterli olmadığı düşünülmektedir. Biyokütle enerjisinin, toplam elektrik üretimi içerisindeki payının %2,14 olmasının nedenlerinden biri de Çizelge 1.1'de görülen ekonomik enerji eşdeğeri ve teorik enerji eşdeğeri arasındaki farkın büyük boyutlarda olmasından kaynaklandığı söylenebilir. Bu aradaki farkın kapatılmasıyla birlikte, biyokütle enerjisinin toplam elektrik üretimi içerisindeki payı artırılabilir.

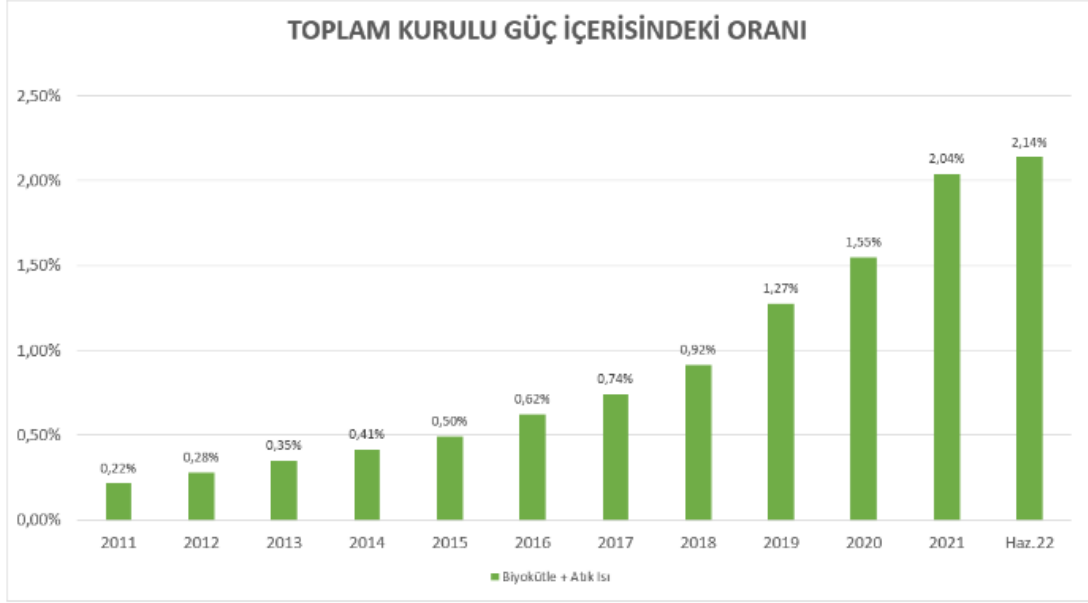
Biyogaz üretimi ve üretilen biyogazın güç sistemlerinde kullanımı üzerine yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Bu tür çalışmaların yanı sıra, tesislerden elde edilen biyogaz hacminin ve metan miktarının artırılması amacıyla da birçok çalışma mevcuttur (Koç vd., 2019; Chatzopoulou vd., 2019).

Çizelge 1.1. Türkiye'deki 2020 yılı enerji kaynakları, atık ve enerji miktarları (ETKB, 2021)

Toplam Hayvan Sayısı	422 832 374 Adet
Hayvansal Atık Miktarı	193 878 079 ton/yıl
Hayvansal Atıkların Enerji Değeri (Teorik)	4 385 371 TEP/yıl
Hayvansal Atıkların Enerji Değeri (Ekonomik)	1 084 506 TEP/yıl
Bitkisel Üretim Miktarı	171 399 002 ton/yıl
Bitkisel Atık Miktarı	62 206 754 ton/yıl
Bitkisel Atıkların Enerji Değeri (Teorik)	25 384 268 TEP/yıl
Bitkisel Atıkların Enerji Değeri (Ekonomik)	1 462 159 TEP/yıl
Belediye Katı Atık Miktarı	32 170 975 ton/yıl
Belediye Atıklarının Enerji Değeri (Teorik)	3 373 011 TEP/yıl
Belediye Atıklarının Enerji Değeri (Ekonomik)	485 858 TEP/yıl
Orman Atıklarının Enerji Değeri (Ekonomik)	859 899 TEP/yıl
Atıkların Toplam Teorik Enerji Eşdeğeri	33 142 650 TEP/yıl
Atıkların Toplam Ekonomik Enerji Eşdeğeri	3 892 422 TEP/yıl



Şekil 1.1. Biyokütle enerjisine dayalı kurulu gücün yıllara göre değişimi (ETKB, 2022)



Şekil 1.2. Biyokütle enerjisinin, toplam kurulu güç içerisindeki yıllara göre oranı (ETKB, 2022).

Biyokütle enerjisinin, toplam elektrik üretimi içerisindeki payının artırılması için ekonomik ve teorik enerji eşdeğerlerinin eşitlenmesi gerekmektedir. Kontrolsüz şekilde depolanan organik atıklar nedeniyle, doğaya kontrolsüz şekilde salınan biyogaz, hem hava kirliliğine neden olmakta hem de enerji üretim potansiyeli olan bir malzeme boşa gitmektedir. Bu durumda biyogaz üretim potansiyeline sahip olan organik atıkların ayrı toplanarak, biyogaz üretimine dahil edilmesi önemlidir. Bunun yanı sıra biyogaz proseslerinde enerji üretimi için kullanılan materyallerin birim materyal başına üretilen biyogaz üretiminin artırılması da elde edilen biyogazın ve/veya üretilen metan miktarının artmasını sağlayabilecektir. Bunun için yapılan çalışmalara öncelik verilmesi ve ilgili kurumlar tarafından bu tür çalışmalara destek verilmesi gerekmektedir.

### 1.1. Biyogaz Üretim Mekanizması

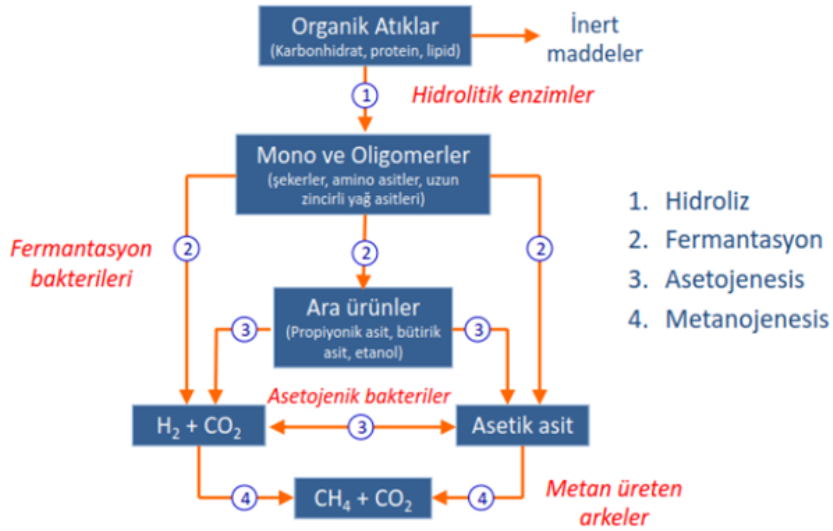
Biyogaz üretim mekanizması Şekil 1.3'te gösterilmiştir. Mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen hidroliz aşaması anaerobik fermantasyonun birinci aşamasıdır. Bu aşamada, kompleks yapıları substrat, daha basit organik yapılara dönüştürülmektedir (FNR, 2010).

Biyogaz prosesinin ikinci aşaması olan asidojenez fazında, fermantasyon bakterileri enerji ihtiyaçlarını karşılamak için hidroliz aşamasında ayrıışan bileşikleri hücre içlerine alarak daha basit bileşenlere dönüştürür ve hücre dışına atar (Henze vd., 2008).

Üçüncü aşama olan asetojenez fazında, mikroorganizmalarca fermantasyon devam eder ve asidojenez aşamasında oluşan uçucu yağ asitleri metan üretiminin öncüsü olan asetat, hidrojen ve karbondioksite dönüşür (Metcalf & Eddy vd., 2014). Bu aşamada, asidojenezden farklı olarak asetat üretimi, asetojenik mikro canlıların aktivitesi ile gerçekleştirilir (Gerardi, 2003).

Mikroorganizmalar tarafından önceki aşamalarda üretilen asetat, hidrojen ve karbondioksite metana çevrildiği aşama olan metanojenez aşaması, anaerobik fermantasyonun dördüncü ve son aşamasıdır. Metan üretiminde, asetatı metan ve karbondioksite dönüştürüren asetolastik metanojenler ve elektron vericisi olarak hidrojen ve elektron alıcısı olarak karbondioksiti kullanarak metan üreten hidrojen kullanan metanojenler olarak iki grup metanojenik mikroorganizma görev alır (Henze vd., 2008; Metcalf & Eddy vd., 2014).

Hidroliz aşaması, anaerobik bakteriler tarafından yürütülen, anaerobik fermantasyonun hızını belirleyen biyogaz üretiminin en önemli aşamasıdır (Koçar vd., 2010). Bu aşamada, polimerler (yağ, protein ve karbonhidrat), daha küçük yapıdaki monomerlere dönüştürülür. İkinci aşamada, üretilen bu monomerler, kısa zincirli asitlere, karbondioksit, hidrojen ve alkollere dönüştürülürler. Üçüncü aşamada asetojenik bakteriler yardımıyla, hidrojen, asetat ve karbondioksit üretilmektedir. Son aşamada ise, asetojenik bakterilerinin faaliyetleri sonucu üretilen organik asitler, asetat ve hidrojen molekülleri, metanojen mikroorganizmalar tarafından karbondioksit ile hidrojenin sentezlenmesi ve asetik asitin parçalanması sonucunda, metan ve karbondioksite dönüştürülerek reaksiyon sonucunda biyogaz elde edilmiş olur. Biyogaz üretiminin %27-30'u, asetik asitin oksidasyonu ile gerçekleşirken, %70'lik kısmı ise hidrojen ve karbondioksite indirgenmesi sonucu üretilmektedir (Görmüş, 2018; Deublein, 2011; Kaya ve Öztürk, 2012).



Şekil 1.3. Biyogaz üretim aşamaları (Çallı, 2012)

Anaerobik fermantasyon işleminde reaksiyon süreleri, atık türüne, iyon içeriklerine, pH, karıştırma aralıklarına ve sıcaklık faktörüne bağlıdır (İlkiliç ve Deviren, 2011). Karışım içerisinde çözünür halde bulunmayan maddeler, mikroorganizmaların salgıladıkları enzimler yardımıyla karışım içerisinde çözünür hale gelir. Bu enzimleri salgılayan mikroorganizmalar, uzun zincirli kompleks karbonhidratları, proteinleri ve yağları, kısa zincirli hale dönüştürürler (Hang vd., 2016). Hidroliz aşaması anaerobik fermantasyonun hızını belirlediğinden dolayı biyogaz üretim aşamalarının en önemlisidir. Bu aşamada elde edilen ürünler, metan üreten bakterilerin kullanabileceği niteliktedir. Hidroliz süreleri kullanılan substrata göre değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin, selüloz ve yağ içeriği fazla olan organik maddelerin hidroliz süresi oldukça uzundur (Koçar vd., 2010). Bu nedenle biyogaz üretiminin kısa sürelerde tamamlanması ve elde edilen özgül metan miktarının artırılması amacıyla bazı ön işlemler uygulanmaktadır.

## 1.2. Ön İşlemler

Biyogaz üretimi genel olarak; tarımsal atıklar, atık çamurlar, hayvan gübrelerinin ve kirliliği yüksek endüstriyel atıkların arıtımı için kullanılmaktadır. Biyogaz işleminin başarılı sayılabilmesi için en önemli kriterin özgül metan üretim verimi olduğu düşünüldüğünde substrat seçimi önemli bir

yer tutmaktadır (Vijayalekshmy, 1985). Biyogaz üretimi için kullanılacak karışımda biyobozunurluğu düşük olan organik maddelerin yoğunluğu, hidroliz aşamasını kısıtlamaktadır. Ön işlemler bu kısıtları azaltmak veya tamamen ortadan kaldırmak ve bununla birlikte biyogaz veriminin artırılmasıyla uygulanmaktadır. Ön işlemler, termal, kimyasal veya biyolojik yöntemlerin biri veya birkaçı aynı anda kullanılarak yapılabilmektedir (Çilingir, 2018). Ön işlem metotları, kompleks yapılı organik molekülleri basit yapılı moleküllere indirgeyerek organik atıkların mikrobiyolojik yollarla daha kolay katabolize edilebilmesine yardımcı olmasının yanı sıra biyogaz üretim verimini artırmakta, metan gazı üretim oranını yükseltmekte ve bekleme süresini azaltmaktadır (Yadvika vd., 2004, Bougrier vd., 2005).

Mekanik ön işlem yardımıyla, materyalin partikül boyutu küçültülerek, organik maddelerin mikroorganizmalara temas yüzeyi artırılmış olmakta ve hidroliz aşaması nispeten kısalmaktadır (Çilingir, 2018). Isı ile ön işlem ve kimyasal ön işlem yardımıyla, materyalin biyobozunurluğu artmaktadır. Isı ve kimyasal madde kullanımıyla, materyalin hücre duvarı parçalanmakta, selülozik yapısı bozulmakta, lignin bağları zayıflatılmakta ve bu nedenle biyobozunurluk artmaktadır (Lasekan vd., 2012).

### **1.2.1. Fiziksel ön işlemler**

Fiziksel ön işlemler yardımıyla, hidroliz basamağının etkinliği artmakta ve süresi kısaltılabilmektedir. Bu işlem ile substratın anaerobik koşullarda mikroorganizmalarca parçalanması daha kolay olmaktadır. Mekanik, termal ve ultrasonik olmak üzere üç tür fiziksel ön arıtım çeşidi mevcuttur (Çilingir, 2018).

### **1.2.2. Mekanik ön işlemler**

Parçacıkların boyutu küçültülerek yapılan bu işlem ile organik madde miktarı yüksek atıkların içerdiği selülozun kristal yapısı bozulmakta ve mikroorganizmalara temas eden yüzey alanı artmaktadır. Böylece, mikroorganizmaların daha kolay kullanabileceği yapıda organik maddeler elde

edilmektedir (Çilingir, 2018). Yapılan bazı çalışmalar, hidrolik bekletme süresi kısa tutulduğunda bile atığa uygulanan mekanik önışlemin metan üretimini arttırdığını göstermiştir (Cantrell vd., 2008). Yemek atıkları üzerinde yapılan bir çalışmaya göre mekanik olarak partikül madde boyutunun küçültülmesi ile, kimyasal oksijen ihtiyacı'nda (KOİ) %40 artış sağlanırken bu küçültme işlemi yardımıyla biyogaz üretim veriminde %28 artış elde edilmiştir (Kendir ve Uğurlu, 2018).Evsel arıtma çamuru kullanılarak yapılan bir çalışmada, bu malzemenin biyolojik olarak bozunabilirliğini arttırmak için sıvı-katı faz ayırma işlemi uygulanmış ve bu ön işlem yardımıyla %15-26 daha fazla biyogaz üretimi sağlanmıştır (Luo vd. 2010). Ön işlemler içerisinde, mekanik ön işlemler etkili ve kolay uygulanabilir bir yöntem olarak dikkate alınmaktadır. Ancak büyük ölçekli uygulamalarda yüksek maliyet gerektirmesi, yöntemin dezavantajıdır (Çilingir, 2018).

### **1.2.3. Termal ön işlemler**

Bu yöntem en çok uygulama alanına sahip olan ve en başarılı ön işlemdir. Bu ön işlemin uygulanması sırasında substrata uygulanan ısıl enerjinin etkisiyle, substrat içeriğindeki protein, karbonhidrat gibi makro moleküllerin parçalanması sağlanmaktadır ve kolay çözünebilir formlar oluşmaktadır (Bozkurt, 2012). Yapılan bir çalışmada, 70-121°C termal ön işlemlerde biyogaz üretiminin %20-30 arttığı, sıcaklığın 160-180°C'ye çıkarıldığında ise %40-100 arttığı gösterilmiştir. Ancak sıcaklık 200°C'nin üstüne çıktığında, mikroorganizmaların DNA ve RNA'larında hidroliz meydana gelmekte ve mikroorganizmaların bu hidrolizi sonucunda açığa yüksek konsantrasyonlarda azot ve fosfor, anaerobik çürütme üzerinde inhibisyona neden olmaktadır (Salminen ve Rintala, 2010). Benzer şekilde sıcaklık 180°C'nin üstüne çıkarıldığında, yağ ve proteinlerin molekül yapısındaki değişimden dolayı biyogaz verimi düşmektedir (Liu vd., 2012). Bu nedenlerle uygulanacak termal ön işlemler, enerji ihtiyacı öncelikli olmak üzere, optimum sıcaklık, uygulama süresi ve substrat yapısına bağlı olarak belirlenmektedir.

#### **1.2.4. Mikrodalga ile ön işlemler**

Suyun doğal dipolar yapısının yüksek dielektrik kaybı oluşturmaya sebep olması nedeniyle mikrodalga ile ısıtma yöntemi, atıkların arıtımında ön işlem olarak son zamanlarda oldukça fazla kullanılmaktadır. Özellikle atıksu çamurları ve hayvan gübreleri gibi su içeriği yüksek olan atıkların bertarafı için kullanışlı bir yöntemdir. Yapılan bazı çalışmalara göre mikrodalga irradyasyonunun, selülozun yapısını değiştirebileceğini, atıklarda enzimsel duyarlılığın arttırabildiğini, lignini ve hemiselülozun bozunmasını hızlandırdığını göstermektedir (Kendir ve Uğurlu, 2018). Mikrodalga ön işlemi ile bileşiklerin hidrojen bağlarının kırılarak parçalandığı düşünülmektedir (Gelegenis vd., 2007). Bu nedenle, konvansiyonel yöntemlere göre avantajlı hale getirmektedir. Aynı zamanda, çıkıştaki kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ<sub>ç</sub>) ve çözünmüş mikrobiyal ürünler (SMP) arttırması sebebiyle son zamanlarda uygulamaları artmıştır (Gelegenis vd., 2007).

#### **1.2.5. Kimyasal ön işlemler**

Kimyasal ön işlemler, organik maddelerin mikroorganizmalar tarafından kullanımını kolaylaştırmak ve biyogaz üretim verimini artmak amacıyla, asitler, bazlar ya da oksidanlar tarafından parçalanmasını sağlamak için yapılmaktadır. Alkali-asidik ön işlemler, ozon veya farklı çözücüler kullanarak yapılan kimyasal ön işlemler olmak üzere çeşitli kimyasal ön işlemler mevcuttur. Anaerobik çürütmede, alkalitenin arttırılmasıyla pH ayarlaması yapılan işlemler daha çok tercih edilmektedir (Ward, vd., 2008).

Genel olarak, soda veya sodyum hidroksit kullanılarak uygulanan alkali ön işlemler özellikle lignoselülozik biyokütle, yağlar, hidrokarbonlar ve proteinler gibi büyük yapılu moleküllerin daha çözünebilir haldeki formlarına dönüştürülmesini sağlamaktadır. Bu ön işlemde, özellikle pH 10'dan büyük olduğunda mikroorganizma popülasyonunda azalmalar ve KOİ<sub>ç</sub>'de artış meydana gelmekte bu nedenle de anaerobik prosesin etkinliğini arttırmaktadır. Yapılan bir çalışmada, kimyasal ön işlem için aktif çamura sodyum hidroksit katılmış ve bu ön işlem sonrası KOİ ve organik madde (OM) miktarlarında

azalmalar görülürken, biyogaz üretiminde artışlar gözlenmiştir (Motasem ve Afzai, 2013).

### 1.2.6. Biyolojik ön işlemler

Biyogaz proseslerinde, prosesin işlevini sürdürdürebilmesi için birden fazla mikroorganizma görev almaktadır (Deublein vd., 2008). Bu mikroorganizmalar, Hidroliz, Asidogenez, Asetogenez ve Metanojenez basamaklarından birinde veya birkaçında (Çizelge 1.2) görev alarak prosesin sonucunda, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S ve H<sub>2</sub> gazların miktarlarını büyük ölçüde etkilemektedir.

Çizelge 1.2. Biyokütlenin parçalanmasında anaerobik ortamda görev alan mikroorganizmalar (Deublein vd., 2008)

Görevi	Görevli Bakteriler
Proteinleri, amino asit ve şekerlere dönüştürme	<i>Clostridium, Proteus vulgaris, Bacteriodes, Peptococcus, Bacillus, Vibrio,</i>
Karbonhidratları basit şekerlere dönüştürme	<i>Clostridium, Bacteriodes, Staphylococcus, Acetovibrio cellulities</i>
Yağları, yağ asitleri, amino asitler ve alkollere dönüştürme	<i>Clostridium, Staphylococcus, Micrococcus</i>
Amino asit ve şekerleri, yağ asitleri, ve alkollere dönüştürme	<i>Zymomonas mobilis</i>
Amino asitleri doğrudan asetata dönüştürme	<i>Lactobacillus, Escherichia, Staphylococcus, Micrococcus, Bacillus, Pseudomonas, Desulfovibrio, Selenomonas, Sarcina, Streptococcus, Desulfobacter, Desulfuromonas</i>
Amino asitleri ara ürünlere dönüştürme	<i>Clostridium, Streptococcus, Eubacterium</i>
Yağ asitleri ve alkolleri ara ürünlere dönüştürme	<i>Clostridium, Syntrophomonas wolfei</i>
Ara ürünleri asetata ve H <sub>2</sub> 'e dönüştürme	<i>Syntrophomonas wolfei, Syntrophobacter wolinii</i>
Asetatı H <sub>2</sub> 'e dönüştürme	<i>Clostridium aceticum</i>
Asetatı metana dönüştürme	<i>Methanothrix, Methanosarcina, Methanosprillum</i>
H <sub>2</sub> 'i CH <sub>4</sub> 'a dönüştürme	<i>Methanobacterium, Methanobrevibacterium, Methanoplanus</i>

Diğer ön işlemlerle karşılaştırıldığında, daha düşük biyogaz verim artışı elde edilen bu ön işlemde amaç, substratların kullanılan mikroorganizmalar tarafından daha kolay bozunabilir organik maddelere dönüşmesini sağlamaktır. Mikroorganizmalar tek olarak veya beraber kullanılarak ön işlem

gerçekleştirilebilmektedir. Bu ön işlem, düşük enerji gereksinimi ve kimyasal ihtiyacının olmayışı nedeniyle diğer ön işlemlere göre daha avantajlıdır (Çilingir, 2018). Biyolojik ön arıtımda substratın çeşidine bağlı olmakla beraber, kullanılan selüloz, proteaz, lipaz, pektinaz, nötraz ve ksilenaz yardımıyla substratın hidrolizi olarak tanımlanmaktadır. Ön arıtımda kullanılan enzimlerin, diğer ön arıtım yöntemleriyle kıyaslandığında düşük enerji gereksinimi, bu enzimlerin yüksek seçiciliği, inhibitör özelliklerinin oluşmaması nedeniyle bazı avantajları vardır. Enzimler, daha geniş sıcaklık ve pH aralığında çalışabilme, yüksek aktiveye sahip olma ve tekrardan kullanılabilme özelliklerinden dolayı maliyeti diğer yöntemlerden daha azdır (Kendir ve Uğurlu, 2018). Ürün seçiciliği bakımından oldukça spesifik, toksisitesi olmayan ve reaksiyon koşullarını dengede tutan enzimler, bu avantajları nedeniyle endüstriyel bazlı üretimler için önem arz eden biyokatalizörleridir (Bommarius ve Paye, 2013; Chapman vd, 2018). Mikrobiyal enzim üretim çalışmaları, bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimlerin ihtiyaç duyulan miktarı karşılayamaması ve izolasyon ve saflaştırılma işlemlerindeki zorluklar nedeniyle giderek artmaktadır (Rao vd., 1998). Bitki ve hayvan kaynaklı enzimlerin standardizasyonundaki problemler ve dönemsel kısıtlamaların olması nedeniyle endüstride kullanımı aksatmayacak yeni enzim kaynakları bulunmaya çalışılmıştır. Mikroorganizmaların kısa sürelerde üretilibilmeleri, genetik mutasyonlara hızlı cevap vermeleri nedeniyle bu canlılar en olası enzim kaynakları olarak değerlendirilmişlerdir (Kubicek ve Druzhinina, 2005). Kullanılan mikrobiyal enzimlerin %45,5'ini karbonhidrazlar, %27'sini proteazlar, kalan kısmını ise amilaz, lipaz gibi enzimler oluşturmaktadır (Baweja vd., 2016).

Ön işlemler incelendiğinde, kullanılmak istenen yöntemin etki düzeyinin yanı sıra, yöntem maliyetlerinin de etkili olduğu söylenebilir. Çizelge 1.3 incelendiğinde en önemli kısıtın yöntemlerin kullanılmasındaki maliyetler olduğu görülmektedir. Sürdürülebilirlik açısından incelendiğinde; (1) Kimyasal ön işlemler için gerekli kimyasal maddelerin temini, geri kazanılması ve malzeme devamlılığının işlemleri dışa bağımlı hale getirmesi, (2) Isıl ön işlemlerde istenilen sıcaklığın sağlanabilmesi için gerekli enerji ihtiyacının fazlalığı, (3) Fiziksel işlemlerde kullanılan ekipmanın ilk yatırım maliyetleri,

tamir-bakım-onarım maliyetleri ve enerji ihtiyacının fazlalığı gibi dezavantajları bulunmaktadır.

Çizelge 1.3. Biyogaz üretimde kullanılan güncel ön işlemler (Şenol vd., 2020)

Ön İşlem Türü	Ön İşlem Etkisi	Ön İşlem Fonksiyonu	Ekonomik Değerlendirme	Kaynak
<b>Fiziksel Ön İşlemler</b>	Ultra ses dalgası kullanımı ve öğütme	Gözenek sayısının artışı, kristal derecesinin azalması	Yüksek enerji maliyeti	Taherzadeh vd., 2008; Bochmann vd., 2013; Önyeche vd., 2002.
<b>Isıl Ön İşlemler</b>	0-180°C'ye maruz bırakma	Selülozun parçalanması, hemiselüloz ve ligninin yüksek giderimi	Yüksek enerji maliyeti	Hendriks vd., 2009; Johnson ve Elander, 2009.
<b>Asit Ön İşlemler</b>	Asitlere maruz bırakma (sülfürik asit, fosforik asit, nitrik asit, HCl, karbonik asit vb.)	Hemiselüloz hidrolizini sağlar	Asidin geri kazanımı veya pH'nın sonradan ayarlanması zordur.	Johnson ve Elander, 2009; Tüzün, 1999.
<b>Alkali Ön İşlemler</b>	Sodyum hidroksit, potasyum hidroksit, amonyak ve kireç çözeltileri maruz bırakma.	Polimerizasyon aşaması ve kristalizasyon azaltır, lignin hidrolizi sağlanır	Baz çözeltilerin yüksek maliyeti vardır.	Bochmann vd., 2013; Johnson ve Elander, 2009;
<b>Çözücü (Solvent) Ön İşlemler</b>	Organik çözücülere (Metanol, etanol, aseton, etilen glikol, hidrofurfuril alkoller vb.) maruz bırakma	Ligninin hidrolizini sağlar.	Yüksek çözücü ve çözücünün yeniden kazanılma işleminin maliyeti	Johnson ve Elander, 2009; Tüzün, 1999.

Biyolojik ön işlemin dezavantajı olan “daha düşük biyogaz verimi” kısmı, kullanılan mikroorganizma çeşidi ve mikroorganizma miktarı ayarlanarak ve hatta son zamanda başarıyla sonuçlanan çalışmalarda görüldüğü gibi rastgele mutasyon işlemine tabi tutulmuş mikroorganizmalar tarafından üretilen enzim miktarlarını artırarak ortadan kaldırılabilir. Böylelikle hem daha düşük maliyetlerle ve çevreye daha az zarar vererek, hem de dışa bağımlılığı azaltarak, Çizelge 1.1’de verilen ekonomik enerji eşdeğeri ve teorik enerji eşdeğeri arasındaki fark kapatılabilir. Buna bağlı olarak biyokütle enerjisinin toplam elektrik üretimi içerisindeki payı artırılabilir.

### **1.3. Enzimler**

Biyobozunur atıkların artan miktarları ve bu organik maddelerin içerisinde kolay ayrışamayan maddelerin bulunması nedeniyle biyogaz proseslerinin sürelerinin kısaltılabilirliği üzerine birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar, substrat üzerinde yapılanlar, mikroorganizmalar ve bu canlıların ürettiği enzimler üzerinde yapılan çalışmalar olarak yoğunlaşmıştır.

Büyük biyomolekül olan enzimler, çeşitli kimyasal dönüşümler için gereklidir (Smith vd, 1997). Enzimler belirli reaksiyonları hızlandırıp, aktivasyon enerjisini geçici süreyle düşüren spesifik biyomoleküllerdir (Singh vd, 2016). Hücrede kimyasal reaksiyonların neredeyse tümü enzimlere ihtiyaç duyar (Şafak, 2019). Mikrobiyal enzimler, enzim teknolojisinin hızla gelişmesiyle dikkatleri üzerinde toplamaktadır (Gurung vd, 2013).

Endüstriyel enzimlerin üretim çalışmalarının amacı, endüstriyel süreç için yeni ve kolay üretilen enzimler elde etmektir. Örneğin; özgün yaşam koşullarından izole edilen haloarkealardan elde edilen enzimler, 50-90°C aralığında yüksek sıcaklık, yüksek tuzluluk ve farklı pH'lar gibi zorlu koşullar altında aktivite gösterebilmektedirler (Şafak, 2019).

#### **1.3.1. Endüstriyel enzimler**

Ürün seçiciliği bakımından oldukça spesifik, toksisitesi olmayan ve reaksiyon koşullarını dengede tutan enzimler, bu avantajları nedeniyle endüstriyel bazlı üretimler için önem arz eden ve özellikle farmasötik, gıda, ve içecek endüstrilerinde kullanılan biyokatalizörleridir (Bommarius ve Paye, 2013; Chapman vd, 2018).

Tüketimin artması, maliyet azaltma isteği ve doğal kaynakların gün geçtikçe tükenmesi nedenleriyle endüstriyel kullanımlarda mikrobiyal enzimler tercih edilmektedir (Choi vd, 2015). Kolay bulunabilmeleri ve hızlı büyüme yetenekleri ve ağır kimyasalların ve bileşiklerin sentezi için "temiz" çözümler

sunmaları nedeniyle mikroorganizmalar, endüstriyel enzimlerin üretimi için kullanılan başlıca kaynaklardandır (Illanes vd, 2012). Çevreye verilen zararın az olması, yüksek verimlerde ve kalitede üretim gerçekleştirilebilmesi nedeniyle mikrobiyal enzim uygulamaları, geleneksel yöntemlere göre hızla artmaktadır (Singh vd, 2016).

Günümüzde, gıda, yem, deterjan, deri tabaklama, tekstil, ilaç, kozmetik ve ince kimyasal sanayide kullanılan yüzlerce endüstriyel ürünün üretiminde enzimlerden yararlanılmaktadır. Amaca bağlı olarak; endüstriyel enzimler,

(i) Teknik enzimler,

(ii) Gıda enzimleri,

(iii) Yem enzimleri olarak üç sınıfa ayrılmaktadır (Kumar vd., 2014).

Üretilen endüstriyel enzimlerin; %27'si gıda ve alkollü içecek sanayisinde, %18'i deterjan sanayisinde, %17'si biyoteknolojik ürünlerde, %8'i biyoyakıt üretiminde, %8'i hayvan yemi sanayisinde kullanılmaktadır (Kumar vd., 2014).

Bitkisel, hayvansal veya mikrobiyolojik yollarla üretilebilen enzimler gıda endüstrisinde, gıda kalitesini arttırmak ve çeşitlilik oluşturmak için kullanılmaktadır (Shinde ve Yadav, 2014).

### **1.3.2. Mikrobiyal enzimler**

Mikrobiyal enzim üretim çalışmaları, bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimlerin ihtiyaç duyulan miktarı karşılayamaması ve izolasyon ve saflaştırılma işlemlerindeki zorluklar nedeniyle giderek artmaktadır (Rao vd., 1998).

Hayvansal ve bitkisel enzimlerin çoğunlukla bir organ veya dokuda bulunması nedeniyle, bitki ve hayvanın geri kalan dokuları enzim üretimi açısından değersiz son ürünler olarak sınıflandırılmaktadır. Bitki ve hayvan kaynaklı enzimlerin standardizasyonundaki problemler ve dönemsel kısıtlamaların olması nedeniyle endüstride kullanımı aksatmayacak yeni enzim kaynakları

bulunmaya çalışılmıştır. Mikroorganizmaların kısa sürelerde üretilmelerini, genetik mutasyonlara hızlı cevap vermeleri nedeniyle bu canlılar en olası enzim kaynakları olarak değerlendirilmişlerdir (Kubicek, 2005).

Enzimler endüstriyel kullanımlarda yaygınlaşmasına paralel olarak, üretimi zorlaştıran bazı parametreler mevcuttur. Bu zorluklar, kararlılık, katalitik etkinlik ve özgüllük gibi bazı faktörleri içinde barındırır. Ancak bu zorlukların aşılması için son zamanlarda, enzimlerin doğal kaynaklardan sağlanması, rastgele mutasyonlar, immobilizasyon gibi çeşitli yaklaşımlar üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (Elleuche vd., 2014).

Rastgele mutasyonlar, deneysel çalışmalarla olabileceği gibi mikroorganizmaların olumsuz çevre koşullarına maruz kalmasıyla da olabilmektedir. Mikroorganizmalar büyümeyi kısıtlayıcı bir ortamda karşılaştığında (örneğin açlık sırasında), sabit faz mutasyonu olarak bilinen bir işlemle ortama uyum sağlamış mutantlar popülasyonun çoğunu oluşturarak bir süre sonra bu popülasyonu ele geçirirler (Kivisaar, 2003).

Hücre popülasyonları ölümcül olmayan olumsuz koşullara tabi tutulduğunda "adaptif mutasyon" ortaya çıkar (Bhattacharjee ve Mahajan, 1998). Adaptif mutasyon üzerine yapılan on yıllık araştırma, olumsuz koşullar altında mutasyon oranlarını artırabilecek mekanizmaların olduğunu ortaya koymaktadır (Foster, 2000). Örneğin, Laktozu metabolize edemeyen, ancak laktoz tek enerjisi ve karbon kaynağı olduğunda laktoz kullanımına dönen bir *Escherichia coli* suşunun bu durumu sağlayabilmesi için adaptif mutasyon geçirmesi gerekmektedir (Bhattacharjee ve Mahajan, 1998).

#### **1.4. Mutasyonlar**

Oluşan değişikliğin konumu ve değişim büyüklüğüne göre mutasyonlar; "nokta mutasyonlar" ve "kalıp değiştirme mutasyonları" olarak sınıflandırılır. Nokta mutasyonlar, moleküler ağırlıkta herhangi bir değişim olmadan genellikle baz değişimleri gösterir (Dahle vd., 1994; Fenner vd., 1987; Günalp vd., 1986).

Nokta mutasyonlar sonucunda, yapısal ve fonksiyonel olarak önemli değişimlere neden olmamaktadır. Nokta mutasyonlara göre daha geniş çaplı olan kalıp değiştirme mutasyonları, baz dizinine bir veya bir kaç bazın girmesi veya çıkması sonucu meydana gelmektedir (Dahle vd., 1994; Ersoy ve Bayşu, 1986). Bu nedenle, mutasyon noktasını takip eden bölgede baz dizilimi değişir ve böylece proteinin yapısı veya fonksiyonu değişmiş olur. Bu tür mutasyonlarda normalden daha kısa zincire sahip anormal protein sentezi gerçekleşir (Krauzer, 1988). Mutasyona neden olan ve popülasyonda mutasyon oranını artıran etkenler mutajen olarak tanımlanır (Günalp vd., 1986). Hasarın olduğu yere göre mutasyonların da etki değeri değişmektedir.

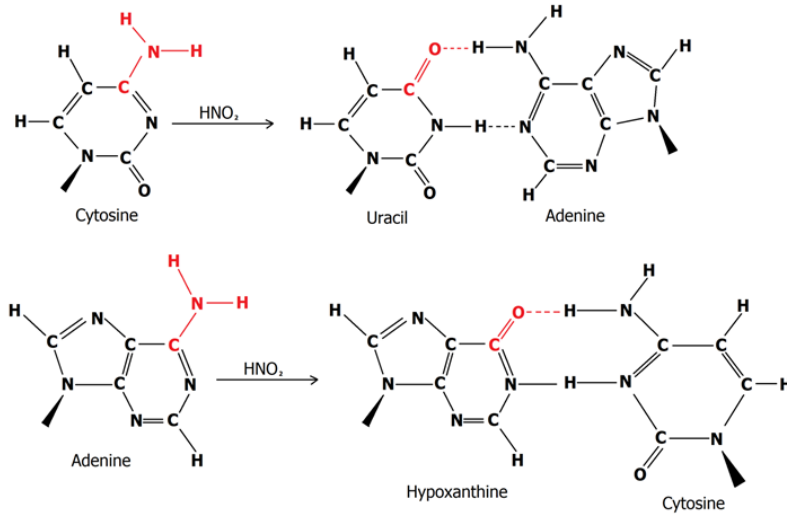
#### **1.4.1. Kimyasal mutajenler**

Kimyasal ajanlar etki şekillerine göre;

- DNA molekülleri üzerinde yer alan purin (adenin ve guanin) ve pirimidin (sitozin ve timin/urasil) bir veya bir kaçının kimyasal yapısını değiştiren nitroz asit ve alkilleyici ajanlar (EMS, EES, DES, MNNG).
- Nükleik asitin replikasyonu esnasında yeni sentezlenen zincire yerleşerek yanlış baz eşleşmelerine neden olanlar.
- Çerçeve kayması mutasyonlarına neden olan nitrojen mustard derivasyonlar olmak üzere üç grupta sınıflandırılmaktadır. (Hopwood,1970).

#### **1.4.2. Nitroz asit (HNO<sub>2</sub>)**

Nitroz asit, öncelikle amino grupları oksidatif deaminasyon yolu ile enol ve keto gruplarına dönüştürerek bu yolla; sitozin, adenin ve guanin sırasıyla urasil, hipoksantin ve ksantine dönüştürülür. Sonuç olarak urasil adenin ile baz çifti yaparak GC →AT transisyonu, hipoksantin sitozinle baz çifti yaparak AT → GC transisyonu, ksantinde adenin ile baz çifti yaparak AT→ GC transisyonu (Şekil 1.4) oluşur (Hopwood, 1970).



Şekil 1.4. Nitroz asit mutagenesizinin mekanizması

### 1.4.3. Etil metasülfat (EMS)

EMS ( $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{C}_2\text{H}_5$ ), mutajenik teratojenik ve büyük ihtimalle kanserojen organik bir bileşiktir. Bu nükleotid, özellikle guanin alkilasyonu (organik bileşikte bir hidrojen atomunun yerine girme), genetik materyalde rastgele mutasyonlara neden olur. Genellikle tek nokta mutasyonlarını üretir. Bu bileşik,  $5 \times 10^{-4}$  ila  $5 \times 10^{-2}$  derişimlerde mutasyonlara neden olabilmektedir (Hopwood, 1970).

EMS'de bulunan etil grubu, DNA'daki guanin ile reaksiyona girerek, anormal O-6-etilguanin oluşmasına neden olur. DNA replikasyonu sırasında genellikle O-6-etilguanin karşısında sitozinin yerine, timin yerleşir. Bu replikasyonun çoğalmasıyla, orijinal G:C baz çiftinin yerine, bir A:T çifti gelebilmektedir. Bu durum, genetik bilgisinin değişimine neden olmakta ve hücrelere zarar vermektedir. EMS bileşiği genetik çalışmalarda mutajen olarak kullanılır (Hopwood, 1970).

### 1.4.4. N-metil-N'-nitrosoguanidin (MNNG)

MNNG çok etkili bir mutajendir. Bu mutagenin kullanıldığı mikroorganizmalarda öldürme etkisi ve aynı zamanda canlı kalan hücrelerdeki mutasyon ihtimali çok yüksektir. *Salmonella typhimurium* (Eisenstark vd., 1965), *Saccharomyces pombe* (Megent, 1965) ve *Streptomyces coelicoler*'de

(Hopwood, 1970) MNNG ile yapılan çalışmalar canlı kalan hücrelerden %8-10'unun okzotrof (besin moleküllerinin sentezi engellenen) olduğunu göstermiştir.

Kullanımı sırasında çok fazla dikkat gerektirmesi, istenen mutasyon etkilerinin meydana gelmesi ile mutantların analizini güçleştirmesi gibi nedenler bu kimyasalın dezavantajlarındandır. Ortalama kullanım miktarı *E.coli* için 0,1-1 mg/ml'dir.

*E.coli* üzerinde yapılan bazı çalışmalarda MNNG kullanılarak elde edilen mutasyonların %30'unun, EMS kullanılarak elde edilen mutantların %70'inin replikasyon sırasında, baz eşleşmelerinin değişmesiyle meydana geldiği, geriye kalan mutasyonların ise eksik tamir mekanizmalarından dolayı olduğu tespit edilmiştir (Hopwood, 1970).

#### **a) Baz analogları:**

Baz analogları, DNA bazlarına benzer moleküller olduğundan DNA sentezi esnasında DNA yapısına girebilirler. 5-brom urasil (5-B-U) bir kimyasal olup Baz analoglarına örnek olarak gösterilebilir.

5-B-U, timin yerine DNA'ya girerdiğinde ve tautomerik bir kayma olursa, 5-B-U, guanin ile eşleşir. Replikasyondan sonra A=T yerine G≡C şeklinde bir transisyon (değişim) meydana gelir. (Klug ve Cummings 2002, Maki, 2002).

#### **b) DNA tabanlarını değiştiren ajanlar:**

Bu ajanlar, çoğalma aşamasında olmayan genomlara etki etmektedir. Bunlardan nitröz asiti, bazıları deamine (molekülden bir amin grubunun çıkarılması) etmekte ve böylelikle hidroksilamin, sitozin ile reaksiyona girip hidroksilaminositozin oluşturmaktadır (Ersoy ve Bayşu, 1986).

### **c) Alkilleyici ajanlar:**

Nitrosoguanidin (MNNG), etilmetan sülfonat (EMS) ve nitrojen mustard (NM) gibi bileşikler bu grupta yer almaktadır. Bunlar bazlardaki azot molekülüne bir alkil grubu ekleyerek reaksiyon gösterirler (Arda, 1985; Günalp vd., 1986; Flint vd., 2000)

### **d) İnterkelasyon yapan ajanlar:**

Akridin boyaları (akriflavin, proflavin, acridin orange) bu grupta yer almaktadır. Bu ajanlar özellikle dsDNA üzerine etkilidir. Bunlar, çoğalma aşamasındaki DNA moleküllerinin tek iplikcik olduğu durumda baz dizinlerin arasına girerler (Akman, 1983; Günalp vd., 1986).

### **1.4.5. Fiziksel mutajenler**

**a) Sıcaklık ve pH:** Bu etkenler depurinasyona (purin bazlarının giderilmesi) neden olurlar (Yeşilbağ, 2002).

**b) Işıklar:** İyonize ışınlar (x ve gama) DNA molekülünde delesyon (kromozomun bir parçasının kopup, kaybolması) veya inzersiyonlara (DNA dizisine bir veya daha çok baz çiftinin eklenmesi) neden olurken non-iyonize ışınlar (ultraviyole) DNA molekülünde yan yana bulunan pirimidin bazları arasında dimerleşmelere (aynı iki molekülün birleşerek yeni bir molekül oluşturması) yol açmaktadır (Günalp vd., 1986; Ersoy ve Bayşu, 1986).

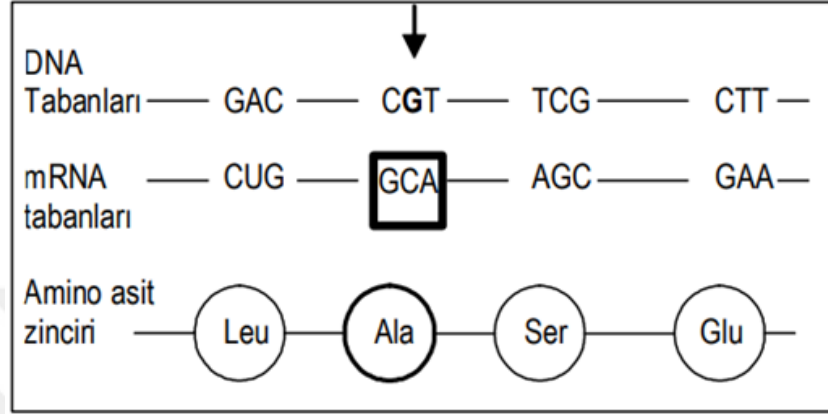
### **1.4.6. Mutasyon mekanizmaları**

Mutasyonlar; baz yer değişimleri, dizine bir veya birkaç baz çiftinin girmesi veya çıkması, bazlar arasında bağların oluşması ve intramoleküler bağların kopması şeklinde ortaya çıkar (Yeşilbağ, 2002).

#### **a) Bir baz çiftinin yerini başka bir baz çiftinin alması:**

Bu tip değişiklikler nokta mutasyonları oluşturur. Meydana gelecek baz değişimi sadece bir kodonu ve dolayısıyla sadece bir amino asiti etkilemektedir (Şekil 1.5). Bir baz dizini tarafından kodlanan polipeptid zincir yüzlerce amino asit

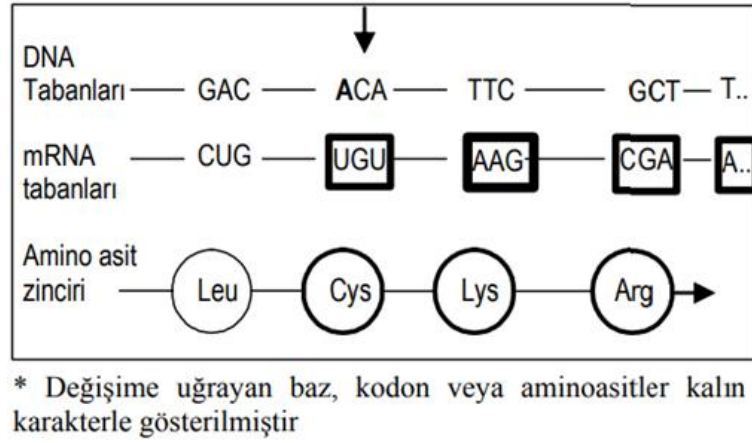
içerdiğinden, bu tip bir değişiklik (sadece bir amino asitin değişimi) ilgili proteinde önemli bir fonksiyonel bozukluğa yol açmaz (Bilgehan, 1987). Purin bazları (A ve G) veya pirimidin (C ve T) bazları arasında meydana gelen yer değişimleri transisyonel mutasyon, purin ve pirimidin bazlarının karşılıklı yer değiştirmesi transversiyonel mutasyon olarak tanımlanır (Yeşilbağ, 2002).



şekil 1.5. Baz değişim mekanizması (Yeşilbağ, 2002.)

**b) Baz dizinine bir veya birkaç baz çiftinin girmesi (inzerasyon) veya çıkması (delesyon):**

Genomdaki dizilime bir baz çiftinin girmesi ile oluşan değişim şekil 1.6'da gösterilmiştir. Tek bazın inzerasyonu (DNA dizisine bir veya daha çok baz çiftinin eklenmesi) takip eden tüm dizilimi bozduğundan, sentezlenecek amino asitlerin değişimine neden olacaktır. Buna bağlı olarak ilgili proteinin fonksiyonları değişecek ya da tamamen kaybolacaktır (Skraban vd., 1999; Inman vd., 2002). Aynı mekanizma baz delesyonları (kromozomun bir parçasının kopup kaybolması) için de söz konusudur. Genomdan birden fazla bazın ve bir genin çıkması da söz konusu olabilir. Bu tip değişimlerin geri dönüşümü oldukça zordur (Yeşilbağ, 2002).



Şekil 1.6. Baz inzersiyonuyla oluşan değişim (Yeşilbağ, 2002.)

### c) Bazlar arasında bağların oluşması (dimerizasyon):

Dimerizasyon için başlıca etken UV ışınlarıdır. Burada, pirimidin bazları arasında kovalent bağ oluşumuna dayanan bu mekanizma söz konusudur. Bu durum nedeniyle (Dimerizasyon) DNA zincirinde yer alan pirimidin bazlarının arasındaki mesafe kısalır ve bu bölgeler transkripsiyon sırasında atlanır (Arda, 1983).

### 1.5. Biyogaz Prosesine Etki Eden Faktörler

Köklü bir teknoloji olarak gösterilen ve farklı organik maddelerin kullanıldığı anaerobik arıtmanın (Pöschl vd., 2010), istenilen çalışma verimine ulaşması ve bu verimin sürekliliği için; pH, sıcaklık, Toplam Organik Karbon (TOK), uçucu organik madde (OM), katı madde alıkonma süresi (SRT), organik yükleme hızı (OLR), Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ), alkalinite, uçucu yağ asitleri (UYA veya VFA), VFA/alkalinite gibi parametrelerin kontrol altında tutulması gerekmektedir. Bu parametrelerin (Çizelge 1.4) kontrol altında tutulması ile elde edilen yüksek verimlerin sabit kalması sağlanabilmektedir (Koyuncu ve Nas, 2022).

Çizelge 1.4. Anaerobik proseslerde optimum koşullar (Öztürk, 1999)

Parametre	Optimum Şartlar
Atık Bileşimi	Karbon elementi, Azot-Fosfor ve iz elementler açısından uygun oranlı olmalı, O <sub>2</sub> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> gibi oksitleyici maddeler içermemeli
KOİ/N/P	300/5/1
pH	6,5-8,2
Sıcaklık	25-40 (35-37)°C ~ 50-60 (55)°C
Alkalinite	1000-4000 (2000) mg/L CaCO <sub>3</sub>
VFA	<1000-1500 mg/L (asetik asit olarak)
VFA/Alkalinite	< 0,1

\* Parantez içindeki sayılar optimum değerleri vermektedir.

### 1.5.1. Uçucu yağ asitleri (VFA)

Uçucu yağ asitleri (VFA) veya diğer ismiyle kısa zincirli yağ asitleri, altıdan az karbon atomuna sahip yağ asitlerine verilen genel isimdir. Asetik ve propiyonik asitler genellikle üretimi en yüksek orana sahip zayıf organik asitlerdir (Gidstedt, 2017). En yaygın VFA ve bazı özellikleri Çizelge 1.5'te verilmiştir.

Çizelge 1.5. En yaygın VFA'lar ve özellikleri (Wainaina, 2020)

VFA	Mol Ağırlık (g/mol)	Molekül Formülü	Ayrışma Sabiti (pKa)	Kaynama Noktası (°C)
Asetik Asit	60,05	CH <sub>3</sub> COOH	4,76	117,9
Propiyonik Asit	74,08	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH	4,88	141,1
İzobütirik Asit	88,11	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCOOH	4,84	154,4
Bütirik Asit	88,11	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	4,82	163,7
İzovalerik Asit	102,13	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> COOH	4,77	176,5
Valerik Asit	102,13	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	4,84	186,1

VFA, kimya endüstrisi de dahil olmak üzere çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Hidrojen, metan ve biyobütanoller gibi biyoyakıtların çoğunun üretiminde ve biyopolimer üretimlerinde uçucu yağ asitlerinden yararlanılır (Strazzeri vd., 2018).

VFA'lar biyogaz proseslerinin verimini etkileyen önemli parametrelerdendir. Biyogaz üretiminde, pH düşüşüne bağlı karşılaşılan inhibisyon sorunları VFA yüksekliğinden dolayı olabilmektedir (Wainaina vd., 2019). Bu nedenle VFA kontrolü ile proses veriminin olumsuz etkilenmesi engellenebilir. VFA üretimi

hidroliz adımında gerçekleşir ve daha sonra anaerobik çürütme işlemi son aşamaya kadar devam ederse metana dönüşür (Bilgiç, 2021).

VFA üreten mikroorganizmalar, aşırı alkali veya asidik koşullara dayanamazlar. Bu nedenle anaerobik çürütme işleminde, pH ölçümleri genel süreç hakkında nasıl önemliyse, VFA ölçümleri de bir o kadar önemlidir (Hultman ve Alshwan, 2019; Lee vd., 2014). Optimum pH aralığı VFA üretimi için 5,25 ile 11 arasında belirtilebilir. Ancak bu değerler kullanılan atık türüne göre değişiklik gösterir. Numunenin arıtma çamuru olması durumunda pH aralığı 8 ila 11 arasında seçilmelidir (Zhang vd., 2009; Lee vd., 2014). Buna ek olarak, mutfak atıkları için diğer pH değerlerine kıyasla, pH 7'de elde edilen VFA üretim verimleri en uygun değer olarak bulunmuştur (Lee vd., 2014; Zhang vd., 2005). Farklı pH değerleri, üretilen VFA türlerini değiştirir (Lee vd., 2014). Aynı zamanda alkalinite koşulları, metanojenesis desteklemez ise üretilen uçucu yağ asitleri ilerleyen safhalarda tüketilmemekte ve böylelikle biyogaz verimi düşmektedir (Zhang vd., 2009; Lee vd., 2014).

Biyogaz proseslerinde hidroliz ve asidojeniz aşamalarında yapılan optimum pH ayarı, VFA üretimini hızlandırır. Aynı zamanda metanojenik aktivitelerin önlenmesinde pH'ın ayarlanması da çok önemlidir. Metanojeniz basamağında görev alan arkeler için optimum pH 7,0 ila 8,2 pH arasında olmalıdır (Cheah vd., 2019).

Biyogaz prosesleri mezofil şartlarda işletilecekse VFA 50-300 mg/L olması prosesinin iyi işlediğini gösterir (Metcalf ve Eddy, 2003). Anaerobik çürütücülerde 1.000-1.500 mg/l arasında VFA beslemesi yapılabilir (Öztürk, 2007). VFA konsantrasyonunun 2.200 mg/l olduğu şartlarda, organik yükün azaltılması gerekmektedir (Schober vd., 1999). Aşırı uçucu yağ içeren yüksek organik yüklerden meydana gelen VFA'lar, anaerobik sindirimi yoğun bir şekilde engellemektedir (Xu vd., 2014).

Beslenen malzemedeki VFA miktarı, malzeme çeşidine göre değişiklik göstermektedir. Biyogaz proseslerinde, metanojen basamağında görev alan

bakteriler yardımıyla hidroliz aşamasında üretilen VFA'nın kullanılması sonucunda proses çıkışında cürufun VFA miktarında azalmalar olmaktadır. Aynı zamanda bekleme süresinin artması ile VFA miktarındaki azalma artmaktadır (Sosnowski vd., 2008).

### **1.5.2. Hidrolik bekleme süresi (HRT)**

Anaerobik reaksiyonlarda bekleme süresinin artması ile biyokimyasal reaksiyonların hızları azalmaktadır. Anaerobik sistemlerin içeriğinde bulunan organik maddenin mikroorganizmalar tarafından katabolize edilerek biyogaz üretilmesi için bekleme süresi önemli bir etkidir. Bekleme süreleri, prosesin işletilme sıcaklığına göre değişiklik göstermektedir. Bu süreler termofilik ve mezofilik şartlarda işletilen anaerobik çürütücüler için sırasıyla 10-40 gün arasında değişmektedir (Verma, 2002). Belirlenen bu sürelerde, anaerobik reaktör içindeki organik maddelerin %70-80'inin reaksiyona girerek bozunduğu kabul edilmektedir (Öztürk, 2005). Sürekli karıştırılmalı tank reaktör (CSTR) çalışmalarında elde edilen birim organik madde başına metan miktarlarının, biyometan potansiyel (BMP) çalışmalarında elde edilenden az olmasının sebebi, CSTR'daki organik maddelerin bekleme süresinden önce sistemi terk etmesidir. Aynı zamanda bozunması zor olan organik maddelerin katabolize olması için gerekli zaman bazen fazla olabilmektedir (Kasarcı, 2012).

### **1.5.3. pH**

Anaerobik proseslerde stabil tutulması gereken önemli bir parametre olan pH, mikroorganizmaların çoğalma hızını etkilemektedir (Yadvika vd., 2004). Anaerobik proseslerde, görev yapan her bir mikroorganizma grubunun kendi optimum pH'sı bulunmakla birlikte bu değerler 6-8,5 gibi dar aralıkta gerçekleşir. Optimumu pH değerleri metanojen ve asetojenler için 7, asidojenlerin için ise 6 civarındadır. Metanojenler pH değişkenine daha hızlı tepki vermekte ve asidik ortamlarda faaliyet gösterememektedir. Bu nedenle pH 6,6'nın altında faaliyetleri çok yavaşlar (Demir, 2019; Türker, 2008). Bu nedenle metanojenler için pH değerinin 6,5-8,2 arasında tutulması gerekmektedir (Yadvika vd., 2004).

Anaerobik proseslerde pH dengesinin bozulması ile VFA birikmesi görülebilir. Bu durum ise ortam pH'sı düşebilir (Demir, 2019; Türker, 2008). Bazı organik atıkların alkalinite üretiminin fazla olması anaerobik sistemlerde VFA birikmesini engelleyebilmektedir. Üretilen alkalinite, VFA üretimini dengeler ve pH düşmesinin önüne geçer (Türker, 2008). Düşük pH değeri alkalinite ile dengelenemezse anaerobik sistemde gaz üretiminde yavaşlama, üretilen gaz hacminde azalma ve gaz konpozisyonundaki yüzdesinde düşüşler görülmektedir. Bu durumun önüne geçilmesi için anaerobik proseslerde VFA/Alkalinite oranı 0,1'in altında olmalıdır (Demir, 2019).

#### **1.5.4. Alkalinite**

Alkalinite, biyolojik aktivitenin optimum düzeyde tutulması için gerekli pH'nın dengelenmesi için önemli bir parametredir (Grady vd., 2011). Organik atıkların bünyesinde bulunan ve kolay bozunabilen maddelerin bozunması sonucunda, ortamda VFA ve CO<sub>2</sub> konsantrasyonları artar. Bu bozunma ortam pH'sını 5'in altına kadar düşürür (Quasim ve Chiang, 1994). Alkalinite düşen pH'nın tamponlanmasına ve biyolojik aktivitenin düzenlenmesine yardımcı olur. Alkalinite değerinin 1000–5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L olduğu ortamlarda biyolojik aktivitenin devam edeceği bildirilmiştir (Thcobanoglous vd., 1993).

Anaerobik sistemde beslenen malzemede alkalinite; 1.000-4.000 mg/L ve sistem çıkışındaki cürufta ise 2.500-4.000 mg/L olabileceği belirtilmiştir (Öztürk vd., 2005). Anaerobik sistemdeki stabilitenin bozulduğu pH düşüşünden önce biyogaz bileşimindeki CO<sub>2</sub> miktarının artışıyla ya da alkalinite değerindeki düşme yardımıyla tespit edilebilir (Klein, 2002).

VFA/Alkalinite değerinin kontrolü anaerobik proseslerin işletilmesinde çok önemlidir. Bu oranın 0,1'den küçük olması prosesin iyi çalıştığını göstermektedir (Öztürk, 2007). Metcalf ve Eddy (2003)'e göre ise bu oran <0,3 mg VFA / mg/L CaCO<sub>3</sub> değerleri arasında olmalıdır.

## 1.6. Metagenom analizi

Metagenomik yeni nesil dizileme, hem patojen hem de hasta genomlarının kapsamlı analizi için vazgeçilmez bir araçtır. Yeni nesil dizileme (mNGS), mikrobiyal ve insan genetik materyallerini ölçmek için gelişmiş sıralama teknolojilerini uygulamaktadır (Han vd., 2019).

Bu yöntemin bazı avantajları;

- Bir örnekte, bakteri, virüs, mantar, parazitler ve patojenlerin tespitini sağlar (Chiu ve Miller, 2019).
- mNGS klinik alanlardaki mikrobiyomlar ek bilgiler sağlayabilir. Bu polimikrobiyal enfeksiyonlar için kritiktir (Chiu ve Miller, 2019).
- Bu yöntem, kültür temelli kullanılarak tanımlama yöntemleri veya geleneksel yöntemlere göre geniş ve kolay bir şekilde mikroorganizma profillerini bulmaya yardımcı olur (Duan, vd., 2021).
- mNGS, hastalığın izlenmesine izin verir tedaviyi değerlendirmenin yanı sıra yörünge enfeksiyon seyri üzerinde de etkin olarak kullanılabilir (Qian vd., 2021)

## 1.7. Tüm genom analizi

Yeni moleküler yöntemlerden olan tüm genom analizi (WGS) yardımıyla, fenotipik antibiyotik testleri yanında son yıllarda antibiyotik direnç ve farklı genlerin karşılaştırmalı analizleri daha kolay yapılabilmektedir (Barilleau vd., 2021; Lerminiaux vd., 2020).

Tüm genom analizleri, taksonlar (cins, tür vb.) arasındaki ilişkinin belirlenmesine kullanılmakta ve bunların ayırt edilebilmesi amacıyla da veriler sağlamaktadır (Toru, 2022). Horizontal (yatay) gen transfer (HGT) bu paylaşımın neden olan esas yoldur. Gram negatif bakterilerde genomik veya patojenite adalarının HGT ile aktarımı gerçekleşebilir ve bu onlara yeni ekolojik işlevler, evrimsel sıçramalarını sağlayabilir. Hatta yeni konaklar kazanmasına yardım edebilir (Lerminiaux vd., 2020).

Patojenite adalarının bakteri evrimini ve yeni konaklara adaptasyonunu en iyi anlatabilecek model patojen *Salmonella*'lardır. Bu cinste toplam 24 patojenite adası tanımlanmıştır. Ancak bu adaların hepsinin virülans faktörlerini taşıdığı deneysel olarak doğrulanmamıştır (Hayward vd., 2014; Lerminiaux vd., 2020; Urrutia vd., 2014). *Salmonella* türlerinin 2600'den fazla serotipi bulunmakta olup, bulaşları başlıca kontamine su ve gıdalar aracılığı ile fekal-oral yolla olmaktadır (Bahramianfard vd., 2021; Barilleau vd., 2021).

Tüm genom analizi verileri kullanılarak yapılan sekans serotip analizleri, son yıllarda geliştirilmiştir ve birbirlerine filogenetik açıdan %95 ve üstünde benzer kökenlerde oldukça başarılı olduğu antijenik serotipleme yerine genomik verilerle altın standart olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir (Banerji vd., 2020; İbrahim vd., 2018).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Biyolojik ön işlemler arasında sistemlere mikroorganizma eklenerek yapılan birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda sistem mekanizmasına etki eden doğru mikroorganizmanın seçilmesi ile işlemler hızlanabilmektedir. Çizelge 2.1 incelendiğinde, mikroorganizmaların kullanıldığı biyodizel üretimi, Hidroliz, Metanojenik Aktivitenin Artırılması, Sezyum üretkenliği artışı ile ilgili bir çok çalışmanın olduğu görülmektedir. Çizelgede belirtilen çalışmalarda, bakteri ilavesiyle metan miktarında büyük artışlar gözlenmiştir. Metan miktarı artışlarının en dikkat çekenleri; *Bacillus paralicheniformis* ilavesi yapılan bir çalışmada %53,6 (Kumar vd., 2021), karışık konsorsiyumda %5 etanol içeren karışımda %67, %1 gliserol eklenen karışıma göre %270 daha fazla (Prasertsan, 2021), *Bacteroides* ve *Clostridium* bakımından zengin metanojenik konsorsiyumda %85,5 (Tukanhan vd., 2021), *Kosmotoga* ve *Rhodopirellula* ilavesi yapılan bir çalışmada %60 (Yıldırım vd., 2017), *Methanobacterium formicicum*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanisarcina frisia*, *Methanotherix soehngeni* içeren konsorsiyumda %76 (Christy vd., 2014), Lignoselülotik mikrobiyal konsorsiyumda %50, *Bacteroides* sp., *Azospira oryzae* (*Dechlorosoma* sp.) ve Clostridiales (Firmicutes) içeren konsorsiyumda %53 (Weiß vd., 2010) şeklinde sıralanabilir.

Çizelge 2.1. Biyogaz üretimde kullanılan biyolojik yöntemler (Bakteri ilavesi)

Etki Türü	Çalışma amacı	Eklenen bakteri veya bakteri kaynakları	Verimi artışı (Metan veya biyogaz)	Referans
Hidroliz	Biyogaz veriminin artırılması	Aktinomiset ve karışık konsorsiyum	Actinomycetes suşları; %8,4 karışık konsorsiyum; %44	(Tirumale ve Nand, 1994)
Hidroliz	Biyogaz veriminin artırılması	Aktinomiset bakteri türü	CD-4 suşu %46, Shiv-15 suşu %39	(Attar vd., 1998)
Hidroliz	Biyogaz veriminin artırılması	Selüloolitik Bakteriler	selüloz (b), ksilan (c) ilave edilen karışımda; biyogaz %56,36 metan %18,09 artışı	Wahyudi vd., 2010)
Hidroliz	Biyogaz üretiminin artırılması	<i>Bacteroides</i> sp., <i>Azospira oryzae</i> ( <i>Dechlorosoma</i> sp.) ve Clostridiales (Firmicutes)	%162 ksilanaz artışı, %53 metan artışı	(Weiß vd., 2010)
Hidroliz ve Metanojen	Biyogaz veriminin artırılması	<b>Kullanılan Mikrobiyal Ajanlar;</b> - maya ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sp., <i>Coccidioides immitis</i> sp. ve <i>Hansenula anomala</i> sp.), -Selüloolitik bakteriler ( <i>Bacillus licheniformis</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus subtilis</i> sp. ve <i>Pleurotus florida</i> sp.)	%33,1 biyogaz artışı, %34,6 Metan artışı  Selülozda %5,81 azalma  Hemiselülozda %25,1 azalma	(Zhong vd., 2011)
Hidroliz	Biyogaz üretiminin artırılması	Lignoselülotik mikrobiyal konsorsiyum (LMC)	%187 selüloz ve %165 hemiselüloz bozunması artışı, %40 biyogaz artışı, %50 Metan artışı	(Tuesorn vd., 2013)
Hidroliz ve Metanojen	Biyogaz veriminin artırılması	- Konsorsiyum "B"; <i>Bacteroides</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Clostridium</i> ve <i>Propionibacterium</i> - Konsorsiyum "C" metanojenik bakteriler içermektedir; <i>Methanobacterium formicicum</i> , <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> , <i>Methanisarcina frisia</i> , <i>Methanotherx soehngeni</i> . - Konsorsiyum "A" ise bu 8 izolatın hepsini içermektedir.	metan miktarını;  - Konsorsiyum "C" %76, - Konsorsiyum "A"; %23 - Konsorsiyum "B"; %1 artırmıştır.	(Christy vd., 2014)

Çizelge 2.1. Biyogaz üretimde kullanılan biyolojik yöntemler (Bakteri ilavesi) (Devam)

<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	Metan veriminin artırılması	<i>Acetobacteroides hidrojenigenes</i>	<i>A. hidrojenigenes</i> + metil selüloz karışımında metan verimi <b>%16,8</b> artış  <i>A. hidrojenigenes</i> + ksilan karışımında metan verimi <b>%7</b> artış	(Zhang vd., 2015)
<b>Hidroliz</b>	Biyogaz üretiminin artırılması	- <i>P. Xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> , - <i>C. cellulovorans</i> , - <i>F. succinogenes</i> S85.	Metan üretimi artışları; - <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> ; %17,8, - <i>C. cellulovorans</i> ve <i>F.succinogenes</i> karışım S85; %4,9	(Çater vd., 2015)
<b>Hidroliz</b>	Selüloz, Hemiselüloz ve lignin giderimi ve metan aktivitesinin artırılması	<i>Clostridium stercorarium</i> ve <i>Bacteroides cellulosolvens</i>	Selüloz, Hemiselüloz ve ligninde sırasıyla %68,8 - %78,2 - %77,4 - %89 ve %15,4- %33,7 giderim. Metan miktarında %210-246 oranında artış	(Hu vd., 2016)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	Metan veriminin artırılması	<i>Methanoculleus bourgensis</i> MS2T	Metan üretiminde %36 artış.	(Fotidis vd., 2017)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	Metan veriminin artırılması	<i>Miscanthus floridulus</i> (OT Türü)	Metan veriminde %49 artış	(Katukuri vd., 2017)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	Metan veriminin artırılması	Koyun işkembe sıvısından %2 ve %4 zenginleştirilen kültür (içeriğinde <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Methanobacteriales</i> suşları bulunan) (zenginleştirme kültüründe <i>Methanosarcinales</i> baskın) ( <i>Cloacamonaceae</i> , standart inokulumda bol miktarda)	%4 zenginleştirilen kültürde %27 Metan verimi artışı	(Özbayram vd., 2017)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	Metan veriminin artırılması	<i>Clostridium thermocellum</i> <i>Micrococcus roseus</i>	<i>Clostridium thermocellum</i> %34 metan artışı  <i>Micrococcus roseus</i> %10 metan artışı	(Tsapekos vd., 2017)

Çizelge 2.1. Biyogaz üretimde kullanılan biyolojik yöntemler (Bakteri ilavesi) (Devam)

<b>Hidroliz</b>	Biyogaz üretiminin artırılması	<i>Aspergillus fumigatus</i>	%21 metan artışı	(Yahmed vd., 2017)
<b>Hidroliz ve Metanojen</b>	Biyogaz veriminin artırılması	<b>R0;</b> <i>Mycobacterium</i> , <b>R1;</b> <i>Kosmotoga</i> ve <i>Rhodopirellula</i> <b>R2;</b> <i>Clostridium</i> ve <i>Longilinea</i> <b>R3;</b> <i>Clostridium</i> en baskın cinsler.	Metan üretiminde en yüksek verim R <sub>2</sub> 'de %60 olarak gerçekleşmiştir.  Biyogaz artışları: R <sub>2</sub> : %15 R <sub>3</sub> : %20 R <sub>1</sub> : %5	(Yıldırım vd., 2017)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	Metan veriminin artırılması	<i>Clostridium thermocellum</i>	Metan veriminde %39 artış	(Öner vd., 2018)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	Metan veriminin artırılması	<i>Polyporus brumalis</i> BRFM985 (Mantar)	Metan veriminde %52 artış	(Rouches vd., 2018)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	Metan veriminin artırılması	İşkembe sıvısı: <i>Neocallimastix frontalis</i> <i>Syntrophococcus sucromutans</i>	Bağırsak sıvısıyla ön işlemde geçirilmiş kağıt çamuru, ön işlem geçirmemiş göre %340 metan artışı	(Takizawa vd., 2018)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	Metan veriminin artırılması	<i>Bacillus Subtilis</i>	Metan veriminde %17,4 artış	(Xu vd., 2018)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	Metan veriminin artırılması	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Metan veriminde %78 artış	(Zhang vd., 2018)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	Lignoselüloz bazlı anaerobik arıtımda <i>Orpinomyces</i> sp. Kullanım sonuçlarının değerlendirilmesi	<i>Orpinomyces</i> sp. (Anaerobik mantar)	%15-33 metan verimini artışı	(Akyol vd., 2019)

Çizelge 2.1. Biyogaz üretimde kullanılan biyolojik yöntemler (Bakteri ilavesi) (Devam)

<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	Metan veriminin artırılması	<i>Methanosarcina</i>	CH <sub>4</sub> üretimi (> <b>70%</b> )	(Ferraro vd., 2019)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	Metan veriminin artırılması	<i>Coprothermobacterales</i> (phyla <i>Coprothermobacterota</i> ), <i>Corynebacterineae</i> (phyla <i>Actinobacteria</i> ) <i>Petrotogales</i> (phyla <i>Thermotogae</i> ), <i>Clostridiales</i> (phyla <i>Bacteroidetes</i> ), <i>Lactobacillales</i> (phyla <i>Firmicutes</i> ) <i>Haloplasmales</i> (phyla <i>Tenericutes</i> ) <i>Corynebacterineae</i> Enterococcus Caldicoprobacter	En yüksek metan verimi HRT 3'te <b>%54,6</b> elde edilmiştir.  HRT3'te bakteri bileşiminde en yüksek popülasyon <i>Corynebacterineae</i> ( <b>~%28</b> ) Enterococcus ( <b>~%21</b> ) Caldicoprobacter ( <b>~%18</b> )	(Yin vd., 2019)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	Metan veriminin artırılması	<i>Orpinomyces joyonii</i> (Mantar)	Biyogaz <b>%25</b> , Metan <b>%38,4</b> artış	(Shetty vd., 2020)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	Metan veriminin artırılması	<i>Methanoculleus</i> sp. DTU887	Metan veriminde <b>%21</b> artış	(Yan vd., 2020)
<b>Hidroliz</b>	Pirinç samanının anaerobik arıtımı	<i>Bacillus paralicheniformis</i> VKVVG3 (CDF), <i>Perlucidibaca piscinae</i> VKVVG6 (CDd1), <i>Bacillus clausii</i> VKAK2 (RSa1) ve <i>Bacillus mojavensis</i> VKAK1 (Cdb1)	<i>Bacillus paralicheniformis</i> 'te <b>%53,6</b> Metan artışı	(Kumar vd., 2021)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	Metan veriminin artırılması	Baskın bakteriler; <i>Sandarakinotalea</i> sp., <i>Lachnobacterium</i> sp., <i>Blautia</i> sp., <i>Marinobacter</i> sp., <i>Anaerotruncus</i> sp., <i>Clostridium</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Acinetobacte</i> sp.	%5 etanol içeren karışımda <b>%67</b> metan artışı  Metan üretim oranı %5 etanol eklenmiş karışımda, %1 gliserol eklenen karışıma göre %270 daha fazla	(Prasertsan., 2021)

Çizelge 2.1. Biyogaz üretimde kullanılan biyolojik yöntemler (Bakteri ilavesi) (Devam)

<b>Hidroliz ve Metanojen</b>	Biyogaz veriminin artırılması	<i>VadinBC27, Candidatus Cloacamonas, Sedimentibacter, Petrimonas, Ruminiclostridium ve Ruminofilibacter</i> dahil olmak üzere 22 bakteri türü kullanılmıştır.	<b>%5,9</b> biyogaz artışı, <b>%7,4</b> Metan artışı propiyonik asit konsantrasyonunda %55,7 azalma	(Shen vd., 2021)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	<i>Bacteroides</i> ve <i>Clostridium</i> açısından zengin metanojenik konsorsiyumun, yüksek katı anaerobik çürütme sistemlerinin biyogaz üretimini artırması	<i>Bacteroides, Clostridium</i> bakımından zengin metanojenik konsorsiyum	<b>%67,2</b> Yağı alınmış paliye posası hidrolizinin artışı, <b>%85,5</b> Metan verimi artışı	(Tukanghan vd., 2021)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	<i>Metanosarcina thermophila</i> ve biyokömür takviyesi ile özgül metan miktarının artırılması	<i>Metanosarcina thermophila</i> ve biyokömür	Özgül metan veriminde 1 g/L biyokömür ve <b>%5</b> , <i>M. Thermophila</i> ilavesi ile <b>%32</b> , 2 g/L biyokömür ve % 10 <i>M. Thermophila</i> ilavesi ile <b>%20</b> 'lik artış	(Lee vd., 2022a)
<b>Metanojenik Aktivitenin Artması</b>	<i>Methanosarcina thermophila</i> ilavesi ile metan miktarının artırılması	<i>Methanosarcina thermophila</i>	Tek mikroorganizma yüklemeli reaktörde <b>%37</b> metan verimi artışı, Rutin mikroorganizma yüklemeli reaktörde <b>%32</b> metan verimi artışı	(Lee vd., 2022b)

Organizma ve mikroorganizmaların mutasyonları sonucunda, enzim üretim verimlerinin artırılabilirliği ile ilgili bir çok çalışmadan bazıları Çizelge 2.2'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde; *Bacillus subtilis* E6-5 suşunun EMS ile mutasyonu sonucunda proteaz üretiminin 9,2 kat arttığı (Özdemir ve Demirkan, 2020), *Kemel B* (KB) fungusunun MNNG ile mutasyonu sonucunda lipaz enzimi aktivitesinin %91,2 oranında arttığı (Nabilasani vd., 2019), *Bacillus subtilis* suşunun UV ve EtBr ile mutasyonu sonucunda 8,2 kat daha fazla enzim üretildiği (Özalpar, 2018), *Caenorhabditis elegans* kullanılarak Kinaz aktivitesinde 3 kat artış gözlemlendiği (Paradis vd., 2017), *Aspergillus niger* suşunun UV, EMS ve EtBr ile mutasyonu sonucunda glikoamilaz enziminde 2 ila 4 kat artış olduğu (Raju vd., 2012), *Bacillus amyloliquefaciens* suşunun EMS ile mutasyonu sonucunda amilaz üretiminde 1,4 kat artış olduğu (Haq vd., 2010), *Staphylococcus aureus* suşunun  $\beta$ -D-1- thiogalactopyranoside (IPTG) ile mutasyonu sonucunda laktonaz aktivitesinde 2.5 kat artış olduğu (Tanaka vd., 2006), *Cyathus bulleris* suşunun EtBr ile mutasyonu sonucunda 4,2 kat fazla lakkaz ürettiği (Dhawan vd., 2001), *Bacillus* sp. MK716 suşunun EMS ile mutasyonu sonucunda amilaz enzim üretiminde 40 kat artış olduğu (Sidhu vd., 1997) tespit edilmiştir.

Çizelge 2.2. Kimyasal ve/veya fiziksel Mutasyon sonucunda enzim miktarında elde edilen artışlar

Çalışma amacı	Kullanılan bakteri	Kullanılan yöntem	Kullanılan kimyasallar	Sonuç	Referans
Mutasyonların, proteaz üretimi üzerindeki etkilerinin araştırılması	<i>Bacillus subtilis</i> E6-5	Kimyasal	EMS	Maksimum proteaz aktivitesine sahip mutantın ana suşdan 9,2 kat daha fazla proteaz ürettiği belirlenmiştir.	Özdemir ve Demirkan (2020)
ITC kimyasalının mutasyona etkisinin belirlenmesi	<i>Escherichia coli</i>	Kimyasal	İyodo-tiyosiyanat kompleksi (ITC)	ITC'ye maruz kalan <i>E. coli</i> 'nin maruz kalmamış kültürlerle kıyasla mutasyon oranında hafif ve önemli olmayan bir artışa sahip olduğunu bulunmuştur.	Tonoyan vd. (2020)

Çizelge 2.3. Kimyasal ve/veya fiziksel Mutasyon sonucunda enzim miktarında elde edilen artışlar (Devam)

Comet Tahlili ve Ames Testi ile in vitro olarak anti-genotoksik / anti-mutajenik aktivitelerin değerlendirilmesi	Gram negatif <i>Escherichia coli</i>	Kimyasal	4-nitrokinolin-1-oksit (NQO), hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ve benzo (a) piren (B [a] P)	EcN'nin anti-genotoksik / anti-mutajenik aktivitesinin konsantrasyona bağlı olduğu gösterilmiştir.	Janosch vd. (2019)
Mutasyonların, lipaz üretimi üzerindeki etkilerinin araştırılması	<i>Kemel B</i> (KB) fungusu	Kimyasal Fiziksel (UV)	UV, EMS ve MNNG	MNNG kimyasalı ile mutasyona uğratılmış fungusların lipaz enzimi aktivitesinin %91,2 oranında arttığını tespit etmişlerdir.	Nabilasani vd. (2019)
Mutasyonların, enzim üretimi üzerindeki etkilerinin araştırılması	<i>Bacillus subtilis</i>	Kimyasal Fiziksel (UV)	UV ve EtBr	Mutantlar içerisinde en büyük zon çapına (25 mm) sahip olan mutantın sıvı ortamda enzim üretim kapasitesi test edilmiştir. Sonuç olarak, mutant suş ana suştan 18,2 kat daha fazla enzim ürettiği tespit edilmiştir. En yüksek enzim üretimi 24'üncü saatte elde edilmiştir.	Özalpar (2018)
Mutasyonların, kinaz üretimi üzerindeki etkilerinin araştırılması	<i>Caenorhabditis elegans</i> , yuvarlak solucanlardan olup serbest yaşayan bir nematoddur.	-	-	Kinaz aktivitesinde 3 kat artış.	Paradis vd. (2017)
Mutasyonların, amilaz üretimi üzerindeki etkilerinin araştırılması	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	Kimyasal	-	Elde edilen mutanlardan bazılarının yabani suşa göre daha yüksek amilaz enzimi ürettiği belirlenmiştir.	Suribabu vd. (2014)

Çizelge 2.4. Kimyasal ve/veya fiziksel Mutasyon sonucunda enzim miktarında elde edilen artışlar (Devam)

Mutasyonların, amilaz+, ksilanaz ve CMCaz+ üretimi üzerindeki etkilerinin araştırılması	<i>Bacillus sp.</i>	Kimyasal	EtBr	Mutant varyetelerde amilaz aktivitesinin ana suşa göre %91 - %35 oranında daha yüksek ksilanaz enzimi ürettiği belirlenmiştir.	Khodayari, (2013)
Mutasyonların, glikoamilaz üretimi üzerindeki etkilerinin araştırılması	<i>Aspergillus niger</i>	Kimyasal Fiziksel (UV)	UV, EMS ve EtBr	UV: 18,11 U/ml/dk, EMS: 14,93 U/ml/dk, EtBr: 18,31U/ml/dk ve EMSveEB: 18,84 U/ml/dk glikoamilaz ürettikleri ve yabani suşa göre 2 ila 4 kat daha fazla enzim üretimlerinin olduğu belirlenmiştir.	Raju vd. (2012)
Mutasyonların, selülaz üretimi üzerindeki etkilerinin araştırılması	<i>Humicola insolens</i> (termofilik mantar suşu)	Kimyasal Fiziksel (UV)	UV, MNNG, HNO <sub>2</sub> , EtBr ve EMS	Mutantların selülaz üretim kapasitelerinin orijinal suşlara göre sırasıyla; %17,36, %41,17, %5,25, %23,07 ve %29,07 oranında arttığı tespit edilmiştir.	Javed ve Mariyam (2011)
Mutasyonların, Redüktoizomera z üretimi üzerindeki etkilerinin araştırılması	<i>Escherichia coli</i>		X-ışını	Redüktoizomera z aktivitesinde 3 kat artış	Bastian vd. (2011)
Mutasyonların, alfa amilaz Enzimi üretimi üzerindeki etkilerinin araştırılması	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Kimyasal Fiziksel (UV)	UV, MNNG ve EMS	UV sonucu alfa amilaz üretimini yok, EMS'ye (50-300 ul/ml) maruz bırakılan mikroorganizmaların enzim miktarının ana bakteriye göre 1,4 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir.	Haq vd. (2010)

Çizelge 2.5. Kimyasal ve/veya fiziksel Mutasyon sonucunda enzim miktarında elde edilen artışlar (Devam)

Laktonaz drp35	<i>Staphylococcus aureus</i>	Kimyasal	$\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Laktonaz aktivitesinde 2,5 kat artış.	Tanaka vd. (2006)
(NQNO) ve MNNG tarafından inhibe etme kabiliyetinin araştırılması	Probiyotik olmayan laktobasiller	Kimyasal	4-nitrokinolin-N-oksit (NQNO) MNNG	NQNO'nin <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii subsp.</i> , aktivitesini inhibe ettiği ve MNNG'nin sadece <i>L. acidophilus</i> suşunda inhibisyona neden olduğu ortaya konulmuştur.	Caldini vd. (2005)
Mutajenlerin H/C oranlarına etkisinin belirlenmesi	<i>Aspergillus oryzae</i>	Kimyasal Fiziksel (UV)	MNNG, UV ve Nitrous asit (NaNO <sub>2</sub> )	NaNO <sub>2</sub> , UV ve MNNG mutantları yabancı tiplere karşılaştırdıklarında sırasıyla %65,3, %52,8 ve %39,4 daha yüksek H/C orana sahip olduğu belirlenmiştir.	Azin ve Noroozi (2001)
Ethidium bromid'in (EtBr) lakkaz üretimi üzerindeki etkisinin incelenmesi.	<i>Cyathus bulleri</i>	Kimyasal	EtBr	Mutant mikroorganizmanın orijinal suşa göre 4,2 kat fazla lakkaz üretimi sağladığı görülmüştür.	Dhawan vd., (2001)
Mutajenlerin Axtaxanthin Üretimlerine etkisinin belirlenmesi	<i>Itaematococcus pluvialis</i>	Kimyasal Fiziksel (UV)	UV, MNNG ve EMS	Axtaxanthin üretiminin 2,2-3,2 kat arttırdığı bildirilmiştir.	Tripathi vd. (2001)
MNNG kimyasal ajanın mutasyona etkisinin belirlenmesi	<i>E. coli</i>	Kimyasal	MNNG	(MNNG) ile mutasyon oranının <i>Escherichia coli</i> 'nin kültür yaşına ve pH değerine bağlı olduğu görülmüştür	Golyasnaya ve Turina (2000)

Çizelge 2.6. Kimyasal ve/veya fiziksel Mutasyon sonucunda enzim miktarında elde edilen artışlar (Devam)

Mutajenlerin Antimutajenik aktivitelerinin belirlenmesi	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ve bifidobakteri suşu	Kimyasal	- N-metil, N'-nitro, N-nitrosoguanidin; - 2-nitroflourene; - 4-nitro-o-fenilendiamin; 4-nitrokinolin-N-oksit; Aflatoksin-B; 2-amino-3-metil-3H-imidazokinolin; 2-amino-1-metil-6-fenil-imidazo (4,5-b) piridin ve 2-amino-3-metil-9H-pirido (3,3-6) indol	Organik asitler arasında, bütirik asit en yüksek mutajen inhibisyonu gösterdiği ve asetik asit, Lactic ve pürüvik asitleri kayda değer düzeyde inhibisyon göstermediği gözlenmiştir.	Lankaputhra ve Shah (1998)
EMS'nin amilaz artışı üzerindeki etkisi	<i>Bacillus</i> sp. MK716 suşu	Kimyasal	EMS	Mutant MK716 suşunun amilaz enzim üretiminde 40 kat artış sağlandığı belirlenmiştir.	Sidhu vd. (1997)
MNNG mutajenitesi üzerindeki antimutajenik etki araştırılması	<i>Lactococcus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsine ait 71 suş	Kimyasal	MNNG	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 106 (LA2) suşlarının, MNNG mutajenitesine karşı %77 ile en yüksek inhibisyonu gösterdiği ortaya çıkmıştır	Hosoda vd. (1992)
Mutajenlerin Antimutajenik aktivitelerinin incelenmesi	- <i>Streptococcus thermophilus</i> - <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Kimyasal	4-nitrokinolin-N-oksit (NQNO) 2-aminofloren	Bakterilerin antimutajenik bileşikleri ürettiği gözlenmiştir	Bodana ve Rao (1990)
Mutasyonların Enzim üretimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi	-	Geleneksel Mutasyon yöntemleri	-	Elde edilen mutant suşların amilaz üretiminin orijinal suşlara göre 1500 kat fazla olduğunu tespit edilmiştir.	Yoneda vd. (1982)
Yöntemlerin mutasyon özelliklerinin karşılaştırılması	<i>E. coli</i>	Kimyasal Fiziksel (UV)	- ICR 191-A - MNNG - EMS - 2-AP	ICR 191-A ve UV kullanılarak yapılan işlemlerde Çerçeve kayması mutasyonu gözlenirken, diğer kimyasallarda gözlenmemiştir.	Berger vd. (1966)

Literatür bildirişleri, mikroorganizma ilavesinin biyogaz ve metan üretim verimine olumlu etkisi olduğunu göstermiştir. Bu çalışma ile;

- 1) Bir önceki CSTR çalışmasından alınan numuneler kullanılarak bakteri izolasyonu, izole edilen bakterilerin saflaştırması, mutajen kimyasal uygulamaları, tür tespiti ile elde edilen mikroorganizmaların tespitinin yapılması
- 2) İzole edilen bakterilerin ve bunların mutajen kimyasal uygulamaları sonucunda elde edilen mutantlarının enzim analizlerini yaparak kimyasal mutajenlerin enzim üretim verimlerine etkilerinin tespiti,
- 3) BMP ünitesini kullanarak en yüksek biyogaz ve metan üretim verimini sağlayan bakteri suşlarının belirlenmesi
- 4) Seçilen ümitvari bakterilerin tüm genom analizleri yardımıyla mutant bakterilerinin ana bakterilere göre baz dizilimlerindeki farklılıkların tespiti,
- 5) CSTR işletim koşullarında en yüksek biyogaz ve metan üretim verimini sağlayan bakteri suşlarının, biyogaz ve metan üretim verimine etkilerinin belirlenmesi,
- 6) Metagenom analizleri yardımıyla, CSTR sisteminde görev yapan mikroorganizmaların zamanla değişimlerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçlar doğrultusunda çalışmanın asıl amacı, uygun bakteri kullanılarak, reaktör hacmi değiştirilmeden HRT azaltılarak özgül metan miktarının artırılmasıdır.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

Denemelerde, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi bünyesinde işletilen süt sığırcılığı tesisinden temin edilen sığır gübresi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan gübre, tesis çıkışından alınmıştır.

CSTR prosesinde kullanılan sığır gübresinin içeriğinin ve özelliğinin değişmesini engellemek için gübre + su karışımı yapılarak bidonlara konulmuş ve +4°C'de soğuk hava deposunda muhafaza edilmiştir. Saklama koşullarına bağlı olarak 1 defa BMP ve ilki başta olmak üzere toplam 5 defa da CSTR denemelerinde kullanılmak üzere farklı dönemde sığır gübresi temin edilmiştir. Bu şekilde, kullanılan materyalin soğuk hava deposunda fazla yer kaplamasının ve zaman içinde nispeten bozunmaya uğrayarak bazı özelliklerini kaybetmesinin önüne geçilmeye çalışılmıştır. Bakteri izolasyonu işlemi, bir önceki çalışmada (Alkaloid İşleme Atıklarının Sığır Gübresi ile Anaerobik Ayrıştırılmasında Gaz Karıştırmanın ve Hidrojen Beslemenin Metan Üretimine Etkisi (Tübitak-118Y074) kullanılan CSTR sistemi kullanılarak yapılmıştır.

Tez çalışması kapsamında ana bakteriler ve mutajen kimyasal uygulaması sonunda elde edilen mutant bakterilerin biyogaz hacmine ve metan miktarına katkısının belirlenmesi amacıyla BMP testleri yapılmıştır. Testlerde kullanılan aşı materyali hâlihazırda laboratuvarında bulunan kararlı koşullarda işletilen CSTR tipi anaerobik reaktörden alınmıştır. BMP denemelerinde kullanılan malzeme özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. BMP testlerinde kullanılan malzemelerin özellikleri

Materyal	KM (%)	OM (%)	N (%)	C (%)	C/N	pH
Sığır Gübresi	8,24	78,51	1,74	36,54	21,00	7,59
Aşı	6,75	71,52	2,11	34,42	16,31	7,56

CSTR denemelerinde yüklenen malzemelerin özellikleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. CSTR denemelerinde kullanılan materyallerin ve reaktörlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Materyal	KM (%)	OM (%)	N (%)	C (%)	C/N	pH
SG+Su Karışımı-1	8,84	76,51	1,89	36,44	19,31	7,19
SG+Su Karışımı-2	9,38	79,89	1,91	36,93	19,34	7,56
SG+Su Karışımı-3	9,74	77,39	1,69	36,66	24,77	7,57
SG+Su Karışımı-4	9,75	78,80	1,82	37,05	20,31	7,79
SG+Su Karışımı-5	10,47	80,13	1,80	37,55	20,93	7,64
KNT-1 Başlangıç	5,86	72,14	1,99	34,81	17,48	7,31
KNT-1 SON	6,06	71,70	2,14	34,41	16,16	7,37
KNT-2 Başlangıç	5,83	72,37	2,03	34,62	17,06	7,32
KNT-2 SON	5,99	72,50	1,90	34,29	18,03	7,42
ANA-1 Başlangıç	5,82	72,04	1,94	34,01	17,51	7,37
ANA-1 SON	6,09	72,00	1,91	34,06	17,83	7,42
ANA-2 Başlangıç	5,81	71,15	1,99	33,99	17,08	7,35
ANA-2 SON	6,00	70,58	1,95	33,00	16,95	7,41
MNNG-1 Başlangıç	5,85	71,34	2,06	34,00	16,48	7,36
MNNG-1 SON	5,93	70,84	2,05	33,39	16,31	7,41
MNNG-1 Başlangıç	5,91	71,92	1,97	33,43	17,01	7,19
MNNG-2 SON	6,11	71,51	1,90	33,76	17,85	7,47

\*OM, N ve C verileri kuru bazda verilmiştir.

### 3.2. Metot

Bu çalışma altı aşamadan oluşmaktadır. 1. aşamada bir önceki CSTR çalışmasından alınan numuneler kullanılarak bakteri izolasyonu, izole edilen bakterilerin saflaştırması, mutajen kimyasal uygulamaları, tür tespiti 2. aşamada izole edilen bakterilerin ve bunların mutajen kimyasal uygulamaları sonucunda elde edilen mutantlarının enzim analizleri, 3. aşamada BMP ünitesini kullanarak en yüksek biyogaz ve metan üretim verimini sağlayan bakteri suşlarının belirlenmesi, 4. aşama seçilen ümitvari bakterilerin tüm genom analizleri yardımıyla mutant bakterilerinin ana bakterilere göre baz dizilimlerindeki farklılıkların tespiti, 5. aşamada CSTR işletim koşullarında en yüksek biyogaz ve metan üretim verimini sağlayan bakteri suşlarının, biyogaz

ve metan üretim verimine etkilerinin belirlenmesi ve 6. aşamada Metagenom analizleri yardımıyla, CSTR sisteminde görev yapan mikroorganizmaların zamanla değişimlerinin tespiti çalışmaları yapılmıştır.

### **3.2.1. Bakteri izolasyonu, saflaştırılması, tür tespiti, mutajen kimyasal uygulamaları**

Bakteri izolasyon çalışmasında selektif besiyerleri kullanılmıştır. Laboratuvarında yürütülen bir önceki CSTR çalışmasından alınan örnekler ile bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonrasında sırasıyla saflaştırma, mutajen kimyasal uygulamaları yapılmıştır. Tür tespiti ve tüm genom analizleri hizmet alınarak yetkili bir firmaya yaptırılmıştır. Diğer deneme ve analizler, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Makinaları ve Teknolojileri Mühendisliği Bölümü bünyesinde bulunan Kompost ve Biyogaz Araştırma Laboratuvarı ve Biyokütle Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Tüm bakteriyolojik çalışmalar Şekil 3.1'de görülen anaerobik kabinde yapılmıştır. Kabin sızdırmazlığının sağlanması için kapağına ve kapağın geldiği birleşim yerine fitil yerleştirmiş olup üzerine ağırlık konulmuştur. Böylelikle içeriye hava girişi engellenmiştir. Kabinde kroze içinde alkol yakılarak içerideki havanın tüketilmesi sağlanmış ve petri kaplarına agar dökümü, bakteri ekimi, stok hazırlama vb. çalışmalar bu aşamadan sonra yapılmıştır. Petrilere dökülen agarlar 24 saat 37°C'de inkübe edilmiş ve kontaminasyon olmadığından emin olunduktan sonra ekim, saflaştırma vb. çalışmalar yapılmıştır. Ekim sırasında kontaminasyona neden olabilecek sürüntü, döküntü vb. olması durumunu göz önünde bulundurarak kabin içi işlem öncesinde ve sonrasında etil alkol ile dezenfekte edilmiştir. Bu çalışmada tüm işlemlerde bir petri sadece kontrol amacıyla kabin içerisinde kullanılarak kontaminasyon kontrol edilmiştir. Petri kapları kabinden çıkartılmadan önce streçfilm yardımıyla kapatılmıştır.



Şekil 3.1. Bakteriyolojik çalışmaların yapıldığı anaerobik ortam

### a) Bakteri İzolasyonu ve Saflaştırma İşlemleri

Çalışmada istenilen bakterilerin izolasyonu için selektif besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerlerine yayma plak yöntemi ile bir önceki çalışmada kullanılan CSTR reaktörlerinden alınan örnek dilisyonlarının ekimi yapılmış ve en büyük zon oluşturan koloniler alınarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ana bakteriler yatık agar besiyerine stok oluşturularak +4°C'de soğuk hava deposuna ve -20°C'de dondurucuya kaldırılmıştır. Bu ana bakteriler kullanılarak diğer işlemler gerçekleştirilmiştir.

Bakteri izolasyonu işlemlerinde; Proteaz bakterileri; %1 Na-Caseinat içeren MPCA (Sevinç, 2010), Selülaz bakterileri; %1 CMC (Karboksi Metil Selülaz) içeren LB-Agar (Immanuel vd., 2006; Raza vd., 2019) ve Lipaz bakterileri, likid yağ ilave edilmiş olan LB Agar besiyeri kullanılarak izole işlemi gerçekleştirilmiştir.

Petriyeriler üzerinde üreme gösteren kolonilerden en büyük zonu oluşturan koloni çizme plak yöntemi ile saflaştırma yapılmıştır. Selülaz için %1 CMC ve proteaz için %1 Na-Caseinat (Lipaz için ise sadece LB Broth) içeren LB Broth besiyerine (Kroottidilaganandh, 2000) ekimi yapılmıştır. Herhangi bir aksaklık yaşandığında kullanılmak amacıyla ana kültürden, %1 CMC ve %1 Na-Caseinat (Lipaz için ise sadece LB Agar) içeren LB-Agar besiyeri ile hazırlanmış yatık agara ekim yapıp, soğuk hava deposunda +4°C'de ve -20°C'de bekletiletilmiştir (Immanuel vd., 2006; Raza vd., 2019).

## **b) Proteaz üreten bakterilerin izolasyonu**

İzolasyon için %1 Na-Caseinat içeren MPCA besiyeri hazırlanarak proteaz üreten bakteriler izole edilmeye çalışılmıştır (Sevinç, 2010). Selektif besiyeri hazırlanmasında, kazeinli ortamın hazırlanması için, kazein suda çözünmediğinden, 0,1 M NaOH içerisinde kaynatılmıştır. Daha sonra kazein ve MPCA karıştırılarak 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlanarak, otoklav işleminden sonra 50-55°C'ye kadar soğutulan besiyerleri, her petride 15-20 ml olacak şekilde petri kaplarına 15'er mL dökülerek soğumaya bırakılmıştır (Sevinç, 2010; Lennette vd., 1985).

Bir önceki çalışmada kullanılan CSTR reaktörlerinden seyreltme yardımıyla sırasıyla  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  (Temiz, 1994) örnekler alınarak ve yayma plak yöntemi ile petrilere bakterilerin ekimi yapılmıştır. Petriler üzerinde üreme gösteren kolonilerden en büyük zonu oluşturan koloni (Sevinç, 2010) çizme plak yöntemi ile saflaştırılmış, en son %1 Na-Caseinat içeren LB Broth besiyerine ekimi yapılarak herhangi bir aksaklık yaşandığında kullanılmak amacıyla ana kültürden, %1 Na-Caseinat içeren MPCA besiyeri ile hazırlanmış eğik agara ekim yapıp, soğuk hava deposunda +4°C'de ve -20°C'de bekletilmiştir.

## **c) Selülaz üreten bakterilerin izolasyonu**

İzolasyon için %1 CMC (Karboksi Metil Selülaz) içeren LB-Agar besiyeri hazırlanarak burada selülaz üreten bakteriler izole edilmeye çalışılmıştır (Immanuel vd., 2006; Raza vd., 2019). Selektif besiyeri hazırlanmasında, %1 CMC ve LA-Agar karıştırılarak 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlanmıştır. Otoklav işleminden sonra 50-55°C'ye kadar soğutulan besiyerleri, her petride 15-20 ml olacak şekilde petri kaplarına 15'er mL dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Bir önceki çalışmada kullanılan CSTR reaktörlerinden seyreltme yardımıyla sırasıyla  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  (Temiz, 1994) örnekler alınarak ve yayma plak yöntemi kullanılarak petrilere ekimi yapılmıştır. Petriler üzerinde üreme gösteren kolonilerden en büyük zonu oluşturan koloni çizme plak yöntemi ile saflaştırma yapılarak, en son %1 CMC içeren LB Broth besiyerine

(Krootdilaganandh, 2000) ekimi yapılmış ve sonraki çalışmalar için bekletilmiştir. Herhangi bir aksaklık yaşandığında kullanılmak amacıyla ana kültürden, %1 CMC içeren LB-Agar besiyeri ile hazırlanmış eğik agara ekim yapıp, soğuk hava deposunda +4°C'de bekletilmektedir. (Immanuel vd., 2006; Raza vd., 2019).

#### **d) Lipaz üreten bakterilerin izolasyonu**

İzolasyon için %1 likid yağ eklenmiş LB-Agar kullanılmıştır. Selektif besiyeri hazırlanmasında, %1 Likid yağ ve LB-Agar karıştırılarak 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlanmıştır. Otoklav işleminden sonra 50-55°C'ye kadar soğutulan besiyerleri, her petride 15-20 ml olacak şekilde petri kaplarına 15'er mL dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Bir önceki çalışmada kullanılan CSTR reaktörlerinden seyreltme yardımıyla ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ) (Temiz 1994) örnekler alınarak ve yayma plak yöntemi kullanılarak petrilere ekimi yapılmıştır. Petriler üzerinde üreme gösteren kolonilerden en büyük zonu oluşturan koloni çizme plak yöntemi ile saflaştırma yapılarak, en son %1 Likid yağ içeren LB Broth besiyerine ekimi yapılarak sonraki çalışmalar için bekletilmiştir. Herhangi bir aksaklık yaşandığında kullanılmak amacıyla ana kültürden, %1 Likid yağ içeren LB-Agar besiyeri ile hazırlanmış eğik agara ekim yapıp, soğuk hava deposunda +4°C'de bekletilmektedir.

#### **e) İzole edilen bakterilerin tür tespiti**

Bakteri örneklerinin DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti (Polonya) (Şekil 3.2) kullanılmıştır. DNA izolasyonundan sonra elde edilen DNA'ların miktar ve saflığını kontrol etmek için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) (Şekil 3.2) cihazında spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. PCR çalışmasında universal primer olarak 27F - 1492R primerleriyle, tür tayini için hedeflenen gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Yaklaşık 1470 bazlık bölgeyi çoğaltmak için tek aşamalı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonunuz Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiştir. Örnekler için PCR sonrasında agaroz

jelde tek bant elde edilerek, PCR işleminin başarılı olduğu gözlemlenmiştir. PCR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnekler için MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılıp, kitin prosedürlerine uyarak saflaştırılmıştır. Sanger Dizileme örnekleriniz için, Macrogen Hollanda laboratuvarında, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Şekil 3.3) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılmıştır (Applied Biosystems, Foster City, CA). 27F ve 1492R primerleriyle elde edilen okumalar, bir konsensus dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır. Tür tespiti çalışmaları iş akış şeması Şekil 3.4'te verilmiştir. Kullanılan primer dizileri ve PCR koşulları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kullanılan primer dizileri ve PCR koşulları

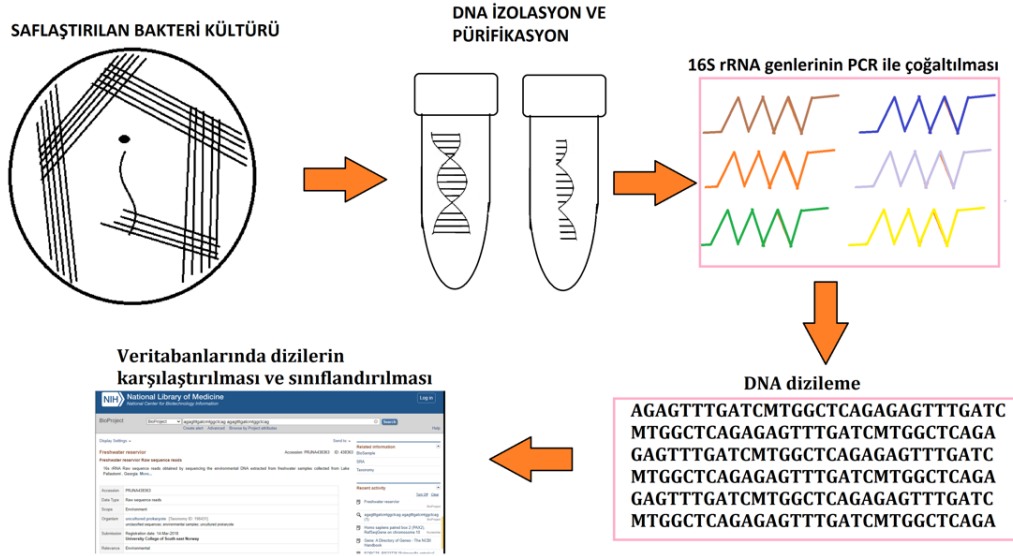
Kullanılan primerler	27F 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' 1492R 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'
PCR koşulları	Takahiro vd. (2004), tarafından verilen değerler revize edilerek. Bakteri suşları için thermal cycler'da 94°C'de 5 dk. ilk denatürasyon işleminin ardından, 40 siklus 95°C'de 45 sn. denatürasyon, 57°C'de 45 sn. bağlama ve 72°C'de 60 sn. DNA uzatma ve son olarak 72°C'de 5 dk. uzatma.



Şekil 3.2. EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti (solda), Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazı (Sağda)

Agaroz Jel Elektrofrez: PCR (kyratec thermocycler) (Şekil 3.4) ile elde edilen amplifikasyon sonuçları, %1,5'lük agaroz jelde 100 volt akımda 90 dakika elektrofrezde yürütülmüştür. Ethidium bromide boyası kullanılarak UV

ışığında görüntüsü alınmıştır. Daha sonra PCR örnekleri 4 µl olacak şekilde mikropipet ile eklenerek ve 30 dakika 100 watt enerji ile çalıştırıldı. Elektroforez işlemi bittikten sonra UV ışığında jel görüntüleme cihazında görüntüsü alınmıştır.



Şekil 3.4. Tür tespiti çalışmaları akım şeması

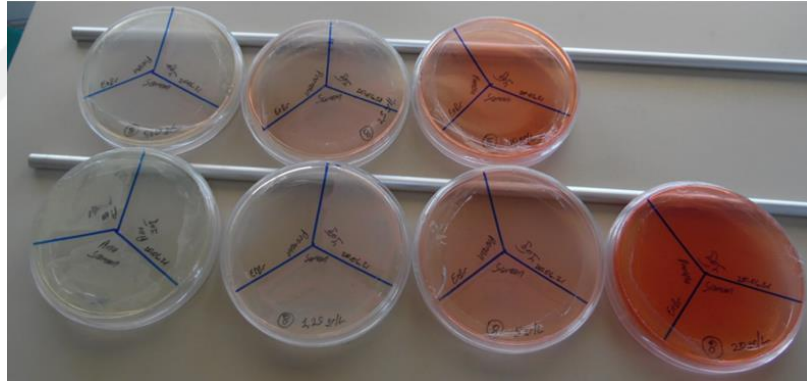
## f) Mutajen Kimyasal Uygulamaları

Mutajen kimyasal olarak EtBr, MNNG EMS (Şekil 3.5) ve Fosforik Asit, kimyasalları kullanılmıştır. Petri kapları 3'e bölünmüş ve EtBr için 0,625 g/L'den başlayarak 2'şer kat artarak 20 g/L'ye (Şekil 3.6) kadar, diğer kimyasallar için ise (Fosforik Asit, MNNG ve EMS) 5 g/L'den başlayarak 2'şer kat artarak 40 g/L' kadar derişimler hazırlanarak önceden hazırlanan petri kapları

içerisindeki katı besiyerlerine drigalski spatülü yardımıyla eşit olarak yayılmış ve 24 saat 37°C inkübasyona bırakılmıştır. Her derişim için 3'er petri kabı kullanılmıştır. Böylelikle hem kontaminasyon olması durumunda yedekte mutajen kimyasal içeren petri kabı bulundurulmuş hem de bakteri ilavesi sonucunda bakteriyel çoğalma olmaması durumunda diğer petrilere çoğalan kolonilerin kullanılması sağlanmıştır.



Şekil 3.5. Mutasyon çalışmalarında kullanılan mutajen kimyasallar



Şekil 3.6. EtBr ilave edilen katı besiyeri

Mutajen kimyasal içeren petri kaplarına ekimi yapılan bakterilerden Etbr için 2,5 g/L'lik derişimde olan ortamdan, protein bakterisi MNNG kimyasalında 40 g/L, diğer kimyasallar için ise 20 g/L'lik konsantrasyonlu ortamlarda üreme olmuş, bunun dışında bir üst konsantrasyonda üreme gözlenmemiştir. Bu nedenle en yüksek konsantrasyonlarda üretim gösteren bakteriler izole edilerek saflaştırılmıştır.

### **3.2.2. Enzim analizleri**

#### **a) Proteaz analizi**

Substrat olarak kullanılan Na-Kazeinatın proteaz enzimi ile hidrolize edilerek amino asit oluşturulması, belirli inkübasyon süresi sonunda kullanılmayan kazeinin çöktürülerek elde edilen süperantın Folin & Ciocalteau ile renklendirilmesi ve 680 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunarak tyrosin eşdeğerinin belirlenmesi esasına dayanmaktadır.

#### **b) Lipaz Analizi**

Yöntemin esası, substrat olarak kullanılan p-nitrofenol bütirat katılarak proteinlerin sudaki çözünürlüğünün azaltılması ve bu yolla enzim proteinlerinin çökmesini sağlayarak 410 nm'de ölçülmesine dayanmaktadır (Bradford, 1976).

#### **c) Selülaz Analizi**

Selülaz aktivitesi, substrat olarak CMC (Karboksimetil Selüloz) kullanılarak indirgen şekerlerin ölçülmesi temeline dayanan 3,5-dinitrosalisilat asit (DNS) metodu ile belirlenmiştir (Bernfeld, 1955; Lin vd.,1997). Renk değişimi 540 nm de okunmuştur (Hakamada vd., 1997).

### **3.2.3. Biyometan potansiyeli (BMP) ünitesi**

BMP, reaktöre eklenen substratın üretebileceği maksimum metan hacmi olarak tanımlanmaktadır. BMP denemesinde kullanılan aşının anaerobik ortama uyum sağlamış ve kararlı koşullara sahip olan bakteri kültürü olması gerekmektedir. BMP değerleri bulunmak istenen materyalin (substrat), gerçek potansiyelinin bulunabilmesi için aşından elde edilen biyogaz içindeki metan miktarının, elde edilen bu değerden çıkartılması gerekmektedir (Angelidaki vd., 2009).

Çalışmada kullanılan BMP test ünitesi (Şekil 3.7), Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Makinaları ve Teknolojileri Mühendisliği Bölümü bünyesinde bulunan Kompost ve Biyogaz Araştırma Laboratuvarı'nda yer almaktadır. Biyogaz işlemi 80x60x20 cm ebatlı, sıcaklık kontrollü bir su

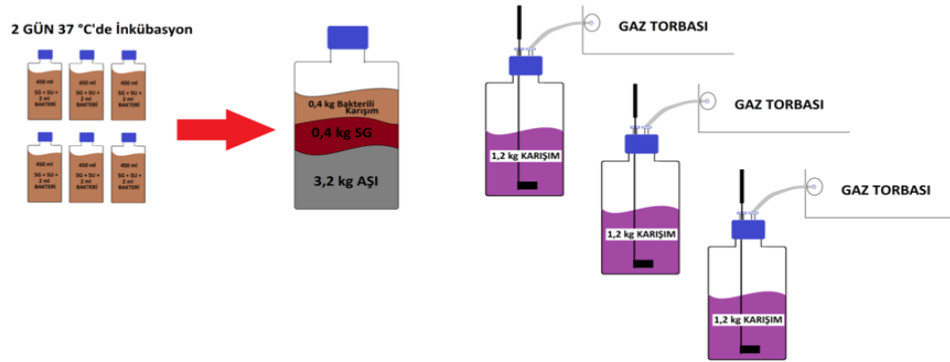
banyosu içinde her üniteye 2 L'lik sızdırmaz cam şişelerden oluşan 36 adet reaktörde gerçekleştirilmiştir. Sistem, 1500 W elektrikli ısıtıcı, sirkülasyon pompası ve sıcak su havuzundan oluşmaktadır. Her biyoreaktör 10 devir/dakika çıkış dişli kutusu ile birleştirilmiş 12 V DC motorla çalışan mekanik döner karıştırıcılar ile karıştırılmaktadır. Reaktörler sıcak su havuzuna yerleştirilmiş olup sıcaklık geri beslemeli olarak kontrol edilmiştir. Çalışma sırasında, karıştırıcılar 1 dakika açık 29 dakika kapalı bir döngü ile çalışacak şekilde ayarlanmış ve sıcaklık ölçümleri K-tipi ısıl ölçer ile yapılmıştır. İşletme sıcaklığı  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  dir. Sistemde mekanik karıştırma ve gaz çıkışı için şişenin kapağında biri merkezde (karıştırıcı bağlantısı) olmak koşuluyla 2 adet delik bulunmaktadır. Merkezdeki delik, karıştırıcı aksamda biyogaz sızıntısı olmadan materyalin mekanik olarak karıştırılmasında, diğer delik ise üretilen biyogazın sistemin üst kısmında bulunan 10 L kapasiteli sızdırmaz gaz torbalarında toplanmasında kullanılmıştır. Biyogaz hacmi bir gaz sayacı (Ritter, Bochum, Almanya) kullanılarak tespit edilmiştir. Metan ( $\text{CH}_4$ ) konsantrasyonu bir sensör (Draeger, PIR 7200) kullanılarak ölçülmüştür.

Çalışmada, izole edilen, mutasyona uğratılan, tür tespiti yapılan ve enzim analizleri yapılarak karşılaştırılan bakteri suşlarının biyogaz ve metan üretimi üzerindeki etkilerinin tespiti amacıyla BMP ünitesi uygulanmıştır. Ana deneme kurulmadan önce BMP şişelerinde ve sistemde herhangi bir sıkıntı olmadığını test etmek amacıyla şişelerin tümüne aynı karışım oranlarında malzeme yüklemesi yapılmış ve sonuçlar değerlendirildikten sonra asıl denemeye geçilmiştir.



Şekil 3.7. BMP Ünitesinin görünümü

Denemelerde ilk olarak 0,5 L'lik otoklav şişelerine 450 ml SG+Su karışımı konulup birer gün arayla 3 kez 15 dk 121°C'de otoklavlanmış ve 1'er ml ana ve mutant bakterilerden ilave edilerek 2 gün 37°C'de inkübe edilmiştir. Kontrol grubuna ilave edilen SG+Su karışımı otoklavlanmış ancak içerisine bakteri ekimi yapılmamıştır. İnkübasyon sonunda Şekil 3.8'de verildiği üzere, 3,2 kg Aşı+0,4 kg SG+0,4 kg inkübe edilen bakterili karışım ilave edilmiştir. Her BMP şişesinde 1,25 kg malzeme olacak şekilde bu karışım ilave edilmiş ve deneme başlatılmıştır. Şişelere dağıtıldıktan sonraki kalan karışım ise +4°C sıcaklıkta soğuk hava deposunda gerekli analizlerin yapılması amacıyla saklanmıştır.



Şekil 3.8. BMP Deneme Şeması

BMP ünitelerinde üretilen biyogaz içeriği CH<sub>4</sub> sensörü (Draeger PIR7200) ve biyogaz analizörü (ETG MCA100 biogas analyser) ile belirlenmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Gaz kompozisyonu belirlenmesi için kullanılan senkronize ünite

BMP denemeleri sırasında üretilen biyogazın hacim ölçümleri 40 L/dk kapasiteli KNF (N026.1.2AN.18) marka vakum pompası kullanılarak, Ritter marka 10 ml hassasiyete sahip gaz sayacı ile yapılmıştır (Şekil 3.10).

Elde edilen verilerin sıcaklık düzeltmeleri aşağıdaki formül ile yapılmıştır.

$$\text{Normal Şartlardaki gaz hacmi} = A * \frac{273}{(273+T)} \quad (3.1)$$

A: Ölçüm sonucu elde edilen hacim (L)

T: Oda sıcaklığı (°C)

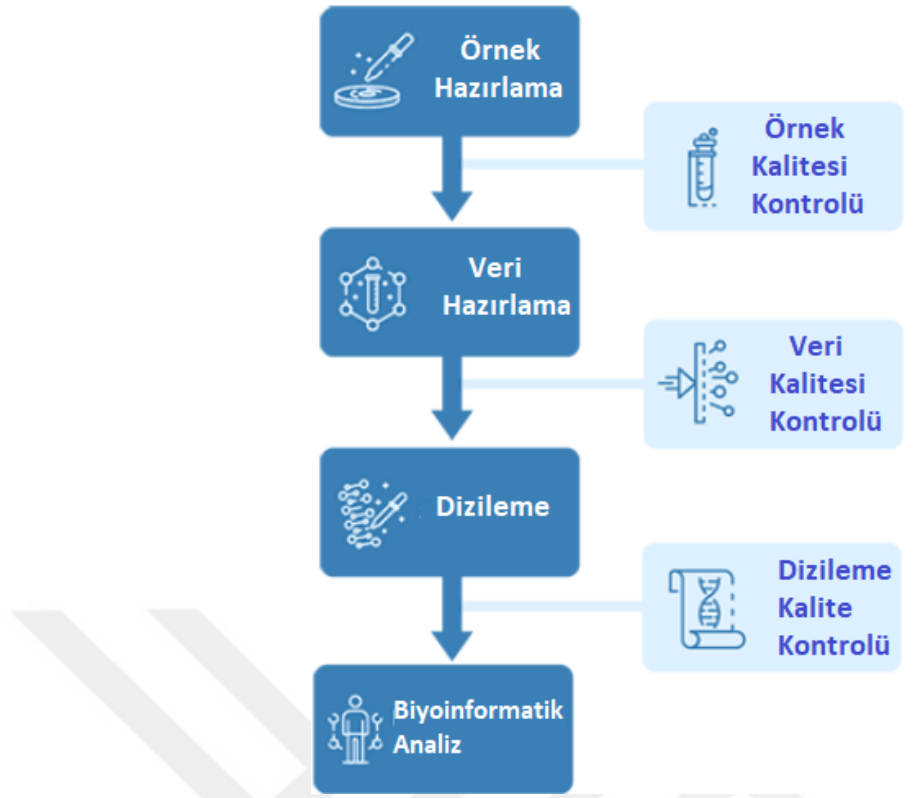


Şekil 3.10. Gaz sayacı

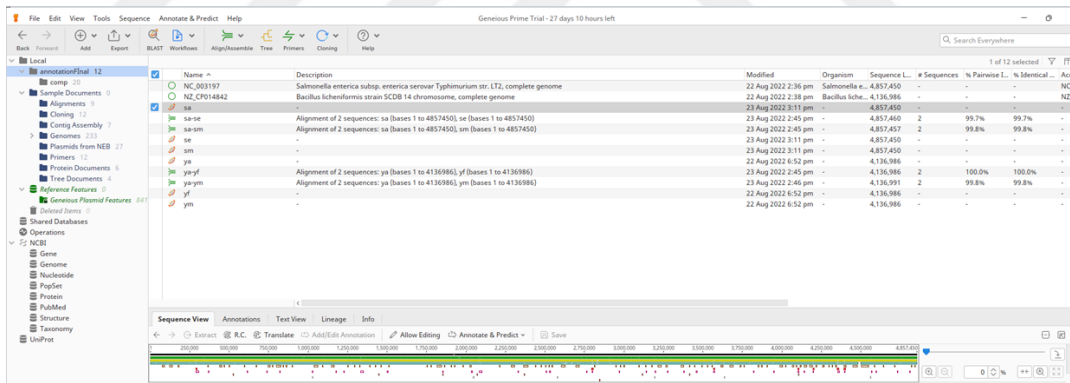
### 3.2.4. Tüm genom analizleri

Tüm genom analizleri enzim analizleri ve BMP denemelerinde elde edilen sonuçlar göz önüne alınarak seçilen 2 ana ve 4 mutant bakteriye hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. Firma tarafından DNA izolasyonu yapılan örneklerin Jel elektroforezi, Nanodrop spektrofotometresi ve Qubit florometresi kullanılarak kalite kontrolü yapılmıştır. Ardından illumina Nextera XT kiti kullanılarak protokole göre kütüphane hazırlanmış ve ra saflaştırma basamaklarında Agencourt Ampure Magnetic Beads kullanılmıştır. Dizileme uygulaması, hizmet sağlayıcı firma tarafından yapılmış olup, firma bünyesindeki illumina HiSeq yeni nesil dizileme platformu kullanılmıştır. Dizileme işleminde 2x150 bp paired-end okumalar yapılmış ve örnek başına minimum 1 Milyar Baz okuma ile 500Gb'lık veri elde edilmiştir. Ham veriler “.fastq” formatında sağlanmış ve firma tarafından ana biyoinformatik analizleri gerçekleştirilmiştir. Ham veriler (.fastq), işlenmiş veriler (.bam, .vcf, .xls ve .fasta) teslim alınarak devamında gereken çalışmalar yapılmıştır. Tüm genom analizinin genel akım şeması Şekil 3.11'de gösterilmiştir.

Analizler tamamlandıktan sonra bakterilerin (*Bacillus licheniformis*, *Salmonella enterica* ana ve MNNG, fosforik asit ve EtBr mutant bakterileri) fasta formatında elde edilmiş ve Geneious Prime (<https://www.geneious.com>) programından yararlanarak analiz edilmiştir (Şekil 3.12). Değerlendirme aşamasında ilk olarak bakterilerin baz dizilimleri elde edilmiştir. Buna göre *Bacillus licheniformis*'in toplam sekans uzunluğu **4.136.989 baz çifti (bp)** ve *Salmonella enterica* için toplam sekans uzunluğu ise **4.857.450 bp** dir. Fasta formatında elde edilen yabancı tip (ana) ve mutant sekansları Geneious Prime programında “Align whole Genomes” sekmesinden yabancı tip bakteri sekanslarının mutasyona uğratılan bakteri sekansları ile aligmentları yapılmıştır. Buna göre mutant bakteri genomunda meydana gelen single nücleotide polymorphism (SNP) bölgeleri tespit edilmiştir.



Şekil 3.11. Tüm Genom analiz çalışmaları akım şeması



Şekil 3.12. Geneious Prime programı ara yüzü görünümü

### 3.2.5. Sürekli karıştırmalı tank reaktör (CSTR) sistemi

CSTR'lar Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Makinaları ve Teknolojileri Mühendisliği Bölümü Kompost ve Biyogaz Araştırma Laboratuvarında bulunmaktadır. CSTR reaktörlerinin yapımında 60 litrelik, sızdırmazlık contalı ve metal çerçeveli sıkıştırımlı plastik variller kullanılmıştır. Bu varillere bir adet hammadde yükleme vanası, bir adet fermente ürünün boşaltılması için çıkış vanası ve reaktörlerin tam boşaltılması

ve acil durumlarda kullanılmak üzere 3 adet küresel vana yerleştirilmiştir. Yükleme-boşaltma sırasında hacimlerde değişimin engellenmesi için giriş-çıkış vanaları, tüm reaktörlerde aynı noktalara konumlandırılmıştır. Birbirinin aynı olarak imal edilmiş reaktörlerin (Şekil 3.13), iki adedi bir araya getirilerek bir profil şase üzerine yerleştirilmiştir.

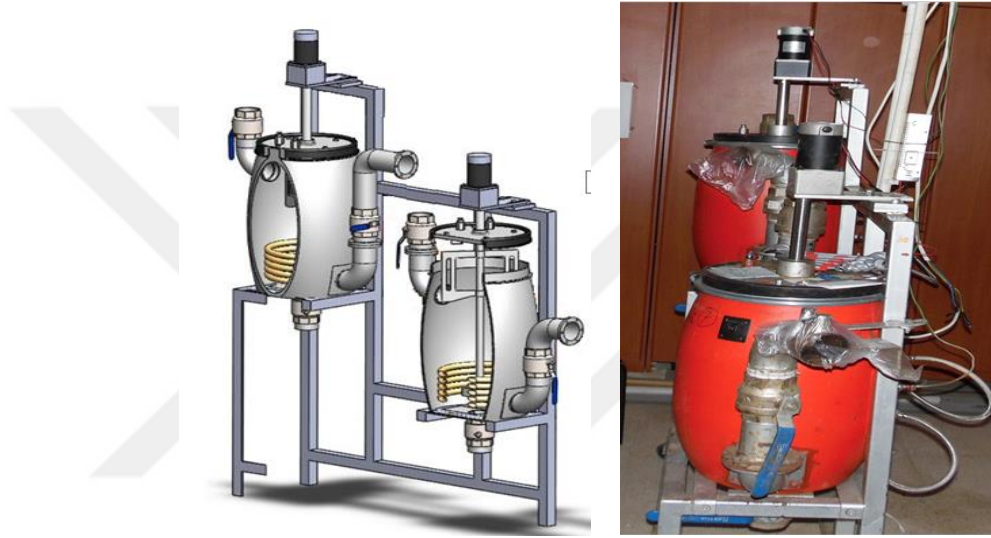
Reaktörlerin plastik bidonlardan imal edilmiş olması nedeniyle, metal bağlantı elemanlarının (giriş ve çıkış bağlantıları ve kapak üzerinde bulunan karıştırıcı bağlantısı) montajı, reaktör alt tabanında ve kapak iç ve dış yüzeyinde 6 mm kalınlıklı karbon çelik malzemeden destek plakaları kullanılarak yapılmıştır. Reaktör sıcaklığının istenilen düzeyde tutulabilmesi için yaklaşık 5 m uzunluğunda 25 mm dış çapında plastik boru kullanılmıştır. Bu plastik boru reaktör içerisinde karıştırıcı millere ve reaktör yüzeyine temas etmeyecek şekilde konumlandırılmıştır (Şekil 3.13).

Sistemde üst kapaktan sızdırmazlığı sağlanmış miller yardımıyla, 3 dakika çalışıp, 20 dakika duracak şekilde, devre tipi zamanlayıcı ile işletilen bir adet karıştırıcı mevcuttur. Karıştırıcıya güç sağlayan motor 90W gücündedir. Reaktör sıcaklıkları, reaktörün dikey eksende orta noktasına, reaktörün yan yüzeyine yatay olarak yerleştirilen K tipi ısıçift ile ölçülmüştür. Sıcaklık değerleri proses kontrol cihazı (Ordel, AC771-00-00-2100) ile 37°C'de sabit tutulmuştur. Sıcaklık değerlerinin sabit tutulması için gerekli olan sıcak su için bir rezervuar sistemi kullanılmış ve bu sistem içerisinde, rezistans ısıtıcılar ve ısıtıcı sisteme bağlı devir daim pompası kullanılmıştır (Şekil 3.14).

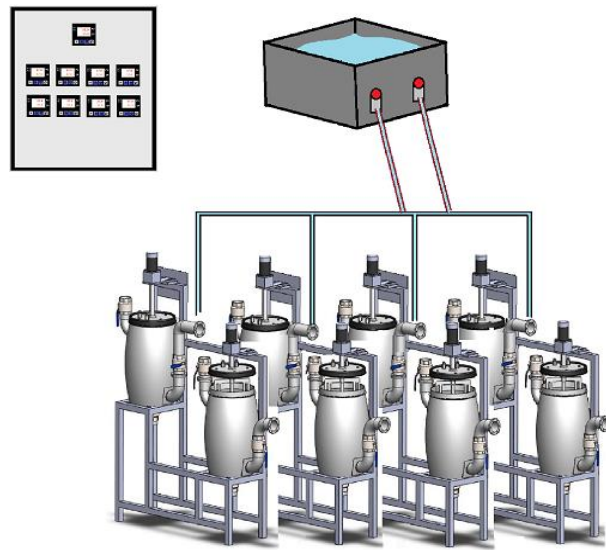
Rezervuardaki su sıcaklıklarının ve karıştırma süreleri kontrol ve sıcaklık ölçümü için kullanılan elemanların (K tipi termocupl) bulunduğu bir kontrol paneli sisteme dahil edilmiştir. Kontroller bu panel üzerinden sağlanmış ve reaktör sıcaklıkları, anlık olarak gösterge panelinden takip edilebilmiştir.

Reaktörden üretilen biyogaz, günlük olarak ölçülmüştür. CSTR prosesinde üretilen biyogaz içeriği CH<sub>4</sub> sensörü (Draeger PIR7200) ve biyogaz analizörü (ETG MCA100 biogas analyser) ile belirlenmiştir. (Şekil 3.9). Üretilen gazın

hacimsel miktarı Ritter markalı 10 mL hassiyetli gaz sayacı kullanılarak el ile ölçülmüştür (Şekil 3.10). Gazın tahliyesi için 40 L/dk kapasiteli KNF (N026.1.2AN.18) marka vakum pompası kullanılmıştır. Gaz örnekleme tamamlanınca gaz torbası tekrar gaz sayacı ve vakum pompası ikilisine bağlanılarak hacimsel ölçüm, gaz akışı durana kadar sürdürülmüştür. Gaz kompozisyonunun tespiti için geçen süreler kaydedilmiş ve vakum pompası yardımıyla Ritter'den elde edilen veriler üzerine eklenerek hacim hesabına dahil edilmiştir.



Şekil 3.13. CSTR'ın teknik çizimi ve tamamlanmış halı



Şekil 3.14. CSTR sistemi teknik çizim görünümü

### **CSTR sistemi işletme koşulları**

Reaktörler aynı şartlarda işletilmiştir. Reaktörlere aynı malzeme (SG+Su karışımı) ile aynı miktarda yükleme yapılmıştır. Bu nedenle yüklenen malzemenin KM oranları, OLR ve HRT değerleri aynıdır. Otomasyon ile takip edilen sıcaklık (37°C) ve karıştırma süreleri (3 dakika çalışma-20 dakika bekleme) de her reaktör için aynı olacak şekilde ayarlanmıştır. Çalışmanın bir diğer aşaması olan bakteri ilavesi ise aynı sıvı besiyeri kullanılarak ve aynı miktarda yapılmıştır. Burada sadece besiyerlerinin bakterili veya bakterisiz olması ve bakteri ilavesi varsa Ana Bakteri – Mutant Bakteri ayrımı dikkate alınarak yapılmıştır. Sıvı besiyerleri bakteri 500 gram olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaktörlerin herbirinden boşaltım (2 kilogram) ve yükleme (1,5 kilogram SG+Su Karışımı) yapıldıktan sonra kontrol reaktörlerine bakterisiz besiyeri, Ana bakterili reaktörlere 24 saat inkübe edilmiş *Salmonella enterica* bakterisi ve Mutant bakterili reaktörlere 24 saat inkübe edilmiş, Mutant *Salmonella enterica* bakterisi 500'er gram olacak şekilde ilave edilmiştir.

Sistem 153 gün boyunca işletilmiş ve işletme sıcaklığı  $37\pm 1^\circ\text{C}$  seçilerek günlük %8-%10 KM içeriğine sahip Sığır Gübresi – Su Karışımı yüklemesi yapılmıştır. Karıştırıcılar 3 dakika açık, 20 dakika kapalı olacak şekilde ayarlanmıştır. Sistemin HRT'si sistem stabil hale gelene kadar 25 gün, bakteri ilavesi başladığında ise 20 gün olacak şekilde ayarlanmıştır.

#### **3.2.6. Metagenom**

Metagenom analizleri CSTR sistemlerinde görev yapan mikroorganizmaların zamanla olan değişimlerini tespit etmek amacıyla hizmet alımı ile yapılmıştır. CSTR sisteminde, bulunan mikroorganizma çeşidi ve popülasyonlarının takip edilmesi prosesin daha iyi anlaşılması açısından önemlidir.

Metagenomik çalışmalar genellikle 1500 baz uzunluğundaki 16S ribozomal RNA geninin analiziyle yapılmaktadır. 16S ribozomal RNA (rRNA) gen bölgesinde 9 adet değişken bölge (V1-V9) bulunmaktadır (Çizelge 3.4). Tüm 16S rRNA gen

dizisini en iyi temsil ettiğinden dolayı V4-V6 bölgelerinin bakteri filogenetik analizi için en güvenilir bölge oldukları bildirilmiştir (Yang vd., 2016). 16S rRNA genlerinin korunmuş bölgeleri içermesi, 16S rRNA genlerini mikrobiyota çalışmalarında oldukça kullanışlı hale getirmiştir (Turan vd., 2016).

Çizelge 3.4. V bölgeleri için başlangıç ve bitiş noktaları (Yang vd., 2016)

Değişken bölge numarası	Başlangıç ve bitiş numaraları
V1	66-99
V2	137-142
V3	433-497
V4	576-872
V5	822-879
V6	986-1043
V7	1117-1173
V8	1243-1294
V9	1435-1465

### 3.3. Analiz Yöntemleri

#### 3.3.1. Nem analizi

Numunelerin nem içeriği, etüv yardımıyla (Mommert UN 110) gravimetrik olarak (APHA Standart Method 2540 B yöntemi) 105°C sıcaklıkta ağırlık değişimi sabitlenene kadar tutulması ile belirlenmiştir.

$$SM(\%) = \frac{(A-B)}{(A-D)} \times 100 \quad (3.2)$$

A: Kurutma işleminden önce numunenin dara ile birlikte ağırlığı (gr)

B: Kurutma işleminden sonra numunenin dara ile birlikte ağırlığı (gr)

D: Daranın ağırlığıdır (gr).

#### 3.3.2. Organik madde (OM)

OM tayini, nem analizi için kurutulan numunelerin Protherm Kamara (PLF 110/45) Laboratuvar Tipi kül fırınında APHA Standart Method 2540 E

yöntemine göre 550°C de 2 saat yakılması ile gerçekleştirilmiştir. Yakma işleminden sonra numuneler desikatöre alınarak oda sıcaklığına getirilerek tartılmıştır (APHA, 2017). OM tayini, deneme başlangıç karışımı, reaktörlerin beslendiği SG+Su karışımı ve deneme sonlandırma aşamalarında yapılmıştır. OM değeri aşağıda verilen Denklem 3.3'e göre hesaplanmıştır;

$$OM(\%) = (A-B)/(A-D) \times 100 \quad (3.3)$$

A: Yakma işleminden önce numunenin dara ile birlikte ağırlığı (gr)

B: Yakma işleminden sonra numunenin dara ile birlikte ağırlığı (gr)

D: Daranın ağırlığıdır (gr).

### 3.3.3. Hidrolik bekletme süresi (HRT)

HRT, reaktör hacminin, günlük yüklenen materyal miktarına bölünmesi ile hesaplanır (FNR, 2013).

$$HRT = \frac{VR}{VS} \quad (3.4)$$

Burada;

VR: Reaktör aktif hacmi (L),

VS: Günlük yüklenen hammadde hacmi (L/gün),

HRT: Hidrolik bekleme süresi (gün) dür.

### 3.3.4. Organik yükleme oranı (OLR)

OLR, reaktöre birim zamanda yüklenen karışımın organik madde miktarı olarak ifade edilir. Reaktöre yüklenen kuru organik madde miktarının, toplam reaktör hacmine bölünmesiyle elde edilir (FNR, 2013).

$$OLR = \frac{(MS \cdot OKM)}{VR} \quad (3.5)$$

Burada,

MS: günlük yüklenen hammadde miktarı (kg/gün)

OKM: hammaddenin organik kuru madde içeriği (%)

OLR: organik yükleme oranı (kg OKM/m<sup>3</sup> gün)

VR: reaktör hacmi (m<sup>3</sup>)

### 3.3.5. Hammadde özgül metan üretimi (HÖMÜ)

HÖMÜ, reaktöre ait bir parametredir. Bu değer reaktöre yüklenen birim organik maddeye karşılık üretilen metan miktarıdır (Göde, .2019)

$$HÖMÜ = \frac{VG}{(MS*OKM)} \quad (3.6)$$

Burada,

VG: günlük olarak üretilen CH<sub>4</sub> miktarı (L),

Ms: günlük yüklenen hammadde miktarı (kg)

OKM: hammaddenin organik kuru madde miktarı (%)

HÖMÜ: hammadde özgül metan üretimi (L CH<sub>4</sub> /kg OKM)

### 3.3.6. pH

pH değerleri alınan sıvı numuneler için direkt ve günlük olarak pH metrede (Milwaukee MW 105) okunmuştur. pH ölçümü ana materyallerde, deneme başlangıcı, reaktör besleme ve deneme sonlandırma aşamalarında yapılmıştır.

### 3.3.7. Karbon ve azot tayini (C/N)

C/N değerleri, elementel analiz cihazı (Elementar Vario Macro Cube MAX CN) yardımıyla tespit edilmiştir. İşlemler sırasında, numuneler 960°C sıcaklıkta yakılarak içerisinde bulunan elementlerin gazlaştırılması sağlanmış ve oluşan bu gaz bir ayrıştırıcıdan geçirilerek, gaz içerisindeki konsantrasyon termal iletkenlik detektörü (TCD) yardımıyla kantitatif olarak belirlenmiştir. Cihaz ölçümlerde en fazla 150 mg C, 100 mg N tespit etme kapasitesine sahiptir. Nem analizleri için kurutulmuş numuneler öğütülerek alüminyum ile sarılmış şekilde cihazın haznesine yerleştirilmiş ve cihazın otomatik olarak numuneleri alması ile analiz gerçekleştirilmiştir. Analizlerde kullanılan elementel analiz cihazına ait görsel Şekil 3.15'te verilmiştir.

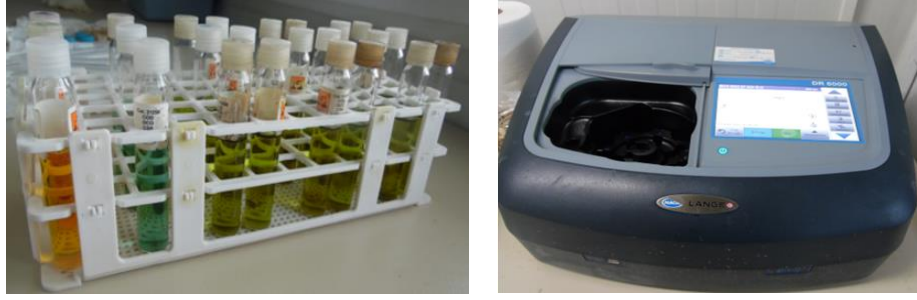


Şekil 3.15. Elementar Vario MAX CN elementel analiz cihazı

### 3.3.8. KOİ Analizi

Reaktörlerde KOİ gideriminin tespiti için 60 günlük deneme süresi içinde 6 günlük KOİ analizi hem yüklenen malzeme hem de çıkan fermente ürün için APHA 1998 standart metod kullanılarak yapılmış ve prosesin KOİ giderimleri hesaplanmıştır. Analizde parçalama çözeltisi olarak potasyum dikromat-civa sülfat çözeltisi ve sülfirik asit-gümüş sülfat karışım çözeltisi hazırlanmış, potasyum hidrojen ftalat (KHP) ( $\text{HOOC}_6\text{H}_4\text{COOK}$ ) stok KOİ çözeltisi hazırlanarak ön hazırlıklar tamamlandıktan sonra KHP stok çözeltisiyle 100 mg/L'den 1000 mg/L'ye kadar derişimler hazırlanarak 600 nm'de spektrofotometre (Hack DR6000) yardımıyla ölçülmüştür (Şekil 3.16). Bu konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri kaydedilerek spektrofotometreye girilmiş ve standart eğri oluşturulmuştur.

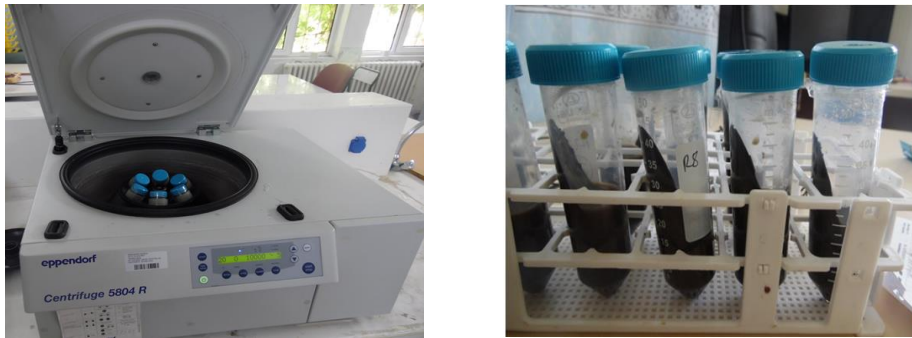
Burada 10 ml'lik cam şişeler içerisine sırasıyla 1,5 mL potasyum dikromat-civa sülfat çözeltisi, 3,5 mL sülfirik asit-gümüş sülfat karışım çözeltisi ve 2,5 ml KHP stok çözeltilerinden hazırlanan derişimlerden ilave edilmiştir. Bu karışımlar 24 hücreli termoreaktöre yerleştirilerek 2 saat 148°C'de muamele görmüştür. Bu işlemlerden sonra standart eğrinin hazırlanması için KHP stok çözeltisi, analizler için ise yüklenen malzeme (1/100 seyreltilmiş) ve reaktörden çıkan fermente ürün (1/50 seyreltilmiş) ilave edilmiştir. Her örnek için 3'er paralel yapılmış ve ortalamaları alınarak hesaplamalar yapılmıştır.



Şekil 3.16. KOİ analizi termoreaktörden çıkan numuneler ve Spektrofotometre

### 3.3.9. VFA analizi

Uçucu yağ asidi (VFA) tayini KOİ analizi yapılan numunelerde yapılmıştır. Analize başlamadan önce numuneler Eppendorf Centrifuge 5804 R marka santrifüj cihazı ile 10 dk 10000 devir/dakika santrifüj edilmiştir (Şekil 3.17). Ardından santrifüj edilen numunelerden 10 ml alınarak 500 mL'lik erlenlere konulmuştur. Üzerine 0,5 mL 1/1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sülfürik asit) ilave edilerek 500 mL'ye tamamlanmıştır. Bu karışımın içerisine manyetik balık atılmış ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcıya geri soğutucu kolon bağlanarak yerleştirilmiştir (Şekil 3.18). Erlenlerdeki karışım kaynadıkça oluşan buharın toplanabilmesi için geri soğutucu kolon önüne bir şişe konulmuş ve oluşan distilattan 150 mL alınarak 250 ml'lik erlenlere konulmuştur. İçerisine 3 damla fenolftalein indikatörü damlatılmıştır. Önceden hazırlanmış 0,1 N NaOH ile titre edilerek harcanan NaOH miktarı kaydedilmiştir. Bu analiz sonucunda değerler asetik asit olarak elde edileceğinden dolayı, derişimi bilinen asetik asit çözeltisi için de aynı distilasyon ve titrasyon işlemi yapılarak bir düzeltme faktörü elde edilmiş ve hesaplamalarda bu değer kullanılmıştır.



Şekil 3.17. Numunelerin santrifüj işleminden sonraki görünümü



Şekil 3.18. Distilasyon düzeneği ve titrasyon işlemi

### 3.4. İstatistiksel Analizler

Veriler, Minitab 18 programı kullanılarak tek yönlü varyans (ANOVA), regresyon ve korelasyon analizleri yardımıyla değerlendirilmiştir. Farklı reaktörlerden alınan verilerin değerlendirilmesi için Tukey testi kullanılmıştır. %95 güven aralığında yapılan Tukey testlerinin sonuçları harf şeklinde ifade edilerek, aynı harfe sahip gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz olarak kabul edilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Çalışmada, bakteri ilavesinin biyogaz prosesi üzerine etkilerinin incelendiği çalışmaların verildiği Çizelge 2.1 ve mutasyon işlemlerinin enzim artışlarına neden olduğunu kanıtlayan çalışmaların verildiği Çizelge 2.2'deki veriler ışığında, biyogaz proseslerine uygun bakterilerin seçilmesi amacıyla CSTR sisteminden özgün mikroorganizma izolasyonu yapılmış ve bu özgün mikroorganizmaların mutasyonları sağlanarak enzim analizleri, BMP ve CSTR denemeleri, Metagenom ve Tüm genom analizleri yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarla “Enzim Üretim Verimleri Artırılan Mutant Bakterilerin Biyogaz Prosesine Etkileri” araştırılmıştır.

### 4.1. İzole Edilen Bakterilerin Tür Tespiti

İzole edilen bakterilerin tür tespiti bakteriyel 16S ribozomal RNA (rRNA)'ya göre NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov> )'dan eşlenikleri tespit edilerek yapılmıştır. Buna göre izole edilen bakterilerin isimleri ve benzerlik oranları aşağıda verilmiştir.. Bu bakteriler şu şekildedir:

- R1319–Yağ (Yağ-Ana): *Bacillus licheniformis* (Benzerlik oranı: %99,86)
- R1319–Protein (Protein-Ana): *Bacillus halotolerans* (Benzerlik Oranı: %98,51)
- R1319–Saman(Saman-Ana): *Salmonella enterica* (Benzerlik Oranı: %98,59)

### 4.2. Enzim Analiz Sonuçları

Çalışmada izole edilen ve mutajen kimyasal uygulanan tüm bakterilere enzim analizi uygulanmıştır.

#### 4.2.1. Proteaz enzimi

Proteaz enzim analizinde (Çizelge 4.1), en yüksek değerler sırasıyla; 2,236 ug/L ve 2,220 ug/L değerleriyle Saman–EtBr (S-EtBr) ve Saman–MNNG (S-MNNG)

isimli bakterilere aittir. Sonrasında Yağ-MNNG (Y-MNNG) (20,192 ug/L), Yağ-EtBr (Y-EtBr) (2,121 ug/L), Protein-MNNG (P-MNNG) (2,192 ug/L) ve Protein-EtBr (P-EtBr) (2,121 ug/L) isimli bakteriler en yüksek enzim miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir.

Her bir bakterinin kendi ana bakterilerine göre kıyaslanmasında ise Yağ bakterilerinin ilk üç sırasında Yağ-Nitrik Asit (Y-Nitrik), Y-MNNG ve Y-EtBr bakterileri yer almaktadır. Protein bakterilerinde ana bakteriye göre sıralaması ise P-MNNG, P-EtBr ve P-Fosforik Asit (P-Fosfor) bakterileri şeklinde sıralanmıştır. Son bakteri olan Saman bakterilerinde ise sıralama S-EtBr, S-MNNG, Saman-EMS (S-EMS) olarak belirlenmiştir. Saman bakterilerinin ardından en yüksek proteaz enzimi üreten bakteri olan *Bacillus liceniformis* (Yağ) bakterileri, Abbasi vd. (2020) tarafından yapılan çalışma ile benzerlik göstermiş ve proteaz üreten bakteriler içerisinde üst sıralarda yer almıştır. Benzer şekilde *Bacillus spp.*'nin proteaz enzimi üretiminde etkili olduğunu belirten Uğurluer (2022), Arzita vd. (2017) ve Sewalt (2016) yaptıkları çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir.

#### **4.2.2. Selülaz enzimi**

Selülaz enzim analiz sonuçları incelendiğinde (Çizelge 4.1), en yüksek değer 0,141 mg/mL değeri ile diğerlerinden daha fazla enzim üretmiş olan Y-MNNG isimli bakteriye ait olduğu belirlenmiştir. Daha sonra sırasıyla Y-MNNG (0,096 mg/mL) ve aynı değerde olan S-MNNG (0,096 mg/mL) gelmektedir. S-Fosfor ve P-EMS ise 0,094 mg/mL selülaz enzimi üretmiştir. Selülaz üretimleri en yüksek iki bakteri, MNNG kimyasalıyla muamele edilmiş bakterilerdir.

Her bir bakterinin kendi ana bakterilerine göre kıyaslanmasında ise Yağ bakterilerinin ilk üç sırasında Y-MNNG, Y-Nitrik ve Y-EMS bakterileri yer almaktadır. Protein bakterilerinde ise ana bakteriye göre P-EMS, P-EtBr ilk iki sıradayken üçüncü sırayı P-MNNG ve P-Nitrik bakterileri paylaşmaktadır. Son bakteri olan Saman bakterilerinde ise sıralama S-MNNG, S-Fosfor ve S-EMS olarak belirlenmiştir. Yağ bakterileri olarak isimlendirilen *Bacillus liceniformis*

bakterilerinin selülaz ve proteaz enzimi üretimlerinde ön sıralarda olması Mohammad vd., (2017) tarafından yapılan ve *Bacillus liceniformis* bakterilerinin selülaz üretimlerinde yüksek fenotip çeşitliliği gösteren bakterilerden olduğunu gösteren çalışmayla benzerlik göstermektedir.

#### 4.2.3. Lipaz enzimi

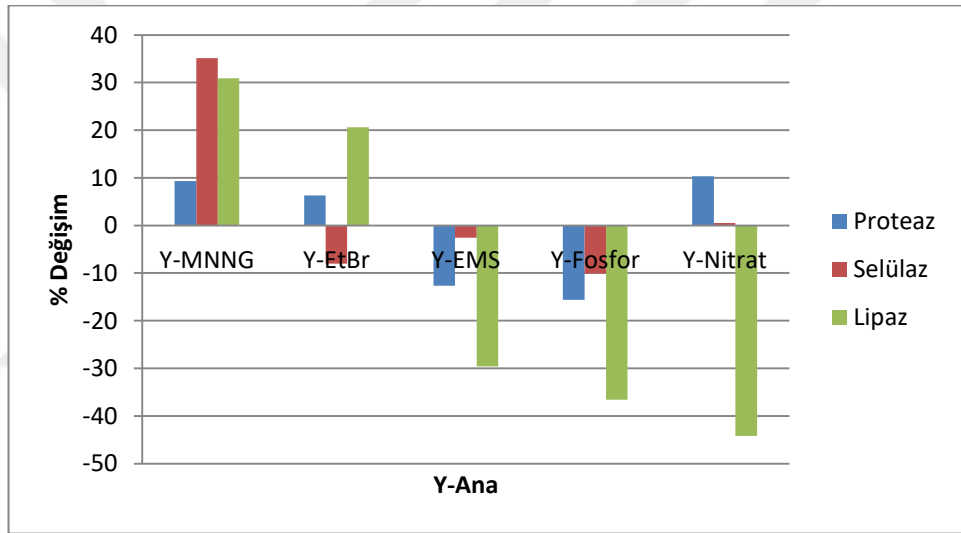
Lipaz analizinde (Çizelge 4.1) en yüksek enzim üretimi, 2329 ug/L ile P-EMS isimli bakteride görülmüş, ikinci sırada, 1693 ug/L ile S-Fosfor ve üçüncü sırada ise 1560 ug/L ile S-MNNG isimli bakteriler öne çıkmışlardır.

Her bir bakterinin kendi ana bakterilerine göre kıyaslanmasında ise Yağ bakterilerinin ilk iki sırasında Y-MNNG ve Y-EtBr bakterileri yer almaktadır. Protein bakterilerinde ana bakteriye göre sıralaması ise P-EMS, P-MNNG ve P-EtBr bakterileri şeklinde sıralanmıştır. Son bakteri olan Saman bakterilerinde ise sıralama S-Fosfor, S-MNNG ve S-EMS olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. Proteaz, Selülaz ve Lipaz enzimlerinin analiz sonuçları

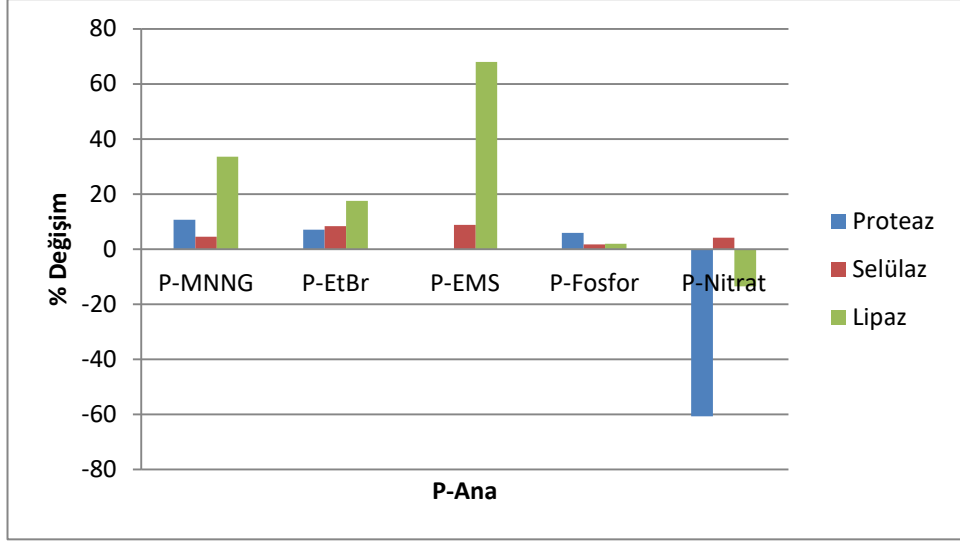
Bakteri	Proteaz (Ug/L)	Selülaz (mg/mL)	Lipaz (Ug/L)
<b>Y-Ana</b>	1,988	0,092	817
<b>Y-MNNG</b>	2,192	0,141	1182
<b>Y-EtBr</b>	2,121	0,085	1029
<b>Y-EMS</b>	1,764	0,089	630
<b>Y-Fosfor</b>	1,719	0,083	598
<b>Y-Nitrik</b>	2,193	0,093	456
<b>P-Ana</b>	1,872	0,086	746
<b>P-MNNG</b>	2,097	0,090	1123
<b>P-EtBr</b>	2,015	0,093	904
<b>P-EMS</b>	1,867	0,094	2329
<b>P-Fosfor</b>	1,990	0,087	761
<b>P-Nitrik</b>	0,618	0,089	645
<b>S-Ana</b>	1,907	0,093	939
<b>S-MNNG</b>	2,220	0,096	1560
<b>S-EtBr</b>	2,236	0,092	1116
<b>S-EMS</b>	1,968	0,093	1296
<b>S-Fosfor</b>	1,878	0,094	1693
<b>S-Nitrik</b>	0,301	0,089	745

Enzim analizlerinden elde edilen veriler MNNG ve EtBr kimyasallarının (bir kaç örnek hariç) neredeyse tüm örneklerde enzim üretim verimlerini artırdığını göstermiştir. Enzim üretimlerini olumsuz yönde etkileyen en başarısız kimyasalların ise EMS, Nitrik Asit ve Fosforik Asit olduğu tespit edilmiştir. Y-Ana bakterilerine göre mutant bakterilerin enzim değişimlerinin verildiği Şekil 4.1 incelendiğinde MNNG kimyasalının proteaz, selülaz ve lipaz enzim üretim verimlerini artırdığı, EtBr'in selülaz enzimi dışında diğer iki enzimin üretim verimliliğini artırdığı, diğer üç kimyasaldan (EMS, Fosforik Asit ve Nitrik Asit) ise sadece Nitrik Asitin proteaz enzim verimliliğine olumlu etki sağladığı diğer enzim üretim verimlerinin olumsuz yönde etkilendiği anlaşılmıştır.



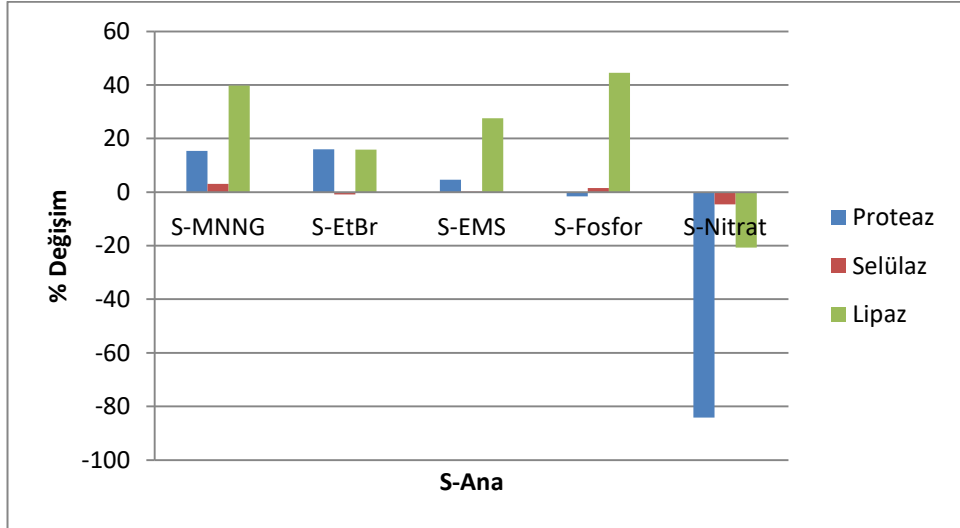
Şekil 4.1. Y-Ana bakterilerine göre mutant bakterilerin enzim değişimleri (%)

P-Ana bakterilerine göre mutant bakterilerin enzim değişimlerinin verildiği Şekil 4.2 incelendiğinde 5 kimyasaldan (MNNG, EtBr, EMS, Fosforik Asit ve Nitrik Asit) sadece Nitrik Asit kimyasalının, proteaz ve lipaz enzim üretim verimlerine olumsuz etkilediği tespit edilmiştir. EMS kimyasalının Lipaz enzimine etkisi dışında diğer kimyasallar çok yüksek verim artışlarına neden olmamakla birlikte olumlu etkiler göstermiştir.



Şekil 4.2. P-Ana bakterilerine göre mutant bakterilerin enzim değişimleri (%)

S-Ana bakterilerine göre mutant bakterilerin enzim değişimlerinin verildiği Şekil 4.3 incelendiğinde Şekil4.7'deki durumun benzeri sonuçlar görülmektedir. Burada da Nitrik Asit kimyasalının, proteaz ve lipaz enzim üretim verimlerine olumsuz etkilerinin olduğu ve lipaz enzim verimlerinin Nitrik Asit kimyasalı dışında diğer 4 kimyasalın kullanımı ile en fazla artış gösteren enzim olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. S-Ana bakterilerine göre mutant bakterilerin enzim değişimleri (%)

### 4.3. BMP Deneme Sonuçları

BMP, bakterilerin maksimum biyometan üretimlerinin ve biyogazın kompozisyonu belirlemek için kullanılmaktadır (Labatut vd., 2011; Weinrich vd., 2018; Bıtrak, 2021).

#### 4.3.1. BMP ön denemesi

BMP denemelerine başlanmadan önce 36 BMP şişesinde sığır gübresi ve aşından oluşan tek bir karışım ile deneme yapılmıştır. Deneme, BMP reaktörleri/şişeleri arasında biyogaz üretim farklılıklarını belirlemek için gerçekleştirilmiştir.

BMP denemesinde, ana deneme yapılmadan önce gerçekleştirilen ön denemelerden elde edilen ölçüm sonuçları (Çizelge 4.2) istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmede Minitab18 programı kullanılmış ve ANOVA testleri gerçekleştirilmiştir. Ön denemede farklı reaktörlerden elde edilen verilerin değerlendirilmesi için Tukey testi kullanılmıştır. Her bir reaktör için gerçekleştirilen 3 ölçüm verileri, %95 güven aralığında yapılan Tukey testleri ile harf şeklinde ifade edilerek, aynı harfe sahip gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz olarak kabul edilmiştir. BMP deneme sonuçları incelendiğinde (Çizelge 4.3) 36 reaktör/şişeden elde edilen metan miktarlarının arasında istatistik olarak fark olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. BMP ön deneme sonuçları

R / Şişe	27.05.2020 (İlk ölçüm)				01.06.2020 (İkinci ölçüm)				04.06.2020 (Üçüncü ölçüm)				Küm. CH <sub>4</sub> (L)
	CH <sub>4</sub> (%)	Hacim (L)	CH <sub>4</sub> (L)	D. CH <sub>4</sub> (L)	CH <sub>4</sub> (%)	Hacim (L)	CH <sub>4</sub> (L)	D. CH <sub>4</sub> (L)	CH <sub>4</sub> (%)	Hacim (L)	CH <sub>4</sub> (L)	D. CH <sub>4</sub> (L)	
R-1	43,0	8,31	3,57	3,27	50,0	9,7	4,87	4,46	50,5	7,09	3,6	3,28	11,01
R-2	44,5	7,91	3,52	3,22	50,3	9,5	4,76	4,36	50,8	7,14	3,6	3,33	10,91
R-3	44,5	7,96	3,54	3,24	50,3	9,5	4,78	4,38	50,8	7,24	3,7	3,37	10,99
R-4	44,2	7,89	3,49	3,20	49,6	9,8	4,88	4,47	50,6	7,11	3,6	3,30	10,97
R-5	43,3	7,00	3,03	2,78	49,6	9,2	4,56	4,18	46,9	11,10	5,2	4,76	11,72

D. CH<sub>4</sub>: Düzenlenen CH<sub>4</sub>

Çizelge 4.2. BMP ön deneme sonuçları (Devam)

R / Şişe	27.05.2020 (İlk ölçüm)				01.06.2020 (İkinci ölçüm)				04.06.2020 (Üçüncü ölçüm)				Küm. CH <sub>4</sub> (L)
	CH <sub>4</sub> (%)	Hacim (L)	CH <sub>4</sub> (L)	D. CH <sub>4</sub> (L)	CH <sub>4</sub> (%)	Hacim (L)	CH <sub>4</sub> (L)	D. CH <sub>4</sub> (L)	CH <sub>4</sub> (%)	Hacim (L)	CH <sub>4</sub> (L)	D. CH <sub>4</sub> (L)	
R-6	44,5	8,09	3,60	3,30	50,1	10	5,01	4,59	50,5	7,25	3,7	3,35	11,24
R-7	44,5	8,25	3,67	3,36	50,3	9,9	4,99	4,57	50,9	7,27	3,7	3,39	11,32
R-8	44,3	8,15	3,61	3,31	49,8	9,9	4,92	4,51	50,3	7,39	3,7	3,41	11,22
R-9	41,5	8,10	3,36	3,08	49,4	9,2	4,52	4,14	50,7	7,09	3,6	3,29	10,51
R-10	44,7	7,38	3,30	3,02	49,4	10	4,92	4,51	50,5	7,25	3,7	3,35	10,88
R-11	44,8	8,06	3,61	3,31	49,6	10	4,94	4,53	50,7	7,40	3,8	3,44	11,27
R-12	44,7	8,31	3,72	3,41	49,8	9,8	4,89	4,48	50,9	7,34	3,7	3,42	11,30
R-13	45,8	8,82	4,04	3,70	49,6	11	5,61	5,14	48,5	6,50	3,2	2,89	11,73
R-14	45,5	8,85	4,03	3,69	49,5	12	5,74	5,26	47,3	8,10	3,8	3,51	12,46
R-15	45,1	8,96	4,04	3,70	49,1	11	5,50	5,04	47,6	6,25	3,0	2,73	11,47
R-16	44,6	7,66	3,41	3,12	49,2	12	6,00	5,50	48,5	7,64	3,7	3,39	12,01
R-17	46,0	9,54	4,39	4,02	49,6	12	6,00	5,50	48,7	7,48	3,6	3,33	12,85
R-18	45,3	10,30	4,67	4,28	49,5	12	5,94	5,44	48,3	7,67	3,7	3,39	13,11
R-19	46,1	8,51	3,92	3,59	49,5	12	5,79	5,30	48,6	6,48	3,2	2,89	11,78
R-20	45,5	8,24	3,75	3,44	49,5	12	5,99	5,49	48,4	7,73	3,7	3,43	12,35
R-21	45,3	9,56	4,33	3,97	49,2	12	5,85	5,36	47,6	8,00	3,8	3,49	12,82
R-22	45,8	10,40	4,78	4,38	49,3	12	5,97	5,47	48,7	7,34	3,6	3,28	13,13
R-23	45,0	9,40	4,23	3,88	49,2	12	5,81	5,32	48,3	7,78	3,8	3,44	12,64
R-24	45,9	9,62	4,41	4,04	49,4	12	5,88	5,39	48,3	7,63	3,7	3,37	12,80
R-25	44,4	6,93	3,08	2,82	51,0	9,7	4,96	4,54	51,5	7,06	3,6	3,33	10,70
R-26	44,1	6,80	3,00	2,75	50,6	9,2	4,67	4,28	51,3	7,25	3,7	3,41	10,43
R-27	44,7	7,37	3,30	3,02	50,8	9,2	4,66	4,27	51,5	7,32	3,8	3,45	10,75
R-28	44,7	7,46	3,33	3,05	51,2	9,4	4,82	4,42	51,7	7,27	3,8	3,44	10,91
R-29	44,1	7,84	3,46	3,17	50,8	9,5	4,81	4,41	51,1	7,11	3,6	3,33	10,90
R-30	44,5	7,81	3,47	3,18	50,4	9,6	4,84	4,43	51,6	7,24	3,7	3,42	11,03
R-31	44,6	7,80	3,48	3,19	50,7	9,3	4,71	4,31	51,5	7,19	3,7	3,39	10,89
R-32	44,4	8,01	3,55	3,25	50,7	9,8	4,98	4,56	50,9	7,37	3,8	3,44	11,25
R-33	45,1	8,24	3,71	3,40	50,3	9,0	4,53	4,15	52,4	7,58	4,0	3,64	11,19
R-34	44,7	7,14	3,19	2,92	50,1	9,6	4,80	4,40	51,1	7,40	3,8	3,46	10,78
R-35	44,6	8,07	3,60	3,30	50,2	9,9	4,94	4,53	51,3	7,24	3,7	3,40	11,22
R-36	43,8	8,16	3,57	3,27	49,4	9,7	4,80	4,40	50,8	7,58	3,9	3,53	11,19

D. CH<sub>4</sub>: Düzenlenen CH<sub>4</sub>

Çizelge 4.3. BMP ön denemesi Tukey test sonucu

Reaktör	N	Ort.	Grup	Reaktör	N	Ort.	Grup	Reaktör	N	Ort.	Grup
R-1	3	3,7	A	R-13	3	3,9	A	R-25	3	3,6	A
R-2	3	3,6	A	R-14	3	4,2	A	R-26	3	3,5	A
R-3	3	3,7	A	R-15	3	3,8	A	R-27	3	3,6	A
R-4	3	3,7	A	R-16	3	4,0	A	R-28	3	3,6	A
R-5	3	3,9	A	R-17	3	4,3	A	R-29	3	3,6	A
R-6	3	3,7	A	R-18	3	4,4	A	R-30	3	3,7	A
R-7	3	3,8	A	R-19	3	3,9	A	R-31	3	3,6	A
R-8	3	3,7	A	R-20	3	4,1	A	R-32	3	3,8	A
R-9	3	3,5	A	R-21	3	4,3	A	R-33	3	3,7	A
R-10	3	3,6	A	R-22	3	4,4	A	R-34	3	3,6	A
R-11	3	3,8	A	R-23	3	4,2	A	R-35	3	3,7	A
R-12	3	3,8	A	R-24	3	4,3	A	R-36	3	3,7	A

#### 4.3.2. BMP denemesi

Yapılan ön denemeden sonra BMP denemeleri (Deneme-1 ve Deneme-2) kurulmuştur. Bu denemelerde, bakterilerin kümülatif biyogaz metan üretimleri zamanın fonksiyonu olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7). İki deneme yürütülmesinin sebebi BMP reaktörlerinin sayısının 36 ile sınırlı olmasıdır. Deneme-1 29 gün sürerken (Çizelge 4.4), Deneme-2 28 gün sürmüştür (Çizelge 4.5). Çizelge 4.4 incelendiğinde, yapılan ilk ölçüm sonuçlarına göre (Deneme-1'in 5. günü ölçümleri) bakteri ilave edilmemiş (ancak tüm içerik bakımından aynı) olan Kontrol (KNT) karışımı 6,82 L biyogaz ve 2,97 L metan üretirken, S-Ana-1 (1. denemedeki S-Ana bakterisi) bakterisi 8,46 L biyogaz ve 3,47 L metan, S-MNNG bakterisi 8,45 L biyogaz ve 3,59 L metan miktarına sahip olduğu görülmektedir. Kontrol'e göre S-Ana-1 bakterisi için biyogaz hacminde %19,42, metan miktarında %14,52 ve S-MNNG isimli bakteride biyogaz hacminde %19,30, metan miktarında %17,42'lik bir artış sağlanmıştır. Deneme-1'de 5. günde yapılan ölçümde en yüksek biyogaz miktarı S-Ana-1'e aittir. Daha sonra üretilen biyogaz hacimlerine göre; S-MNNG, S-EMS, P-EMS, P-MNNG, P-Fosfor, S-Fosfor, P-Ana-1, Y-MNNG, Y-Fosfor, Y-Ana-1, Y-EMS şeklinde sıralanmıştır. Burada MNNG ile muamele yapılan bakterilerin

diğerlerine göre daha fazla biyogaz üretmelerinin sebebi olarak, diğerlerine göre enzim üretimlerinin fazla olması gösterilebilir.

İlk ölçümden sonra alınan ikinci ve üçüncü ölçümlerde bu artışlar azalarak devam etmiştir. Ancak dördüncü ölçümden itibaren gaz üretimlerinin karşılaştırıldığı Kontrol reaktörlerine göre daha az biyogaz hacmi elde edilmeye başlanmıştır. Değerler incelendiğinde tüm deneme boyunca en ümitvari iki bakteri olan S-Ana ve S-MNNG bakterileri bile oldukça düşük üretim gerçekleştirmiştir. İlk üç ölçümde elde edilen artışlar, Kontrol'e göre S-Ana-1 bakterisi için biyogaz hacminde %39,20, metan miktarında %38,10 azalışa ve S-MNNG isimli bakteride biyogaz hacminde %29,20, metan miktarında %29,75'lik bir azalışa dönüşmüştür.

Yapılan son ölçümde ise Kontrol reaktörüne göre üretilen biyogaz miktarlarında azalışlar devam ederek, Kontrol'e göre S-Ana-1 bakterisi için biyogaz hacminde %27,86, metan miktarında %33,70 azalma ve S-MNNG isimli bakteride biyogaz hacminde %21,77, metan miktarında %27,49'luk bir azalma ile deneme sonunda, Kontrol, S-Ana-1 ve S-MNNG bakterileri tarafından üretilen biyogaz hacimleri neredeyse eşitlenmiştir. Bunun sebebinin ise bakteri varlığının, sistemin hidroliz aşamasını hızlandırması olduğu düşünülmektedir (Shen vd., 2021; Kumar vd., 2021). Böylelikle substratın fazla olduğu ilk aşamada kontrole göre daha fazla biyogaz üretilmiş ve bakterilerin kullanacağı substratın azalması ile normal anaerobik hızda ilerleyen kontrol reaktörlerinden daha az biyogaz üretmeye başlamıştır. Sonuç olarak kümülatif değerler incelendiğinde (Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5) son ölçümle birlikte elde edilen kümülatif biyogaz hacimlerinin Kontrol, S-Ana-1 ve S-MNNG için neredeyse aynı olması bu düşüncüyü kuvvetlendirmektedir. Kontrol reaktörlerinden daha az kümülatif biyogaz hacmine sahip olan bakterilerin ise hidroliz aşamasını yavaşlatması nedeniyle bu sonuçlara ulaşılmış olabileceği ihtimali bulunmaktadır.

Çizelge 4.4. Kümülatif biyogaz miktarlarının zamanın fonksiyonu olarak değişimi (L) (Deneme-1)

GÜN	KNT	Y- Ana- 1	Y- Fos.	Y- MNG	Y- EMS	P- Ana- 1	P- Fos.	P- MNG	P- EMS	S- Ana- 1	S- Fos.	S- MNG	S- EMS
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	6,8	6,9	7,0	7,2	6,8	7,3	7,6	7,7	8,1	8,5	7,3	8,5	8,4
8	14,1	13,7	13,7	14,0	14,1	13,8	14,2	14,6	15,0	17,0	14,8	17,5	16,3
11	22,2	21,6	21,9	23,0	21,6	20,5	20,9	21,1	21,9	25,5	21,5	26,1	24,3
16	32,9	30,6	31,9	32,1	30,1	29,6	30,1	31,1	31,4	34,6	29,9	34,4	33,1
29	41,6	37,4	39,0	38,5	37,1	35,5	36,3	38,2	38,0	41,4	37,2	41,5	39,9

Deneme-1 ve Deneme-2'den elde edilen kümülatif biyogaz ve metan değerleri incelendiğinde İkinci denemede elde edilen kümülatif biyogaz miktarı Deneme-1'den elde edilenlere kıyasla daha az olduğu belirlenmiştir. Deneme-2 verileri (Çizelge 4.5) kendi aralarında sıralandığında ise Y-Et'e aittir. Sonrasında sırasıyla; Y-Nitrik, P-Ana-2, P-Nitrik, Y-Ana-2, S-Nitrik olarak sıralanmaktadır.

Çizelge 4.5. Kümülatif biyogaz miktarlarının zamanın fonksiyonu olarak değişimi (L) (Deneme-2)

GÜN	KNT	S- Ana-2	S- EtBr	S- Nitrik	P- Ana-2	P- EtBr	P- Nitrik	Y- Ana-2	Y- EtBr	Y- Nitrik
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	13,4	12,1	13,4	13,5	17,1	15,2	17,0	15,3	17,4	16,8
12	22,4	18,7	19,9	21,5	25,3	22,6	25,4	22,9	25,6	25,1
28	31,9	27,6	28,6	30,5	33,6	29,2	33,5	30,7	34,6	34,2

Kümülatif metan miktarlarının verildiği Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7 Deneme-1'de ve Deneme-2 verileri incelendiğinde sadece P-Ana-2, P-Nitrik, Y-Nitrik ve Y-EtBr bakterileri kontrol grubundan elde edilen kümülatif metan değerlerinden fazla üretim gerçekleştirmiş oldukları görülmektedir. Ancak, kümülatif biyogaz verilerinde görülen durum burada da tespit edilmiştir. İlk yüklemmeden sonraki birkaç günlük sürede oldukça aktif olan reaktörler, daha sonra aktiviteleri azaldığından dolayı, deneme sonunda işlevsiz gibi görünmüşlerdir. Bunun en büyük sebebinin hidrolize edecek substratın azalması sonucunda ilk aşamada iyi performans sergileyen bakterilerin substratın azalmasına paralel olarak

popülasyonlarının da azalması olarak düşünülebilir. Burada ilk ölçümlerde kontrole göre daha fazla metan üreten P-Fosfor, P-MNNG, P-EMS, P-EtBr, S-Ana-1, S-Fosfor, S-MNNG, S-EMS, S-EtBr, S-Nitrik ve Y-Ana-1 bakterilerinin ilk iki ölçümden sonraki metan üretimleri çok düşük olması bu tezi kuvvetlendirmektedir.

Çizelge 4.6. Kümülatif metan miktarlarının zamanın fonksiyonu olarak değişimi (L) (Deneme-1)

GÜN	KNT	Y-Ana-1	Y-Fos.	Y-MNG	Y-EMS	P-Ana-1	P-Fos.	P-MNG	P-EMS	S-Ana-1	S-Fos.	S-MNG	S-EMS
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	2,97	2,79	2,96	2,93	2,81	2,94	3,03	3,12	3,33	3,47	2,99	3,59	3,56
8	6,46	6,08	6,28	6,33	6,37	6,09	6,18	6,39	6,61	7,69	6,66	8,01	7,41
11	10,51	10,22	10,37	10,62	10,24	9,56	9,65	9,73	10,03	12,04	10,74	12,43	11,44
16	16,47	15,40	16,11	15,78	15,11	14,79	14,89	15,43	15,29	16,36	15,14	17,02	16,33
29	21,02	18,95	19,79	19,16	18,70	17,75	18,11	19,04	18,76	19,76	18,72	20,59	19,72

Çizelge 4.7. Kümülatif metan miktarlarının zamanın fonksiyonu olarak değişimi (L) (Deneme-2)

GÜN	KNT	S-Ana-2	S-EtBr	S-Nitrik	P-Ana-2	P-EtBr	P-Nitrik	Y-Ana-2	Y-EtBr	Y-Nitrik
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	5,83	5,34	5,84	5,98	7,60	6,82	7,56	6,81	7,78	7,36
12	10,13	8,39	8,82	9,77	11,51	10,30	11,60	10,47	11,64	11,29
28	14,66	12,67	12,68	14,08	15,43	13,13	15,54	14,26	15,78	15,42

Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9 incelendiğinde, Deneme-1'de Y-Ana-1 bakterileri ve bunların mutantlarında kontrol grubuna göre sadece ilk ölçümde biyogaz hacminde artışlar gözlenmiştir. Sonraki 4 ölçümde üretilen biyogazın hacmindeki azalışlar fazlaşarak devam ettiği görülmektedir. Bu durumlar Protein ve Saman Ana ve Mutant bakterilerinde de geçerlidir. Fakat Saman bakterileri için ölçülen değerler incelendiğinde son ölçüme kadar Kontrol grubuna göre fazla hacimde biyogaz ürettiği görülmektedir. Deneme-2'de S-Ana-2 bakterileri ve EtBr ve Nitrik asitle muamele yapılmış mutantları negatif

yönde seyreden biyogaz üretimi sergilemiştir. Bu denemede ise Protein ve Yağ Bakterileri azalan bir artış göstermiş ve P-EtBr mutanıtı ile Y-Ana-2 bakterileri dışında negatiflik görülmemiştir. İki deneme sonuçları incelendiğinde, Kontrol'e göre en yüksek biyogaz üreten bakterinin Y-Et bakterisi olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra sırasıyla Y-Nitrik, P-Ana-2, P-Nitrik şeklinde devam etmektedir. Diğer bakterilerde kayda değer şekilde olumlu bir etki görülmemiştir.

Çizelge 4.8. Kümülatif biyogaz miktarlarının Kontrol'e göre % değişimi (Deneme-1)

GÜN	Y-Ana-1	Y-Fos.	Y-MNG	Y-EMS	P-Ana-1	P-Fos.	P-MNG	P-EMS	S-Ana-1	S-Fos.	S-MNG	S-EMS
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1,38	2,41	4,60	0,45	6,22	10,72	11,51	16,11	19,42	6,42	19,30	18,92
8	-3,78	-3,15	-1,08	-0,10	-2,59	0,17	2,62	5,73	16,69	4,40	19,11	13,47
11	-3,00	-1,53	3,15	-3,02	-8,90	-6,67	-5,77	-1,85	12,52	-3,56	14,75	8,31
16	-7,51	-3,32	-2,79	-9,10	-11,15	-9,51	-5,84	-4,79	4,93	-10,04	4,23	0,51
29	-11,06	-6,65	-7,99	-11,93	-17,06	-14,35	-8,91	-9,36	-0,43	-11,67	-0,22	-4,09

Çizelge 4.9. Kümülatif biyogaz miktarlarının Kontrol'e göre % değişimi (Deneme-2)

GÜN	S-Ana-2	S-EtBr	S-Nitrik	P-Ana-2	P-EtBr	P-Nitrik	Y-Ana-2	Y-EtBr	Y-Nitrik
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	-10,44	0,34	0,90	21,75	11,94	21,04	12,64	22,88	20,01
12	-19,61	-12,36	-4,05	11,81	1,15	11,97	2,59	12,77	11,03
28	-15,38	-11,43	-4,51	5,35	-9,04	5,01	-3,63	7,91	6,79

Çizelge 4.10 incelendiğinde, Y-Ana-1 bakterileri ve bunların mutantlarında kontrol grubuna göre hiçbir ölçümde metan hacminde artış gözlenmemiştir. Bu durumlar Protein ana bakteriler ve mutantları için benzerlik göstermiş olmasına rağmen ilk 3 ölçümde genel olarak pozitif yönde etkisi olduğu ve daha sonra negatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Saman Ana ve Mutant bakterilerinde ise bu pozitif etki son iki ölçüme kadar sürmüş ve sonrasında negatif bir seyir izlemiştir.

Çizelge 4.10. Kümülatif metan miktarlarının Kontrol'e göre % değişimi (Deneme-1)

GÜN	Y-Ana-1	Y-Fos.	Y-MNG	Y-EMS	P-Ana-1	P-Fos.	P-MNG	P-EMS	S-Ana-1	S-Fos.	S-MNG	S-EMS
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-6,01	-0,26	-1,24	-5,45	-0,72	2,24	5,10	10,90	14,52	0,76	17,42	16,80
8	-6,13	-2,73	-2,13	-1,50	-6,01	-4,54	-0,98	2,23	15,95	2,96	19,35	12,80
11	-2,74	-1,37	1,01	-2,58	-9,95	-8,98	-8,01	-4,74	12,72	2,12	15,44	8,14
16	-7,00	-2,27	-4,40	-9,07	-11,40	-10,66	-6,75	-7,73	-0,69	-8,77	3,24	-0,91
29	-10,89	-6,26	-9,77	-12,46	-18,50	-16,05	-10,46	-12,07	-6,38	-12,33	-2,09	-6,58

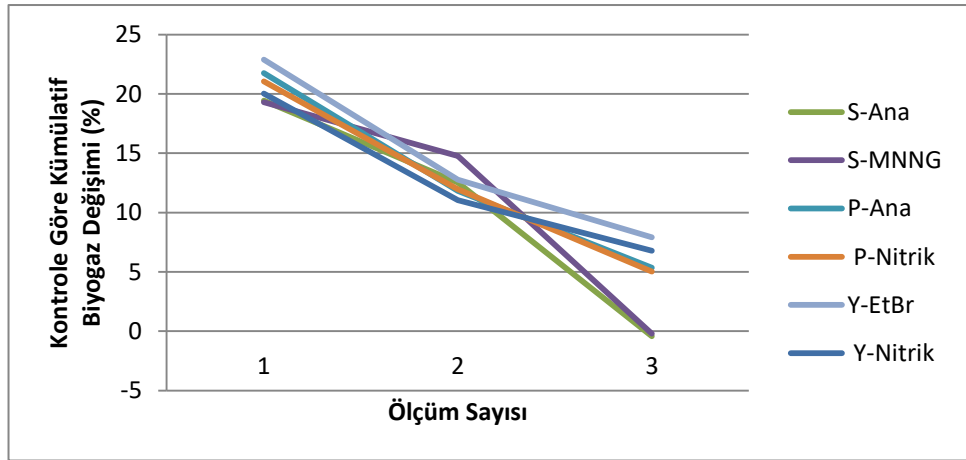
Deneme-2'de (Çizelge 4.11) S-A-2 bakterileri, EtBr ve Nitrik asitle muamele yapılmış mutantları ilk ölçümde pozitif etki göstermiş olmasına rağmen daha sonraki ölçümlerde negatif yönde seyreden metan üretimi sergilemiştir. Bu denemede ise Protein ve Yağ Bakterileri azalan bir artış göstermiş ve P-Ana-2, P-Nitrik, Y-EtBr ve Y-Nitrik bakterileri negatif etki göstermeden pozitif azalan bir artış ile reaksiyonlarını sürdürmüşlerdir. İki deneme sonuçları incelendiğinde, Kontrole göre en iyi metan üreten bakteri Y-Et bakterisi olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra sırasıyla P-Ana-2, P-Nitrik, Y-Nitrik şeklinde devam etmektedir. Diğer bakteriler fazla bir olumlu etki gösterememiştir.

Çizelge 4.11. Kümülatif metan miktarlarının Kontrol'e göre % değişimi (Deneme-2)

GÜN	S-Ana-2	S-EtBr	S-Nitrik	P-Ana-2	P-EtBr	P-Nitrik	Y-Ana-2	Y-EtBr	Y-Nitrik
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	-9,15	0,19	2,53	23,40	14,47	22,88	14,43	25,07	20,82
12	-20,71	-14,83	-3,71	11,94	1,60	12,60	3,26	12,99	10,23
28	-15,62	-15,57	-4,07	5,03	-11,62	5,67	-2,75	7,18	4,96

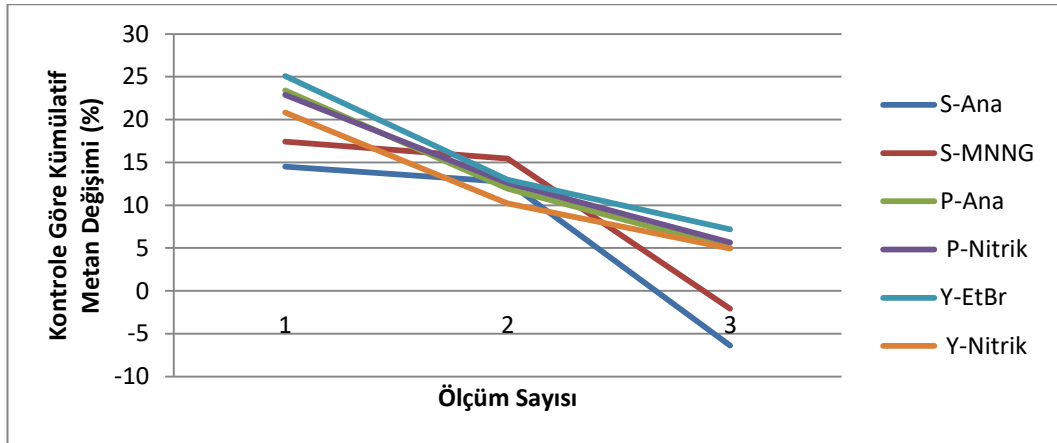
Kurulan BMP denemesinde ilk denemede en ümitvari olan iki bakteri olan S-Ana-1 ve S-MNNG bakterilerinin ve ikinci denemede Y-EtBr, P-Ana-2, P-Nitrik, Y-Nitrik bakterilerinin kontrol karışımına göre, ölçümler arası biyogaz üretim miktarlarının farklarını gösteren Şekil 4.4 incelendiğinde, ilk ölçümde tüm bakterin de %20 civarında artış gösterdiği görülmektedir. Bu artışlar daha

sonraki ölçümlerde Kontrol'e göre artış göstermiş fakat son ölçümde çok fazla azalma kaydederek kümülatif değerlerde son değerler neredeyse aynı olmuştur.



Şekil 4.4. Y-EtBr, P-Ana-2, P-Nitrik, Y-Nitrik, S-Ana-1 ve S-MNNG bakterilerin Kontrol'e göre (kümülatif Biyogaz biyogaz değişimi)

Bu değişimler kümülatif metan değerlerinde de benzerlik göstermiş ve Şekil 4.5'de de görüldüğü üzere son ölçümde elde edilen ölçüm sonuçlarıyla neredeyse aynı değerleriyle ulaşılmıştır.



Şekil 4.5. Y-EtBr, P-Ana-2, P-Nitrik, Y-Nitrik, S-Ana-1 ve S-MNNG bakterilerin Kontrol'e göre kümülatif metan değişimi

Özgül biyogaz ve metan miktarları kıyaslandığında (Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13), diğer değerlerde yüksek olduğu gibi kontrol grubunun en iyi performans gösteren grup olduğu ortaya çıkmaktadır. Deneme sonunda kümülatif değerler için hesaplanan özgül biyogaz ve metan miktarlarının verildiği Çizelge 4.13

incelendiğinde, Kontrol'e göre tüm bakterilerin daha düşük değere sahip oldukları ve S-MNNG bakterilerinin kontrol reaktörlerinden elde edilen verilere en yakın reaktör olduğu görülmüştür.

Özgül biyogaz üretimi değerlendirildiğinde (Çizelge 4.12), izole edilen ve bunların mutant bakterileri arasında en iyi performansı 0,503 L/g OM değeri ile S-MNNG göstermiştir. Diğer pozitif etki gösteren bakteriler içerisinde S-Ana-1 ve bunların mutant bakterilerinin ağırlıklı olduğu görülmektedir. Özgül biyogaz üretimleri sırasıyla; S-EMS (0,484 L/g OM), S-Ana-1 (0,484 L/g OM), Y-Fosfor (0,473 L/g OM), S-Fosfor (0,468 L/g OM), P-MNNG (0,463 L/g OM) ve P-EMS (0,461 L/g OM) olarak tespit edilmiştir.

Özgül metan üretim miktarları kıyaslandığında da benzer olarak, en iyi performansı 0,250 L/g OM değeri ile S-MNNG göstermiştir. Diğer bakterilerde sırasıyla özgül metan üretim miktarları; Y-Fosfor (0,240 L/g OM), S-Ana-1 (0,240 L/g OM), S-EMS (0,239 L/g OM), Y-MNNG (0,233 L/g OM), P-MNNG (0,231 L/g OM), Y-Ana-1 (0,230 L/g OM), P-EMS (0,227 L/g OM), S-Fosfor (0,227 L/g OM), Y-EMS (0,226 L/g OM), P-Fosfor (0,220 L/g OM) ve P-Ana-1 (0,215 L/g OM) olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.12. Özgül biyogaz ve metan üretim miktarları (Deneme-1)

İÇERİK	Kümülatif biyogaz (L)	Kümülatif CH <sub>4</sub> (L)	Kontrol'e göre hacim değişimi (%)	Kontrol'e göre CH <sub>4</sub> değişimi (%)	Ana Bakteriye Göre kümülatif biyogaz değişimi (%)	Ana Bakteriye Göre kümülatif metan değişimi (%)	Özgül metan üretimi (L <sup>biyogaz</sup> /g OM)	Özgül metan üretimi (L CH <sub>4</sub> /g OM)
Aşı	11,94	5,36					0,203	0,092
Kontrol	41,55	21,02	-	-	-	-	0,504	0,255
Y-Ana-1	37,41	18,95	-11,06	-10,89	-	-	0,453	0,230
Y-Fosfor	38,96	19,79	-6,65	-6,26	3,97	4,18	0,473	0,240
Y-MNNG	37,67	19,16	-10,31	-9,77	0,68	1,01	0,457	0,233
Y-EMS	37,12	18,70	-11,93	-12,46	-0,79	-1,42	0,450	0,226
P-Ana-1	35,50	17,75	-17,06	-18,5	-	-	0,431	0,215
P-Fosfor	36,34	18,11	-14,35	-16,05	2,31	2,07	0,441	0,220
P-MNNG	38,16	19,04	-8,91	-10,46	6,96	6,79	0,463	0,231
P-EMS	38,00	18,76	-9,36	-12,07	6,58	5,43	0,461	0,227
S-Ana-1	39,87	19,76	-4,24	-6,38	-	-	0,484	0,240
S-Fosfor	38,60	18,72	-7,68	-12,33	-3,30	-5,59	0,468	0,227
S-MNNG	41,46	20,59	-0,22	-2,09	3,85	4,03	0,503	0,250
S-EMS	39,92	19,72	-4,09	-6,58	0,14	-0,19	0,484	0,239

Deneme-2'den elde edilen değerlere bakıldığında (Çizelge 4.13) Deneme-1'den elde edilen sonuçlardan daha düşük olduğu açıkça görülmektedir. Bu durum kullanılan substratın diğer denemedekinden farklı olmasından kaynaklanabilir. Deneme-2 sonuçları kendi aralarında kıyaslandığında, Kontrol'e göre pozitif etki göstermiş olan bakteriler olduğu görülmektedir. Bu bakterilerden en yüksek katkı sağlayan %7,91 biyogaz ve %7,18 metan artışı sağlayan Y-EtBr bakterileridir. Bunların dışında Y-Nitrik, P-Ana-2 ve P-Nitrik bakterileri de biyogaz ve metan üretimlerinde pozitif yönde bir etki sağlamıştır.

Bu denemede bakterilerden P-EtBr bakterileri dışında tüm bakteriler kendi ana bakterilerine kıyasla daha fazla biyogaz ve metan üretmiştir. Bunların içerisinde kendi ana bakterilerine göre en yüksek üretim artışları, kontrol kıyaslamalarının aksine S-Nitrik bakterilerine aittir. Sonra sırasıyla; Y-EtBr, Y-Nitrik, P-Nitrik ve S-EtBr şeklindedir.

Çizelge 4.13. Özgül biyogaz ve metan üretim miktarları (Deneme-2)

İÇERİK	Kümülatif biyogaz (L)	Kümülatif CH <sub>4</sub> (L)	Kontrol'e göre hacim değişimi (%)	Kontrol'e göre CH <sub>4</sub> değişimi (%)	Ana Bakteriye Göre kümülatif biyogaz değişimi (%)	Ana Bakteriye Göre kümülatif metan değişimi (%)	Özgül metan üretimi (L <sup>biyogaz</sup> /g OM)	Özgül metan üretimi (L <sub>CH<sub>4</sub></sub> /g OM)
KNT	31,85	14,66	-	-	-	-	0,423	0,194
Y-Ana-2	30,74	14,26	-3,63	-2,75	-	-	0,408	0,190
Y-EtBr	34,58	15,78	7,91	7,18	11,13	9,66	0,459	0,210
Y-Nitrik	34,17	15,42	6,79	4,96	10,05	7,5	0,453	0,204
P-Ana-2	33,65	15,43	5,35	5,03	-	-	0,447	0,205
P-EtBr	29,21	13,13	-9,04	-11,6	-15,2	-18	0,388	0,174
P-Nitrik	33,53	15,54	5,01	5,67	-0,36	0,67	0,445	0,206
S-Ana-2	27,60	12,67	-15,4	-15,6	-	-	0,366	0,169
S-EtBr	28,58	12,68	-11,4	-15,6	3,42	0,04	0,379	0,169
S-Nitrik	30,48	14,08	-4,51	-4,07	9,42	9,99	0,405	0,187

Deneme-2'de özgül biyogaz ve metan üretim miktarları kıyaslandığında, Deneme-1'in aksine kontrol grubu diğer bazı bakteri gruplarına göre düşük verimli çalışmıştır. Deneme-2'de en iyi performans gösteren grup 0,459 L/g OM biyogaz ve 0,210 L/g OM metan üreten Y-EtBr bakterileridir. Biyogaz üretiminde sıralama Y-Nitrik (0,453 L/g OM), P-Ana-2 (0,447 L/g OM) ve P-

Nitrik (0,445 L/g OM) şeklindeyken, metan miktarları kıyaslandığında sıralama tam tersine P-Nitrik (0,206 L/g OM), P-Ana-2 (0,205 L/g OM) ve Y-Nitrik (0,204 L/g OM) olarak belirlenmiştir.

BMP denemeleri sonunda elde edilen veriler içerisinde 29 günlük kümülatif biyogaz ve metan üretimleri Çizelge 4.14'te verilmiştir. Çizelge incelendiğinde Kontrol karışımının, kümülatif değerler olarak diğer karışımlardan önde olduğu anlaşılmaktadır. Bunun yanında Y-Fosfor bakterisinin, Kontrol ve S-MNNG bakterisinden sonra en yüksek CH<sub>4</sub> (metan) üreten 3. bakteri olduğu tespit edilmiştir. Bu bakteri dikkatli incelendiğinde enzim üretimi açısından en düşük bakterilerden biridir. Üç enzim analiz sonucu incelendiğinde (Çizelge 4.19), enzim üretimlerinde ilk on bakterinin içerisinde bulunmamaktadır. Ancak, özgül metan üretim miktarı sıralamasında S-Ana bakterisi ile üçüncü sırada yer almaktadır. Bu durum da bu biyogaz ve metan üretim artışlarının sadece enzim üretimlerinden kaynaklanmayabileceğini, aynı zamanda mutajen kimyasalların bakterilerin çoğalma kinetiğine de etki etmiş olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle bakteri sayımı yapılmış ve değerlendirilmiştir (Çizelge 4.32).

Çizelge 4.14. Kümülatif biyogaz ve metan üretim sıralaması

	<b>Kümülatif hacim (L)</b>	<b>Kümülatif CH<sub>4</sub> (L)</b>	<b>Kümülatif CO<sub>2</sub>(L)</b>
<b>Kontrol</b>	41,59	21,02	15,69
<b>S-MNNG</b>	41,50	20,59	15,67
<b>Y-Fosfor</b>	38,96	19,79	14,8
<b>S-Ana</b>	41,38	19,76	14,89
<b>S-EMS</b>	39,94	19,72	14,93
<b>Y-MNNG</b>	38,48	19,16	14,36
<b>P-MNNG</b>	38,20	19,04	14,3
<b>Y-Ana</b>	37,38	18,95	14,1
<b>P-EMS</b>	38,02	18,76	14,02
<b>S-Fosfor</b>	37,21	18,72	14,17
<b>Y-EMS</b>	37,10	18,70	13,89
<b>P-Fosfor</b>	36,34	18,11	13,65
<b>P-A</b>	35,50	17,75	13,23

BMP denemelerinde paralel reaktörler arasındaki farklılıkların tespiti için Minitab kullanılarak korelasyon testi yapılmıştır. Test sonuçları Çizelge 4.15.'te

verilmektedir. Çizelge incelendiğinde Y-Ana, Y-MNNG, P-Ana, P-EMS, S-Fosfor reaktörleri arasında farklılıkların olduğu (P-value>0,05), bu reaktörlerin dışında kalan diğer reaktörlerin paralelleri arasında istatistik anlamlılık oranlarının yüksek olduğu (P-value<0,05) görülmektedir.

BMP denemesinde yüklemde kullanılan malzemeler ile deneme sonunda şişelerden alınan fermente ürün ile yapılan OM analizlerinden elde edilen veriler Çizelge 4.16'da verilmektedir. Burada giderim verimleri sıralamasında ilk sırada yer alan S-EMS (%12,05) bakterilerinin olduğu şişelerdir. Daha sonra sırasıyla; Y-EMS, S-MNNG, Y-Ana, S-Ana, S-Fosfor ve Y-MNNG bakterileri %10'dan fazla giderim sağlamış, diğerlerinin OM giderim verimleri %10'dan düşük olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.15. BMP denemesindeki paraleller için korelasyon test sonucu

İçerik	Reaktör No	Korelasyon Değeri	Anlamlılık kat sayısı (P-value)
KNT	1-2-3	1-2:0,935 1-3:0,971 2-3:0,915	1-2:0,020 1-3:0,006 2-3:0,029
Y ANA	4-5-6	4-5:0,963 4-6:0,683 5-6:0,842	4-5:0,009 4-6:0,203 5-6:0,073
Y-FOSFOR	7-8-9	7-8:0,922 7-9:0,986 8-9:0,974	7-8:0,026 7-9:0,002 8-9:0,005
Y-MNNG	10-11-12	10-11:0,469 10-12:0,955 11-12:0,595	10-11:0,425 10-12:0,011 11-12:0,290
Y-EMS	13-14-15	13-14:0,867 13-15:0,937 14-15:0,899	13-14:0,057 13-15:0,019 14-15:0,038
P-ANA	16-17-18	16-17:0,951 16-18:0,144 17-18:-0,141	16-17:0,013 16-18:0,817 17-18:0,821
P-FOSFOR	19-20-21	19-20:0,867 19-21:0,937 20-21:0,899	19-20:0,002 19-21:0,001 20-21:0,012
P-MNNG	22-23-24	22-23:0,916 22-24:0,974 23-24:0,979	22-23:0,029 22-24:0,005 23-24:0,004
P-EMS	25-26-27	25-26:0,699 25-27:0,984 26-27:0,800	25-26:0,189 25-27:0,002 26-27:0,104
S-ANA	28-29-30	28-29:0,929 28-30:0,992 29-30:0,958	28-29:0,022 28-30:0,001 29-30:0,010
S-FOSFOR	31-32-33	31-32:0,329 31-33:0,760 32-33:0,859	31-32:0,589 31-33:0,136 32-33:0,062
S-MNNG	34-35-36	34-35:0,957 34-36:0,986 35-36:0,992	34-35:0,011 34-36:0,002 35-36:0,001
S-EMS	37-38-39	37-38:0,964 37-39:0,839 38-39:0,901	37-38:0,008 37-39:0,075 38-39:0,037

Çizelge 4.16. OM giderim

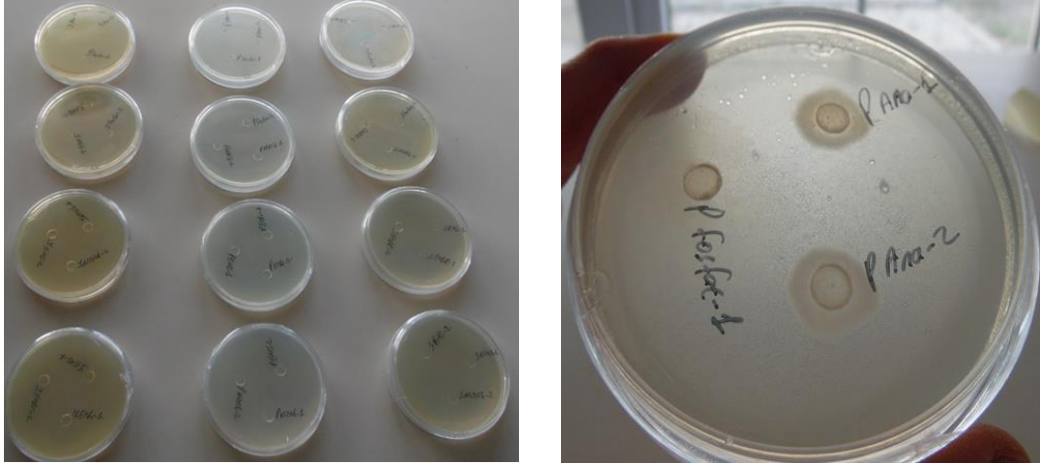
Numune Adı	Başlangıç organik madde (%)	Bitiş organik madde (%)	Organik madde giderim (%)
S-EMS	79,34	70,81	12,05
Y-EMS	79,37	70,93	11,90
S-MNNG	79,59	71,88	10,72
Y-Ana	79,45	71,25	11,51
S-Ana	79,50	71,48	11,22
S-Fosfor	79,62	72,03	10,54
Y-MNNG	79,70	72,41	10,07
P-MNNG	79,74	72,64	9,78
KNT	79,77	72,75	9,65

(Başlangıç OM-bitiş OM)/Başlangıç OM= Organik madde giderimi (%)

Enzim analizleri ve BMP testlerinden elde edilen verilerin doğruluğunun desteklenmesi amacıyla selektif besiyeri kullanılarak çoğalma hızının tespiti çalışmaları yapılmıştır. Bunun için bakterileri selektif besiyerlerinde (likid yağ, CMC ve Na-caseinat) 24 saat inkübasyonda bırakılmış ve süre sonunda oluşan zon çapları ölçülmüştür (Şekil 4.6). Ölçülen çaplar Çizelge 4.17’de verilmiştir. Bu zonlardan en büyük olan iki tanesi 36 mm ile S-Fosfor ve S-MNNG bakterileridir. Bu değerler, diğer verilerle (Enzim analizi, özgül metan üretim miktarları) kıyaslandığında S-MNNG bakterisi için elde edilen verilerde uyum sağlandığı görülmüştür.

Çizelge 4.17. Bakterilerin petri kaplarındaki çapları

Bakteri Adı	Çap (mm)	Ort çap (mm)	Bakteri Adı	Çap (mm)	Ort çap (mm)	Bakteri Adı	Çap (mm)	Ort çap (mm)
Y-Ana-1	7	6,5	P-Ana-1	16	15,5	S-Ana-1	15	15
Y-Ana-2	6		P-Ana-2	15		S-Ana-2	15	
Y-Fosfor-1	0	0	P-Fosfor-1	22	25	S-Fosfor-1	40	36
Y-Fosfor-2	0		P-Fosfor-2	28		S-Fosfor-2	32	
Y-MNNG-1	17	16,5	P-MNNG-1	33	35	S-MNNG-1	35	36
Y-MNNG-2	16		P-MNNG-2	37		S-MNNG-2	37	
Y-EtBr-1	17	17,5	P-EtBr-1	19	17,5	S-EtBr-1	16	16
Y-EtBr-2	18		P-EtBr-2	16		S-EtBr-2	0	
Y-EMS-1	12	11,5	P-EMS-1	34	30,5	S-EMS-1	21	28
Y-EMS-2	11		P-EMS-2	27		S-EMS-2	35	
Y-Nitrik-1	11	11,5	P-Nitrik-1	29	29,5	S-Nitrik-1	9	9
Y-Nitrik-2	12		P-Nitrik-2	30		S-Nitrik-2	9	



Şekil 4.6. Bakteri çaplarının tespiti çalışmaları

Özgül metan üretimlerinin kıyaslanması, bakterilerin ürettikleri biyogazdan elde edilebilecek enerji değerinin hesaplanmasında önemli bir parametre olduğundan (Ertop vd., 2019), ümitvari bakteriler arasından seçim yapılırken bu değere (özellik metan miktarı) göre sıralama yapılması ve seçimin bu sıralamaya göre yapılması önemlidir. Bakteri zon çapları, özgül biyogaz ve metan miktarları kıyaslaması yapılan Çizelge 4.18 incelendiğinde, S-MNNG bakterilerinin yapılan zon analizlerinde, özgül biyogaz hacmi üretiminde ve metan üretiminde ilk sırada yer aldığı görülmektedir. Fakat zon çapı sıralamasında ilk sırada yer alan S-Fosfor bakterileri biyogaz üretiminde 5. sırada, metan üretiminde ise 9. sırada yer almaktadır.

Zon çapı sıralamasında 2. sırada olan P-MNNG bakterileri; biyogaz ve metan üretiminde 6. sırada yer almaktadır. Zon çapı sıralamasında 3. sırada olan P-EMS bakterileri; biyogaz üretiminde 7. sırada ve metan üretiminde 8. sırada yer almaktadır. Zon çapı sıralamasında 4. sırada olan P-Nitrik bakterileri; özgül biyogaz ve metan üretiminde ilk 11'de yer alamamıştır. Zon çapı sıralamasında 5. sırada olan S-EMS bakterileri; biyogaz üretiminde 2. sırada ve metan üretiminde 4. sırada yer almaktadır. Zon çapı sıralamasında 6. sırada olan P-Fosfor bakterileri; özgül biyogaz ve metan üretiminde 11. sırada yer almaktadır. Zon çapı sıralamasında 7. sırada olan P-EtBr bakterileri; özgül biyogaz ve metan üretiminde ilk 11'de yer alamamıştır. Zon çapı sıralamasında 8. sırada olan Y-MNNG bakterileri; biyogaz üretiminde 8. Sırada yer almaktayken, metan

üretiminde ilk 11’de yer alamamıştır. Zon çapı sıralamasında 9. sırada olan S-EtBr bakterileri; biyogaz ve metan üretiminde ilk 11’de yer alamamıştır. Zon çapı sıralamasında 10. sırada olan P-Ana bakterileri; özgül biyogaz ve metan üretiminde ilk 11’de yer alamamıştır. Zon çapı sıralamasında 11. sırada olan S-Ana bakterileri; özgül biyogaz ve metan üretiminde 3. sırada yer almaktadır.

Çizelge 4.18. Bakteri zon çapları, özgül biyogaz ve metan miktarları kıyaslaması

Zon çapı sıralama	Bakteri İsim	Biyogaz Üretim Sıralama	Bakteri İsim	Metan Üretim Sıralaması	Bakteri İsim
1	S-Fosfor ve S-MNNG (36 mm)	1	S-MNNG (0,503 L/g OM)	1	S-MNNG (0,250 L/g OM)
2	P-MNNG (35 mm)	2	S-EMS (0,484 L/g OM)	2	Y-Fosfor (0,227 L/g OM)
3	P-EMS (30,5 mm)	3	S-Ana (0,484 L/g OM)	3	S-Ana (0,240 L/g OM)
4	P-Nitrik (29,5 mm)	4	Y-Fosfor (0,473 L/g OM)	4	S-EMS (0,239 L/g OM)
5	S-EMS (28 mm)	5	S-Fosfor (0,468 L/g OM)	5	Y-MNNG (0,233 L/g OM)
6	P-Fosfor (25 mm)	6	P-MNNG (0,463 L/g OM)	6	P-MNNG (0,231 L/g OM)
7	P-EtBr ve Y-EtBr (17,5 mm)	7	P-EMS (0,461 L/g OM)	7	Y-Ana (0,230 L/g OM)
8	Y-MNNG (16,5 mm)	8	Y-MNNG (0,457 L/g OM)	8	P-EMS (0,227 L/g OM)
9	S-EtBr (16 mm)	9	Y-Ana (0,453 L/g OM)	9	S-Fosfor (0,227 L/g OM)
10	P-Ana (15,5 mm)	10	Y-EMS (0,450 L/g OM)	10	Y-EMS (0,226 L/g OM)
11	S-Ana (15 mm)	11	P-Fosfor (0,441 L/g OM)	11	P-Fosfor (0,220 L/g OM)

Enzim analizlerinin karşılaştırıldığı Çizelge 4.19 incelendiğinde; Protez enzim artışında birinci sırada olan S-EtBr bakterileri Lipaz üretiminde 10. sırada, Selülaz üretiminde ise ilk 10’a girememiş durumdadır. Protez enzim artışında ikinci sırada olan S-MNNG bakterileri Lipaz üretiminde 4. sırada, Selülaz üretiminde ise 6. sırada yer almaktadır. Protez enzim artışında üçüncü sırada olan P-MNNG bakterileri Lipaz üretiminde 5. sırada, Selülaz üretiminde ise 4. sırada yer almaktadır. Protez enzim artışında dördüncü sırada olan Y-Nitrik bakterileri Lipaz üretiminde de 3. sırada, Selülaz üretiminde ise 9. sırada yer almaktadır. Protez enzim artışında beşinci sırada olan Y-MNNG bakterileri Lipaz üretiminde 6. sırada, Selülaz üretiminde ise 1. sırada yer almaktadır.

Protez enzim artışında altıncı sırada olan P-EtBr bakterileri Lipaz üretiminde 9. sırada, Selülaz üretiminde ise 3. sırada yer almaktadır. Protez enzim artışında yedinci sırada olan Y-EtBr bakterileri Lipaz üretiminde 8. sırada, Selülaz üretiminde ise ilk 10'a girememiş durumdadır. Protez enzim artışında sekizinci sırada olan P-Fosfor bakterileri Lipaz üretiminde ilk 10'a girememiş, Selülaz üretiminde ise 7. sırada yer almaktadır. Protez enzim artışında dokuzuncu sırada olan S-EMS bakterileri Lipaz üretiminde 7. sırada, Selülaz üretiminde ise 10. sırada yer almaktadır. Protez enzim artışında onuncu sırada olan P-MNNG bakterileri Lipaz ve Selülaz üretiminde 5. sırada, Selülaz üretiminde ise 4. sırada yer almaktadır. Protez enzim üretiminde ilk 10'a girememiş olan P-EMS bakterileri Lipaz üretiminde 1. sırada, Selülaz üretiminde ise 2. sırada yer almaktadır. Aynı şekilde Protez enzim üretiminde ilk 10'a girememiş olan S-Fosfor bakterileri Lipaz üretiminde 2. Sırada, Selülaz üretiminde ise 8. sırada yer almaktadır.

Cizelge 4.19. İzole edilen bakterilerin enzim üretim verimlerinin kıyaslanması

Protez Üretim sıralama	Ana bakteriye göre artış	Lipaz Üretim sıralama	Ana bakteriye göre artış	Selülaz Üretim sıralama	Ana bakteriye göre artış
1	S-EtBr (%16,00)	1	P-EMS (%67,98)	1	Y-MNNG (%35,16)
2	S-MNNG (%15,42)	2	S-Fosfor (%44,52)	2	P-EMS (%8,84)
3	P-MNNG (%10,72)	3	Y-Nitrik (%42,39)	3	P-EtBr (%8,37)
4	Y-Nitrik (%10,30)	4	S-MNNG (%39,79)	4	P-MNNG (%4,55)
5	Y-MNNG (%9,31)	5	P-MNNG (%33,60)	5	P-Nitrik (%4,15)
6	P-EtBr (%7,10)	6	Y-MNNG (%30,90)	6	S-MNNG (%3,12)
7	Y-EtBr (%6,29)	7	S-EMS (%27,56)	7	P-Fosfor (%1,75)
8	P-Fosfor (%5,93)	8	Y-EtBr (%20,62)	8	S-Fosfor (%1,47)
9	S-EMS (%4,59)	9	P-EtBr (%17,53)	9	Y-Nitrik (%0,50)
10	P-MNNG (%0,29)	10	S-EtBr (%15,88)	10	S-EMS (%0,15)

BMP testlerinden elde edilen veriler, sistem içerisindeki hidroliz bakterilerinin ilk aşamada görevlerini çok iyi bir şekilde yerine getirdikleri ve daha sonra katabolize edecek malzeme azalmasından dolayı popülasyonlarında azalma

meydana gelerek etkinliklerini kaybettiklerini düşünölmektedir. Bu düşünöcenin doğruluğunun tespiti için CSTR denemesi kurulması kararlaştırılmıştır. CSTR sisteminde kullanılacak bakterinin seçimi için elde edilen; enzim analiz sonuçları, kümülatif biyogaz ve metan miktarlarının Kontrol'e göre % değişimleri, OM giderimleri, bakterilerin petri kaplarında oluşturdukları zon çapları, özgül biyogaz ve metan üretim miktarları verileri kullanılarak Min-Max Normalizasyonu (Feature Scaling) yapılarak bu değerlerin herbiri toplanarak kıyaslama işlemleri yapılmıştır. Kıyaslamada ana faktör olarak özgül metan miktarları kullanılmasının uygun olacağı düşünölmekle birlikte, diğer parametrelerin de özgül metan miktarına direkt olarak etkisi olduğuna karar verilerek öncelik oranı belirlenmemiş ve Çizelge 4.20'deki tüm değerşkenler eşit oranlarda işleme dahil edilmiştir. Kıyaslama için kullanılan formöl aşağıdaki gibidir (Özkan, 2016);

$$zxi = \frac{(xi - xmin)}{(xmax - xmin)} \quad (4.1)$$

$x_i$  : Analiz sonucu elde edilen geręek değer

$x_{min}$  :Analizler sonucu elde edilen en düşük değer

$x_{max}$  :Analizler sonucu elde edilen en yüksek değer

Formöl uygulanarak elde edilen veriler Çizelge 4.20'de verilmiştir. Çizelgede verilen toplam değerler incelendiğinde, S-MNNG bakterisinin en yüksek değere sahip olan bakteri olduğu (6,89) anlaşılmaktadır. Daha sonra sırasıyla; S-EMS (5,95), Y-MNNG (5,55), S-Ana (5,38), S-Fosfor (5,26), P-EMS (5,23), P-MNNG (5,01) devam eden bir sıralama sözkonusudur. Bu değerler göz önüne alınarak, S-MNNG bakterilerinin CSTR prosesinde denenmesi gerektiği anlaşılmıştır. Ana bakteri ile ilgili olan verilerin kıyaslanması amacıyla da CSTR sisteminde S-Ana bakterileri diğer bir bakteri grubu olarak CSTR denemesine dahil edilmiştir.

Çizelge 4.20. Min-Max Normalizasyonu (Feature Scaling) Verileri

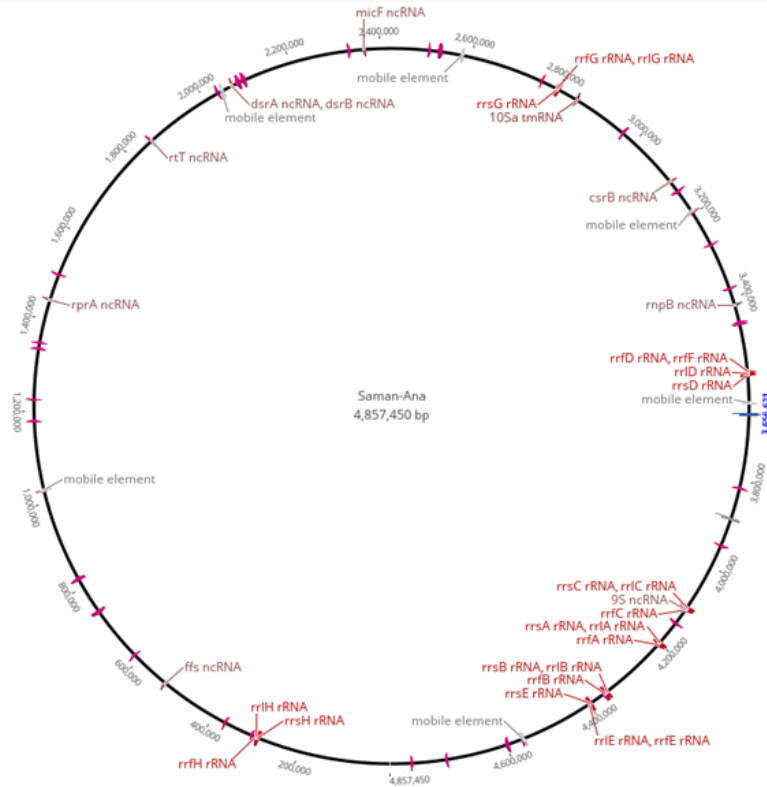
Bakteri İsmi	Proteaz Enzimi (Ug/L)	Puan	Selüloz Enzimi (mg/mL)	Puan	Lipaz Enzimi (Ug/L)	Puan	Kümülatif biyogazın Kontrol'e göre % değişimi	Puan	Kümülatif metanın Kontrol'e göre % değişimi	Puan	OM Giderim (%)	Puan	Petri çapları (cm)	Puan	Özgül Biyogaz Üretim (L/g OM)	Puan	Özgül Metan Üretim Sıralama (L/g OM)	PUAN	TOPLAM
Y-Ana	1,988	0,87	0,092	0,16	817	0,19	-11,06	0,25	-10,89	0,30	11,51	0,89	6,50	0,16	0,453	0,60	0,230	0,75	4,17
Y-MNNG	2,192	0,98	0,141	1,00	1182	0,39	-7,99	0,38	-9,77	0,34	10,07	0,61	16,50	0,44	0,457	0,63	0,233	0,79	5,55
Y-EtBr	2,121	0,94	0,085	0,03	1029	0,31	-11,43	0,24	7,18	1,00	9,24	0,44	17,50	0,47	0,459	0,64	0,210	0,51	4,58
Y-EMS	1,764	0,76	0,089	0,10	630	0,09	-11,93	0,22	-12,46	0,24	11,90	0,97	11,50	0,30	0,457	0,63	0,226	0,71	4,01
Y-Fosfor	1,719	0,73	0,083	0,00	598	0,08	-6,65	0,44	-6,26	0,48	9,57	0,51	1,00	0,00	0,473	0,75	0,240	0,88	3,87
Y-Nitrik	2,193	0,98	0,093	0,17	456	0,00	6,79	1,00	4,96	0,91	9,67	0,53	11,50	0,30	0,453	0,60	0,204	0,44	4,92
P-Ana	1,872	0,81	0,086	0,05	746	0,15	-17,06	0,00	-18,5	0,00	9,14	0,42	15,50	0,41	0,431	0,41	0,215	0,57	2,82
P-MNNG	2,097	0,93	0,09	0,12	1123	0,36	-8,91	0,34	-10,46	0,31	9,78	0,55	35,00	0,97	0,463	0,67	0,231	0,76	5,01
P-EtBr	2,015	0,89	0,093	0,17	904	0,24	-9,04	0,34	-11,62	0,27	8,42	0,28	17,50	0,47	0,388	0,07	0,174	0,07	2,79
P-Fosfor	1,990	0,87	0,087	0,07	761	0,16	-14,35	0,11	-16,05	0,10	9,57	0,51	25,00	0,69	0,441	0,49	0,220	0,63	3,63
P-EMS	1,867	0,81	0,094	0,19	2329	1,00	-9,36	0,32	-12,07	0,25	9,25	0,45	30,50	0,84	0,461	0,65	0,227	0,72	5,23
P-Nitrik	0,618	0,16	0,089	0,10	645	0,10	5,01	0,93	5,67	0,94	7,69	0,14	29,50	0,81	0,445	0,53	0,206	0,46	4,17
S-Ana	1,907	0,83	0,093	0,17	939	0,26	-0,43	0,70	-6,38	0,47	11,22	0,84	15,00	0,40	0,484	0,84	0,240	0,88	5,38
S-EtBr	2,236	1,00	0,092	0,16	1116	0,35	-11,43	0,24	-15,57	0,11	9,86	0,57	16,00	0,43	0,379	0,00	0,169	0,00	2,86
S-MNNG	2,220	0,99	0,096	0,22	1560	0,59	-0,22	0,71	-2,09	0,64	10,72	0,74	36,00	1,00	0,504	1,00	0,250	1,00	6,89
S-EMS	1,968	0,86	0,093	0,17	1296	0,45	-4,09	0,54	-6,58	0,46	12,05	1,00	28,00	0,77	0,484	0,84	0,239	0,87	5,95
S-Fosfor	1,878	0,81	0,094	0,19	1693	0,66	-11,67	0,23	-12,33	0,24	10,54	0,70	36,00	1,00	0,468	0,71	0,227	0,72	5,26
S-Nitrik	0,301	0,00	0,089	0,10	745	0,15	-4,51	0,53	-4,07	0,56	7,00	0,00	9,00	0,23	0,405	0,21	0,187	0,22	2,00
max	2,236	max	0,141	max	2329	max	6,79	max	7,18	max	12,05	max	36,00	max	0,504	max	0,250	max	6,89
min	0,301	min	0,083	min	455,5	min	-17,06	min	-18,5	min	7,00	min	1,00	min	0,379	min	0,169	min	2,01

#### 4.4. Tüm Genom Analizlerinin Sonuçları

S-Ana, S-MNNG, S-EtBr, Y-Ana ve Y-Fosfor, Y-MNNG bakterilerinin tüm genom analizleri yapılmıştır. Bu bakteriler, özgül metan miktarları ve enzim analiz sonuçlarına göre seçilmiştir. Yapılan tüm genom analizinin kalite değerleri Çizelge 4.21’de verilmiştir. Elde edilen sekanlarda yabancı tip *Salmonella enterica* bakterisi Saman-Ana (S-A) olarak isimlendirilmiş ve tezde bu şekilde kullanılmıştır. S-A’ya ait genom ve anotasyonu Şekil 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.21. Ham sekansın kalite değerleri

Örnekler	S-Ana	S-EtBr	S-MNNG	Y-Ana	Y-Fosfor	Y-MNNG
Kodlama	Illumina 1.9	Illumina 1.9	Illumina 1.9	Illumina 1.9	Illumina 1.9	Illumina 1.9
Toplam diziler	3268598 x2	3883026 x2	4272161 x2	3885525 x2	4758211 x2	4286507 x2
Düşük kalite olarak işaretlenen diziler	0	0	0	0	0	0
Dizi uzunluğu	150	150	150	150	150	150
%GC	52	52	53	51	51	46

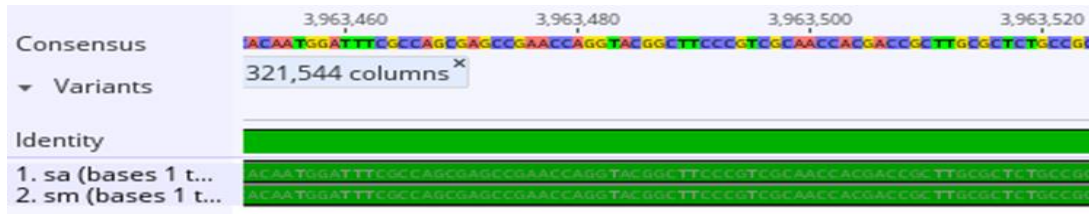


Şekil 4.7. S-Ana’ya ait genom ve anotasyonu

S-Ana'ya göre S-MNNG ve S-EtBr'de meydana gelen mutasyonlar Geneious Prime programında "Align whole Genomes" ile analiz edilerek tespit edilmiştir. Buna göre *Salmonella enterica* bakterisinin tüm genom sekansı 4.857.450 olarak tespit edilmiştir. Mutant bakterinin sekans uzunluğu da aynıdır. S-Ana ve S-EtBr alignment sonucuna göre her iki sekans arasında %99,68 benzerlik bulunmaktadır. Mutant bakteride, yabancı tip bakteriye göre 31.152 adet SNP (Tek nükleotid polimorfizmi) tespit edilmiştir. Bu hali ile EtBr uygulamasının en yüksek oranda mutasyona sebep olduğu gözlemlenmiştir. S-Ana ve S-EtBr alignment sonucu elde edilen verilerin ekran görüntüsü Şekil 4.8'de verilmiştir. S-Ana ve S-MNNG alignment sonucuna göre her iki sekans arasında %99,78 benzerlik bulunmaktadır. Mutant bakteride yabancı tip bakteriye göre 21.446 adet SNP tespit edilmiştir. S-Ana ve S-MNNG alignment sonucu elde edilen verilerin ekran görüntüsü Şekil 4.9'da verilmiştir. Ayrıca genel görünüm olarak text formatında SNP'lerin örnek gösterimi Çizelge 4.22'de verilmiştir. Buna göre noktalı kısımlar her iki genomda da aynı olan bölgeleri ifade ederken, nükleotid değişimleri durumunda ana ve mutant sekanslarındaki nükleotidleri gösterilmiştir.



Şekil 4.8. S-Ana ve S-EtBr alignment sonucu elde edilen verilerin ekran görüntüsü

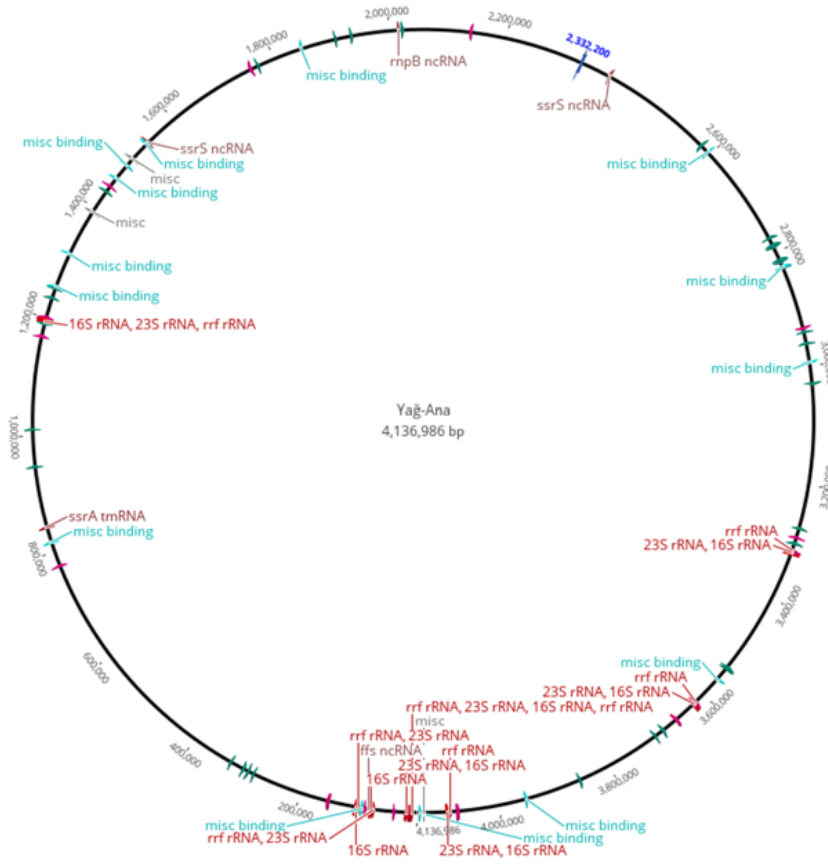


Şekil 4.9. S-Ana ve S-MNNG alignment sonucu elde edilen verilerin ekran görüntüsü

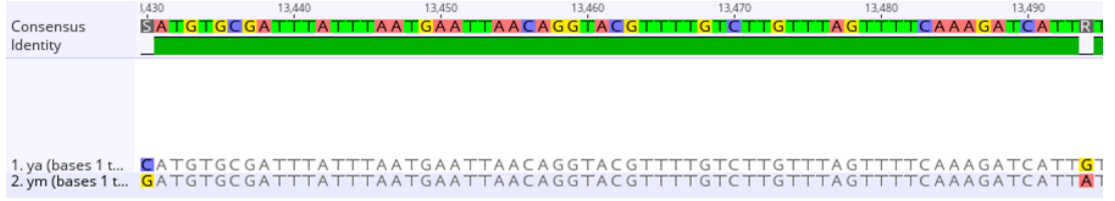
Çizelge 4.22. Text formatında SNP'lerin örnek gösterimi

Consensus (4680)	GCTGTCGAATGCGATGGATGTGAGTCAGCCGAATAACTGGCCGCGYGT <b>K</b> G <b>A</b> R <b>G</b> A <b>G</b> Y <b>T</b> TT
S-A	.....T.....T.....A.....T...G...
S-E	.....C...G.....G.....C...A..

Y-Ana'ya ait genom ve anotasyonu Şekil 4.10'da verilmiştir. Buna göre Y-Ana'ya göre Y-MNNG ve Y-Fosfor'da meydana gelen mutasyonlar Geneious Prime programında "Aling whole Genomes" ile analiz edilerek tespit edilmiştir. Buna göre *Bacillus licheniformis* bakterisinin tüm genom sekansı 4.136.986 bp olarak tespit edilmiştir. Mutant bakterinin sekans uzunluğu da aynıdır. Y-Ana ve Y-MNNG alignment sonucuna göre her iki sekans arasında %99,79 benzerlik bulunmaktadır. Mutant bakteride yabancı tip bakteriye göre 17.722 adet SNP tespit edilmiştir. Y-Ana ve Y-MNNG alignment sonucu elde edilen verilerin ekran görüntüsü Şekil 4.11'de verilmiştir.

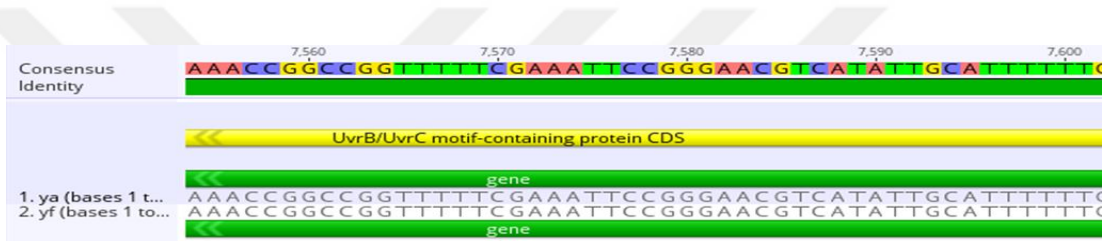


Şekil 4.10. Y-Ana'ya ait genom ve anotasyonu



Şekil 4.11. S-Ana ve S-MNNG alignment sonucu elde edilen verilerin ekran görüntüsü

Y-Ana ve Y-Fosfor alignment sonucuna göre her iki sekans arasında %99,78 benzerlik bulunmaktadır. Mutant bakteride yabancı tip bakteriye göre 17.246 adet SNP tespit edilmiştir. Y-Ana ve Y-Fosfor alignment sonucu elde edilen verilerin ekran görüntüsü Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. Y-Ana ve Y-Fosfor alignment sonucu elde edilen verilerin ekran görüntüsü

Mutajen kimyasal uygulanan bakterilerin ana bakterilere göre DNA nükleotit baz değişimlerinin toplu özeti Çizelge 4.23’te verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, EtBr kimyasalının en yüksek mutasyona sebep olan kimyasal olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak ise uygulanan bütün kimyasalların (EtBr, MNNG ve Fosforik Asit) tek baz değişimine neden olduğu, SNP meydana getirdiği ve bu şekilde nokta mutasyonuna neden olduğu (Dahle vd., 1994; Fenner vd., 1987; Günalp vd., 1986) görülmüştür. Bu kimyasalların DNA molekülleri üzerinde yer alan purin ve pirimidinlerin bir veya bir kaçının kimyasal yapısını değiştiren kimyasallar oldukları (Hopwood,1970) yapılan bu çalışmada kanıtlanmıştır. Aynı zamanda, bu üç kimyasalın da (Fosforik Asit, EtBr ve MNNG) büyük oranda purin (A ve G) veya pirimidin (C ve T) bazlarının kendi aralarında değişimi ile baz eşleşmelerinde değişimlere (Hopwood, 1970) yol açarak transversiyonel mutasyona (Yeşilbağ, 2002) neden olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.23. Mutant bakterilerin ana bakteriye göre DNA nükleotit baz değişimlerinin toplu özeti

Örnekler	S-Ana ve S-EtBr	S-Ana ve S-MNNG	Y-Ana ve Y-MNNG	Y-Ana ve Y-Fosfor
Tüm genom sekansı (bp)	4.857.450		4.136.986	
Benzerlik oranı	%99,68	%99,78	%99,79	%99,78
SNP	32.152	21.446	17.722	17.246

#### 4.5. CSTR Deneme Sonuçları

##### 4.5.1. CSTR ön denemesi

Bu denemede, ümitvari bakterilerin CSTR sistemini kullanarak biyogaz ve metan üretim verimlerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, efektif işleme hacmi 50 L olan 8 adet CSTR ünitesi ile ön deneme 28.02.2022 tarihinde başlatılmıştır. Bu ön denemenin amacı, aynı biyogaz malzemesini (sığır gübresi) ve aşığı kullanarak aynı kuru madde, bekleme süreleri ve organik yükleme oranlarında biyogaz ve metan üretim farklılıklarını belirlemektir. Biyogaz işlemi stabil hale geldiğinden emin olunduktan sonra 36 gün boyunca aynı şartlarda işletilmeye devam edilmiştir. İlk deneme sonuçları Çizelge 4.24'te verilmiştir. Bu veriler incelendiğinde R-1, R-2, R-3, R-4, R-7 ve R-8 reaktörleri arasında  $\pm$ %0,46'lık bir sapma olduğu görülmüş ve ana denemeye başlamak için bu veriler ve Tukey test sonucu değerlendirilerek (Çizelge 4.25) reaktörlerin ve sistemin hazır olduğu tespit edilmiş ve daha sonra ana denemeye geçilmiştir.

Ana denemede, deneme bitiş tarihi olan 03.07.2022 tarihine kadar günlük 2,5 kg malzeme yüklenerek HRT 20 gün olarak ayarlanmıştır. Deneme başlangıçtan bitiş tarihine kadar 153 gün aralıksız işletilmiştir.

Çizelge 4.24. Reaktörlerin stabilizasyonundan sonraki 36 günlük özgülmetan üretim miktarı (L CH<sub>4</sub>/g OM)

GÜN	R-1	R-2	R-3	R-4	R-7	R-8	R-9	R-10
1	0,162	0,162	0,147	0,181	0,161	0,154	0,147	0,169
2	0,210	0,184	0,194	0,203	0,191	0,180	0,180	0,189
3	0,166	0,170	0,191	0,179	0,163	0,171	0,172	0,153
4	0,126	0,155	0,156	0,159	0,171	0,150	0,153	0,156
5	0,192	0,139	0,155	0,158	0,155	0,155	0,152	0,153
6	0,147	0,174	0,158	0,166	0,169	0,156	0,160	0,149
7	0,163	0,168	0,169	0,180	0,175	0,171	0,170	0,167
8	0,257	0,229	0,216	0,235	0,246	0,227	0,366	0,223
9	0,192	0,199	0,221	0,196	0,212	0,205	0,277	0,215
10	0,192	0,185	0,181	0,196	0,199	0,187	0,180	0,178
11	0,187	0,172	0,180	0,185	0,185	0,179	0,179	0,170
12	0,153	0,137	0,146	0,153	0,149	0,144	0,150	0,140
13	0,158	0,158	0,151	0,156	0,159	0,157	0,157	0,147
14	0,146	0,143	0,146	0,147	0,147	0,144	0,141	0,138
15	0,167	0,157	0,161	0,173	0,162	0,147	0,162	0,154
16	0,218	0,190	0,212	0,211	0,210	0,217	0,201	0,191
17	0,212	0,192	0,202	0,202	0,202	0,206	0,192	0,182
18	0,200	0,201	0,207	0,206	0,203	0,206	0,198	0,190
19	0,213	0,202	0,205	0,209	0,199	0,197	0,203	0,189
20	0,200	0,199	0,201	0,199	0,198	0,202	0,191	0,180
21	0,191	0,192	0,133	0,196	0,193	0,192	0,184	0,172
22	0,208	0,205	0,204	0,209	0,207	0,200	0,196	0,191
23	0,209	0,234	0,214	0,214	0,218	0,215	0,204	0,191
24	0,215	0,216	0,214	0,210	0,200	0,202	0,194	0,188
25	0,245	0,242	0,232	0,243	0,237	0,233	0,239	0,242
26	0,215	0,224	0,213	0,221	0,217	0,213	0,211	0,202
27	0,222	0,222	0,212	0,226	0,221	0,213	0,213	0,200
28	0,097	0,105	0,106	0,108	0,105	0,105	0,104	0,105
29	0,276	0,277	0,266	0,285	0,270	0,268	0,262	0,225
30	0,221	0,224	0,210	0,219	0,217	0,208	0,201	0,175
31	0,197	0,203	0,198	0,204	0,201	0,190	0,191	0,188
32	0,219	0,224	0,237	0,242	0,235	0,236	0,216	0,209
33	0,227	0,224	0,229	0,229	0,223	0,213	0,213	0,212
34	0,200	0,205	0,201	0,206	0,199	0,206	0,199	0,180
35	0,200	0,204	0,202	0,208	0,202	0,202	0,180	0,170
36	0,187	0,189	0,190	0,186	0,186	0,191	0,184	0,180
<b>ORT</b>	<b>0,194</b>	<b>0,192</b>	<b>0,191</b>	<b>0,197</b>	<b>0,194</b>	<b>0,190</b>	<b>0,192</b>	<b>0,179</b>

Çizelge 4.25. CSTR ön denemesi Tukey test sonucu

Reaktör	N	Ortalama	Grup	Reaktör	N	Ortalama	Grup
R-1	36	0,194	A	R-7	36	0,194	A
R-2	36	0,191	A	R-8	36	0,191	A
R-3	36	0,191	A	R-9	36	0,192	A
R-4	36	0,197	A	R-10	36	0,180	A

#### 4.5.2. Ana CSTR denemesi sonuçları

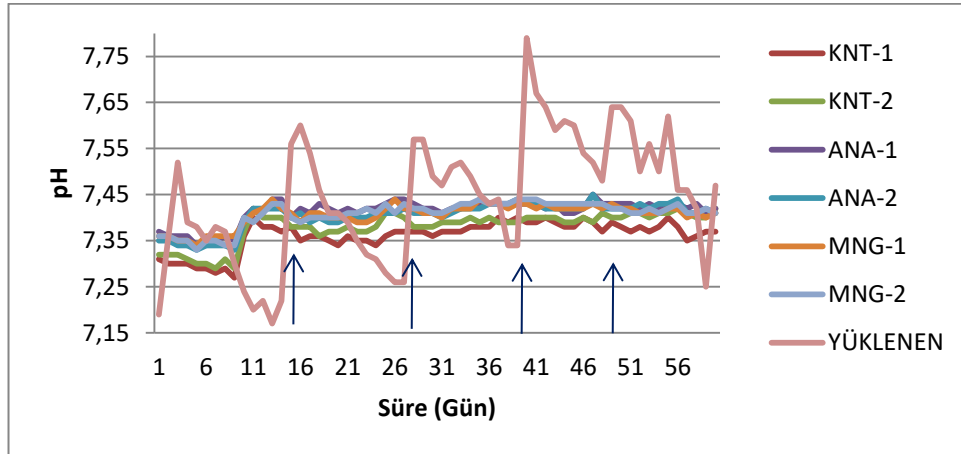
Deneme başlangıcında reaktör hacimleri 40 L olacak şekilde ayarlanarak, ilk dolun işleminde SG ve Aşı kullanılmıştır. Kurulumundan sonra sistemin sıcaklık değeri olan 37°C'ye gelmesi beklenmiştir. İlk besleme, deneme kurulduktan 1 gün sonra başlamış ve günlük yüklemeler deneme sonuna kadar aynı saatte yapılmıştır. Sistemin hidrolik bekleme süresi (HRT) 20 gün olacak şekilde günlük 2 kg yükleme (1,5 kg SG+su karışımı, 0,5 kg bakterili veya bakterisiz besiyeri) yapılmıştır. İşlem ilk olarak reaktör alt çıkışlarından 2 kg malzeme boşaltılması ile başlamakta ve KM oranı ortalama %9-10 aralığında olan SG+Su karışımı sisteme yüklenmektedir. Bu işlemin ardından kontrol reaktörlerine bakterisiz 0,5 kg sıvı besiyeri, diğer reaktörlere ise 24 saat inkübe edilmiş 0,5 kg bakterili (Ana ve Mutant) sıvı besiyeri (Öner vd., 2018; Shetty vd., 2020) yüklenmiştir.

Sıvı besiyeri olarak ilk etapta (28.04.2022) LB Broth, daha sonra 21.05.2022 tarihine kadar Nutrient Broth, 06.06.2022 tarihine kadar tekrar LB Broth, 26.06.2022 tarihine kadar 2 g LB Agar + 3 g Pepton Water karışımı ve son olarak deneme bitene kadar 1 g PCA + 3 g Pepton Water karışımı ile hazırlanmıştır. Besiyerlerinin çeşitli broth ve agarlardan hazırlanmış olması önceden temin edilmiş olan besiyerlerinin yetmemesi sebebiyledir. Özellikle katı besiyeri kullanılarak hazırlanan besiyerlerinin katılaştırmanın engellenmesi amacıyla agarlı besiyeri oranları mümkün olan en düşük düzeyde tutulmuştur. Kontrol reaktörleri dahil olmak üzere, tüm reaktörlere aynı besiyeri yüklemesi (bakterili veya bakterisiz) yapıldığı için bu değişimler reaktörler arasında

herhangi bir değişime neden olmamıştır. Bu durum yapılan ölçümlerde de teyit edilmiştir.

CSTR denemesi 36 gün süren sistem stabilizasyonundan sonra, HRT'nin üç katı (60 gün) yürütülmüştür. İşletme esnasında yapılan analiz ve ölçüm sonuçları kaydedilmiş ve gerekli hesaplamalar yapılmıştır.

Prosesten çıkan biyogaz 300 L kapasiteli sızdırmaz torbalarda biriktirilmiş ve günlük olarak biyogaz debisi ve metan konsantrasyonu ve ölçümüştür. Günlük olarak reaktörlerden alınan örneklerde pH, yüklenen malzeme ve çıkan fermente ürün özellikleri ölçülmüştür. Reaktörlerden çıkan fermente ürünün pH aralığı deneme boyunca tüm reaktörler için 7,20-7,40 arasında seyretmiştir (Şekil 4.13). Ancak yüklenen malzemede bu değer değişkenlik göstermiş ve 7,14-7,79 arasında değişmiştir. pH değerleri sistemin düzgün çalışması için uygun aralıklar içerisinde (Yadvika vd., 2004; Chernicharo, 2007; Khanal, 2008) Karışım yeni olduğunda (oklar yeni karışımın yükleme zamanı başlangıcını göstermektedir) pH'nın yüksek olması ve zaman geçtikçe pH'da düşüşler meydana gelmesi, Şekil 4.13'deki salınımı açıklamaktadır.



Şekil 4.13. CSTR denemesinde pH'nın zamanın fonksiyonu olarak değişimi (oklar yeni karışımın yükleme zamanı başlangıcını göstermektedir)

CSTR denemesinde başlangıçtan itibaren %5,6-6,1 KM oranıyla işletilmiştir. Yüklenen malzemenin KM oranı %8,8-10,7 oranında değişmiştir. OM oranları reaktörlerde %70,18-72,95 arasında, yüklenen malzeme için ise %76,23-80,93

arasında değişiklik göstermiştir. Reaktörlerin OM giderim verimleri (Çizelge 4.26) %6,37–12,07 arasında değişiklik göstermiştir. OM giderim verimleri 60. günün sonunda kontrol reaktörleri için ortalama %10,18, Ana bakterili reaktörler için ortalama %11,19 ve MNNG Bakterili reaktörler için %11,33 olarak gerçeklemiştir. Organik maddenin kullanım oranının artmasıyla, oluşan biyogaz ve metan miktarlarının artması, doğru orantılı olarak gerçekleşmesi beklenen bir durumdur (Bıtrak, 2021).

Çizelge 4.26. CSTR denemesinde reaktörlerin OM giderim verimlerinin zamanın fonksiyonu olarak değişimi (%)

Gün	1	8	13	29	44	60
Knt-1	7,77	8,05	10,49	6,37	9,10	10,67
Knt-2	7,48	8,51	9,86	6,76	9,60	9,68
S-Ana-1	7,90	9,23	11,14	8,08	9,72	10,30
S-Ana-2	9,03	9,82	11,13	9,31	10,82	12,07
S-MNNG-1	8,79	9,14	11,21	9,06	10,73	11,75
S-MNNG-2	8,05	8,89	10,77	7,28	9,03	10,91

Bakterilerin ilavesi ile başlayan ve 60 gün süren deneme boyunca 6 kez numune alınmış ve bu numunelerle VFA, Alkalinite ve KOİ analizleri gerçekleştirilmiştir. Prosese yüklenen ve alınan numunelerde VFA analizi yapılmıştır (Çizelge 4.27). Sonuçlar, yüklenen malzemeler için VFA değerlerinin 1920-2320 mg VFA/L (asetik asit olarak) arasında ve reaktörlerden alınan fermente ürün için ise 72-168 mg VFA/L (asetik asit olarak) arasında değiştiğini göstermiştir. Analizlerde elde edilen bu veriler, CSTR sisteminin VFA açısından uygun olduğunu göstermektedir (Öztürk, 1999; Metcalf ve Eddy, 2003).

Çizelge 4.27. CSTR denemesinde VFA'nın zamanın fonksiyonu olarak değişimi (mg/L)

Gün	Yüklenen	KNT-1	KNT-2	S-Ana-1	S-Ana-2	S-MNNG-1	S-MNNG-2
1	2320	136	128	96	104	120	96
8	1920	120	136	104	88	112	96
13	2264	112	96	96	104	104	112
29	2152	160	144	80	72	112	104
44	2136	168	160	160	136	104	120
60	2064	128	152	120	104	120	104

Alkalinite ölçüm sonuçları Çizelge 4.28’de verilmiştir. Reaktörlerden alınan örneklerin alkalinite değerleri, yüklenen malzemenin alkalinite değerlerine göre değişiklik göstermiştir, 60 günlük deneme süresince 6 ayrı günde alınan numuneler üzerinde yapılan deneyler sonucunda; alkalinite değerlerinin yüklenen malzemeye göre %10-20 arasında daha düşük seyrettiği görülmüştür. Yüklenen ve boşaltılan malzemenin alkalinite değerlerinin literatürdeki değerler arasında olduğu görülmüştür (Öztürk vd., 2005).

Çizelge 4.28. CSTR denemesinde alkalinitenin zamanın fonksiyonu olarak değişimi

Gün	Yüklenen	KNT-1	KNT-2	S-Ana-1	S-Ana-2	S-MNNG-1	S-MNNG-2
1	2600	2250	2330	2160	2020	2180	2140
8	3200	2940	2270	2470	2350	2450	2440
13	3250	2570	2510	2710	2510	2750	2660
29	3090	2350	2400	2370	2390	2290	2310
44	2700	2630	2120	2220	2490	2400	2250
60	2940	2700	2760	2780	2790	2520	2590

Anaerobik proseslerin işletilmesinde önemli parametrelerden biri olan VFA/Alkalinite oranları Çizelge 4.29’da verilmiştir. CSTR sisteminin sorunsuz çalışması için bu oranın 0,1’den düşük olması gerekmektedir (Öztürk vd., 2007; Metcalf ve Eddy, 2003). Deneme süresince alınan 6 numune üzerinde yapılan VFA ve Alkalinite oranlanmış (Çizelge 4.29) ve gerekli olan bu değer deneme boyunca sağlandığı görülmüştür.

Çizelge 4.29. CSTR denemesinde VFA/Alkalinite oranının zamanın fonksiyonu olarak değişimi

Gün	Yüklenen	KNT-1	KNT-2	S-Ana-1	S-Ana-2	S-MNNG-1	S-MNNG-2
1	0,89	0,06	0,05	0,04	0,05	0,06	0,04
8	0,60	0,04	0,06	0,04	0,04	0,05	0,04
13	0,70	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
29	0,70	0,07	0,06	0,03	0,03	0,05	0,05
44	0,79	0,06	0,08	0,07	0,05	0,04	0,05
60	0,70	0,05	0,06	0,04	0,04	0,05	0,04

Deneme süresince alınan 6 numune üzerinde yapılan KOİ analizleri Çizelge 4.30’da verilmiştir. Proseste KOİ giderim verimleri KNT-1, KNT-2, S-Ana-1, S-

Ana-2, S-MNNG-1 ve S-MNNG-2 için sırasıyla; %57, %64,9, %59,3, %69,4, %58,1 ve %63,5 olarak gerçekleşmiştir.

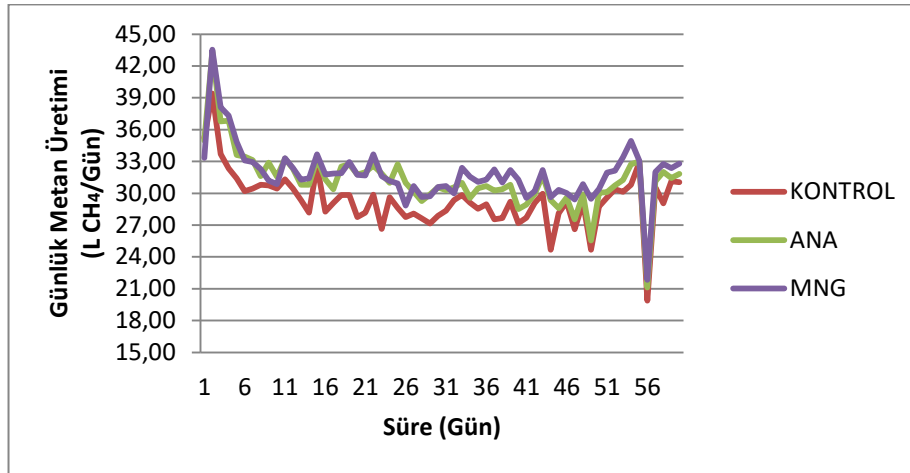
Çizelge 4.30. CSTR denemesinde KOİ'nin zamanın fonksiyonu olarak değişimi (mg/L)

Gün	Yüklenen	KNT-1	KNT-2	S-Ana-1	S-Ana-2	S-MNNG-1	S-MNNG-2
1	65.844	41.791	42.663	37.036	40.106	38.589	43.109
8	88.034	61.802	57.531	56.676	59.666	67.568	68.423
13	99.817	63.577	66.994	66.780	65.712	68.168	63.043
29	54.657	30.562	37.938	43.557	40.569	44.317	43.170
44	53.298	42.540	37.181	29.068	38.371	35.537	40.407
60	55.989	24.095	19.643	22.776	17.157	23.446	20.423

#### 4.1.1.1. CSTR denemesinde biyogaz, metan, özgül metan üretimi

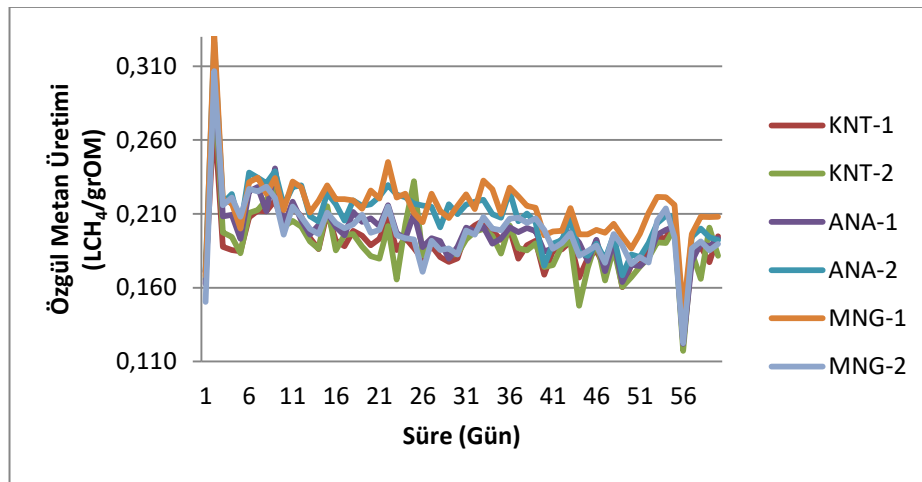
CSTR denemesinde yükleme için kullanılan malzeme, yaklaşık 15-20 gün yetecek miktarlarda süt sığırcılığı tesisinden getirilmiş ve KM oranı %9-10 aralığında ayarlanmaya çalışılmıştır. Karışım +4°C'de soğuk hava deposunda tutulmasına rağmen ilk günlük karışım ile son günlük karışım arasında farklılıklar olduğu görülmüştür. Tesisten alınan sığır gübresi karıştırıcıda su ilave edilerek homojen olana kadar karıştırılmıştır. İlk karışımdan sonra bu malzemeler 80 L kapasiteli varillere doldurularak +4°C'de soğuk hava deposunda saklanmıştır. Ancak, karışımın varillere dolumu esnasında veya günlük yüklemeler esnasında homojenitenin tam sağlanamadığı durumlarda KM ve buna bağlı olarak OM açısından farklılık göstermesi mümkün olmaktadır.

CSTR prosesinden elde edilen günlük metan değerlerinin verildiği Şekil 4.14 incelendiğinde yüklenen malzeme günlük olarak aynı miktarlarda eklenmesine rağmen, üretilen metan miktarlarında dalgalanmalar olduğu görülmektedir. Bu salınımların sebeplerinden birinin de bu durum olduğu düşünülebilir. Bu salınımın dışında, S-MNNG bakterilerinin ilave edildiği reaktörlerin, günlük metan üretiminin ilk ölçümden itibaren (birkaç ölçüm dışında) diğer reaktörlere göre daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. Kontrol reaktörlerinde ise deneme boyunca diğer reaktörlerden (S-Ana ve S-MNNG bakteri ilaveli) daha düşük metan üretimi gerçekleşmiştir.



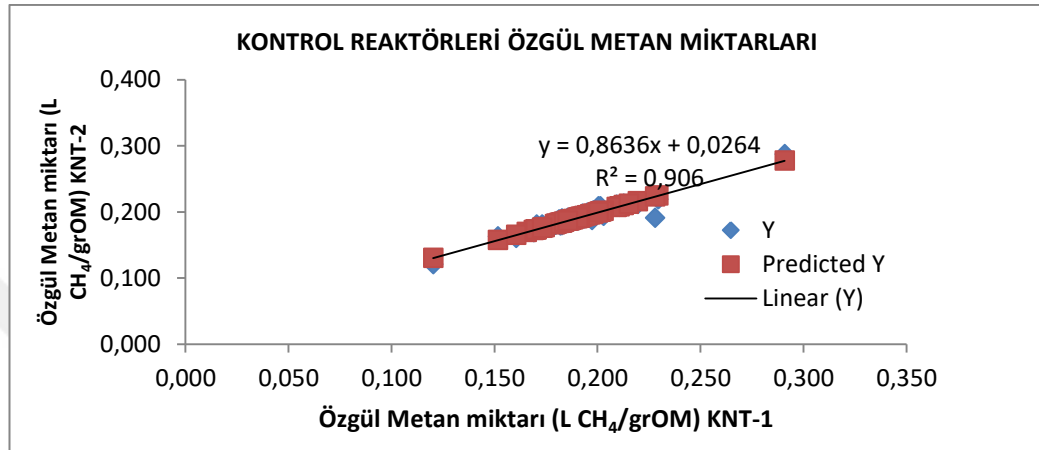
Şekil 4.14. CSTR prosesinden elde edilen günlük metan miktarları

Reaktörlerin 60 günlük özgül metan üretim miktarı gösterildiği Şekil 4.15 incelendiğinde MNNG ile muamele edilmiş olan bakteri kültürüyle beslenen reaktörlerin diğer reaktörlere göre özgül metan miktarının daha fazla olduğu görülmektedir. Aynı zamanda, ana bakteri (*Salmonella enterica*) ilavesi yapılan reaktörlerin de özgül metan miktarları kontrol reaktörlerine göre daha fazladır. Günlük metan üretimine benzer olarak, yüklenen malzemenin özelliğine göre tüm reaktörlerde üretimler salınım göstermiştir. Fakat yüklenen malzemeler tüm reaktörlerde aynı şekilde etkili olduğundan, bu dalgalı değerler, tüm reaktörlerde neredeyse aynı oranda yükselme/düşüş etkisi göstermiştir.



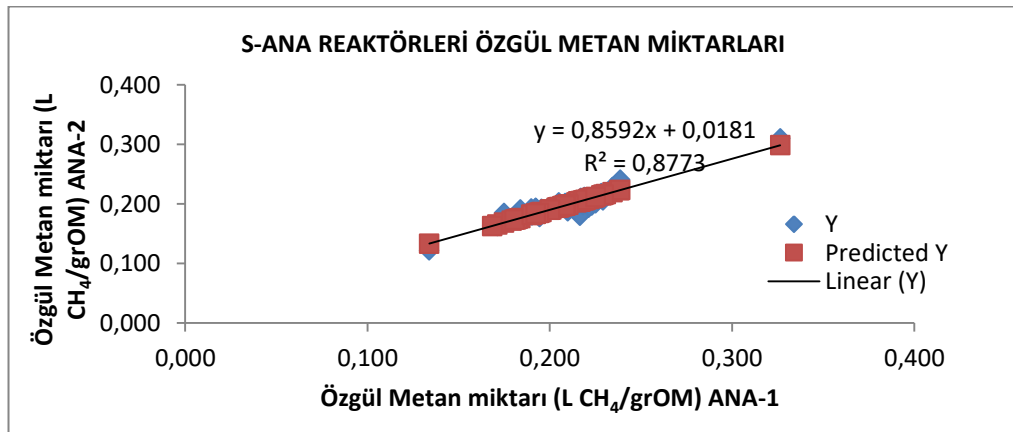
Şekil 4.15. CSTR prosesinden elde edilen özgül metan miktarları

Kontrol reaktörlerinden elde edilen özgül metan miktarlarının regresyon analizi sonuçlarının verildiği Şekil 4.16 incelendiğinde, 60 günlük (3 HRT) CSTR denemelerinden elde edilen sonuçlara göre 2 paralel arasında güçlü bir anlamlılık olduğu (Standart Hata:0,006; P-value<0,05; R<sup>2</sup>:0,906 ) tespit edilmiştir.



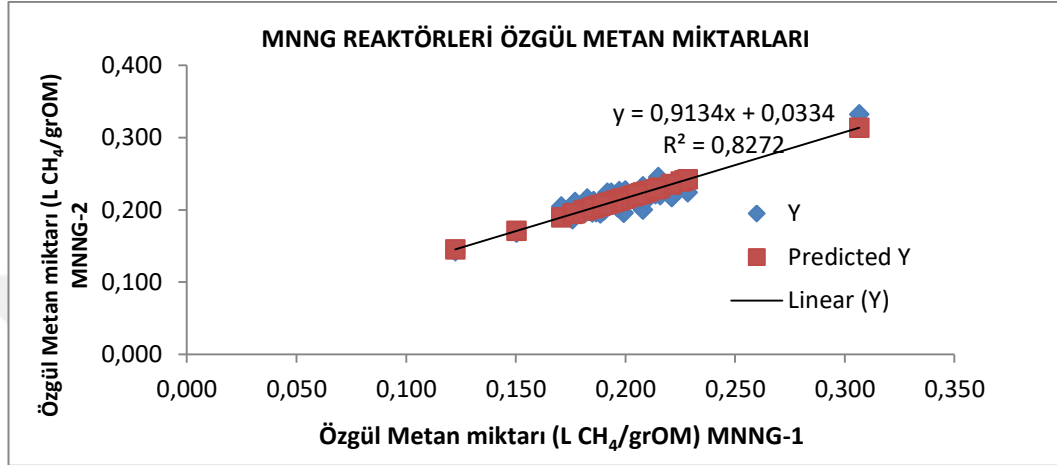
Şekil 4.16. Kontrol reaktörlerinden elde edilen özgül metan miktarlarının regresyon analizi sonuçları

S-Ana bakterili reaktörlerden elde edilen özgül metan miktarlarının regresyon analizi sonuçlarının verildiği Şekil 4.17 incelendiğinde kontrol reaktörlerinde olduğu gibi 2 paralelden elde edilen sonuçlar arasında güçlü bir anlamlılık olduğu (Standart Hata:0,008; P-value<0,05; R<sup>2</sup>:0,877 ) tespit edilmiştir.



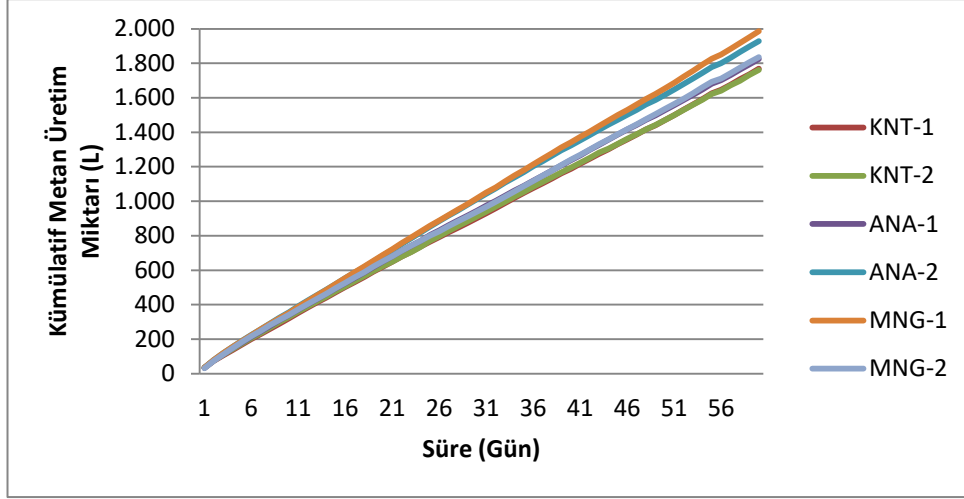
Şekil 4.17. S-Ana bakterili reaktörlerden elde edilen özgül metan miktarlarının regresyon analizi sonuçları

S-MNNG bakterili reaktörlerden elde edilen özgül metan miktarlarının regresyon analizi sonuçlarının verildiği Şekil 4.18 incelendiğinde kontrol reaktörlerinde olduğu gibi 2 paralelden elde edilen sonuçlar arasında diğer reaktörlerden az olmasına rağmen güçlü bir anlamlılık olduğu (Standart Hata:0,009; P-value<0,05; R<sup>2</sup>:0,827 ) tespit edilmiştir.



Şekil 4.18. S-MNNG bakterili reaktörlerden elde edilen özgül metan miktarlarının regresyon analizi sonuçları

Prosesten elde edilen kümülatif metan miktarları değerlendirildiğinde (Şekil 4.19) 60 günlük süre sonunda kontrol reaktörleri, ana bakteri yüklemesi yapılan reaktörler ve mutant bakteri ilaveli reaktörlerde sırasıyla ortalama (2 paralel ortalaması); 1614 L, 1720 L ve 1751 L metan üretimi gerçekleşmiş ve S-Ana bakteri ilaveli reaktörde %6,55, S-MNNG bakteri ilaveli reaktörde 8,48 artış (Çizelge 4.31) elde edilmiştir. Bu artışlar çalışmada elde edilmek istenen sonucu vermiş ve izole edilen ve mutajen kimyasal uygulaması yapılan bakterilerin Sisteme dahil edilmesi ile biyogaz proseslerinde metan artışı sağladığını göstermiştir.



Şekil 4.19. CSTR prosesinden elde edilen kümülatif metan üretim miktarları

CSTR prosesi 3 HRT işletildiğinden, geçen sürelerde HRT'ler arası üretim verimlerindeki değişimin tespiti için Çizelge 4.31 hazırlanmış ve 20 günlük periyotlar halinde ayarlanan üç HRT boyunca bakteri ilaveli reaktörlerde artış devam ederken, bu artışlar stabil olarak kalmamış bazı salınımlar göstermiştir.

İlk 20 günlük süreçte artış oranları hem Ana hem de Mutant bakteri ilaveli reaktörlerde neredeyse aynıdır. Fakat ikinci 20 günlük süreçte her iki bakteri için kontrol reaktörlerine göre artış devam ederken, Ana ve Mutant bakterili reaktörlerin üretim verimleri arasında farklılık gözlenmeye başlamıştır. Bu farklılık son 20 günlük süreçte daha da artmış ve son HRT'de iki bakterinin (Ana ve Mutant) metan üretim verimleri arasındaki fark daha da açılmıştır.

Çizelge 4.31. CSTR sisteminden elde edilen kümülatif metan değerleri

	KNT	S-Ana	S-MNNG
Kümülatif metan üretimi (L)	1614,05	1719,75	1750,91
<b>Değişim Toplam</b>		<b>6,55%</b>	<b>8,48%</b>
1.HRT (L)	569,24	611,36	613,54
<b>Değişim HRT-1</b>		<b>7,40%</b>	<b>7,78%</b>
2. HRT (L)	519,58	561,98	570,08
<b>Değişim HRT-2</b>		<b>8,16%</b>	<b>9,72%</b>
3. HRT (L)	525,23	546,41	567,29
<b>Değişim HRT-3</b>		<b>4,03%</b>	<b>8,01%</b>

HRT'ler arasındaki bu değişimler yüklenen malzemelerden kaynaklanabileceği gibi reaktörler içerisindeki bakteri popülasyonundaki değişimden de kaynaklanabileceği düşünölmektedir. Bunun için Metagenom analizlerinin sonuçları önem arz etmektedir.

#### 4.6. Metagenom Analiz Sonuçları

Mikroorganizmalar farklı özelliklere sahip canlılardır. Bu nedenle belirlenen bazı ortak özellikleri dikkate alınarak sınıflandırılmış ve gruplar halinde düzenlenmiştir. Bu amaçla oluşturulmuş sisteme taksonomi (Michael v.d., 2012), sınıflandırma, isimlendirme ve tanımlama olmak üzere üç alanı kapsamaktadır. Bunlardan sınıflandırma, benzerlikleri esas alınarak organizmaların belirli gruplar içinde düzene konulmasına verilen addır. İsimlendirme, organizmalara, belirli kurallar çerçevesinde isim verme işlemidir. Tanımlama ise organizmaların hangi taksona ait olduklarını belirleme işlemi olarak tanımlanır. Oluşturulmuş olan bu yöntem ile organizmalar tam bir taksonomik şema içinde yerleştirebilmektedir (Vandamme vd., 1996).

Sınıflandırma şeması, en büyük ve en genelden, en küçük ve en özel olana kadar devam eden yedi dizi şeklinde düzenlenmiştir. Bu sıralama; Alem, Şube, Sınıf, Takım, Aile, Cins ve Tür şeklinde büyükten küçüğe doğru ilerlemektedir (Vandamme vd., 1996). Çalışmada elde edilen veriler Cins seviyesine kadar indirgenebilmiştir (Şekil 4.20).

Metagenomik, CSTR denemelerinde HRT aralarındaki farklılıkların ve sistemin ilerleyişinin takibinin daha sağlıklı yapılabilmesi için kullanılacak yöntemlerden biridir. Metagenom analizi sonuçları incelenerek, prosesin başlangıcında ve ilerleyen safhalarındaki mikroorganizmaların popülasyonlarındaki değişim tespit edilmiştir. Aynı zamanda sistemden elde edilen olumlu veya olumsuz sonuçların hangi mikroorganizma veya bakteri gruplarından kaynaklanıyor olabileceği hakkında bilgi vermektedir.

CSTR sisteminin başlangıç tarihinde ve ilerleyen sürelerde her bakteri ilaveli reaktör için numune alınmış ve her reaktör için 2'ser adet olacak şekilde toplamda 6 metagenom analizi yaptırılmıştır. Metagenom analiz sonuçları Şekil 4.20'de verilmiştir. Şekil incelendiğinde, bakteri popülasyonlarındaki farklılıklar açıkça görülmektedir. Denemenin başında reaktörlerden alınan numunelerin sonuçları incelendiğinde, aynı malzeme ile yükleme yapılmış olmasına rağmen reaktörlerde aynı bakteri cinslerinin popülasyonunun değişiklik gösterebileceği tespit edilmiştir. Başlangıçta Kontrol reaktöründe *SHA-41* (*Kloacimonadales* takımından muhtemel (*Spirochaetes bakterisi*) bakteri cinsi popülasyonu fazla iken (%13,73), Ana bakterili (%14,96) ve MNNG bakterili (%12,08) reaktörde *Bacteroidales* takımından *UCG-001* bakteri cinsi popülasyonu fazladır. Son durumda ise Kontrol reaktöründe *Bacteroidales* takımından *UCG-001* bakteri cinsi popülasyonu (%15,61), S-A bakterili reaktörde popülasyonu azalmış olmasına rağmen (%9,77) ve S-M bakterili (%13,89) reaktörde popülasyonu artış göstererek *Bacteroidales* takımından *UCG-001* bakterilerin fazla olduğu görülmüştür.

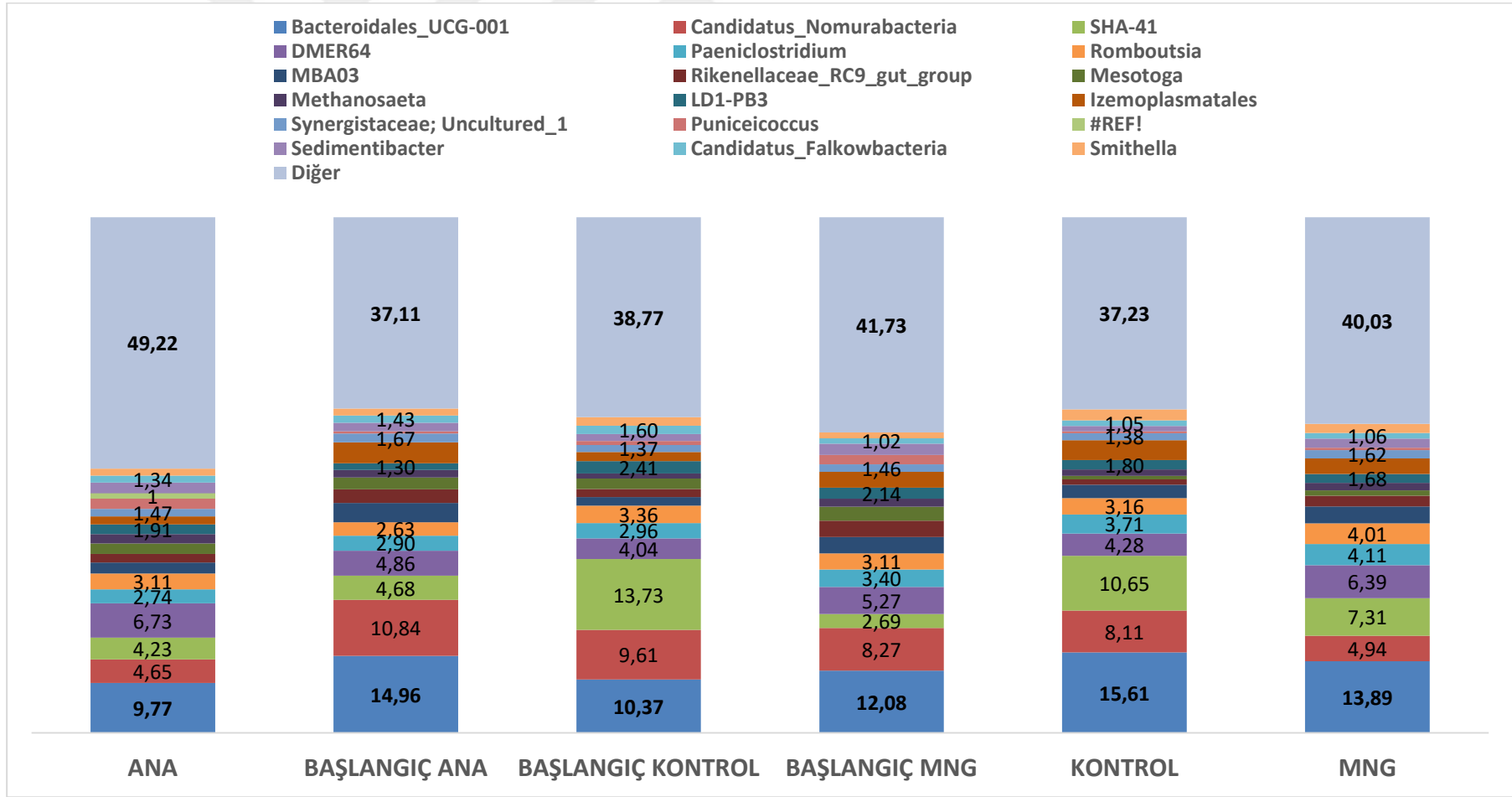
Metagenom analizleri incelendiğinde 7 bakterinin CSTR prosesinde önemli bir yerinin olduğu görülmektedir. Bu bakteriler cins düzeyinde; *Bacteroidales\_UCG-001* (*Prevotellaceae* Ailesinden), *Candidatus nomurabacteria*, *SHA-41*, *DMER64* (*Bacteroidales* takımından ve *Rikenellaceae* Ailesinden), *Paeniclostridium*, *Romboutsia*, *MBA03* şeklinde isimlendirilmişlerdir. Bu bakteriler, Knt-Başlangıç (%45,72), Knt-Son (%48,12), S-A-Başlangıç (%44,62), S-A-Son (%33,40), S-M-Başlangıç (%37,97) ve S-M-Son (%43,93) reaktörlerinde diğer bakterilerden daha fazla popülasyona sahiptir. Bu bakterilerin CSTR prosesi üzerinde işlevlerinin araştırılması ve popülasyon oranlarının ayarlanması ile sistem geliştirilmesi ve verim artışları mümkün olabilecektir.

Metagenomik analizlerin sonucunda 6 örnek içerisinde popülasyonu en fazla olan *Bacteroidales*, bakteri ilavesi çalışmalarında sisteme dışarıdan eklenen bakteriler içerisinde önemli bir yer tutmaktadır (Weiß vd., 2010; Christy vd., 2014; Zhang vd., 2015; Yin vd., 2019; Tukanghan vd., 2021). Aynı zamanda, *Candidatus* bakterileri (Shen vd., 2021; Özbayram vd., 2017), *Clostridium*

bakterileri (Zhong vd., 2011; Christy vd., 2014; Ćater vd., 2015; Tsapekos vd., 2017; Yıldırım vd., 2017; Yin vd., 2019; Prasertsan vd., 2021; Shen vd., 2021; Tukanghan vd., 2021), bakteri ilavesi ile biyogaz ve metan üretim artışlarının araştırıldığı çalışmalarda önemli bir yer tutmuştur.

CSTR sisteminde VFA veya VFA/Alkalinite oranlarından kaynaklı bir problem olması durumunda, DMER64 cinsi bakterilerin ilave edilmesi ile bu sorundan çözülebileceği (Lee vd., 2019) bilgisinin yanı sıra bu bakterinin hangi oranda sisteme dahil edilmesi gerektiğinin tespiti ile kısa sürede problemlerin çözümü mümkün olacaktır.





Şekil 4.20. Metagenom Analiz Sonuçları

#### 4.7. CSTR Sistemine Yüklenen Bakterilerin Sayım Sonuçları

Enzim analizlerinden elde edilen veriler, bakterilerden bazılarının diğerlerine göre daha fazla enzim ürettiğini göstermiştir. Bu değişimin, mutajen kimyasalların enzim üretim verimlerine olan etkilerinden mi yoksa bakteri çoğalma kinetiğinin değişiminden mi kaynaklı olabileceği göstermesi açısından CSTR sistemine ilave edilen bakterilerin sayımları yayma plak yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu bakteri sayımlarının sonuçları incelendiğinde (Çizelge 4.32), mutant bakterilerin 37°C'de 24 saat inkübasyonundan sonraki sayısının ( $\times 10^{11}$ ) ana bakteriye göre ( $\times 10^8$ ) oldukça fazla olduğu (yaklaşık 1000 kat) görülmüştür. Bu durum göz önüne alındığında, mutajen kimyasalların enzim üretim verimlerini artırmayıp, bakterilerin çoğalma kinetiğine olumlu etki sağlamış olabileceği düşünülmektedir. Bu iki durumdan (enzim üretim verimlerinin veya çoğalma hızının artırılması) hangisinin gerçekleştiği tam olarak bilinemese de birim zamanda üretilen enzim miktarının arttığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Aynı zamanda farklı besiyerlerinin S-M bakterilerinin çoğalma hızına fazla bir etkisi olmazken, S-Ana bakterilerinde iki besiyeri (LB ve PCA+PW) arasında PCA (1 gr/500 ml) +PW (3 gr/500 ml) karışımının LB Broth besiyerine göre daha fazla çoğalmaya yardımcı olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.32. CSTR sitemine yüklenen bakteri sayıları

Analiz No	Bakteri Adı	Besiyeri	500 ml'de Bakteri sayısı ( $10^{11}$ )	Bakteri Adı	Besiyeri	500 ml'de Bakteri sayısı ( $10^8$ )
1	S-MNNG	LB	75	S-Ana	LB	60
2	S-MNNG	LB	65	S-Ana	LB	30
3	S-MNNG	LB	100	S-Ana	LB	105
4	S-MNNG	LB	75	S-Ana	LB	15
5	S-MNNG	LB	85	S-Ana	LB	50
6	S-MNNG	PCA+PW	10	S-Ana	PCA+PW	10000
7	S-MNNG	PCA+PW	50	S-Ana	PCA+PW	3000
8	S-MNNG	PCA+PW	450	S-Ana	PCA+PW	3500
9	S-MNNG	PCA+PW	30	S-Ana	PCA+PW	10500

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, selektif besiyerleri ile izolasyon yöntemi kullanılarak halihazırda devam eden CSTR sisteminden alınan numunelerden izolasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve ardından selektif katı besiyeri ile hazırlanan petri kaplarında en büyük zon oluşturan sadece bir bakteri kolonisinden örnek alınarak saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra 3 adet ana bakteri suşu elde edilmiş ve bundan sonraki tüm işlemler (tür tespiti, mutajen kimyasal uygulaması, enzim analizi, BMP, CSTR) bu bakteriler üzerinden yürütülmüştür.

İzolasyon işlemlerinden sonra mutajen kimyasal uygulaması için kimyasalların 40 g/L'ye kadar seyreltik çözeltileri hazırlanarak dezenfeksiyon işlemleri yapıldıktan sonra, mutajen kimyasal uygulamaları gerçekleştirilmiş ve enzim analizlerine geçilmiştir.

Enzim analizlerinde elde edilen sonuçlardan, uygulanan mutajen kimyasalların enzim üretimlerine etkisinin olduğu ortaya çıkmıştır. Bazı suşlarda bu etki olumsuzken, bazılarında ise olumlu şekilde kendisini göstermiştir. Enzim analizlerinden elde edilen verilere göre, kimyasal mutajen uygulaması en fazla Lipaz Enzimi üretiminde artış (%67,98, %44,52 vb.) göstermiştir. Daha sonra Selüloz Enzimi maksimum %35,16 oranında artış göstermiştir. Proteaz Enziminde ise artış maksimum %16'da kalmış ve bu değerlerin önceki çalışmalarda elde edilen sonuçtan (9,2 kat artış) oldukça az olduğu görülmüştür. Çalışmada elde edilen veriler, yapılan bu kimyasal uygulamalarının enzim artışlarına neden olabildiği gibi azalmalara da neden olabileceğini ortaya koymaktadır

İzole edilen 3 Ana bakteri ve 5 ayrı kimyasal (Fosforik Asit, MNNG, EMS, EtBr ve Nitrik Asit) muamelesi sonucunda elde edilen suşlar ile birlikte toplam 18 ayrı bakteri suşu (Ana ve Mutant Bakteriler) kullanılarak BMP denemeleri yapılmıştır. BMP denemelerine başlamadan önce sistemin güvenilirliği, yapılan ön deneme ile test edilmiş ve tespit edilen sorunlar giderildikten sonra ve Tukey

testi uygulanmış ve test sonucunda ana denemeye başlanmıştır. Deneme sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde, Saman bakterileri olarak isimlendirilen *Salmonella enterica* bakterisi ve bu bakterinin S-MNNG, S-EMS mutantlarının, biyogaz hacmi ve metan miktarı artışlarında olumlu etkileri olduğu görülmüştür. BMP denemesinde yapılan ölçümlerde, S-Ana bakterisi %15,95, S-MNNG bakterisi %19,35 ve S-EMS bakterisi %16,80 oranlarında artış göstermiştir. Ancak bu artışlar, 5 ölçümde sadece birinde elde edilen maksimum değerlerdir. Bu nedenle bu bakterilerin gerçekten biyogaz hacminde ve/veya metan miktarında artış sağlayıp/sağlamadığının tespiti için CSTR denemelerinin yapılmasının gerekli olduğu kararlaştırılmıştır. CSTR denemeleri yapılacağı sırada aktif çalışabilen 8 reaktör olduğundan ve Ana bakteri ile mutantının arasında değerlendirme yapılabilmesi adına CSTR sisteminde kullanılacak bakterinin seçimi için elde edilen; enzim analiz sonuçları, kümülatif biyogaz ve metan miktarlarının Kontrol'e göre % değişimleri, OM giderimleri, bakterilerin petri kaplarında oluşturdukları zon çapları, özgül biyogaz ve metan üretim miktarları verileri kullanılarak Min-Max Normalizasyonu (Feature Scaling) yapılarak bu değerlerin her biri toplanarak kıyaslama işlemi yapılmıştır. Bu değerler göz önüne alınarak, S-MNNG bakterilerinin CSTR prosesinde denenmesi gerektiği anlaşılmıştır. Ana bakteri ile ilgili olan verilerin kıyaslanması amacıyla da CSTR sisteminde S-Ana bakterileri diğer bir bakteri grubu olarak CSTR denemesine dahil edilmiştir.

CSTR sistemi, bu deneme için revize edilmiş ve ana denemeye geçilmeden önce BMP denemesinde olduğu gibi ön bir deneme yapılmıştır. Deneme sonucunda reaktörlerden elde edilen veriler arasında ortalama %0,45 farklılık olduğu tespit edilmiş ve Tukey testi uygulanarak test sonucunda R-1, R-2, R-3, R-4, R-7 ve R-8 nolu reaktörler ile CSTR denemeleri başlatılmıştır. Bu bakterilerin etkilerinin görülebilmesi için CSTR sistemi, HRT:20 gün olacak şekilde 3 HRT (60 gün), başlangıçtan itibaren ise aralıksız 153 gün boyunca işletilmiştir. Deneme sırasında yapılan analizler ve ölçümlerden literatürde verilen bilgilerin dışına çıkan analiz veya ölçüm olmamıştır. Günlük malzeme (SG+Su karışımı) yüklemenin yanısıra, bakteri ilavesi yapılmış olup, deneme boyunca gerekli hijyen kontrolleri sağlanmıştır. Günlük yapılan analizler yanısıra, OM değerleri

tespiti, VFA analizi, Alkalinite ve KOİ analizlerinin yapılabilmesi için 1. (deneme kurulduktan sonraki gün), 8., 13., 29., 44. ve 60. günlerde numuneler alınarak söz konusu analizler yapılmıştır. Metagenom analizi için ise deneme kurulumundan sonraki gün ve 30. gün, CSTR boşaltım vanasından alınan fermente üründen numune alınmış, steril falkon tüplerinde ve soğuk zincir bozulmadan analize gönderilmiştir.

CSTR denemelerinin sonucunda sisteminden elde edilen kümülatif metan değerleri her HRT'de farklılık göstermiştir. Ana Bakterinin ilave edildiği reaktörde, HRT 1: %7,40, HRT 2: %8,16 ve HRT 3: %4,03 olacak şekilde ortalama %6,55'lik bir artış sağlanmıştır. Mutant bakterili reaktörlerde ise HRT'ler arasında fazla bir değişim olmamış ve sonuç olarak deneme sonunda %8,48'lik bir metan artışı görülmüştür. Çalışmada elde edilen metan artış oranının, Çizelge 2.1'de verilen değerlerden bir kısmı ile benzer olduğu görülmektedir. Bu artış değerlerinden (%6,55 ve %8,48) daha fazla artış sağlayan diğer çalışmalardaki yüksek artış değerlerine ulaşabilmek için, çalışmada elde edilen tecrübe yardımıyla, çalışmaların yönlendirilmesi ve daha önceden yapılan eksikliklerin bulunarak bunların düzeltilmesi gerekmektedir.

Çalışmada, biyogaz hacmi ve özgül metan miktarı artışının bakteri ilavesi ile artabileceği, kimyasal mutajen kullanılarak enzim üretim verimlerinin artırılabilmesinin mümkün olduğu kanıtlanmıştır. Elde edilen çok önemli diğer bir sonuç ise 25 günlük HRT süresinin bakteri ilavesi ile 20 güne indirilebilmesinin mümkün olmasıdır. HRT'nin 25 gün olarak ayarlandığı ve bakteri ilavesi yapılmayan 36 günlük denemede, Reaktörler için günlük ortalama özgül metan miktarları R-1, R-2, R-3 ve R-4, R-7 ve R-8 reaktörleri için sırasıyla; 0,194 L CH<sub>4</sub>/grOM, 0,192 L CH<sub>4</sub>/grOM, 0,191 L CH<sub>4</sub>/grOM, 0,197 L CH<sub>4</sub>/grOM, 0,194 L CH<sub>4</sub>/grOM, 0,190 L CH<sub>4</sub>/grOM ve 0,192 L CH<sub>4</sub>/grOM olarak gerçekleşmiştir. HRT'nin 20 gün olarak ayarlandığı ana denemede, S-A ve S-M bakterilerinin ilavesi ile reaktörlerden elde edilen 60 günlük veriler incelendiğinde ise R-1 ve R-2 reaktörleri günlük ortalama 0,191 L CH<sub>4</sub>/grOM, R-3 ve R-4 reaktörleri günlük ortalama 0,203 L CH<sub>4</sub>/grOM, R-7 ve R-8 reaktörleri ise 0,206 L CH<sub>4</sub>/grOM özgül metan üretimi gerçekleştirdiği görülmüştür. Özgül

metan miktarına göre bir değerlendirme yapıldığında; her iki denemede R-1 ve R-2 reaktörlerine bakteri ilave edilmemiş ve HRT:25 ile HRT:20 gün arasında %8,03 oranında bir azalma görülmüştür. *Salmonella enterica* ana (S-Ana) bakterisi ilave edilmiş olan R-3 ve R-4'te %1,49 oranında azalma meydana gelmiş, MNNG ile muamele edilmiş *Salmonella enterica* Mutant bakterisi ilave edilmiş olan R-7 ve R-8 nolu reaktörlerde ise %0,24 oranında artış meydana gelmiştir. R-1 ve R-2 reaktörlerinden elde edilen özgül metan miktarlarının %8,03 oranında azalmış olması HRT'nin kısalmış olması nedeniyle olağan bir durumdur. Ancak diğer 4 reaktörde bakteri ilavesinin yardımıyla bu azalma meydana gelmemiştir. Bu durum da çalışmada izole edilen ve mutasyona uğratılan bakterilerin kullanılmasının, CSTR sistemlerinde daha kısa sürede (HRT'de 25 günden 20 güne düşüş) daha fazla enerji (metan miktarında %8,48 artış) üretimi sağlama potansiyeli olduğunu ortaya koymuştur.

Kullanılan yöntemlerin revizasyonları, proste kullanılacak malzemeye göre uygun mikroorganizma seçimi ve sisteme yüklenen mikroorganizma miktarı gibi değişkenler ayarlanarak, yeni kurulacak veya halihazırda işletilen biyogaz tesislerinin üretim verimlerinin artırılması sağlanabilecektir.

Tez çalışmaları sonucunda elde edilen veriler ve edinilen tecrübeler ışığında, sonraki çalışmalarda enzim üretimini artıran başka yöntemler (mutasyon yöntemi değiştirilerek) denenerek elde edilecek mutant bakteriler yardımıyla özgül metan miktarının artışı daha da artırılabilir. Aynı zamanda, başka mikroorganizma kaynakları araştırılarak (çeşitli hayvan dışkıları, fosseptik çukurları, terk edilmiş kuyular vb.), bakteri çeşitliliğinin artırılması ve bu bakterilerin birlikte kullanılabilirliğinin biyogaz sistemlerine etkilerinin araştırılması ile biyogaz sisteminin metan üretim verimliliğinin artırılması mümkün olabilecektir. Bunların yanı sıra çalışmada izole edilen bakterilerin çeşitli substratlarla denenmesi, bakterilerin (Ana veya Mutant) etkilerinin tam olarak ortaya konulmasını sağlayabilecektir.

## KAYNAKLAR

- Abbasi, M., H., Mehmood, R., Khawar, M., B., Amaan, H., N., Arif, A., Saeed, T., Rafiq, M., (2020). Alkalophilic protease producing bacteria and some biotechnological potentials. RADS Journal of Biological Research & Applied Sciences, 11(2), 136-143.
- Akman, M., 1983. Bakteri Genetiği. (2. Baskı). Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Sivas.
- Akyol, Ç., İnce, O., Bozan, M., Özbayram, G., İnce, B., 2019. Fungal bioaugmentation of anaerobic digesters fed with lignocellulosic biomass: What to expect from anaerobic fungus *Orpinomyces* sp.. Bioresource Technology. [Volume 277](#), April 2019, Pages 1-10.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J., L., Guwy, A., J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., van Lier, J., B., 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. Water Science & Technology- Pages 927-934.
- APHA, 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (23. baskı).
- APHA, 1998. Su ve Atık Suların İncelenmesi için Standart Yöntemler, 20. baskı. Amerikan Halk Sağlığı Derneği (APHA), Amerikan Su İşleri Birliği (AWWA) ve Su Çevre Federasyonu (WEF), Washington, DC.
- Arda, M., 1985. Genel Bakteriyoloji. Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi yayın no: 402,. A.Ü. Basımevi, Ankara.
- Arzita, S., Agustien, A., Rilda, Y. (2017). The diversity of the alkaline protease producers, thermophilic obligate *Bacillus* spp., from Sungai Tutung Hot Spring, Kerinci, Jambi, Indonesia. Journal of Pure and Applied Microbiology, 11(4), 1789-1797.
- Attar, Y., Mhetre, S., T., Shawale, M., D., 1998. Biogas production enhancement by cellulolytic strains of Actinomycetes. Biogas Forum I, 72, pp. 11-15.
- Aybek, A., Üçok, S., İspir, M.,A., Bilgili, M., E., 2015. Türkiye’de kullanılabilir hayvansal gübre ve tahıl sap atıklarının biyogaz ve enerji potansiyelinin belirlenerek sayısal haritalarının oluşturulması. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi 12(3): 109-120.
- Azin, M., Noroozi, E., 2001. Random mutagenesis ve use of 2-deoxy-Dglucose as an antimetabolite for selection of  $\alpha$ -amylase-over producing mutants of *Aspergillus oryzae*. World Journal of Microbiology and Biothecnology, 17: 747-750.

- Bahramianfard, H., Derakhshandeh, A., Naziri, Z., Khaltabadi, F.,i R., 2021. Prevalence, virulence factor and antimicrobial resistance analysis of Salmonella Enteritidis from poultry and egg samples in Iran. *BMC Vet ReS*. 2021;17(1):196.
- Banerji, S., Simon, S., Tille, A., Fruth, A., Flieger, A., 2020. Genome-based Salmonella serotyping as the new gold standard. *Sci Rep*. 9;10(1):4333.
- Barilleau, E., Védrine M., Koczerka M., 2021. Investigation of the invasion mechanism mediated by the outer membrane protein PagN of Salmonella Typhimurium. *BMC Microbiol*. 21(1):153.
- Bastian, S., Liu, X., Meyerowitz, J., T., Snow, C., D., Chen, M., M., Y., Arnold, F., H., 2011. Engineered ketol-acid reductoin some rase and alcohol dehydrogenase enable anaerobic 2-methylpropan-1-olproduction attheoretical yield in Escherichiacoli. *Metabolic Engineering* 13. 345–352.
- Baweja, M., Nain, L., Kawarabayası, Y., Shukla, P., 2016. Current Technological Improvements in Enzymes Toward Their Biotechnological Applications. *Frontiers in Microbiology*, 965(7):1-13.
- Berger, H., Bammar, W., J., and Yanofsky., C., 1966. Spontaneous and ICR 191-A-induced framshifts in the A gene of *E.coli* tryptophan synthetase. *Journal of Bacteriology*, 96:1672.
- Bernfeld, P., 1955. Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods Enzymol*, 1: 149-158.
- Bhattacharjee S., K., Mahajan S., K., 1998. The origin of adaptive mutations: Explaining the mutational spectra of Lac<sup>+</sup> revertants of the *Escherichia coli* strain FC40. *Curr. Sci*. 74, 583–590.
- Bıtrak, N., B., 2021. Alkaloid İşleme Atıkları İle Sığır Gübresinin Anaerobik Arıtılmasında Optimum Karışım Oranlarının Belirlenmesi Ve Organik Yükleme Hızlarının Biyogaz Üretimine Etkisi. Doktora Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Isparta.
- Bilgehan, H., 1987. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi..Barış yayınları, İzmir.
- Bilgiç, B., 2021. Investigation of The Factors Affecting Membrane Bioreactor Performance During Volatile Fatty Acid Production from Food Waste. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul.
- Bochmann, G., Montgomery L., F., R., Murphy J., Baxter D., 2013. Storage and pretreatment of substrates for biogas production. Editor: Wellinger A., Woodhead Publishing, A.B.D, 42, 85–103.

- Bodana, A., Rao, D., R., 1990. Antimutagenic Activity of Milk Fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. [Journal of Dairy Science Volume 73, Issue 12](#), December 1990, Pages 3379-3384.
- Bommarius, A., S., Paye, M., F., 2013. Stabilizing biocatalysts. *Chemical Society Reviews*, 42:15, 6534-6565.
- Bougrier, C., Carrere, H., Delgenes, J., P., 2005. Solubilization of Waste Activated Sludge by Ultrasonic Treatment. *The Chemical Engineering Journal*, 106(2): 163-169.
- Bozkurt, S., 2012. Eysel Nitelikli Katı Atıkların Geri Dönüşüm Olasılıkları ve Bertaraf Yöntemlerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Bradford, M., M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bukvic, Z., Kralik D., Tolisic Z., 2002. Biomass Methane. Energy Efficiency and Agricultural Engineering. Conference Proceedings, 1: 264-270. Rousse, Bulgaria.
- Caldini, G., Trotta, F., Villarini, M., Moretti, M., Pasquini, R., Sforzolini, G., S., Cenci, G., 2005. Screening of potential lactobacilli antigenotoxicity by microbial and mammalian cell-based tests. *International Journal of Food Microbiology* 102. 37 – 47.
- Cantrell, K., B., Ducey, T., Ro, K., S., Hunt, P., G., 2008. “Livestock waste-to-bioenergy generation opportunities”, *Bioresource Technology* 99: 7941-7953.
- Čater, M., Fanedl, L., Malovrh, S., Logar, R., M., 2015. Biogas production from brewery spent grain enhanced by bioaugmentation with hydrolytic anaerobic bacteria. *Bioresource Technology*. [Volume 186](#), June 2015, Pages 261-269.
- Chapman, J., Ismail, A., Dinu, C., 2018. Industrial applications of enzymes. Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8:6, 238.
- Chatzopoulou, M., A., Simpson, M., Sapin, P., Markides, C. N., 2019. Off-design Optimisation of Organic Rankine Cycle (ORC) Engines with Piston Expanders for Medium-scale Combined Heat and Power Applications. *Applied Energy*, 238, 1211-1236.
- Cheah, Y., K., Antich, C., V., Dosta, J., Mata-Álvarez, J., 2019. Volatile fatty acid production from mesophilic acidogenic fermentation of organic

fraction of municipal solid waste and food waste under acidic and alkaline pH. *Environmental Science and Pollution Research*.

- Chernicharo, C., A., L., 2007. Biological Wastewater Treatment Series 4: Anaerobic Reactors. IWA Publishing, 175p, London.
- Chiu, C., Y., Miller S.,A., 2019. Clinical metagenomics. *Nature Reviews Genetics* 20:341-355.
- Christy, P., M., Gopinath, L., R., Divya, D., 2014. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. [Volume 34](#), June 2014, Pages 167-173.
- Çallı, B., 2012. Atıklardan Biyogaz Üretimi. Türkiye Kimya Derneği-Genç Kimyacılar Platformu, <http://mebig.marmara.edu.tr/Presentations/BiyogazUretimi.pdf>. (Erişim tarihi 01.05.2019).
- Choi, J., M., Han, S., S., Kim, H., S., 2015. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. [Biotechnology Advances Volume 33, Issue 7](#), 15 November 2015, Pages 1443-1454.
- Çilingir, E., Ç., 2018. Mikrodalga Destekli Asit ve Alkali Ön Arıtımın Tavuk Atıklarından Biyogaz Üretimine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Dahle, J., Frey H., R., Haas L., Kaaden O. R., Liess B, Moening V., 1994. *Virologie I und Virologie II*. Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule, Hannover.
- Demir, E., 2019. Arıtma Çamurlarının Anaerobik Çürütülmesinde Hidrodinamik Kaviteleşmenin Biyogaz Verimine Etkisi. Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı. Bursa.
- Deublein, D., Steinhauser, A., 2008. *Biogas from waste and renewable resources*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Deublein, D., Steinhauser, A., 2011. *Biogas from Waste and Renewable Resources: an Introduction*. John Wiley & Sons, Weinheim.
- Dhawan, S., Lal, R., Kuhad, R., C., 2003. Ethidium bromide stimulated hyper laccase production from bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. *Letters in Applied Microbiology* 36(1):64-7. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2003.01267.x.
- Duan, H., Li X., Mei A., Li P., Liu Y., Li X., Li W., Wang C., Xie S., 2021. The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in infectious diseases. *BMC Infectious Diseases* 21:62.

- Eisenstark, A., Eisenstark, R., Vansicle, R., 1965. Isolation of mutants. *Mutation Research*, 2: 1-10.
- Elleuche, S., Schröder, C., Sahm, K., Antranikian, G., 2014. Extremozymes-biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. [Current Opinion in Biotechnology Volume 29](#), October 2014, Pages 116-123.
- ETKB, 2019. Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı, Enerji İşleri Genel Müdürlüğü, <http://www.yegm.gov.tr/yenilenebilir/biyogaz.aspx> (Erişim tarihi 01.05.2019).
- ETKB, 2021. Türkiye'deki 2020 yılı enerji kaynakları, atık miktarları ve enerji. Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı, Bilgi Merkezi, <https://enerji.gov.tr/bilgi-merkezi-enerji-biyokutle> (erişim tarihi 10.04.2021).
- ETKB, 2022. Türkiye'deki 2022 yılı enerji kaynakları, atık miktarları ve enerji. Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı, Bilgi Merkezi, <https://enerji.gov.tr/bilgi-merkezi-enerji-biyokutle> (erişim tarihi 10.10.2022).
- Erensoy, A., Çek, N., 2020. Mikrobiyal Yakıt Hücrelerinde Kullanılan Saf Kültür Mikroorganizmaları ve Genel Özellikleri. *European Journal of Science and Technology* No. 18, pp. 109-117.
- Ersoy, E., Bayşu N., 1986. *Biyokimya*. A.Ü.Vet. Fak. yay no: 408 A.Ü. Basımevi, Ankara.
- Ertop, H., Aksoy, E., Yücel, A., 2021. Bazı Tarımsal Atıklardan Elde Edilebilecek Kullanılabilir Biyogaz Enerjisi Potansiyelinin Belirlenmesi: Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti Örneği. Bölüm 7. Sayfa: 101:112.
- Fenner, F., Bachman P., A., Gibbs E. P., Murphy F. A., Rott R., Studdert M. J., 1987. *White Do. Veterinary Virology*. Academic press, San Diego.
- Ferraro, A., Massini, G., Miritana, V., M., Signorini, A., Race, M., Fabbricino, M., 2019. A simplified model to simulate bioaugmented anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Biogas production efficiency related to microbiological data. *Science of The Total Environment*. [Volume 691](#), 15 November 2019, Pages 885-895.
- Flint, S., J., Enquist L., W., Krug R., M., Rocaniello U., R., Skalka A., M., 2000. *Principles of Virology*. ASM Press, Washington.
- FNR, 2010. *Biyogaz Üretimi ve Kullanımı El Kitabı (Çeviri)*. (5. baskı). FNR Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (Yenilenebilir Hammaddeler İhtisas Ajansı), 261s, Gülzow-Prüzen.

- FNR, 2013. Entwicklung Biogasanlagen <http://mediathek.fnr.de/grafiken/daten-undfakten/bioenergie/biogas/entwicklung-biogasanlagen.html> adresinden 18 Haziran 2019 tarihinde edinilmiştir.
- Foster, P., L., 2000. Adaptive mutation: implications for evolution. [Bioessays. 2000 Dec; 22\(12\): 1067-1074.](#)
- Fotidis, I., A., Treu, L., Angedaki, I., 2017. Enriched ammonia-tolerant methanogenic cultures as bioaugmentation inocula in continuous biomethanation processes. *Journal of Cleaner Production* 166. 1305-1313.
- Gelegenis, J., Georgakakis, D., Angelidaki, I., Mavris, V., 2007. Optimization of biogas production by co-digesting whey with diluted poultry manure. *Renewable Energy* 32: 2147-2160.
- Gerardi, M., H., 2003. *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. John Wiley & Sons, Inc., 177p, Hoboken, New Jersey.
- Gidstedt, S., 2017. Production of volatile fatty acids by hydrolysing sludge from Sjölunda WWTP.
- Golyasnaya, N., V., Turina, N., A., 2000. Culture age of *Escherichia coli* and the frequency of mutation induced by N-methyl-N-Nitro-N-Nitroso guanidin. *Microbiology*, 69(6): 684-688.
- Göde, E., 2019. Helisel Tübüler Biyogaz Reaktörünün Tasarımı, Yapımı ve İşletilmesi: Sığır Gübresi Uygulama Örneği. Yüksek Lisans Tezi. Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Isparta.
- Görmüş, C., 2018. Türkiye'deki Hayvan Gübrelerinin Biyogaz Enerji Potansiyelinin Belirlenmesi. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 78. Tekirdağ.
- Grady, C., P., J., L., Daigger, G., T., Love, N., G., Filipe, C., D., M., 2011. *Biological Wastewater Treatment (3rd Edition)*. CRC Press, 1022p, London.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., Rai, V., 2013. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. Review Article. Open Access. Volume 2013. Article ID 329121. <https://doi.org/10.1155/2013/329121>.
- Güenalp, A., Ayter, Ş., Lüleci, G., Kart, A., Sakızlı, M., 1986. *Tıbbi Biyoloji*. Meteksan yayınları, Ankara.
- Hakamada, Y., Koike, K., Yoshimatsu, T., Mori, H., Kobayashi, T., Ito, S. 1997. Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate, *Bacillus sp.* KSM-S237. *Extremophiles*, 1: 151-156.

- Han D., Li Z., Li R., Tan P., Zhang R., Li J., 2019. mNGS in clinical microbiology laboratories: on the road to maturity. *Critical Reviews in Microbiology* 45:668-685.
- Hang, W., Zhao, Y., Chen, H., 2016. Study on biogas production of joint anaerobic digestion with excess sludge and kitchen waste. *Procedia*, 35 (2016), 756-762.
- Haq, I., Ali, S., Javed, M.M., Hameed, U., Saleem, A., Adnan, F., Qadeer, M. A., 2010. Production of alpha amylase from a randomly induced mutant strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application as a desizer in textile industry. *Pakistan Journal of Botany*, 42(1): 473-484.
- Hayward, M., R., AbuOun M., La Ragione R., M., Tchórzewska M., A., Cooley W., A., Everest D., J., Petrovska L., Jansen V., A., Woodward M., J., 2014. SPI-23 of *S. Derby*: role in adherence and invasion of porcine tissue. *PLoS One*. 19;9(9):e107857.
- Hendriks, A., T., W., M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100 (1), 10–18.
- Henze, M., Loosdrecht, M., C., M., Ekama, G., A., Brdjanovic, D., 2008. *Biological Wastewater Treatment : Principles. Modelling and Design*. IWA Publishing, 511p, London.
- Hopwood, D., A., 1970. Isolation of mutants. *Methods in Microbiology*, vol. 3A, p. 3363. Academic Press, New York.
- Hosoda, M., Hashimoto, H., Morita, H., Chiba, M., 1992. Antimutagenicity of Milk Cultured with Lactic Acid Bacteria Against N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine. *Dairy Sci* 75:976—981.
- Hu, Y., Hao, X., Wang, J., Cao, Y., 2016. Enhancing anaerobic digestion of lignocellulosic materials in excess sludge by bioaugmentation and pre-treatment. *Waste Management* 49. 55–63.
- Hultman, S., Alshwan Z., 2019. Production of volatile fatty acids from anaerobic digestion using food waste, sludge and cow manure.
- Illanes, A., Cauerhff, A., Wilson, L., Castro, G., R., 2012. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technology*. Volume 115, July 2012, Pages 48-57.
- Immanuel, G., Dhanusha, R., Prema, P., Palavesam, A., 2006. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *Internat J Environmental Science and Technology* 3:25-34.

- Inman, M., Lovato, L., Doster, A., Jones, C., 2002. A mutation in the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 disrupts the latency reactivation cycle in calves. *Journal of Virol*; 76: 6771-6779.
- İbrahim, G., M., Morin P., M., 2018. *Salmonella* Serotyping Using Whole Genome Sequencing. *Front Microbiol.* 13;9:2993.
- İlkiliç, C., Deviren, H., 2011. Biyogazın Üretimi ve Üretimi Etkileyen Faktörler. In 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11), Elazığ, Turkey, 16-18.
- Janosch, D., Dubbert, S., Eiteljörge, K., Diehl, B., W., K., Sonnenborn, U., Passchier, L., V., Waassenaar, T., M., Büнау, R., 2019. Anti-genotoxic and anti-mutagenic activity of *Escherichia coli* Nissle 1917 as assessed by in vitro tests. *Beneficial Microbes*, 2019; 10(4): 449-461.
- Javed, M., M., Haq, I., Mariyam, I., 2011. Multistep mutagenesis for the over-expression of cellulase in *Humicola insolens*. *Pakistan Journal of Botany* 43(1):669-677.
- Johnson, D., K., Elnder, R., T., 2009. Pretreatments for Enhanced Digestibility of Feedstocks. Blackwell Publishing Ltd, New Jersey, A.B.D.
- Kapluhan E., 2014. Enerji Coğrafyası Açısından Bir İnceleme: Biyokütle Enerjisinin Dünyadaki ve Türkiye'deki Kullanımı. *Marmara Coğrafya Dergisi*, Sayı: 30, Temmuz - 2014, s.97-125.
- Kasarcı, A., O., 2012. Yemekhane ve Hayvan Atıklarından Bioenerji Geri Kazanımı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Katukuri, N., R., Fu, S., He, S., Xu, X., Yuan, X., Yang, Z., Guo, R., B., 2017. Enhanced methane production of *Miscanthus floridulus* by hydrogen peroxide pretreatment. *Fuel*. [Volume 199](#), 1 July 2017, Pages 562-566.
- Kaya, D., Öztürk, H., H., 2012. Biyogaz Teknolojisi: Üretim-kullanım-projeleme. *Ümüttepe Yayınları, İzmit/Kocaeli*, 253.
- Kendir, E., Uğurlu, A., 2018. A comprehensive review on pretreatment of microalge for biogas production. *International Journal of Energy Research*, 1-21. DOI: 10.1002/er.4100.
- Khanal, S., K., 2008. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*. Wiley-Blackwell, 301p, Iowa.
- Khodayari, F., 2013. Yem Katkısı Olarak Kullanılan Enzimleri Üreten Yeni Bakteri Suşlarının İzolasyonu, Mutasyonu ve Enzim Üretimindeki

Etkinliklerinin Saptanması. Doktora Tezi. Çukuruva Üniversitesi. Zootekni Anabilim Dalı. Adana.

- Kivisaar, M., 2003. Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. [Environmental Microbiology. Volume 5, Issue 10](#) p. 814-827.
- Klein, J., 2002. Anaerobic wastewater treatment-the anaerobic digestion of lipids, *Tampere University of Technology, Department of Environmental Engineering*.
- Klug, W., S., Cummings, M. R., 2002. Genetik Kavramlar. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Koç, Y., Yağlı, H., Koç, A., 2019. Exergy Analysis and Performance Improvement of a Subcritical/Supercritical Organic Rankine Cycle (ORC) for Exhaust Gas Waste Heat Recovery in a Biogas Fuelled Combined Heat and Power (CHP) Engine through the Use of Regeneration. *Energies*, 12(4), 575.
- Koçar, G., Eryaşar, A., Ersöz, Ö., Arıcı Ş., Durmuş A., 2010. Biyogaz teknolojileri. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, Turkey.
- Koçar, G., Eryaşar, A., Ersöz, Ö., Arıcı, Ş., Bayrakçı, G., Aytav, E., 2013. Kırsal Kesim Biyogaz Teknolojilerinin Geliştirilmesi ve Yaygınlaştırılması Gündümlü Teknoloji Geliştirme Projesi Proje No: 07/Dpt/003.
- Koyuncu, M., Akgün, H., 2017. Çiftlik Hayvanları ve Küresel İklim Değişikliği Arasındaki Etkileşim. *U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2018, Cilt 32, Sayı 1, 151-164.
- Koyuncu, S., Nas, B., 2022. Anaerobik Çamur Çürütücülerde Farklı Katı Madde Alıkonma Sürelerinde Uçucu Yağ Asitleri ve Alkalinitenin Biyogaz Üretim Verimine Etkileri. *Journal of Engineering Sciences and Design*. 10(1), 103 – 109.
- Krauzer, N., K., 1988. Genetic variation and exchange. In. Zinsser Microbiology eds. Joklik W.,F., Practici-Hall int., USA, 103-110.
- Krootdilaganandh, J., 2000. Isolation and selection of thermotolerant bacteria capable of producing cellulase. Chiang Mai. Chiang Mai University Press. 20-21.
- Kubicek, C., Druzhinina, I., 2005. Species Concepts and Biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from Aggregate Species to Species Clusters. *Journal of Zhejiang University Science B*, 6(2):100-112.
- Kumar, V., Rawat, J., Patil, R., C., Barik, C., R., Purohit, S., Jaiswal, H., Fartyal, N., Goud, V., V., Kalamdhad, A., S., 2021. Exploring the functional

significance of novel cellulolytic bacteria for the anaerobic digestion of rice straw. *Renewable Energy*. [Volume 169](#), May 2021, Pages 485-497.

- Labatut, R., A., Angenent, L., T., Scott, N., R., 2011. Biochemical Methane Potential and Biodegradability of Complex Organic Substrates. *Bioresource Technology*, 102(3), 2255–2264.
- Lakaputhra, W., E., V., Shah, N., P., 1998. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. *Mutation Research* 397:169-182.
- Lasekan, A., Abu Bakar, F., Hashim, D., 2012. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. *Waste management*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2012.08.001>.
- Lee, J., Koo T., Yulisa A., Hwang S., 2019. Magnetite as an enhancer in methanogenic degradation of volatile fatty acids under ammonia-stressed condition. *Journal of environmental management*. [PubMed 31035235](#) Doi: 10.1016/j.jenvman.2019.04.038.
- Lee, W., S., Chua, A., S., M., Yeoh, H., K., Ngoh, G., C., 2014. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chemical Engineering Journal*, vol. 235, pp. 83-99.
- Lee, J., T., E., Lim, E., Y., Zhang, L., T., H., Tsui, Tian, H., Yan, M., Lim, S., Majid, M., A., Jong, M., C., Zhang, J., Wang, C., H., Ok, Y., S., Tong, Y., W., 2022a. *Methanosarcina thermophila* bioaugmentation and its synergy with biochar growth support particles versus polypropylene microplastics in thermophilic food waste anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 360 (2022) 127531.
- Lee, J., T., E., Dutta, N., Zhang, L., Tsui, T., T., H., Lim, S., Kai, T., Z., Lim, E., Y., Jiachen, S., Zhang, J., Wang, C., Ok, Y., S., Ahring, B., K., Tong, Y., W., 2022b. Bioaugmentation of *Methanosarcina thermophila* grown on biochar particles during semi-continuous thermophilic food waste anaerobic digestion under two different bioaugmentation regimes. [Bioresource Technology](#) 360 (12): 127590. DOI: [10.1016/j.biortech.2022.127590](#).
- Lennette, E., H., Balows, A., Hausler, J., W., JR., Shadomy, J.H., 1985. *Manual of Clinical Microbiology*. Vol. 4 Amerika. P: 1149.
- Lerminiaux, N., A., MacKenzie K., D., Cameron A., D., S., 2020. *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1): The Evolution and Stabilization of a Core Genomic Type Three Secretion System. *MicroorganismS*. 8(4):576.
- Lin, L., L., Hsu, W., H., Chu, W., S., 1997. A gene encoding for an  $\beta$ -amylase from thermophilic *Bacillus sp.* Strain TS-23 and its expression in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol*, 82: 325-334.

- Liu, Z., G., Zhou, X., F., Zhang, Y., L., Zhu, H., G., 2012. Enhanced anaerobic treatment of CSTR-digested effluent from chicken manure: The effect of ammonia inhibition. *Waste Management* 32 : 137–143.
- Luo, G., Xie, L., Zou, Z., Wang, W., Zhou, Q., Shim, Z., 2010. Anaerobic treatment of cassava stillage for hydrogen and methane production in continuously stirred tank reactor (CSTR) under high organic loading rate (OLR). *International journal of hydrogen energy* 35 : 11733 -11737.
- Maki, H., 2002. Origins of spontaneous mutations: specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequence-substitution mutagenesis. *Annual Review of Genetics*, 36: 279-303.
- Megent, R., 1965. Screening by visual examination of colonies. *Mutation Research*, 2: 328-331.
- Metcalf & Eddy, 2003. *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*, McGraw-Hill inc, New York.
- Metcalf & Eddy, Tchobanoglous, G., Stensel, H.D., Tsuchihashi, R., Burton, F.L., Franklin L., Abu-Orf, M., Pfarr, W., 2014. *Wastewater Engineering : Treatment and Resource Recovery*. (5th Edition). McGraw-Hill Education, 2018p, New York.
- Michael, T., M., John M., M., 2012. *Brock Biology of Microorganisms*. Thirteenth Edition. Pearson Education. Inc. Publishing as Prentice Hall.
- Mohammad, B., T., Al Daghistani, H., I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., Kennes, C., (2017). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Jordanian hot 76 springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* isolates as potential producers of thermostable enzymes. *International Journal of Microbiology*, 2017, 1-12.
- Motasem, F., Afzal, M., T., 2013. A review on the microwave-assisted pyrolysis technique. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 28, 317-330.
- Nabilasani, G., Trismilah, C., Suhendar, D., Mubarik, N., R., 2019. Lipase Production by Mutant Fungal Isolates for Transesterification. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*. 2019,6 (1), 20-28.
- Öner, B., E., Akyol, Ç., Bozan, M., İnce, O., Aydın, S., İnce, B., 2018. Bioaugmentation with *Clostridium thermocellum* to enhance the anaerobic biodegradation of lignocellulosic agricultural residues. *Bioresource Technology* 249. 620–625.
- Önyeché, T., I., Schläfer, O., Bormann, H., Schröder, C., Sievers, M., 2002. Ultrasonic cell disruption of stabilised sludge with subsequent anaerobic digestion. *Ultrasonics*, 40 (8), 31–35.

- Özalpar, B., 2018. Proteazın Üretimini Arttırmak için Kimyasal Mutagenез (Etidyum Bromid, Etbr) ve Fiziksel Mutagenез (UV) Yoluyla *Bacillus Subtilis* E6-5'den Mutant Suş Geliştirilmesi ve Üretim Ortamının Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Biyoloji Anabilim Dalı. Bursa.
- Özbayram, E., G., Kleinstеuber, S., Nikolausz, M., İnce, B., İnce, O., 2017. Effect of bioaugmentation by cellulolytic bacteria enriched from sheep rumen on methane production from wheat straw. *Anaerobe*. [Volume 46](#), August 2017, Pages 122-130.
- Özdemir, K., Demirkan, E., 2020. Ethyl Methanesulfonate (EMS) Mutation for Hyper Protease Production by *Bacillus subtilis* E6-5 and Optimization of Culture Conditions. *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 2020, 48 (4), 355-365.
- Özkan, K., 2016. Biyolojik Çeşitlilik Bileşenleri ( $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$ ) Nasıl Ölçülür?. Süleyman Demirel Üniversitesi. Orman Fakültesi. Isparta. Yayın No:98, Sayfa 128.
- Öztürk, İ., 1999. Anaerobik Biyoteknoloji ve Atık Arıtımındaki Uygulamaları. İstanbul Teknik Üniversitesi, İnşaat Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, İstanbul, 320 s.
- Öztürk, İ., Timur, H. ve Koşkan, U., 2005. Atıksu arıtımının esasları, T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı, Ankara.
- Öztürk, M., 2005. Hayvan Gübresinden Biyogaz Üretimi. Çevre ve Orman Bakanlığı, Ankara, 53 s.
- Öztürk, İ., 2007. Anaerobik Arıtma ve Uygulamaları, Su Vakfı Yayınları, İstanbul.
- Paradis, S., Ailion, M., Toker, A., Thomas, J., H., Ruvkun, G., 2017. A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN 0890-9369/99.
- Pöschl, M., Ward, S., and Owende, P., 2010. Evaluation of energy efficiency of various biogas production and utilization pathways, *Applied Energy*, volume 87, Issue 11, November, Pages 3305-3321.
- Prasertsan, P., 2021. Enhanced biogas production by co-digestion of crude glycerol and ethanol with palm oil mill effluent and microbial community analysis. *Biomass and Bioenergy*. [Volume 148](#), May 2021, 106037.
- Qasim, S., R., Chiang, W., 1994. Sanitary Landfill Leachate Generation, Control and Treatment, Technomic Publishing Company, Switzerland.

- Qian, Y-Y., Wang, H-Y., Zhou, Y., Zhang, H-C., Zhu, Y., M., Zhou, X., Ying, Y., Cui P., Wu, H-L., Zhang, W-H., Jin, J-L., Ai, J-W., 2021. Improving Pulmonary Infection Diagnosis with Metagenomic Next Generation Sequencing. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 10:567615-567615.
- Raju, E., V., N., Divakar, G., Swetha, C., Geetha, J., Satish, P., 2012. Strain improvement of *Aspergillus niger* for glucoamylase by physical and Chemicalmutagens. *International Research Journal of Pharmaceutical Applied Sciences*, 2(2): 79-91.
- Ramig, R., F., 1990. Principles of Animal Virus Genetics. (In:Virology 2nd eds.). Fields, B.N., Knipe, D.M. Raven press, London, 95-144.
- Rao, M., B., Tanksale, A., M., Gathe, M., S., Deshpande, V., V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2(3): 597-635.
- Raza, A., Bashir, S., Tabassum, R., 2019. Evaluation of Cellulases and Xylanases Production from *Bacillus* spp. Isolated from Buffalo Digestive System. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 25 (1): 39-46, 2019 DOI: 10.9775/kvfd.2018.20280.
- Rouches, E., Zhou, S., Sergent, M., Raouche, S., Carrere, H., 2018. Influence of white-rot fungus *Polyporus brumalis* RFM 985 culture conditions on the pretreatment efficiency for anaerobic digestion of wheat straw. *Biomass and Bioenergy*. [Volume 110](#), March 2018, Pages 75-79.
- Salminen, E., A., Rintala, J., A., 2010. Semi-continuous anaerobic digestion of solid poultry slaughterhouse waste: effect of hydraulic retention time and loading. *Water Research* 36 :3175–3182.
- Schober, G., Schafer, J., Schimid, U. and Trosch, U., 1999. One and two-stage digestion of solid organic waste. *Water Research*, 33, 854-860.
- Sevinç, N., 2010. Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* sp. Suslarından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflastırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı. Bursa.
- Sewalt, V., Shanahan, D., Gregg, L. 2016. The generally recognized as Safe (GRAS) process for industrial microbial enzymes. *Indus. Biotechnol.*, 12: 295-302.
- Sidhu, G., S., Sharma, P., Chakrabarti, T., Gupta, J., K., 1997. Strain improvement for the production of a thermostable  $\alpha$ -amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 525-530.
- Shen, R., Jing, Y., 2021. Simultaneous carbon dioxide reduction and enhancement of methane production in biogas via anaerobic digestion

of cornstalk in continuous stirred-tank reactors: The influences of biochar, environmental parameters, and microorganisms. *Bioresource Technology*. [Volume 319](#), January 2021, 124146.

Shetty, D., Joshi, A., Dagar, S. S., Kshirsagar, P., 2020. Bioaugmentation of anaerobic fungus *Orpinomyces joyonii* boosts sustainable biomethanation of rice straw without pretreatment. *Biomass and Bioenergy* 138. 105546.

Shinde, S., D., Yadav, G., D., 2014. Insight into Microwave-Assisted Lipase Catalyzed Synthesis of Geranyl Cinnamate: Optimization and Kinetic Modeling. *Appl Biochem Biotechnol* DOI 10.1007/s12010-014-1367-3.

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P., K., 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*. 6:174 DOI 10.1007/s13205-016-0485-8.

Skraban, R., Matthíasdóttir, S., Torsteinsdóttir, S., Agnarsdóttir, G., Gudmundsson, B., Georgsson, G., Meloen, R. H., Andrésón, O. S., Staskus, K. A., Thormar, H., Andresdottir, V., 1999. Naturally Occurring Mutations within 39 Amino Acids in the Envelope Glycoprotein of Maedi-Visna Virus Alter the Neutralization Phenotype. *Journal of Virology*; 73: 8064-8072.

Smith, D., R., Stamm, L., A., S., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakelt, D., et.al. 1997. Complete Genome Sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* DH: Functional Analysis and Comparative Genomics. *Journal of Bacteriology*. Nov. 1997, p. 7135-7155.

Sosnowski, P., Smolka, K., A., Kaczorek, K., Ledakowicz, S., 2008 Kinetic investigations of methane co-fermentation of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes, *Bioresource Technology*, 99, 5731-5737.

Suribabu, K., Govardhan, T., L., Hemalatha, K., P., J., 2014. Strain Improvement of *Brevibacillus borostelensis* R1 for Optimization of  $\alpha$ -Amylase Production by Mutagens. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. *Microb Biochem Technol* 2014, 6:3. DOI: 10.4172/1948-5948.1000132.

Strazzera, G., Battista, F., Garcia, N., H., Frison, N., Bolzonella, D., 2018. Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review. *Journal of Environmental Management*, pp. 278-288.

Şafak, H., 2019. *Haloarcula* sp. Ve *Halolamina* Sp. Suşlarında Selülaz Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Samsun.

- Şenol, H., Elibol, E., A., Açikel, Ü., 2017. "iyogaz üretimi için Ankara'nın başlıca organik atık kaynakları. Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 6 (2), 15- 28.
- Şenol, H., Demir, S., Elibol, E., A., 2020. "Farklı meyve atıkları ve organik ham tavuk gübresi atıkları karışımlarından termal ön işlem uygulanarak biyogaz üretiminin incelenmesi", Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University 35:2. 979-990.
- Takahiro, M., Koichi, W., Junji, F., Yukiko, K., Toshihiko, T., Kazumasa, M., Ryuichiro, T., 2004. Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-Targeted Species-Specific Primers for Analysis of Human Intestinal Bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 167–173.
- Tanaka, Y., Morikawa, K., Ohki, Y., Yao, M., Tsumoto, K., Watanabe, N., Ohta, T., Tanaka, I., 2007. Structural and Mutational Analyses of Drp35 from *Staphylococcus aureus*. The Journal of Biological Chemistry Vol. 282, NO. 8, pp. 5770–5780, February 23, 2007. DOI 10.1074/jbc.M607340200.
- Taherzadeh, M., J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9 (9), 1621–1651.
- Takizawa, S., Baba, Y., Tada, C., Fukuda, Y., Nakai, Y., 2018. Pretreatment with rumen fluid improves methane production in the anaerobic digestion of paper sludge. [Waste Management Volume 78](#), August 2018, Pages 379-384.
- Tchobanoglous, G., Theisen, H., Vigil, S.A., 1993. *Integrated Solid Waste Management*, McGraw-Hill Book Co., Singapore.
- Temiz, A., 1994. Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri. Hatipoğlu Yayınları, Ankara. S: 26-120.
- Tirumale, S., Nand, K., 1994. Influence of anaerobic cellulolytic bacterial consortia in the anaerobic digesters on biogas production. *Biogas Forum III*, 58, pp. 12-15.
- Tonoyan, L., Friel, R., O'Flaherty, V., 2020. Mutation rate and efflux response of bacteria exposed to a novel antimicrobial iodo-thiocyanate complex. [Journal of Global Antimicrobial Resistance Volume 22](#), September 2020, Pages 13-17.
- Toru, M., F., 2022. Bazı *Actinobacteria* Türlerinin Enfeksiyon Etkeni *Pseudomonas Spp.*, *Staphylococcus Spp.* ve *Proteus Spp.* İzolatları Üzerine Antimikrobiyal Etkilerinin Deneysel Ve Tüm Genom Tabanlı Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Kırşehir.

- Tripathi, U., Venkateshwaran, G., Sarada, R. and Ravishankar, G. A., 2001. Studies on *Haematococcus pluvialis* for improved production of astaxanthin by mutagenesis. *World Journal of Microbiology and Biothecnology*, 17: 143-148.
- Tsapetos, P., Kougias, P., G., Vasileiou, S., A., Treu, L., Campanaro, S., Lyberatos, G., Angelidaki, I., 2017. Bioaugmentation with hydrolytic microbes to improve the anaerobic biodegradability of lignocellulosic agricultural residues. *Bioresource Technology*. [Volume 234](#), June 2017, Pages 350-359.
- Tuesorn, S., Wongwilaiwalin, S., Champreda, V., Leethochawalit, M., Nopharatana, A., Techkarnjanaruk, S., Chaiprasert, P., 2013. Enhancement of biogas production from swine manure by a lignocellulolytic microbial consortium. *Bioresource Technology*. [Volume 144](#), September 2013, Pages 579-586.
- Tukanghan, W., Hupfauf, S., Brandón, M., G., Insam, H., Salvenmoser, W., Prasertsan, P., Cheirsilp, B., Thong, S., 2021. Symbiotic *Bacteroides* and *Clostridium*-rich methanogenic consortium enhanced biogas production of high-solid anaerobic digestion systems. *Bioresource Technology Reports*. [Volume 14](#), June 2021, 100685.
- Turan, M., K., Günay, Ö., C., Kayış, S., A., Çörtük, M., 2016. 16S rRNA In Microbiota and Basic Bioinformatics Analysis. *Research Article. Journal of BSHR*. 2(1):23-34.
- Türker, M., 2008. Pakmaya, İzmit. ÇEVKOR Çevre Koruma ve Araştırma Vakfı Çevre Eğitimi Merkezi Yayınları: 8- syf:20-21.
- Tüzün, C., 1999. *Organik Kimya*. Palme Yayınları, Ankara, Türkiye.
- Uğurluer, S., G., 2022. Denizel Kökenli Asidik Proteaz Enzim Üreticisi *Bacillus Sp.* Suşlarının İzolasyonu, Enzim Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Kullanım Olanakları. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 119 s.
- Urrutia, I., M., Fuentes, J., A., Valenzuela, L., M., Ortega, A., P., Hidalgo, A., A., Mora, G., C., 2014. *Salmonella Typhi* shdA: pseudogene or allelic variant? *Infect Genet Evol.* 2014;26:146-52.
- Üçok, S., 2016. Sebze ve Meyve Pazar Atıklarının Biyogaz Üretim Potansiyelinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Entsitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 52 s.
- Vandamme, P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*; 60(2): 407-38.

- Verma, S., 2002. Anaerobic Digestion of Biodegradable Organics in Municipal Solid Wastes. Columbia University, Department of Earth and Environmental Engineering, New York, United States of America, 50 pp.
- Vijayalekshmy, M., V., 1985. *Biogas Technology Information Package*. Bombay: Tata Energy Research Institute.
- Wainaina, S., Parchami, M., Mahboubi, A., Sárvári Horváth, I., Taherzadeh, M. J., 2019. Food waste-derived volatile fatty acids platform using an immersed. *Bioresource Technology*, pp. 329-334.
- Wainaina, S., 2020. Developing a food waste-based volatile fatty acids platform using an immersed membrane bioreactor. *Skrifter fran Högskolan ve Boras*, ISSN 0280-381X; 107.
- Wahyudi, A., Hendraningsih, L., Malik, A., 2010. Potency of fibrolytic bacteria isolated from Indonesian sheep's colon as inoculum for biogas and methane production. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 9 No. 20.
- Ward, A., J., Hobbs, P., J., Holliman, P., J., Jones, D., L., 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology* 99 - 7928-7940.
- Weinrich, S., Schäfer, F., Bochmann, G., Liebetrau, J., 2018. Value of Batch Tests for Biogas Potential Analysis. *IEA Bioenergy* (C. 10).
- Weiß, S., Tauber, M., Somitsch, W., Meincke, R., Müller, H., Berg, G., Guebitz, G., M., 2010. Enhancement of biogas production by addition of hemicellulolytic bacteria immobilised on activated zeolite. *Water Research*. [Volume 44, Issue 6](#), March 2010, Pages 1970-1980.
- Xu, W., Fu, S., Yang, Z., Lu, J., Guo, R., 2018. Improved methane production from corn straw by microaerobic pretreatment with a pure bacteria system. *Bioresource Technology*. [Volume 259](#), July 2018, Pages 18-23.
- Xu, Z., Zhao, M., Miao, H., Huang, Z., Gao, S., Ruan, W., 2014. In situ volatile fatty acids influence biogas generation from kitchen wastes by anaerobic digestion, *Bioresource Technology*, 163, 186-192.
- Yadvika, S., Sreekrishnan, T., R., Kohli, S., Rana, V. 2004. Enhancement of Biogas Production from Solid Substrates using Different Techniques, *Bioresource Technology*, 95(1): 1-10.
- Yahmed, N., B., Carrere, H., Marzouki, N., Smaali, I., 2017. Enhancement of biogas production from *Ulva* sp. by using solid-state fermentation as biological pretreatment. *Algal Research*. [Volume 27](#), November 2017, Pages 206-214.

- Yan, M., Treu, L., Campanaro, S., Tian, H., Zhu, X., Khoshnevisan, B., Tsapekos, P., Angelidaki, I., Fotidis, I., A., 2020. Effect of ammonia on anaerobic digestion of municipal solid waste: Inhibitory performance, bioaugmentation and microbiome functional reconstruction. *Chemical Engineering Journal* 401. 126159.
- Yang, B., Wang, Y., Qian, P., Y., 2016. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*. 17: p. 135.
- Yeşilbağ, K., 2002. Mutasyonel Değişimler ve Veteriner Virolojideki Önemi. Uludağ Üniversitesi. *Journal of Research in Veterinary Medicine*. 21. 125-131.
- Yıldırım, E., İnce, O., Aydın, S., İnce, B., 2017. Improvement of biogas potential of anaerobic digesters using rumen fungi. *Renewable Energy*. [Volume 109](#), August 2017, Pages 346-353.
- Yılmaz, İ., T., Gümüş, M., A., 2017. Research on biogas-diesel dual fuel diesel engine. *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 32 (3), 919-927.
- Yin, D., M., Qiao, W., Negri, C., Adani, F., Fan, R., Dong, R., J., 2019. Enhancing hyper-thermophilic hydrolysis pre-treatment of chicken manure for biogas production by in-situ gas phase ammonia stripping. *Bioresource Technology*. [Volume 287](#), September 2019, 121470.
- Yoneda, F., Koga, R., Nishigaki, S., Fukazawa, S., 1982. A synthesis of lumazine derivatives. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 19, 4.
- Zhang, B., Zhang, L.-L., Zhang, S.-C., Shi, H.-Z., Cai, W.-M., 2005. The Influence of pH on Hydrolysis and Acidogenesis of Kitchen Wastes in Two-phase Anaerobic Digestion. *Environmental Technology*, pp. 329-340
- Zhang, P., Chen, Y., Zhou, Q., 2009. Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under mesophilic and thermophilic conditions: Effect of pH. *Water Research*, vol. 43, no. 15, pp. 3735-3742.
- Zhang, J., Guo, R., B., Qiu, L., Qiao, J., T., Yuan, X., Z., Shi, X., S., Wang, C., S., 2015. Bioaugmentation with an acetate-type fermentation bacterium *Acetobacteroides hydrogenigenes* improves methane production from corn straw. *Bioresource Technology*. [Volume 179](#), March 2015, Pages 306-313.
- Zhang, S., Chang, J., Liu, W., Pan, Y., Cui, K., Chen, X., Liang, P., Zhang, X., Wu, Q., Qui, Y., Huang, X., 2018. A novel bioaugmentation strategy to accelerate methanogenesis via adding *Geobacter sulfurreducens* PCA in anaerobic digestion system. *Science of the Total Environment* 642 (2018) 322–326.

Zhong, W., Zhang, Z., Yijing, Z., Shanshan, L., Qiao, S., W., Xiao, M., 2011. Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production. *Bioresource Technology*. [Volume 102, Issue 24](#), December 2011, Pages 11177-11182.

