



T.C.
KONYA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



BİYOLOJİK YÖNTEMLE ENDÜSTRİYEL
ATIKSULARDAN BİYOPOLİMER DEPOLAMA
ŞARTLARININ BELİRLENMESİ

Büşranur ÖZTUNÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

Mayıs 2022
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Büşranur Öztunç tarafından hazırlanan “Biyolojik Yöntemle Endüstriyel Atıksulardan Biyopolimer Depolama Şartlarının Belirlenmesi” adlı tez çalışması 17/06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Konya Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Mustafa ACAROĞLU

.....

Danışman

Prof. Dr. Dilek ERDİRENÇELEBİ

.....

Üye

Prof. Dr. Bilgehan NAS

.....

Üye

Prof. Dr. Mustafa ACAROĞLU

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Saadettin Erhan KESEN
Enstitü Müdürü

Bu tez çalışması Konya Teknik Üniversitesi tarafından 201001074 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Büşranur Öztunç
Tarih:10/04/2022

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

BİYOLOJİK YÖNTEMLE ENDÜSTRİYEL ATIKSULARDAN BİYOPOLİMER DEPOLAMA ŞARTLARININ BELİRLENMESİ

Büşranur ÖZTUNÇ

Konya Teknik Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Dilek ERDİRENÇELEBİ

2022, 92 Sayfa

Jüri

Danışman: Prof. Dr. Dilek ERDİRENÇELEBİ
Prof. Dr. Bilgehan NAS
Prof. Dr. Mustafa ACAROĞLU

Günümüzde her alanda kullanılabilen petrol türevli plastikler, kaynakların sınırlı olması, doğada uzun süre parçalanmadan kalması, çevreye ve canlılara zarar vermesi nedeniyle yerini biyoplastiklere bırakmaya başlamıştır. Biyoplastikler toksik olmayan, canlı bünyesiyle biyouyumlu ve karbon ayak izinin düşük olması gibi avantajlarla öne çıkmaktadır. Her ne kadar petrol türevli plastiklere alternatif olarak kabul edilse de henüz endüstriyel üretim düzeyine ulaşamamıştır.

Biyoplastikler organik katı atıklar, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi yenilenebilir biyolojik kaynaklardan elde edilen plastiklerdir. Saf ve karışık kültür mikroorganizmalar tarafından karbon kaynağı varlığında ve nütrient ve iz metal eksikliğinde Poli-β-hidroksibütirat (PHB) biyopolimeri sentezlenerek depolanır. PHB üretiminde alternatif karbon kaynaklarının arasında endüstriyel atıksuların organik içerikleri de bulunmaktadır. Özellikle gıda endüstrisi atıksularının karbon kaynağını olarak kullanılmasıyla üretim maliyeti düşürebilmektedir. Üretim aşamasında C/N oranı, çamur yaşı, sıcaklık ve çözünmüş oksijen konsantrasyonu gibi parametreler oldukça önemlidir.

Bu tez çalışmasının temel amacı meyve suyu endüstrisi atıksuyunu karbon kaynağı olarak kullanarak, karışık kültürle PHB biyopolimerini maksimum seviyede elde etmek için uygulanabilecek optimum proses şartlarını belirlemektir. Sentetik vişne suyu üretim atıksuyunun yanı sıra azot ve fosfor kaynağı olarak evsel atıksu kullanılmıştır. Aerobik biyolojik çalışma, atıksu arıtım tesisinden elde edilen karışık kültürlerle ardışık kesikli reaktörde tokluk ve açlık fazları ile günlük 2 döngü, 20, 28 ve 30°C olmak üzere 3 farklı sıcaklık seviyesi, C/N oranı 30, 40 ve 60 g KOİ/g N, çamur yaşı 1, 2, 5 ve 10 gün seviyelerinde işletilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda maksimum PHB biyopolimeri üretimi için optimum şartlar, 28°C, C/N 40 ve çamur yaşı 5 gün olarak belirlenmiştir. Sıcaklığın 28°C'ye çıkarılmasıyla C/N 30, 40 ve 60'ta PHB üretimi artarak gerçekleşmiştir. Sıcaklık arttıkça PHB üretim oranı da artmıştır. Çamur yaşı 1, 2, 5 ve 10 gün için yapılan çalışmalarda en yüksek PHB üretimi çamur yaşı 5 gün için gerçekleşmiştir. Çamur yaşı 1 gün için bazı numunelerde PHB üretimi yoktur. Çamur yaşı 10 gün için alınan numunelerde, çamur yaşı 5 güne göre PHB üretim oranı daha düşüktür. C/N oranı 30, 40 ve 60 arasında en yüksek üretim oranı C/N 40'ta gerçekleşmiştir. Bakteri düşük C/N oranlarında (C/N 30) ortamdaki karbonu büyüme ve çoğalma için kullanırken, ortamdaki yüksek karbon miktarından da olumsuz etkilenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ardışık Kesikli Reaktör, Biyopolimer, Karışık kültür, Meyve suyu atıksuyu, Polihidroksibütirat (PHB).

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINATION OF BIOPOLYMER STORAGE CONDITIONS FROM INDUSTRIAL WASTEWATER BY BIOLOGICAL METHOD

Büşranur ÖZTUNÇ

**Konya Technical University
Institute of Graduate Studies
Department of Environmental Engineer**

Advisor: Prof. Dr. Dilek ERDİRENÇELEBİ

2022, 92 Pages

Jury

**Advisor: Prof. Dr. Dilek ERDİRENÇELEBİ
Prof. Dr. Bilgehan NAS
Prof. Dr. Mustafa ACAROĞLU**

Petroleum-derived plastics having limited resources, resistance to biodegradation in the environment and hazardous character for living organisms can be replaced by bioplastics which stand out with their advantages such as being non-toxic, biocompatible with the living body and low carbon footprint. Although they are accepted as alternatives to petroleum-derived plastics, their production has not yet reached the industrial level.

Bioplastics are plastics derived from renewable biological resources such as organic solid waste, plants, animals and microorganisms. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biopolymer is synthesized and stored by pure and mixed culture microorganisms in the presence of carbon source and nutrient and trace metal deficiency. Among the alternative carbon sources in the production of PHB are the organic contents of industrial wastewater. In particular, the use of food industry wastewaters as the carbon source can reduce production costs. During the production phase, parameters such as C/N ratio, sludge age, temperature and dissolved oxygen concentration are regulated.

The main purpose of this study is to determine the optimum process conditions that can be applied to obtain the maximum level of PHB biopolymer with mixed culture by using the fruit juice industry wastewater as a carbon source. In addition to the synthetic sour cherry juice production wastewater, domestic wastewater was used as the nitrogen and phosphorus source. Mixed sludge culture obtained from the municipal wastewater treatment plant was used for the aerobic biological study, in a sequential batch reactor with feast and famine phases, using 2 cycles per day, 3 different temperature levels (20, 28 and 30°C), C/N ratio 30, 40 and 60 g COD/g N, sludge retention time (SRT) of 1, 2, 5 and 10 d. As a result of the study, optimum conditions for maximum PHB biopolymer production were determined as 28°C, C/N 40 and SRT 5 d. By increasing the temperature to 28°C, PHB production increased at C/N 30, 40 and 60. As the temperature increased, the PHB production rate also increased. In the periods conducted for SRT 1, 2, 5 and 10 d, the highest PHB production occurred for SRT 5 d. There was no PHB production in some samples for SRT 1 d. Biomass had a lower PHB production rate for SRT 10 d than 5 d. The highest production rate was obtained at C/N 40 among 30, 40 and 60 g COD/g N. Bacteria used carbon in the environment for growth and reproduction at low C/N ratios (C/N 30) while their PHB accumulation was adversely affected by the high carbon content.

Keywords: Biopolymer, Fruit Juice wastewater, Mixed culture, Polyhydroxybutyrate (PHB), Sequential Batch Reactor.

ÖNSÖZ

Öncelikle laboratuvar çalışmalarım süresince bana destek olan, bilgileri ve tavsiyeleriyle yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. Dilek ERDİRENÇELEBİ'ye çok teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca desteklerini her zaman hissettiğim annem Nimet ÖZTUNÇ, babam Hasan ÖZTUNÇ ve kardeşim M. Samet ÖZTUNÇ'a ve bu süreçte bana destek olan arkadaşlarıma sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Büşranur ÖZTUNÇ
KONYA-2022



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLO DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Biyopolimer	3
2.2 Poli-β-hidroksibütirat (PHB) Biyopolimeri	4
2.3 PHB' nin Tarihçesi	4
2.4 PHB'nin Genel Özellikleri.....	5
2.5 PHB'nin Fiziksel Özellikleri.....	6
2.6 PHB'nin Kimyasal Özellikleri.....	8
2.7 PHB Kullanım Alanları	9
2.7.1 PHB'nin Veterinerlikte Kullanımı	9
2.7.2 PHB'nin Ziraatte Kullanımı.....	9
2.7.3 PHB'nin Tıp Biliminde Kullanımı	9
2.7.4 PHB'nin Tek Kullanımlık Materyallerin Yapımında Kullanımı	10
2.8 PHB Oluşum Şartları	10
2.9 PHB'nin Parçalanabilirliği.....	11
2.10 PHB Üretimini Etkileyen Faktörler	13
2.10.1 C/N Oranı.....	13
2.10.2 pH	14
2.10.3 Sıcaklık	14
2.10.4 Çamur Yaşı	15
2.10.5 Çözünmüş Oksijen	15
2.11 PHB Üreten Mikroorganizmalar	16
2.11.1 <i>Bacillus</i>	16
2.11.2 <i>Alcaligenes</i>	16
2.11.3 <i>Pseudomonas</i>	17
2.11.4 <i>Azotobacter</i>	17
2.12 Karışık Kültür ile PHB Üretimi	17
2.13 Saf Kültür ile PHB Üretimi	18
2.14 Aerobik Dinamik Besleme Rejimi (ADB)	19
2.15 Endüstriyel Atıksulardan PHB Biyopolimeri Üretimi	19
3. MATERYAL ve METOD	25

3.1 Materyal.....	25
3.2 Metod	25
3.2.1 Atıksu Karakterizasyonu	25
3.2.2 Adaptasyon çalışmaları.....	27
3.2.3 PHB Üretim Çalışması AKR İşletim koşulları	28
3.2.4 Analiz Prosedürü	29
3.2.5 Reaksiyon Derecesi ve Hız Katsayısı Belirleme	31
4. BULGULAR.....	32
4.1 20°C’de Yapılan Aktif Çamur AKR Çalışmaları	32
4.1.1 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 10 Gün Deneyleri	32
4.1.2 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 5 Gün Deneyleri	34
4.1.3 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 1 Gün Deneyleri	37
4.1.4 C/N 60 ve Çamur Yaşı: 10 Gün Deneyleri	39
4.1.5 C/N 60 ve Çamur Yaşı: 5 Gün Deneyleri	41
4.1.6 C/N 60 ve Çamur Yaşı: 1 Gün Deneyleri	43
4.2 28°C’de Yapılan Aktif Çamur AKR Çalışmaları.....	45
4.2.2 C/N 30 ve Çamur Yaşı: 5 Gün Deneyleri	45
4.2.3 C/N 30 ve Çamur Yaşı: 2 Gün Deneyleri	46
4.2.4 C/N 30 ve Çamur Yaşı: 1 Gün Deneyleri	48
4.2.5 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 5 Gün Deneyleri	50
4.2.6 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 2 Gün Deneyleri	53
4.2.7 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 1 Gün Deneyleri	55
4.2.8 C/N 60 ve Çamur Yaşı: 5 Gün Deneyleri	57
4.2.9 C/N 60 ve Çamur Yaşı: 2 Gün Deneyleri	59
4.3 30°C’de Yapılan Aktif Çamur AKR Çalışmaları.....	61
4.3.1 C/N 30 ve Çamur Yaşı: 5 Gün Deneyleri	61
4.3.2 C/N 30 ve Çamur Yaşı: 2 Gün Deneyleri	63
4.3.3 C/N 30 ve Çamur Yaşı: 1 Gün Deneyleri	64
4.3.4 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 5 Gün Deneyleri	65
4.3.5 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 2 Gün Deneyleri	67
4.3.6 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 1 Gün Deneyleri	68
4.4. Genel Sonuç Değerlendirme ve Tartışma	70
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Biyobozunur ve biyolojik olarak parçalanmayan plastiklerin sınıflandırılması ..4	4
Şekil 2. 2020-2025 yılları için biyoplastik türlerinde üretim miktarı5	5
Şekil 3. Elektron Mikrografında görüntülenen PHB granülleri.....7	7
Şekil 4. D(-)-β-hidroksi bütirik asitin kimyasal yapısı.....8	8
Şekil 5. Biyopolimer kökenli plastiğin doğada kaybolma süreleri (0, 2, 4, 6, 8 ve 10 haftalık).....12	12
Şekil 6. PHB'nin Parçalanma mekanizması ve sentezi13	13
Şekil 7. Meyve suyu Endüstrisi Üretim Şeması25	25
Şekil 8. Çalışmalarda Kullanılan Ardışık Kesikli Reaktör Düzenegi.....27	27
Şekil 9. Liyofilizatör cihazı31	31
Şekil 10. C/N 40 ve çamur yaşı 10 gün için KOİ ve Amonyak giderim grafiği32	32
Şekil 11. C/N 40 ve çamur yaşı 10 gün için AKM ve UAKM değerleri33	33
Şekil 12. C/N 40 ve çamur yaşı 10 günlük için PHB üretim oranları ve ORP değerleri 34	34
Şekil 13. C/N 40 ve çamur yaşı 5 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri35	35
Şekil 14. C/N 40 ve çamur yaş 5 gün için AKM ve UAKM değerleri35	35
Şekil 15. C/N 40 ve çamur yaşı 5 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri36	36
Şekil 16. C/N 40 ve çamur yaşı 1 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri37	37
Şekil 17. C/N 40 ve çamur yaşı 1 gün için AKM ve UAKM değerleri38	38
Şekil 18. C/N 40 ve çamur yaşı 1 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri38	38
Şekil 19. C/N 60 ve çamur yaşı 10 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri39	39
Şekil 20. C/N 60 ve çamur yaşı 10 gün için AKM ve UAKM değerleri40	40
Şekil 21. C/N 60 ve çamur yaşı 10 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri40	40
Şekil 22. C/N 60 ve çamur yaşı 5 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri41	41
Şekil 23. C/N 60 ve çamur yaşı 5 gün için AKM ve UAKM değerleri42	42
Şekil 24. C/N 60 ve çamur yaşı 5 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri42	42
Şekil 25. C/N 60 ve çamur yaşı 1 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri43	43
Şekil 26. C/N 60 ve çamur yaşı 1 gün için AKM ve UAKM değerleri44	44
Şekil 27. C/N 60 ve çamur yaşı 5 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri44	44
Şekil 28. C/N 30 ve çamur yaşı 5 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri45	45
Şekil 29. C/N 30 ve çamur yaşı 5 gün için AKM ve UAKM değerleri46	46
Şekil 30. C/N 30 ve çamur yaşı 2 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri47	47
Şekil 31. C/N 30 ve çamur yaşı 2 gün için AKM ve UAKM değerleri47	47
Şekil 32. C/N 30 ve çamur yaşı 2 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri48	48
Şekil 33. C/N 30 ve çamur yaşı 1 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri49	49
Şekil 34. C/N 30 ve çamur yaşı 1 gün için AKM ve UAKM değerleri49	49
Şekil 35. C/N 30 ve çamur yaşı 1 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri50	50
Şekil 36. C/N 40 ve çamur yaşı 5 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri51	51
Şekil 37. C/N 40 ve çamur yaşı 5 gün için AKM ve UAKM değerleri51	51
Şekil 38. C/N 40 ve çamur yaşı 5 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri52	52
Şekil 39. C/N 40 ve çamur yaşı 2 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri53	53
Şekil 40. C/N 40 ve çamur yaşı 2 gün için AKM ve UAKM değerleri54	54
Şekil 41. C/N 40 ve çamur yaşı 2 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri54	54

Şekil 42. C/N 40 ve çamur yaşı 1 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri	55
Şekil 43. C/N 40 ve çamur yaşı 1 gün için AKM ve UAKM değerleri	56
Şekil 44. C/N 40 ve çamur yaşı 1 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri	56
Şekil 45. C/N 60 ve çamur yaşı 5 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri	57
Şekil 46. C/N 60 ve çamur yaşı 5 gün için AKM ve UAKM değerleri	58
Şekil 47. C/N 60 ve çamur yaşı 5 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri	58
Şekil 48. C/N 60 ve çamur yaşı 2 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri	59
Şekil 49. C/N 60 ve çamur yaşı 2 gün için AKM ve UAKM değerleri	60
Şekil 50. C/N 60 ve çamur yaşı 2 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri	60
Şekil 51. C/N 30 ve çamur yaşı 5 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri	61
Şekil 52. C/N 30 ve çamur yaşı 5 gün için AKM ve UAKM değerleri	62
Şekil 53. C/N 30 ve çamur yaşı 5 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri	62
Şekil 54. C/N 30 ve çamur yaşı 2 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri	63
Şekil 55. C/N 30 ve çamur yaşı 2 gün için AKM ve UAKM değerleri	64
Şekil 56. C/N 30 ve çamur yaşı 1 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri	64
Şekil 57. C/N 30 ve çamur yaşı 1 gün için AKM ve UAKM değerleri	65
Şekil 58. C/N 40 ve çamur yaşı 5 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri	66
Şekil 59. C/N 40 ve çamur yaşı 5 gün için AKM ve UAKM değerleri	66
Şekil 60. C/N 40 ve çamur yaşı 2 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri	67
Şekil 61. C/N 40 ve çamur yaşı 2 gün için AKM ve UAKM değerleri	68
Şekil 62. C/N 40 ve çamur yaşı 1 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri	68
Şekil 63. C/N 40 ve çamur yaşı 1 gün için AKM ve UAKM değerleri	69

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. PHB ve PP'nin Fiziksel Özellikleri	8
Tablo 2. Biyoplastiklerin radikal grupların değişmesiyle oluşan biyoplastik türleri	9
Tablo 3. Bazı saf kültürler ve biyopolimer üretim miktarı	18
Tablo 4. Numuneler ve karakterizasyon sonuçları	26
Tablo 5. Günlük Çalışma Döngüsü	28
Tablo 6. Reaksiyon dereceleri ile ilgili eşitlikler	31
Tablo 7. PHB analizi yapılamayan numunelerin ORP değerleri.....	69
Tablo 8. Ortam şartları ve PHB oranları.....	71



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	: Santigrat derece
C	: Karbon
N	: Azot
Nm	: Nanometre
mV	: Milivolt

Kısaltmalar

ADB	: Aerobik Dinamik Besleme
AKM	: Askıda Katı Madde
AKR	: Ardışık Kesikli Reaktör
C/N	: Karbon Azot Oranı
ÇO	: Çözünmüş Oksijen
EM	: Elektron mikroskobu
HBS	: Hidrolik Bekletme Süresi
KOİ	: Kimyasal Oksijen İhtiyacı
ORP	: Oksidasyon-Redüksiyon Potansiyeli
PHA	: Polihidroksialkanoat
PHB	: Polihidroksibütirat
PHV	: Polihidroksivalerat
PP	: Polipropilen
TKM	: Toplam Katı Madde
UAKM	: Uçucu Askıda Katı Madde
UKM	: Uçucu Katı Madde

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun artmasıyla birlikte doğadaki kaynaklar azalmakta ve alternatif enerji-materyal kaynakların arayışı artmaktadır. Nüfus artışıyla paralel giden tüketim artışı; dünyamızda yüksek miktarlarda geri dönüştürülemeyen, doğada çok uzun yıllar kaybolmayan materyallerin birikmesine neden olmuştur. Bunun sonucunda ise çevrede ve canlıların bünyesinde büyük problemlere neden olmuştur.

Katı atıklardan organik kökenli plastikler; doğada 1000 yılda parçalanmadan kalabilen, parçalanmaları ise canlı bünyesinde mikroplastik olarak birikebilen kanserojen bir maddedir. İlk üretimi 1862 tarihinde olup neredeyse 160 yıllık bir geçmişi vardır. Bu süreç boyunca düşük maliyetli, kolay şekillenebilir, hafif ve kolay taşınabilir olması plastiğin daha fazla tercih edilmesinin nedeni olmuştur. Avantajlarının yanı sıra dezavantajları da oldukça fazladır.

Günlük hayatta sık sık kullanılan petrol türevli plastik kaplarda Bisfenol A (BPA) bulunmaktadır. Bu maddeye maruz kalındığında kanser, kalp vb. hastalıklarına neden olmaktadır. Ayrıca plastik kaplar sıcak yüzeye temas ettiğinde ya da güneş ışığına maruz kaldığında içeriğindeki BPA maddesi plastik kaptan yiyeceklerin, içeceklerin içerisine nüfuz etmekte ve insan vücuduna girerek östrojen hormonunu taklit ederek insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir.

Plastiklerin içerisinde bulunan renk verici maddeler, plastizerler, kurşun, kadmiyum içeren ısı stabilizerleri, mürekkepler, boyalar çok tehlikeli ve toksik olabilirler. Özellikle petrol türevli polimerlerin üretiminde kullanılan stiren maddesi yiyeceklere temas etmesiyle kansere, cilt rahatsızlıklarına, genetik mutasyonlara yol açmaktadır.

Petrol türevli plastikler parçalanarak mikro plastik haline gelmekte ve denizlerde su yüzeyinde ve denizin alt kademelerinde birikmektedir. Buradan deniz faunasının bünyesinde biyoakümüle olup besin zinciri yoluyla insanların vücudunda birikmektedir. Bu olay sonucunda ise kanser ve kalp rahatsızlıkları meydana gelmektedir. Ayrıca mikroplastikler kozmetik alanında üretilen ürünlerin içerisinde, iç mekânda bulunan tozlarda ve kişisel bakım ürünlerinde fazlasıyla bulunmaktadır.

Partiküller boyutu 1-5 mm olan mikroplastikler lavabolardan atıksu artıma tesislerine ulaşır ve atıksu artıma tesislerinde filtre edilemediğinde direkt olarak doğaya tekrar salınmış olur.

Petrol türevli plastiklerin tüm bu olumsuz özellikleri, çevre dostu biyoplastik üretimi ihtiyacını doğurmuştur. Bu nedenle üretim sürecinde en ekonomik kaynak arayışına ihtiyaç duyulmuştur.

Bu çalışmada karbon kaynağı olarak gıda endüstrisi atıksuyu (sentetik meyve suyu atıksuyu) ile farklı C/N oranları, sıcaklık, çamur yaşı çalışılarak biyopolimer üretiminde optimum şartlar araştırılmıştır.



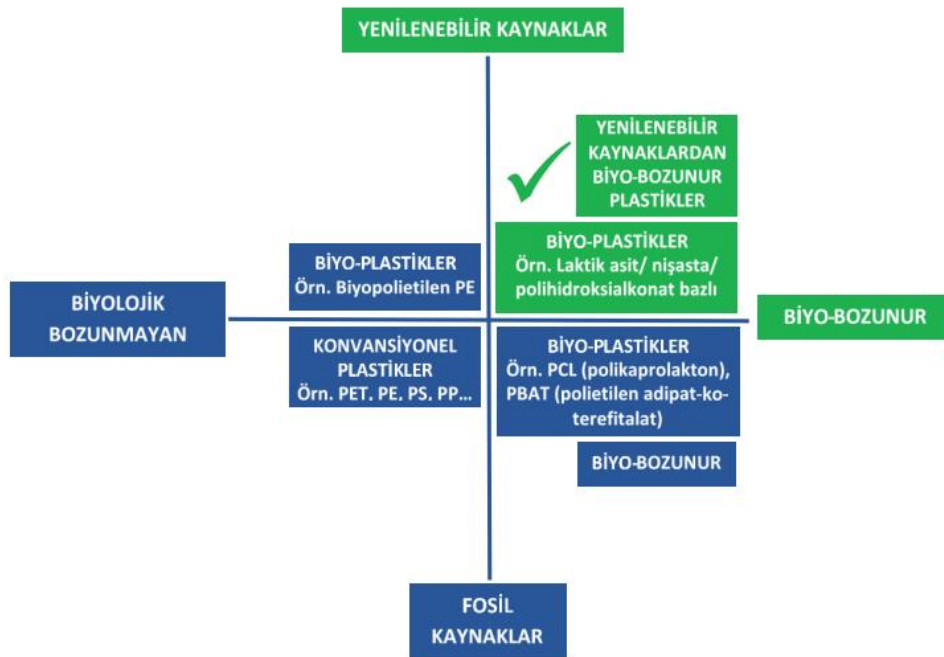
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Biyopolimer

Biyopolimerler, bitkiler hayvanlar, mantarlar ve bakteriler tarafından üretilen; mikroorganizmalar tarafından parçalandığında çevre kirliliğe yol açmayan biyobozunur polimerler olarak tanımlanabilir. (Hazar Yoruç & Uğraşkan, 2017) Biyobozunur polimerler, imalat yöntemlerine ve kaynaklarına bağlı olarak beş kategoride sınıflandırılır:(Kabir ve d., 2020)

- i. Bitkiler (ör: nişasta, selüloz, zein, pektin ve lipit);
- ii. Hayvanlar ve süt ürünleri (örn: kazein, peyniraltı suyu, jelatin, kitosan ve lipit);
- iii. Fermantasyon ürünleri veya yan ürünler (örn: polihidroksibutirat (PHB) ve polihidroksialkanoatlar (PHA));
- iv. Doğal olarak türetilmiş maddelerin kimyasal sentezleri (örn: polilaktik asit (PLA));
- v. Fosil kaynaklarının kimyasal sentezleri (örn: polikaprolaktonlar (PCL) ve poliesteramidler (PEA))

PLA biyopolimeri içerisinde glikoz ya da nişasta bulunan kaynaklardan ya da bakteriyel faaliyetler ile üretilmektedir (Castro-Aguirre ve d., 2016; Majgaonkar ve d, 2021) Ayrıca PHB biyopolimeri de mikroorganizma faaliyetleri sonucunda hücre içi depo granülü olarak üretilen biyobozunur bir polimerdir. Organik katı atıklar ve atıksular kullanılarak da üretimi gerçekleştirilir.



Şekil 1. Biyobozunur ve biyolojik olarak parçalanmayan plastiklerin sınıflandırılması (Çokgör ve d., 2018)

2.2 Poli-β-hidroksibütirat (PHB) Biyopolimeri

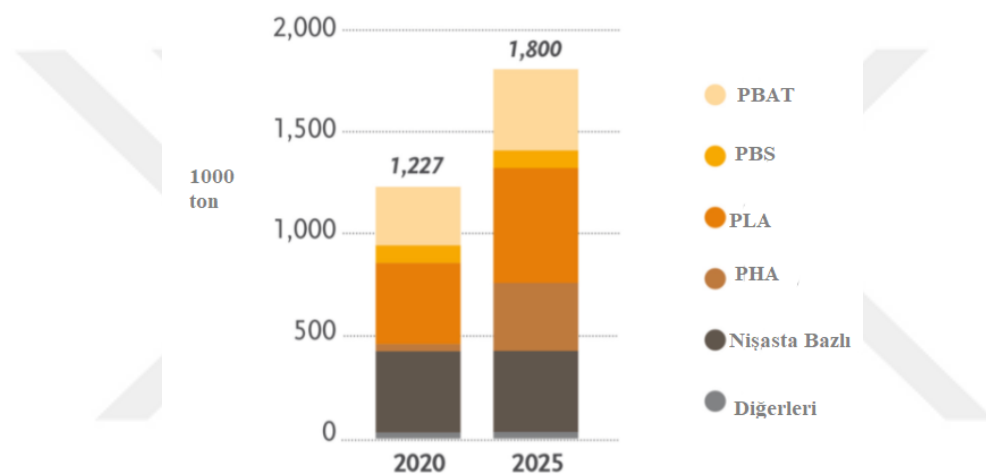
2.3 PHB' nin Tarihçesi

Petrol türevli plastiklere alternatif olan PHB biyopolimeri ilk kez 1925'te Fransız bilim insanı Lemoigne tarafından hücredeki yağ granülleri olarak tanımlanmıştır. Lemoigne topraktan izole ettiği *Bacillus megaterium* bakterisinin ürettiği β-hidroksi bütirik asit, poli-β-hidroksibütirat biyopolimeri olarak adlandırmıştır. 1958 yılında Macrae ve Wilkinson *Bacillus* hücresi içerisinde PHB üretimi ve parçalanması için gereken hücresel şartları araştırmışlardır (Anderson & Dawes, 1990; Braunegg ve d., 1998).

1970 yılında yaşanan petrol krizi nedeniyle petrol fiyatlarının yükselmesiyle biyolojik olarak parçalanmayan plastiklere olan ilgi artmıştır ve bu materyallerin planlanması hız kazanmıştır (ŞAHİN ve d.).

PHB biyopolimerinin ticari olarak ilk üretimi 1960 yıllarda başlasa da endüstriyel üretimi 1970'li yılları bulmuştur. Bu yıllarda *Alcaligenes eutrophus* bakterisi suşundan üretilen ilk ticari ölçekteki ürün BIOPOL ismiyle patentlenmiştir (Anderson & Dawes, 1990; Braunegg ve d., 1998).

Biyopolimer üretim miktarı 2014 yılında ton bazında 1,7 milyon tonken (Çokgör ve d., 2018) 2019 yılında üretim kapasitesi 2,11 milyon tona ulaşmıştır. 2024 yılında ise bu miktarın 2,48 milyon tona ulaşacağı düşünülmektedir. (www.european-bioplastics.org).



Şekil 2. 2020-2025 yılları için biyoplastik türlerinde üretim miktarı (www.european-bioplastics.org).

2.4 PHB'nin Genel Özellikleri

Mikroorganizmalar aracılığıyla üretilen ve katabolize edilen maddeler biyomateryal olarak adlandırılır. Günümüzde mikroorganizmalardan sentezle enzim, selüloz, antibiyotik, ilaç üretmenin yanında biyoplastik gibi biyomateryaller de üretilmektedir. Biyoplastikler pek çok bakteri tarafından üretilebilmektedir. Bunlar; fotosentetik bakteriler, aerobik anaerobik bakteriler, arkeler, algler gibi çok fazla türden bakteri tarafından üretilmektedir.

PHA-PHB biyopolimeri bu yöntemle üretilen en çok bilinen biyomateryaldır. (Luengo ve d., 2003). PHB'ler gram-negatif ve pozitif türler içeren 300'den fazla farklı bakteri türü tarafından sentezlenebilir (Çokgör ve d.).

PHB üreten mikroorganizmalar ortamdaki besi maddesi kısıtlaması olma durumuna göre ikiye ayrılmaktadır (Khanna & Srivastava, 2005). Bunlardan birincisi ortamda fazlaca karbonun bulunduğu ancak, iz metallerin eksikliğinde PHB üreten bakteriler: *Ralstonia eutropha*, *Protomonas extorquens* ve *Pseudomonas oleovorans* örnek verilebilir. 2. grupta ise karbon kaynağının ve besi maddelerinin bol olduğu ortamda PHB üreten bakteriler: *Alcaligenes latus*, *Paracoccus denitrificans*, *Azotobacter vinelandii*'nin mutant suşu, ve rekombinant *Escherichia coli* örnek verilebilir.

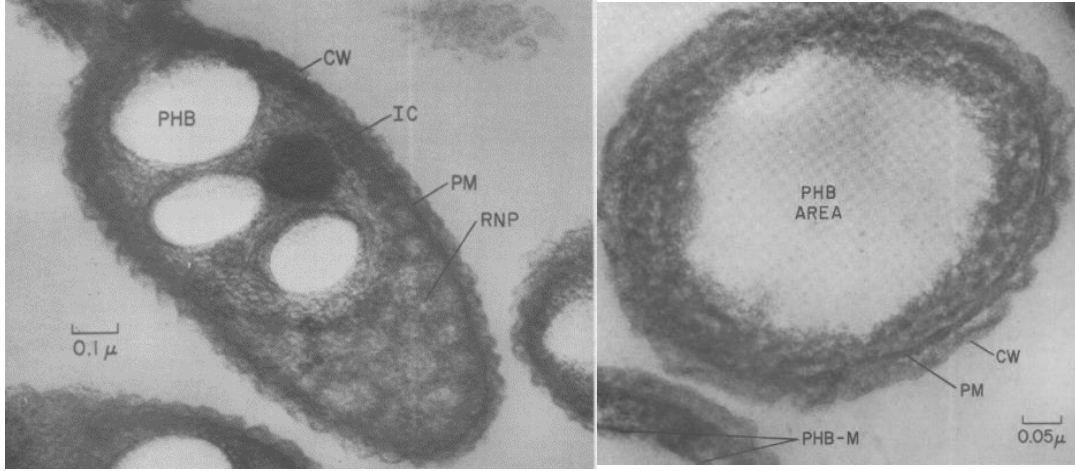
Kullanım alanı oldukça geniş olan PHB biyopolimeri; tek kullanımlık plastiklere alternatif olarak, tıbbi malzemelerin yapımında, ilaçların yapımında ve zirai uygulamalarda tercih edilebilir (Holmes, 1985; Yılmaz & Beyatlı, 2003).

PHB biyopolimeri gıda ve kozmetik alanındaki paketleme materyalleri, tarım, kişisel temizlik araçları ve biyomedikal ürünler gibi alanlarda çok geniş potansiyel uygulamalara açıktır. İnsan ve hayvanların dokusuyla biyoyumlu olduğundan, vücutta absorbe edilen protez aletlerin, cerrahi pens, ameliyat ipliği, eldiven, önlük, maske yapımında ve ayrıca yavaş salınımlı ilaç içeren biyofilm üretiminde PHB' nin kullanılması tercih edilmektedir. Nontoksik özelliği sayesinde de hayvanlar için antihelmitik ilaçlar içeren PHB kapsülleri üretilmektedir (Chowdhury & John, ve d.; Holmes, ve d.; Yılmaz & Beyatlı, ve d.).

2.5 PHB'nin Fiziksel Özellikleri

PHB granülleri, üretici mikroorganizmanın türüne göre farklı granül boyutunda ve fizikokimyasal özellikler gösterebilir (Taidi ve d., 1994). Elektron mikroskobu (EM) kullanıldığında, bakteriyel hücrelerde PHB granülleri kolaylıkla gözlenebilir. Bu granüller küre biçimde olup, çapları 100-800 nm arasında değişmektedir. Granüllerin membran kalınlığı ise 2-4 nm boyutundadır. Yapısında ise %2 protein, %98 PHB içermektedir (Anderson & Dawes, 1990; S. Y. Lee, 1996; Madison & Huisman, 1999) .

Şekil 3'te PHB granülleri gösterilmiştir.



Şekil 3. Elektron Mikrografında görüntülenen PHB granülleri (Lee Young ve d., 1972)

PHB'ler ile petrol bazlı plastikler birbirlerine benzer özelliklere sahiptir (Madison & Huisman, 1999). Fakat PHB biyopolimerinin kırılma uzaması petrol türevli plastiğe göre daha fazladır. PHB'nin kırılma uzaması %6'dır ve kırılma uzaması düşük plastikler ısınma esnasında kolay şekil alsalar bile soğutuldukları zaman kalıcı deformasyona karşı dirençlerini kaybedip kırılma eğilimi gösterebilirler. Bu nedenle bu özellikteki biyopolimerin petrol türevli plastiklere göre kullanım alanını sınırlamaktadır.

PHB'nin kullanım alanlarının genişletilmesi ve daha yaygın kullanımının sağlanması için PHB kopolimerleri (P3HB-c1-3HV) geliştirilmiştir. PHB kopolimeri ile kırılma az, daha esnek biyoplastik elde edilmiştir (S. Y. Lee, 1996).

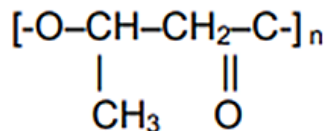
Tablo 1'de PHB ve polipropilenin (PP) fiziksel özelliklerinin karşılaştırılması verilmiştir.

Tablo 1. PHB ve PP'nin Fiziksel Özellikleri (S. Y. Lee, 1996; Lee Young ve d., 1972; Yılmaz & Beyatlı, 2003)

Fiziksel özellikleri	PP	PHB
Kristalin kaynama noktası (°C)	176	175
Kristallik oranı (%)	70	80
Gerilme Gücü (Mpa)	34,5	40
Yoğunluk (g/cm ³)	0,905	1,250
Kırılma uzaması (%)	400	6
Organik çözücüye dayanıklılık	Dayanaksız	Dayanıklı
UV'ye dayanıklılık	Dayanaksız	Dayanıklı

2.6 PHB'nin Kimyasal Özellikleri

Bakteriler tarafından hücre içi depo granülü olarak sentezlenip biriktirilen PHB biyopolimeri, yapısında kısa zincirli β -hidroksi yağ asitleri içermektedir.(Anderson & Dawes, 1990) Bu poliesterin yapısındaki monomerler karboksil (-COOH) ve hidroksil -OH) grupları arasında uzun zincirler oluşturan ester bağları kurar. PHB'nin genel formülü $(C_4H_6O_2)_n$ şeklinde olup (n) sayısı 35000 gibi yüksek sayılara kadar ulaşabilmektedir.(Lee, n.d.; Yılmaz & Beyatlı, n.d.).

**Şekil 4.** D(-)- β -hidroksi bütirik asitin kimyasal yapısı (Yılmaz & Beyatlı, 2003)

Biyoplastiklerin R (alkil grup) grubuna farklı monomerlerin bağlanması ile farklı fiziksel özelliklere sahip biyopolimerler üretilebilir.(S. Y. Lee, 1996).

Tablo 2’de farklı monomer bağları ve oluşan biyoplastik türleri verilmiştir.

Tablo 2. Biyoplastiklerin radikal grupların değişmesiyle oluşan biyoplastik türleri (S. Y. Lee, 1996)

R: (Alkali Grup)	Biyoplastik Türleri
Hidrojen	Poli-β-hidroksipropiyonat
Metil	Poli-β-hidroksibütirat
Etil	Poli-β-hidroksivalerat
Propil	Poli-β-hidroksiheksanoat
Pentil	Poli-β-hidroksioktanoat
Nonil	Poli-β-hidroksidodekanoat

2.7 PHB Kullanım Alanları

2.7.1 PHB’nin Veterinerlikte Kullanımı

PHB’den üretilen ilaçların canlı bünyesinde biyolojik olarak parçalanır ve nonalerjik reaksiyon gösterir. Hayvanlar için antihelmitik ilaçların üretiminde PHB kullanıldığında helmit enfeksiyonların oluşmasını engellemektedir. PHB hayvan dokularında toksik reaksiyon göstermediğinden vücuda yerleştirilen protez aletleri, cerrahi dikiş ipleri ve cerrahi malzemelerinde tercih edilmektedir (Holmes, 1985).

2.7.2 PHB’nin Ziraatte Kullanımı

PHB ve onun kopolimerleri uygun çevresel şartlarda, topraktaki birçok mikroorganizma tarafından tamamen parçalanabilmektedir. Bu özelliği sayesinde PHB biyopolimerinden yapılan su olukları kullanım süresi dolduğunda toprakta parçalanıp gübre olarak kullanılabilir. Canlı dokusuyla biyoyumlu olduğu için bitki köklerini koruma filmleri yapımında kullanılmaktadır. (Holmes, 1985).

2.7.3 PHB’nin Tıp Biliminde Kullanımı

PHB biyopolimeri cerrahi pens, ameliyat ipliği, eldiven, önlük, maske, implant, yavaş salınımlı ilaç içeren fiber bantlar gibi birçok sağlık materyallerinin yapımında

kullanılmaktadır. Tıp alanında kullanılmasının nedeni biyoyumlu olmasından kaynaklıdır ve vücutta şiddetli toksik etki yapmadığından en çok tercih edilen biyopolimer olmuştur (Yılmaz & Beyatlı, 2003).

PHB'nin parçalanma ürünü olan D(-)-3-hidroksibütirik asit ara metabolit bileşimidir ve özellikle beyin ve kalp dokusu için enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Özellikle bu asit beyin gelişiminde etkili bir rol oynamaktadır (Holmes, n.d.).

Diyabet hastaların tedavisinde kullanılan kan serumuna ilave edilen glikoz yerine tercih edilen D(-)-3-hidroksibütirik asitin, daha fazla klinik avantaja sahip olduğu sonucu çıkarılmıştır. Ayrıca obez hastaların tedavisinde uygulanan 14 günlük teropatik açlık süresinde hastaların açlıktan şikâyet etmedikleri tespit edilmiştir (Holmes, 1985).

2.7.4 PHB'nin Tek Kullanımlık Materyallerin Yapımında Kullanımı

PHB ve kopolimerleri termoplastik özellikte oldukları için petrol türevli bazı ticari plastiklerin yerine kullanılmaktadır. PHB'nin düşük su buharı ve hava geçirgenliği özelliği gıda paketleme sektöründe kullanılmasına imkân vermektedir (Yılmaz & Beyatlı, 2003). Polipropilen ile benzer özelliklere sahip olduğu için yıkanabilir kaplar ve iplerin yapımında kullanılmaktadır (Holmes, 1985).

PHB sıkıştırılmış kalıp ve sıkıştırılmış film yapımında kullanılmıştır. Üretilen paket filmleri yüksek gaz bariyeri özelliğindedir ve 25 µm kalınlığındaki bir PHB filmi düşük oksijen geçirgenliğine sahiptir. Bu özelliği sayesinde paketteki bakteriyel faaliyetlerin oluşma ihtimalini düşürüp gıdanın çabuk bozulmasını önlemektedir (Holmes, 1985; Yılmaz & Beyatlı, 2003).

2.8 PHB Oluşum Şartları

Bakterilerin PHB biyopolimerini üretmeleri için olumsuz ortam şartlarında bulunmaları gerekmektedir. Bu uygun olmayan ortam şartları ise; fazlaca karbon kaynağı varlığında ancak büyüme ve gelişme için gerekli olan oksijen, azot ve esansiyel elementlerin eksikliğinde oluşmaktadır. Bu stres koşullarının, (döngüsel tokluk-açlık

rejimi, nütrient eksikliği, tuzluluk oranı ve sınırlı oksijen) farklı düzeylerde uygulanmasıyla üretilen % PHB verimi de artacak ya da azalacaktır.(Anderson & Dawes, 1990; Yılmaz & Beyatlı, n.d.).

Yapılan birçok araştırma bakteri bünyesinde PHB birikimi ile büyüme arasında bir bağ olduğunu göstermiştir. Büyüme hızının maksimum olduğu ekspanansiyel (Log) fazında PHB retimi artarken; durgunluk fazında maksimum seviyeye ulaşır (McCool ve d., 1996).

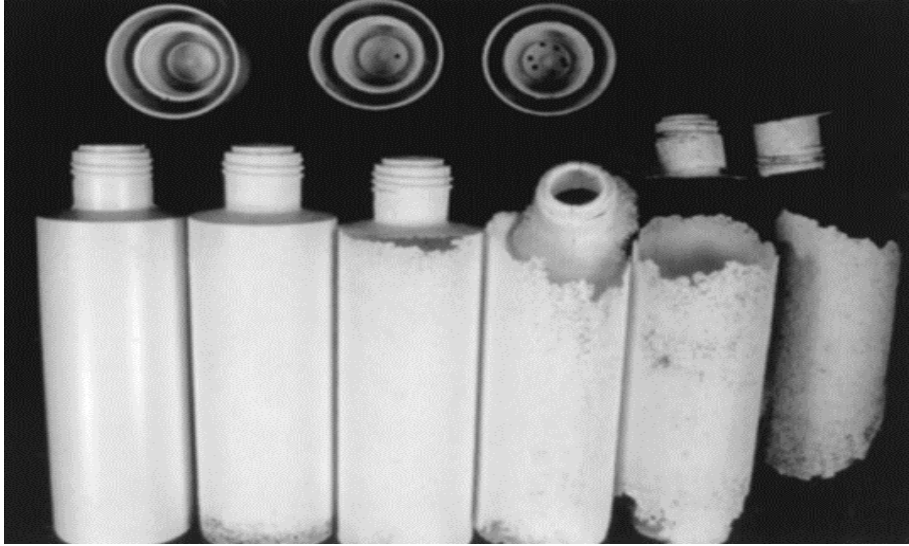
2.9 PHB'nin Parçalanabilirliği

Petrol türevli plastiklerden yapılan tek kullanımlık ürünler doğada 1000 yılda parçalanmadan kalmaktadır fakat biyopolimerler doğada kısa sürede parçalanır ve parçalanma sürecinde toksik salınım yapmazlar.

PHB'den üretilen materyaller anaerobik ve aerobik ortamlarda kolayca parçalanır ve anaerobik ortamda metan, aerobik şartlarda CO₂ ve su gibi parçalanma ürünleri oluşturur (Braunegg ve d., 1998; S. Y. Lee, 1996). Anaerobik ortamda parçalanma süresi birkaç ay sürerken, deniz gibi tuzlu su ortamlarında birkaç yılda parçalanma gerçekleşebilir (Madison & Huisman, 1999).

PHB ve kopolimerleri bakteriler, funguslar ve algler gibi kısacası biyolojik faktörler nedeniyle kısa sürede karbondioksit ve suya dönüşür. Parçalanma süreci mikrobiyal faaliyete, evre ısısı ve biyopolimerin yüzey kalınlığına bağlıdır (Madison & Huisman, 1999).

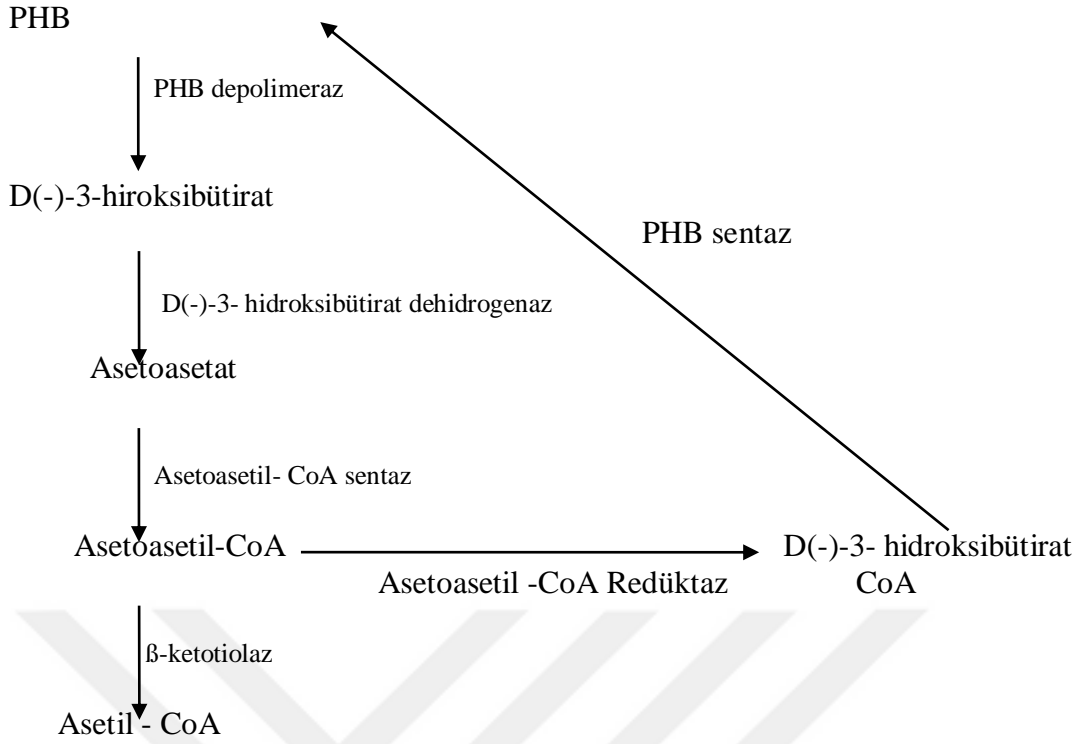
Biyolojik faktörler dışında parçalanma süresine fiziksel ve kimyasal faktörlerde etki eder. Fiziksel faktörleri güneş işığı, ıslanma miktarı oluştururken; Kimyasal faktörleri hidroliz ve oksidasyon hızı oluşturur(Madison & Huisman, 1999).



Şekil 5. Biyopolimer kökenli plastiğin doğada kaybolma süreleri (0, 2, 4, 6, 8 ve 10 haftalık) (Madison & Huisman, 1999)

PHB'nin bakteri hücrelerinde parçalanma mekanizması hücre içi ve hücre dışı olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Hücre içi parçalama enzimi PHB depolimeraz enzimleri *Bacillus megaterium* ve *Alcaligenes eutrophus* bakterilerinde gözlenmiştir. Hücre içi parçalama enzimleri hücre içinde hareketli ve kristalize olan PHB'yi parçalarken; hücre dışı depolimerazlar ise kristalize olan PHB'yi hidrolize eder (Lee Young ve d., 1972).

PHB polimerazı PHB'yi D(-)-3-hidroksibütirat monomerlerine parçalar. D(-)-3-hidroksibütirat dehidrogenaz enzimleri ile parçalanıp Asetoasetatı oluşturur. AsetoasetilCoA oluşması için ortamda Asetoasetil-CoA sentaz enziminin olması gerekir. Ortamda β ketotiaz enziminin bulunmasıyla Asetoasetil-CoA Asetil-CoA'ya dönüşür. Böylelikle ortamda PHB sentezi için Asetoasetil-CoA oluşmuş olur.



Şekil 6. PHB'nin Parçalanma mekanizması ve sentezi (Yılmaz & Beyatlı, 2003)

2.10 PHB Üretimini Etkileyen Faktörler

2.10.1 C/N Oranı

PHB sentezinde karbon azot kaynaklarının sisteme yüksek ya da düşük seviyelerde verilmesi üretim verimi olumlu ya da olumsuz etkileyebilir. Amonyum aerobik dinamik besleme koşullarında takip edilmesi gereken parametredir, PHB üretimini büyük ölçüde etkilemektedir (Dionisi ve d., 2005; Serafim ve d., 2004).

Serafim ve d., (2004) yaptığı çalışmada sisteme 15-180 Cmmol/L asetat ve 0-2,8 Nmmol/L azot verilmiştir. Maksimum PHB verimini 180 Cmmol/L asetat ve 0,7 Nmmol/L azot oranlarında elde etmişlerdir (PHB verimi %67,5).

Johnson ve d., (2010) yaptığı çalışmada 3 farklı C/N oranını kullanmışlardır (sonsuz Cmol/Nmol, 40 Cmol/Nmol ve 8 Cmol/Nmol). Sonuçta; amonyum

kullanılmadığı şartlarda maksimum PHB içeriği (%89) elde edilirken amonyum konsantrasyonunun artması ile PHB içerikleri azalmıştır (%77 ve %69).

Yapılan çoğu araştırmalar sonucunda atıksudaki amonyum miktarı arttıkça büyüme için kullanılan karbon miktarı artarken, polimer depolama aşamasında PHB'nin önemli ölçüde azaldığı sonucuna varılmıştır (Qu & Liu, 2009a).

2.10.2 pH

Aerobik dinamik beslemeli PHB depolama sistemlerinde pH, başlangıçta kullanılan atıksuyun pH değerine göre artıp azalırken reaksiyon boyunca sürekli değişmektedir. PHB'nin üretildiği pH'ın kontrol edilmediği sistemlerde 8-9,5 arasında değişmektedir.(Serafim ve d., 2004).

Serafim, (2004) bolluk/açlık rejiminde pH etkisi üzerine yaptığı çalışmada pH'nın 7 ve 8,3 olduğu ortam şartlarında sentezlenen PHB içeriğinin oldukça düşük olduğu rapor edilmiştir. En yüksek verimi pH'ın kontrol edilmediği durumda elde ederken (%47,5); pH 7'de %27,5, pH 8,3'te %39,8 de elde edilmiştir. pH'ın 7 olduğu çevre şartlarında karbon kaynağının %44'ü bakteriler tarafından hücre enerjisi için kullanılırken %56'sı polimer sentezleme ve bakteriyel büyüme için kullanıldığı rapor edilmiştir.

Dionisi, (2005) yaptığı çalışmada hücre içinde depolanan polimerdeki polihidroksivalerat (PHV) içeriğinin pH 5,5'ta yaklaşık %10 mol, pH 9,5'ta maksimuma seviyeye ulaşarak %30 mol olarak rapor edilmiştir.

2.10.3 Sıcaklık

Çok yüksek ya da çok düşük sıcaklıklar bakteriyel faaliyetleri olumsuz etkilemektedir. Fadhil Md Din. (2008) yaptığı bir araştırmada; 20°C'den daha düşük sıcaklıklarda sistemdeki uçucu yağ asitlerinin PHB sentezi için kullanıldığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada 15°C'de maksimum seviyede (620,41 CmM) PHA sentezlenirken, 30°C'de sadece 383,86 CmM PHA sentezlendiği rapor edilmiştir.

Chudakkadu, (1999) yaptığı PHB üretiminde sıcaklığın etkisinin incelendiği çalışmada 5 farklı sıcaklık (15, 20, 25, 30, 35°C) kullanılmıştır. Sıcaklığın artmasıyla PHB oluşum hızının azaldığı sonucu ortaya çıkmıştır. PHB oluşum hızı Cmmol/Cmol s

cinsinden sırayla bu değerler; 15°C'de 143±1,7, 20°C'de 149±1,2, 25°C'de 139±1,2, 30°C'de 88±0,9 ve 35°C'de 66±1,1 Cmmol/Cmol s'dir.

Johnson, (2010) yaptığı deneysel çalışmada ise 15 ve 30°C iki sıcaklıkta PHB üretimi incelenmiştir. Yüksek kararlı durum sıcaklığında (30°C) PHB depolama kapasitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (ağırlıkça %84). 15°C'de bu oranın (ağırlıkça %35) azaldığı rapor edilmiştir.

Jiang, (2011a) yaptığı çalışmada 20 ve 30°C iki sıcaklığın PHB üretimi üzerine etkisi incelenmiştir ve en yüksek verimin 30°C'de alındığı gözlenmiştir. 20°C'de PHB oranı ağırlıkça %21,5 olurken, 30°C'de ağırlıkça %56,3 olduğu rapor edilmiştir.

2.10.4 Çamur Yaşı

PHB üretimde en önemli parametrelerden biri çamur yaşıdır. Johnson ve d., (2010) yaptığı çalışmada 0,5, 1 ve 4 günlük çamur yaşları kullanılmıştır. Düşük çamur yaşında (0,5-1) PHB veriminin düştüğünü, bakterilerin karbon kaynağını büyüme için kullandığını rapor etmişlerdir.

Deneysel çalışmalarda düşük çamur yaşları yüksek biyokütle elde etmek için kullanılmıştır. Yüksek PHB sentezi elde etmek için yüksek çamur yaşı kullanılmalıdır. Çünkü düşük çamur yaşında bakterinin PHB depolama için kullandığı substratın çok az olduğu sonucu elde edilmiştir (Dionisi ve d., 2005).

Fakat çamur yaşının düşmesiyle yüksek PHB depolama veriminin de elde edildiği çalışmalar mevcuttur. Z. Chen ve d., (2017) gerçekleştirdiği bir araştırmada 10 ve 5 gün olmak üzere iki farklı çamur yaşı çalışılmıştır. Düşük çamur yaşında bakterinin bünyesinde PHB depolamasının arttığı rapor edilmiştir. Dias ve d., (2006) yaptığı çalışmada ise 3 ve 10 günlük çamur yaşları kullanılmıştır. 3 günlük çamur yaşında depolanan PHB içeriği %31 iken, 10 günlük çamur yaşında bu içerik %21 olduğu gözlenmiştir.

2.10.5 Çözünmüş Oksijen

Qu & Liu, (2009b) yaptığı çalışmada farklı yüzdelerdeki çözünmüş oksijen konsantrasyonlarının (%10, %20, %40, %70) PHB depolama verimine olan etkileri

araştırılmıştır. En yüksek verim %70 çözülmüş oksijen konsantrasyonunda alınmıştır. En düşük PHB üretim verimi %10 oksijen konsantrasyonunda elde edilmiştir. Genel olarak çalışmalarda elde edilen optimum aralık 0,75-1 mg/L'dir.

2.11 PHB Üreten Mikroorganizmalar

Deniz, tatlısu, sediment, toprak ve bunun gibi birçok ortamdan izole edilerek elde edilen saf kültürlerden PHB üretimi sağlanabilir. PHB sentezinde en çok bilinen mikroorganizmalara *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* suşları örnek verilebilir (Anderson & Dawes, 1990; Braunegg ve d., 1998).

2.11.1 *Bacillus*

Bacillus suşlarının PHB'yi sentezlemesinin nedeni hücre içi enerji kaynağı olarak kullanılmalarıdır. Spor oluşumundan hemen önceki safhada hücre içi PHB miktarı maksimum seviyededir (Nickerson, 1982). Yapılan araştırmalar sonucunda *Bacillus* türlerinin bazılarının hücre kuru ağırlarının %50'sinden fazla PHB birikimi yaptığı gözlenmiştir (G. Q. Chen ve d., 1991; Ediz & Beyatlı, 2005). Fakat *B. Megaterium* PV302 mutantında üretilen PHB miktarının hücre kuru ağırlığının %16 seviyesinde olduğu rapor edilmiştir (Vijay ve d., 1990).

2.11.2 *Alcaligenes*

Alcaligenes şusu PHB sentezinde fruktoz ve glikozu karbon kaynağı olarak kullanabilir. PHB üretiminde fruktozu kullandığında hücre kuru ağırlığını %80 ve daha fazlasını üretmektedir (Madison & Huisman, 1999). *Alcaligenes latus* suşu substrat olarak endüstriyel üretim atıklarından olan melas ve şeker şurubunu kullandığında hücre kuru ağırlığının %60'tan fazla PHB üretimi gerçekleştirmektedir (Ediz & Beyatlı, 2005; Grothe ve d., 1999). PHB üretiminde amonyumun sınırlandırıldığı çalışmada *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 türünün %76 ile en yüksek PHB üretimini sağladığı bildirilmiştir (Kim So ve d., 1994).

2.11.3 *Pseudomonas*

Pseudomonas bakterileri glukonat veya asetat gibi substrat kaynağını kullandıklarında orta zincir uzunluğunda, β -hidroksibüt yağ asitlerinden oluşan PHA üretebilirler (Hoffmann ve d., 2000).

Bazı *Pseudomonas* suşları (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas fluorescens*) çeşitli substrat kaynağında ve azot ve iz element eksikliğinde PHB üretimi yapamazlar fakat ortamda yağ asitleri mevcutsa PHB üretimi sağlayabilirler (Huisman ve d., 1989).

Ortamda karbon kaynağı olarak metanol varlığında fakat amonyumun eksikliğinde yapılan bir çalışmada *Pseudomonas sp.*135 suşunun %55 oranında üretim yaptığı saptanmıştır. Ayrıca ortamda karbon kaynağı sabit tutulup fosfat (PO_4^{-3}) sınırlandırıldığında ise %34,5 üretim yapıldığı gözlenmiştir (Daniel ve d., 1992).

2.11.4 *Azotobacter*

PHB üretebilen 300'den fazla bakteri suşu vardır ve bunlardan birkaçı endüstriyel ölçekte üretim için kullanılmıştır. *Cupriavidus necator*, *Azohydromonas lata* ve *A. vinelandii* bakterileri kuru ağırlığının %90'ı kadar PHB üretebilir (García ve d., 2014).

Birçok mikroorganizma besin sınırlandırılmasında PHB üretimi yaparken *Azotobacter* suşu için besin sınırlandırılmasına gerek yoktur hücresel gelişimleri boyunca yüksek miktarlarda PHB üretme potansiyeline sahiptir. Üretim aşamasında şeker kamışı melası, şeker pancarı melası, mısır şurubu gibi birçok endüstriyel atık kullanılarak PHB üretimi sağlanabilir (Yılmaz & Beyatlı, 2003).

2.12 Karışık Kültür ile PHB Üretimi

Zenginleştirilmiş kültür kullanılarak PHB üretimi, ardışık kesikli reaktörlerde (AKR) açıklık-tokluk şartlarının sağlanmasıyla elde edilir (Çokgör ve d., 2018). Karışık

kültür bakterileri ürettikleri polimeri açlık fazında depolayıp kıtlık fazında içsel tüketim için kullandıklarından diğer mikroorganizmalara göre rekabet avantajına sahiptirler (Salehizadeh & van Loosdrecht, 2004) (Çokgör ve d., 2018).

PHB'nin endüstriyel ölçekte üretiminde kullanılan saf suşların türü ve bakımı hem substrat hem de reaktör sterilizasyonu üretim maliyetlerini oldukça arttırmaktadır (Mannina ve d., 2019; Villano ve d., 2014). Fakat zenginleştirilmiş kültürle PHB üretiminde steril şartların korunmasına gerek yoktur ve gıda endüstrisi atık ve atık akımlarının kullanması ucuz karbon kaynağı sağlayarak maliyeti oldukça düşürmektedir (Reis ve d., 2003; Salehizadeh & van Loosdrecht, 2004; Villano ve d., 2014).

Karışık kültürlerin hücre yapılarının büyük olması daha fazla polimeri depolamasını sağlar ve hücre duvarlarının kırılabilirliğinin yüksek olması ekstraksiyon aşamasında hücre içinden daha fazla polimer ekstrakte edilmesine olanak sağlar (Mannina ve d., 2019).

2.13 Saf Kültür ile PHB Üretimi

Saf kültür bakterileri PHB üretiminde spesifik karbon kaynakları tercih ederler. Glikoz gibi saf karbon kaynaklarını kullanmaları maliyeti oldukça artırır ve proses esnasında sürekli sterilizasyon gerektirirler. Maliyetinin yüksek olmasına rağmen PHB üretim potansiyelleri oldukça yüksektir (Mannina ve d., 2019)(Monroy & Buitrón, 2020). Tablo 3'te bazı saf kültürler ve biyopolimer üretim miktarları verilmiştir.

Tablo 3. Bazı saf kültürler ve biyopolimer üretim miktarı

Bakteri Türü	Karbon Kaynağı	PHB Miktarı	Kaynak
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Asetat	200 mg/L	(Brandl ve d., 1989)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Bütirat	800 mg/L	(Luongo ve d., 2017)
<i>Rhodopseudomonas sp. S16-VOGS3</i>	Bütirat	1050 mg/L	(Carlozzi ve d., 2019)
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Malat	200 mg/L	(Vincenzini ve d., 1997)

2.14 Aerobik Dinamik Besleme Rejimi (ADB)

Aerobik Dinamik Besleme (ADB) rejimi ya da bir diğerk adıyla açlık tokluk rejimi 1996 yılında keşfedilmiş, temelinde büyümenin sınırlandırılması olan PHB üretimi için kullanılan besleme tipidir (Majone ve d., 1996).

Büyümenin sınırlandırılması 2 şekilde olmaktadır. 1. yöntemde fosfor ve nitrojen eksikliğinde PHB üretimi yapılabilir. 2. yöntemde ise büyüme için gerekli enzim ve RNA miktarının yeterli olmadığı durumlarda PHB sentezi gerçekleştirilir. Fakat en çok kullanılan yöntem nütrient ve iz metallerin eksikliğinde PHB sentezinin yapıldığı yöntemdir (Dias ve d., 2006).

Tokluk fazında sistem karbon kaynağı ile beslenir. Bu fazda bakteriler karbon kaynağı yüksek bir ortamda bulunmaktadır. Bakteriler substratı tamamen tükettikten sonra açlık fazı başlar. Açlık fazında strese giren bakteriler tokluk fazında hücre içi depo maddesi olan PHB'yi depolar. Dinamik koşullarda sistemde depolama büyüme faaliyetlerine göre daha önceliklidir fakat karbon kaynağının uzun süreli bulunduğu ortamda bakteriler substratı sadece büyüme için kullanabilir (Salehizadeh & van Loosdrecht, 2004).

Sadece büyüme odaklı bakterilerin bulunduğu sistemde PHB üretimi yapmak oldukça zordur. Bu durumda tokluk koşullarında uçucu yağ asitleri bittiği anda sistemden süpernatantın atılması, nütrient sınırlandırılması, açlık fazının süresinin değiştirilmesi ya da bolluk/açlık oranının 0,25'i geçmeyecek şekilde uygulanması gerekir (Kourmentza ve d., 2017; Villano ve d., 2014). Bolluk fazı 4 saat ise açlık fazının 16 saati geçmemesi gerekir.

2.15 Endüstriyel Atıksulardan PHB Biyopolimeri Üretimi

Bira endüstrisi atıksuyunda bulunan maltoz, ortamda pH'ın düşmesiyeke fermantasyon prosesi altında hidrolize uğrar ve glikoza dönüşür. Glikoz PHB üretiminde bakterilerinin kullanımı için uygun bir karbon kaynağıdır Amini (2020) yaptığı çalışmada bira atıksuyundan PHB biyopolimeri üretiminde farklı maltoz

oranlarının etkisi, farklı C/N etkisi ve pH'ın etkisi incelenmiştir. Çalışmada, bira fabrikası fermantasyon tanklarından alınan maltoz oranı yüksek atıksulara *C. necator* (DSMZ 454) saf kültürü aşılmalıdır ve ortam şartları; pH 4,5-7, oda sıcaklığı (25°C) ayarlanmıştır. Farklı maltoz oranlarının (20, 30, 40, 50 ve 60 g/L) etkisi incelendiğinde en yüksek verimin 40 g/L' de elde edildiği tespit edilmiştir. Yüksek karbon (60 g/L) miktarında üretimin en düşük olmasının sebebi ise yüksek ilk karbon konsantrasyonu (60 g/L), bakteriyel hücresel aktiviteleri inhibe etmesine, bu da yavaş karbon alımına ve daha az biyopolimer üretimine yani, substrat inhibisyonundan kaynaklanabilecek PHA konsantrasyonunun yanı sıra PHA birikim oranını da azalmasına neden olmaktadır. Farklı C/N oranlarının (100/2,100/4, 100/6) etkisine bakıldığında en yüksek PHB verimi C/N 100/2 ve maltoz miktarı 40 g/L'de elde edilmiştir ve oluşan PHB ağırlıkça %54'tür. pH'ın PHB üretimine etkisinde; bakterinin mikrobiyal büyümesi için optimum pH değeri 7 olmasına rağmen , pH 7'de PHB üretiminin maksimum ve minimum değerleri tespit edilmiştir. Bu nedenle, biyokütlenin PHB üretme tepkisi sadece optimize edilmiş pH'a bağlı olmadığını, aynı zamanda karbon kaynağının oranına (C/N40 ve C/N 60) da bağlı olduğu anlaşılmaktadır.

Palmeiro-Sánchez, (2016) yaptığı çalışmada substratın değişkenliğinin biyopolimer özellikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Denede 2 adet AKR kullanılmıştır. Bunlar: (1) PHA üreten mikrobiyal topluluğun aerobik dinamik besleme koşulları altında (tokluk-açlık rejimi) bir UYA karışımıyla beslenerek geliştirildiği kültür seçim aşaması ve (2) hücrelerin içindeki PHA içeriğini maksimize etmek için fazla organik madde altında çalıştırılan AKR'nin kullanıldığı biyopolimer üretim aşamasıdır. 1. reaktöre aşı için önceden fermente edilmiş ton balığı işleme atık suyu kullanılmıştır. Reaktör farklı miktarlarda Asetik Asit, Propiyonik Asit, Bütrik Asit, Valerik Asit ve KH_2PO_4 KCL ve $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ile beslenmiştir. Reaktörde ortam şartları ise; sıcaklık 30°C ve çözülmüş oksijen konsantrasyonu (tokluk) 7,6 mg/L ve (açlık) 0,4 mg/L'dir. Hidrolik bekletme süresi ve çamur yaşı 1 gündür. Reaktör 12 saatlik iki döngüde çalıştırılmıştır. 2. reaktör: Biyopolimer biriktirme deneyleri için 5 litreye kadar hacme sahip bir aerobik beslemeli kesikli reaktör kullanılmıştır. Bu reaktör, 1. reaktörden çekilen biyokütle ile aşılmalıdır. ÇO konsantrasyonu çevrimiçi olarak ölçülüp ve deney boyunca UYA karışımı eklenmiştir. PHA içeren tüm biyokütle numunelerinin her birine formaldehit eklenmiştir. Daha sonra numuneler -20°C'de

dondurulmuş ve ardından bir liyofilizatörde dondurularak kurutulmuştur. Daha sonra bu numuneler, geri kazanım ve biyopolimer saflaştırması için işlenmiştir. Sonuçlarda ise tek substrat olarak asetat kullanıldığında ağırlıkça %53,8'lik bir maksimum PHA miktarı elde edilmiştir.

Duque, (2014) yaptığı araştırmada üç aşamalı bir proses kullanılarak karışık mikrobiyal kültürler ile PHA üretimi gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak peyniraltı suyu ve şeker kamışı melası kullanılmıştır. Deney düzeneği üç laboratuvar ölçekli reaktör sistemi ve içi boş fiber membran filtrasyon modülünden oluşmaktadır. 1. aşama asidojenik fermentasyon için anaerobik biyoreaktör, 2. aşama PHA üreten karışık kültür için AKR ve 3. aşama PHA birikimi için AKR' den oluşmaktadır. 1. aşama ortam şartları; sıcaklık 37°C 'de ve pH 6'da tutulup C/N oranı 100/5,4'e ayarlanmıştır. 2. aşama ortam şartları; 800 mL'lik bir çalışma hacmine sahip bir AKR'de gerçekleştirilmiştir. Reaktör 4 aşamadan oluşan 2 döngüde çalıştırılmıştır. C/N/P molar oranı 100/10/1 tutulup döngü boyunca amonyak mevcudiyeti sağlanmıştır. Karıştırma 300 rpm'de yapılır ve pH 8'de tutulmuştur. 3. aşama ortam şartları; karışık kültürün PHA birikim performansı, sürekli havalandırma ve karıştırma sağlanan 500 ml çalışma hacimli cam reaktörde gerçekleştirilmiştir ve diğer şartlar 2. aşama ile aynıdır. Yapılan deney sonucunda ise fermente şeker kamışı melası ve peyniraltı suyundan sırasıyla %56 ve %65'lik bir maksimum PHA içeriğine ulaşılmıştır.

Campanari, (2014) zeytinyağı fabrikası atık suyundan karışık mikrobiyal kültür ile polihidroksialkanoat (PHA) üretimi, fenollerin giderilmesi ve geri kazanımını da içeren çok aşamalı bir süreç üzerine çalışma yapmıştır. Sürecin ilk aşaması, polifenollerin giderilmesi ve geri kazanımını takiben asidojenik bir fermentasyon ile zeytinyağı fabrikası atıksuyunu ön işlemine odaklanmaktadır. Ardından fermente edilmiş zeytinyağı atıksuyu 2,40 ile 8,40 g KOİ/L olarak reaktöre beslenmiştir. AKR döngüsünün uzunluğu günde dört döngü oluşturacak şekilde 6 saatte uygulanmıştır. Sıcaklık 25°C 'de ve pH 7,6'da kontrol edilmiştir. Başlangıç çözünmüş oksijen seviyesi 8 mg/L'dir. Reaktöre besleme yapılmaya başlandığında metabolik aktivitenin artması nedeniyle, ÇO seviyesi aniden 2 mg/L seviyesine düşmüştür. Bununla birlikte, ÇO yaklaşık 5 mg/L'lik bir konsantrasyonda stabilize olup yavaş yavaş başlangıç değerine (neredeyse 8 mg/L) geri dönmüştür. 30 günlük çalışmanın sonunda optimal çalışma

koşulu, 4,70 g KOİ/L'de gözlenmiştir. Sonuçta ise en yüksek PHB depolama hızı ve verimi değerini (%53) göstermektedir.

Colombo, (2016) yaptığı deneysel çalışmada: Farklı oranlarda laktik, asetik ve bütirik vb. asitlerden oluşan iki fermente peyniraltı suyu kullanılmıştır. Bu oranlar sırasıyla 1. atıksu için laktik, asetik ve bütirik asit 58/16/26 ve (% KOİ Organik Asit (OA)) oranlarındayken; 2. atıksu için asetik, propiyonik, bütirik, laktik ve valerik asit 58/19/13/6/4 (% KOİOA) olarak uygulanmıştır. PHA üreten bakterilerdeki zenginleştirme, aerobik dinamik besleme (ADB) stratejisi uygulanarak 1 litrelik bir çalışma hacmine sahip Ardışık Kesikli Reaktörde gerçekleştirilmiştir. Kısaca AKR döngü uzunluğu dört ayrı aşamadan oluşan 12 saattir: (i) giriş (4 dakika), (ii) havalandırma (675 dakika), (iii) çökeltme (40 dakika) ve (iv) geri çekme (5 dk). Hidrolik bekletme süresi 1 gün, Çamur yaşı 5 gün, Sıcaklık 25°C'de ve pH 8,8'de tutulmuştur. 6 L/dk havalandırma ve 110 rpm'de karıştırma sağlanmıştır. Sonuçta PHA birikimi 1. ve 2. atıksu için sırasıyla 296 ve 390 (PHA kg/VSS) elde edilmiştir.

Wang, (2019) yaptığı çalışmada, çözünmüş oksijen (ÇO) seviyelerinin hem PHA birikimi hem de aktif çamur için nitrifikasyon oranları üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Amaç, PHA üretimi sırasında gereksiz nitrifikasyon aktivitesini azaltacak olan PHA birikimi için optimum ÇO seviyesini belirlemektir. Deney 0 ile 5 mg/L arasındaki farklı ÇO seviyelerinde PHA üretim oranlarını belirlemek için 1 L (çalışma hacmi 800 mL) reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Havalandırma difüzörler ile sağlanıp manyetik karıştırma yapılmıştır. Gerçek zamanlı veriler her 10 saniyede bir kaydedilip her deney için ortalama ÇO değerleri hesaplanmıştır. Asetat, propiyonat, bütirat ve valeratin eşit Cmol konsantrasyonlarına sahip 8 mL'lik bir substrat karışımı başka hiçbir besin eklenmeden reaktöre dozlanmıştır. Biyokütlenin VSS konsantrasyonu yaklaşık 4,4 g/L ve pH, HCl (0,5 M) ile dozlama yoluyla yaklaşık 7,5'te kontrol edilmiştir. Sıcaklık 22°C'de tutulmuştur. Deney sonucunda ise daha yüksek ÇO koşullarında, tam nitrifikasyonla sonuçlanırken ihmal edilebilir toplam nitrojen giderimi sağlanmıştır. Amonyumun çoğu, az miktarda nitrit birikimiyle birlikte nitrata dönüştürülmüştür. ÇO konsantrasyonları sınırlayıcı olmadığına hem PHA üretimi hem de amonyum dönüşümü, görünür bir sınırlama olmaksızın paralel olarak ilerlediği gözlenmiştir. Yeterince düşük ÇO seviyelerinin uygulanmasıyla, biyopolimer birikimi eş zamanlı nitrifikasyon ve denitrifikasyon prosesleriyle ilerleyebildiği rapor edilmiştir.

Jiang, (2011a) sıcaklığın ve döngü uzunluğunun, kesikli reaktörlerde (AKR'ler) polihidroksibütirat (PHB) üreten popülasyonlar arasındaki mikrobiyal rekabet üzerindeki etkisi araştırmıştır. AKR'nin çalışması, başlangıç aşaması, besleme aşaması, reaksiyon aşaması ve biyokütle çıkış aşamasından oluşan 1 saat, 4 saat, 12 saat ve 18 saatlik döngüler olacak şekilde ayarlanmıştır. 4 saat ve 12 saat döngü uzunluğuna sahip iki AKR, 20°C 'de çalıştırılmıştır ve 1 saat, 4 saat, 12 saat ve 18 saat döngü uzunluklarına sahip dört AKR, 30°C 'de çalıştırılmıştır. Çamur yaşı ve hidrolik bekleme süresi 1 gün olarak ayarlanmıştır. Reaktörlerin pH 7'de tutulmuştur. Tüm reaktörler, tek karbon kaynağı olarak asetatla beslenmiştir. Tüm reaktörler için organik yük $2,25 \text{ Cmmol/Lh}^{-1}$ ' de sabit tutulmuştur. Sıcaklık değişimleri bazı türleri etkilediği gözlenmiştir. 20°C ve 30°C'de ortamda AKR'lerde *Zoogloea* ve *Plasticumulans acidivoranlar* suşları baskın olmuştur ve her ikisi de PHB'yi hücre kuru ağırlığının %75'inden fazlasını biriktirmiştir. Döngü başına beslenen substrat miktarı döngü uzunluğu ile ilişkili olduğundan, uzun döngü ile çalıştırılan reaktörlerindeki substrat konsantrasyonu önemli ölçüde daha yüksektir bu da daha fazla mikrobiyal faaliyete neden olup daha fazla PHA birikimi sağladığı rapor edilmiştir.

Jiang, (2011b) karışık kültürler üreten polihidroksibütirat (PHB) zenginleştirilmesi için laktat ve laktat/asetat karışımının kullanımını araştırmıştır. Karışık kültürler, bir açlık-tokluk rejimi oluşturan sıralı kesikli reaktörlerde (AKR) zenginleştirilmiştir. AKR'ler, asetat üzerinde üstün bir PHB üreten suşun (yani, 12 saatlik döngü uzunluğu, 1 günlük çamur yaşı ve 30°C, pH 7) zenginleştirilmesine olanak tanıdığı koşullar altında çalıştırılmıştır. Sonunda aktif çamurdan iki yeni karışık kültür zenginleştirilmiştir. Laktat üzerinde zenginleştirilmiş karışık kültüre, *Gammaproteo Bacterium* hâkim olduğu gözlenmiştir. Bu zenginleştirme, 6 saat içinde ağırlıkça %90'ın üzerinde PHB biriktirmiştir. Bu yüzden, bir bakteri kültürü için nihai PHB içeriği ve biyokütleyle özgü PHB üretim oranı açısından bildirilen en iyi sonuç olduğu gözlenmiştir. Asetat ve laktat karışımı (1:1 Cmol bazlı) üzerinde zenginleştirilmiş ikinci karışık kültür, 8 saatin biraz üzerinde bir sürede ağırlıkça %84'e kadar PHB üretmiştir. Bu kültürdeki baskın bakteri türleri, *Plasticumulans acidivorans* ve *Thauera selenatis*, büyük miktarlarda PHB biriktirdiği gözlenmiştir. Bu çalışmanın ana sonucu, farklı substratların kullanımının mikrobiyal kompozisyon

üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğu, ancak PHB üretim sürecinin işlevselliği üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Gouveia, (2017) peynir altı suyunu kullanarak asidojenik reaktör çalışma koşullarını, yani pH'ı kontrol ederek PHA biriktirme olasılığına odaklanmıştır. Amaç, pH'ı dinamik olarak değiştirmenin anaerobik reaktörün performansı ve mikrobiyal topluluk profili üzerindeki etkisini araştırmaktır. Çalışma hacmi 1,25 litre olan laboratuvar ölçekli Sürekli Karıştırmalı Tank Reaktör anaerobik koşullar altında çalıştırılmıştır. Reaktör, atıksu arıtma tesisinden alınan biyokütle ile aşılınmış ve peyniraltı suyu ile iklimlendirilmiştir. C:N oranı 100C-mol:6,3N-mol'dür ve HBS 1 gün olarak işletilmiştir. Anaerobik reaktör, pH 4 ile 7 arasında değişen dinamik pH değişiklikleri altında sürekli olarak çalıştırılıp her pH değişiminden sonra pH 6'ya ayarlanmıştır. pH 6'da, laktat ve asetat baskın ürünlerdir ve düşük pH'ta laktat üretimi daha yüksek iken, yüksek pH'ta asetat üretimi tercih edilmiştir. 200 gün boyunca çalıştırılan reaktörde; pH 4,5'te %95, pH 5'te %83, pH 6'da %70, pH7'de %75 PHA birikimi gözlenmiştir.

3. MATERYAL ve METOD

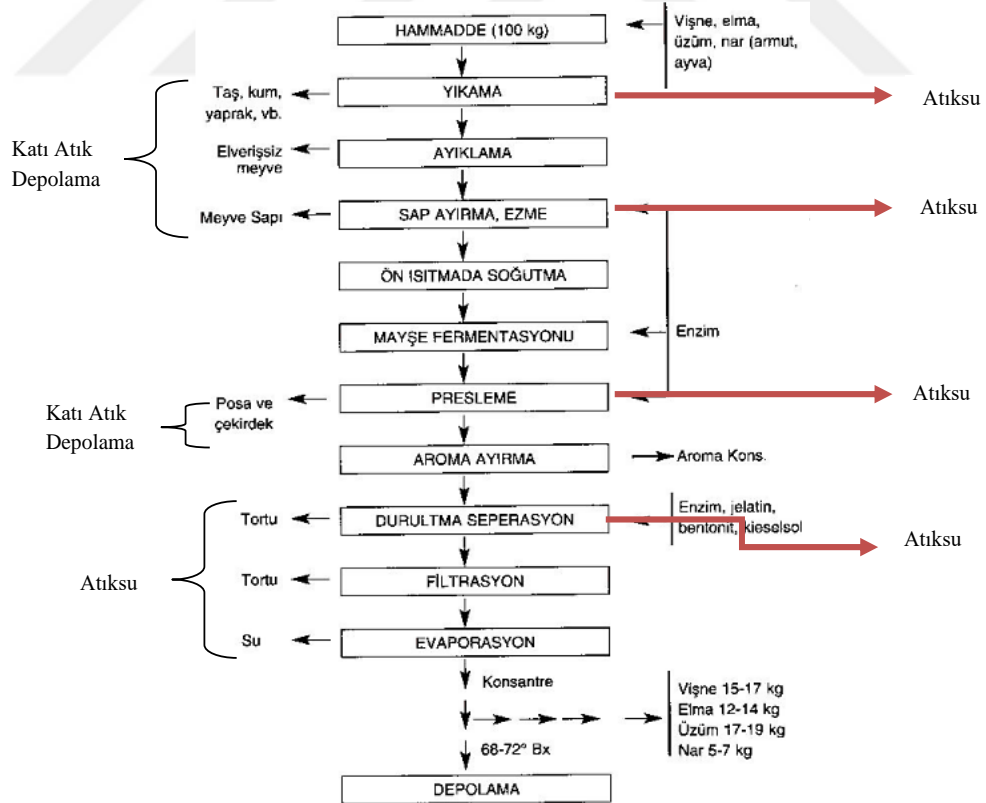
3.1 Materyal

Bu çalışmada karışık mikrobiyal kültürden PHB üretiminde sentetik vişne suyu atıksuyu kullanılmıştır. Düzenli olarak temin edilen evsel atıksu ve karışık bakteri kültür için kullanılan aşı çamuru Konya Atıksu Arıtma Tesisinden alınmıştır ve numuneler buzdolabında +4°C’de muhafaza edilmiştir. Bakteri numunesi aerobik şartların ve aktif çamur prosesinin sağlanması için hava pompası ve difüzörlerle havalandırılmış, günlük olarak beslenmiş ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.2 Metod

3.2.1 Atıksu Karakterizasyonu

Biyopolimer üretiminde karbon kaynağı olarak sentetiği kullanılan meyve suyu atıksuyu için üretim akış şeması Şekil 7’de verilmiştir. Meyve suyu üretiminden kaynaklanan atıksular yıkama, presleme ve filtrasyon basamaklarında oluşmaktadır.



Şekil 7. Meyve suyu Endüstrisi Üretim Şeması

Meyve suyu atıksuyunun organik içeriğini belirlemek için Kimyasal Oksijen ihtiyacı (KOİ) parametresi belirlenmiştir. Azot kaynağı olarak kullanılan evsel atıksu ve bakteri numunesi için ise KOİ, Amonyak azotu, AKM, UAKM deneyleri yapılmıştır. Ardışık kesikli reaktörde reaksiyon boyunca her saat başı alınan numuneler için de KOİ, amonyak azotu, AKM, UAKM, TKM ve UKM analizleri yapılmış ve sonuçlar Tablo 4 'te verilmiştir.

Tablo 4. Numuneler ve karakterizasyon sonuçları

Parametre Numune	KOİ (mgO₂/L)	Amonyak (mgNH₃ - N/L)	AKM (mg/L)	UAKM (mg/L)	pH	İletkenlik μS/cm
Evsel Atıksu	450	110	3450	1935	6,9	30,8
Bakteri numunesi (aşı çamuru)	195	60	6170	2555	7,6	22,18
Sentetik meyvesuyu atıksuyu	100.000	0				

Aşı numunesi için günlük besleme planı belirlenmiştir. Bunun için amonyum klorür (NH₄Cl), sodyum asetat trihidrat (C₂H₃NaO₂3H₂O), sodyum fosfat heptahidrat (NaHPO₄7H₂O) kimyasalları hesaplanan miktarlarda aşı reaktörüne eklenmiştir. Buna göre:

1 gr sodyum asetat içinde;

$$58,04/136,08= 0,44 \text{ gr asetat} \longrightarrow 1/30\text{'u kadar NH}_4\text{Cl}$$

$$0,015/14.53,5=0,057 \text{ gr} \longrightarrow 1/3\text{'ü kadar Sodyum fosfat}$$

$$0,003/94,9.268,07=0,0085 \text{ gr}$$

Sonuç olarak aşı numunesi günlük 1 gr asetat, 0,057 gr azot, 0,0085 gr fosfor ile beslenmiştir.

3.2.2 Adaptasyon çalışmaları

Adaptasyon çalışmaları için 2 litrelik dereceli beher reaktör olarak düzenlenmiş ve hacminin 1.2 litresi aktif olarak kullanılmıştır (Şekil 8). Reaktör, manyetik karıştırıcı cihazına yerleştirildikten sonra içerisine manyetik balık ve difüzör konulup adaptasyon sürecinde 20°C’de ve 500 rpm’de çalıştırılmıştır. Tablo 5’te 24 sa’lik reaktör işletim döngüsü verilmiştir.

Adaptasyon çalışmaları, bakterinin değişen ortam şartlarına alışması için yeni çalışma şartlarında 1 hafta uygulanmıştır. Adaptasyon çalışmaları için reaktöre 600 mL aşı çamuru konulup, C/N oranına göre reaktör evsel atıksu ve meyve suyu atıksuyu ile beslenmiştir. Döngü sırasında 1 saatlik aralıklarla numuneler alınıp (KOİ) ve amonyak azotu deneyleri yapılmıştır. KOİ giderimi için 4 saatlik reaksiyon süresinin yeterli olduğu belirlenmiştir.



Şekil 8. Çalışmalarda Kullanılan Ardışık Kesikli Reaktör Düzeneği

Tablo 5’te KOİ giderimine göre besleme planı verilmiştir. Çöktürme ve boşaltma işleminden sonra reaktör sabah 09:30’da beslenmiştir.13:30’a kadar numuneler alınıp deneyler yapılmıştır. 13:30’dan 17:30’a (açlık periyodu) kadar reaktör havalandırılmıştır. 17:30’da gece beslemesi yapılmıştır. Gece beslemesinin ardından alınan numune sabah 07:30 numunesidir.

Tablo 5. Günlük Çalışma Döngüsü

Proses	Çöktürme	Boşaltma	Besleme ve Reaksiyon	Açlık periyodu	Gece beslemesi ve Reaksiyon
Zaman	07:30	08:30	09:30	13:30 (başlangıç) 16:30 (bitiş)	17:30 (başlangıç) 07:30 (bitiş)
Süre (saat)	1	1	4	3	15 saat

3.2.3 PHB Üretim Çalışması AKR İşletim koşulları

Adaptasyon çalışmalarının ardından PHB depolayabilme kapasitesinin belirlenmesi için PHB reaktörü, sıcaklık (20, 28, 30°C), C/N (30, 40 ,60) ve çamur yaşı (1, 2, 5, 10 gün) olacak şekilde meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenmiştir. Havalandırma ve karışım sağlanarak aktif çamur prosesi yürütülmüştür. Başlangıçta ve döngü sırasında numuneler alınmıştır. 1 saatlik aralıklarla alınan bu numunelerin analizleri yapılmıştır. PHB analizleri için alınan numuneler 10 ml santrifüj tüplerine konulup -20°C’ de dondurucuda muhafaza edilmiştir. Çamur yaşını sağlamak için çalışılan çamur yaşına göre reaktörden 1, 2, 5 ve 10 gün çamur yaşı için sırayla 800, 600, 240 ve 120 mL karışık sıvı (çamur+atıksu) sistemden atılmıştır. Sistemden atılan karışık sıvı (çamur+atıksu) Garrett formülüne göre hesaplanmıştır (Smith ve d., 2013).

$$\text{Çamur Yaşı} = \frac{V}{F_w}$$

Çamur yaşı:gün

V: Reaktör hacmi m³ (1.2 L)

F_w: Çekilen çamurun debisi m³/gün

PHB depolayabilme kapasitesinin belirlenmesi için AKR’nin işletildiği koşullar **Tablo 6.**’da özetlenmiştir.

Tablo 6. Aktif çamur AKR işletme koşulları

Sıcaklık (°C)	C/N (g/g)	Çamur Yaşı (gün)	Başlangıç KOİ Konsantrasyonu (mg O ₂ /L)
20	40	1, 5, 10	1400-1600
	60	1, 5, 10	
28	30	1, 2,5	2000
	40	1, 2, 5	
	60	2, 5	
30	30	1, 2, 5	2000
	40	1, 2, 5	

Reaktör Tablo 6 'da verilen parametrelerde işletilip PHB analizleri yapılmıştır. Fakat GC cihazı arızası nedeniyle bazı numunelerin PHB analizi yapılamamıştır. Analizi yapılamayan numuneler aşağıda verilmiştir.

- 28 °C, C/N 30, çamur yaşı 5 gün
- 30 °C, C/N 30 çamur yaşı 1 ve 2 gün
- 30 °C, C/N 40 çamur yaşı 1, 2 ve 5 gün

3.2.4 Analiz Prosedürü

Deneyler aşağıda belirtilen standart metotlara göre yapılmıştır. (APHA 2005)

- Askıda katı madde AKM (2540.D)
- Uçucu askıda katı madde UAKM (2540.E)
- Toplam Katı madde (TKM) (2540.B)
- Uçucu Katı madde (UKM) (2540.E)
- Amonyak azotu (4500 NH₃-N A ve B.)
- Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) (5220-C)

Deneylerde ve reaksiyon boyunca alınan her numune için oksidasyon redüksiyon potansiyeli (ORP) ve pH ölçümlerinde HAC HQ 40d cihazı kullanılmıştır. Oda sıcaklığı için laboratuvar ölçekli termometre kullanılmıştır. Reaktör sıcaklığı için 100 W'lık akvaryum ısıtıcısı kullanılmıştır. İletkenlik ölçümleri için WTW Inolab Cond 7110 cihazı kullanılmıştır.

AKM ve UAKM analizlerinde cam elyaf filtre kağıdı (isolab-0,45 µm) 105°C'de etüvde 1 saat kurutulduktan sonra tartılıp filtrasyon düzeneğine yerleştirilmiştir. Reaksiyon sırasında karışık sıvıdan alınan 10 mL numune süzöldükten sonra filtre kağıdı 105°C'de etüvde 1.5 saat kurutulup tartılıp AKM hesaplanmıştır. Ardından filtre kağıdı 550°C'de kül fırınında 20 dakika yakılıp tartılarak UAKM konsantrasyonu hesaplanmıştır.

TKM analizi için kroze 103-105°C'de sabit tartıma getirilmiştir. İyice karıştırılmış 10 mL numunen kroze konulup 103-105°C'de etüvde kurutulduktan sonra desikatörde soğutulup tartılmıştır. UKM tayini için tartılan kroze 550°C'de 30 dakika boyunca yakma sonrası desikatörde soğutulup tartıldıktan sonra hesaplaması yapılmıştır.

Amonyak azotu deneyi 10 mL karışık sıvı numunesi borosilikat cam balonuna alınıp 100 mL'ye saf su ile tamamlanması sonrasında yürütülmüştür.

KOİ deneyi kapalı "reflux" metodu ile yürütülmüştür.

PHB analizleri için döngü sırasında alınan karışık sıvı numuneleri 10 mL santrifüj tüplerine konularak -20°C' de muhafaza edilmiştir. GC analizinden önce numuneler liyofilizatörde (BIOBASE BK-FD12) 24 saat dondurularak kurutulmuştur. (Şekil 9).



Şekil 9. Liyofilizatör cihazı

GC analizi için; kurutulmuş katı çamur tartılarak doğrudan HCl, metanol ve hegzan ilavesi ile karıştırılarak 100°C'de 1 sa boyunca esterleştirme işlemi uygulanmıştır. Hegzan ve su ilavesinden sonra 1 mL'lik üst süzüntü fazı GC/FID analizine yönlendirilmiştir. Kolon ısıtma programı 100°C 'den başlayarak 8°C/dk'lık ısınma hızında 235°C'lik son seviyeye kadar ısıtma ve 5 dk bekleme süreci şeklinde uygulanmıştır. İnjektör ve dedektör sıcaklıkları 240°C ve 1:2 split modunda injeksiyon olarak uygulanmıştır. GC'de Agilent-FFAP kapiler kolonu kullanılmıştır.

3.2.5 Reaksiyon Derecesi ve Hız Katsayısı Belirleme

Tablo 6'da reaksiyon dereceleri ile ilgili eşitlikler verilmiştir. Eşitlikler kullanılarak reaksiyon dereceleri belirlenmiştir.

Tablo 6. Reaksiyon dereceleri ile ilgili eşitlikler

Reaksiyon Derecesi	Diferansiyel Hız Yasası	İntegre Edilmiş Eşitlik	Doğrusal Eğri
Sıfıncı Derece	$-dC/dt = k$	$C_t = -k_0t + C_0$	C_t vs t
Birinci Derece	$-dC/dt = kC$	$\ln(C_t) = -k_1t + \ln(C_0)$	$\ln(C_t)$ vs t
İkinci Derece	$-dC/dt = kC^2$	$1/C_t = k_2 + 1/C_0$	$1/C_t$ vs t

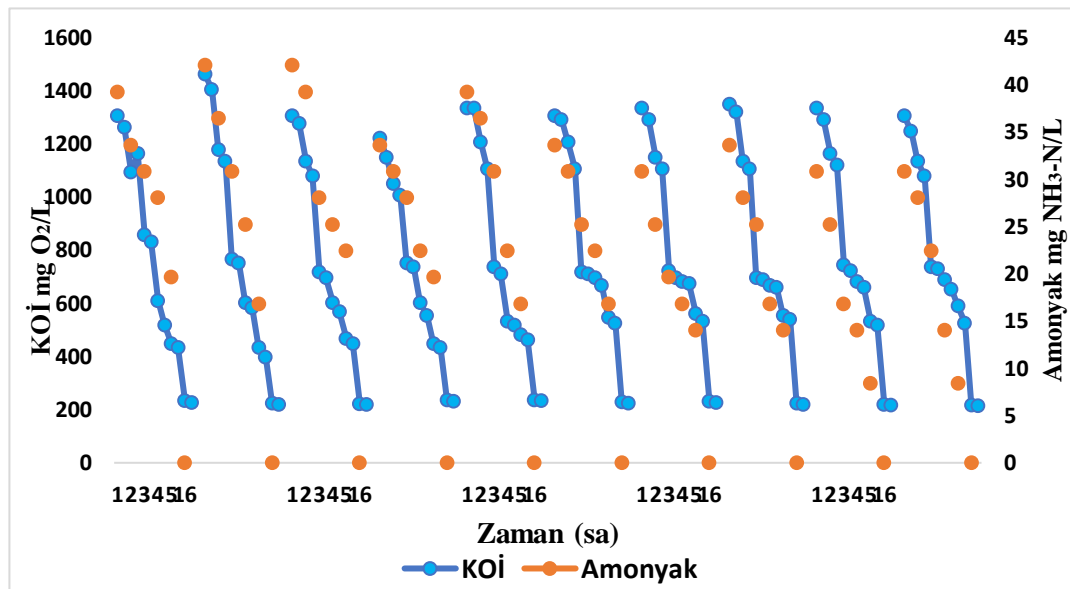
4. BULGULAR

4.1 20°C’de Yapılan Aktif Çamur AKR Çalışmaları

4.1.1 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 10 Gün Deneyleri

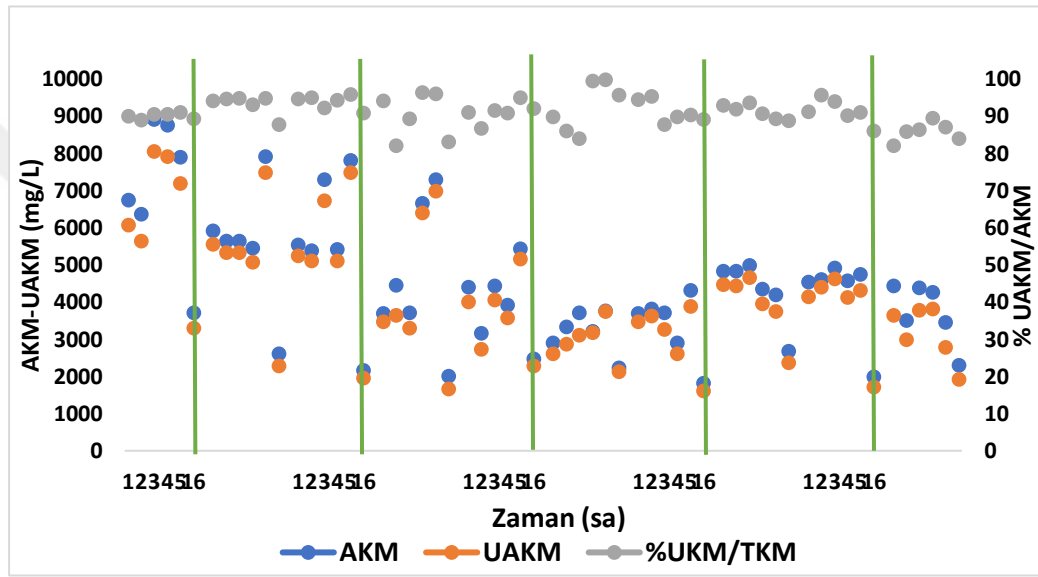
Adaptasyon aşamasında reaktör C/N oranı 40 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenip çamur yaşı 10 gün olacak şekilde işletilmiştir. Adaptasyon sürecinin ardından PHB analizleri için reaktör aynı parametrelerle (C/N 40, çamur yaşı 10 gün) 10 gün boyunca işletilmiştir. 10 gün boyunca reaksiyon süresince alınan numunelerle KOİ, amonyak (Şekil 10), AKM ve UAKM (Şekil 11) değişimi izlenmiştir.

Giriş KOİ değeri 1600 mgO₂/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 200 mgO₂/L’ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonunun 40 mgNH₃-N/L’den 14-16 mgNH₃-N/L seviyelerine indiği gözlenmiştir. Amonyumun tamamen tüketilmemesi hücre sentezi reaksiyonlarının döngü boyunca tamamlanmadığını göstermektedir. Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mgNH₃-N/L ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,292 sa⁻¹ ve k 0,229 sa⁻¹’tir



Şekil 10. C/N 40 ve çamur yaşı 10 gün için KOİ ve Amonyak giderim grafiği

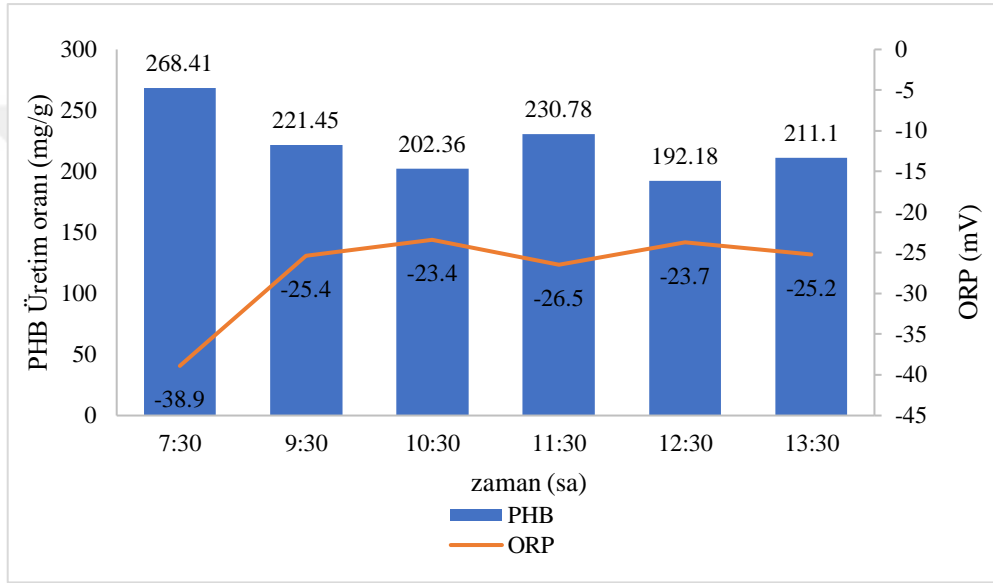
PHB analizinin yapıldığı 10. günün reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 4430 mg/L ve 3630 mg/L olarak, reaksiyon sonunda ise AKM ve UAKM değerleri 4190 mg/L ve 3320 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 11). 07:30 numunesinde UAKM değeri 1710 mg/L iken çöktürülmeden beslenen evsel atıksudan gelen ilave UAKM ile başlangıç değeri 3650 mg/L'ye yükselmektedir. Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,82 olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon sonunda ise UAKM/AKM oranı ise 0,80 olarak hesaplanmıştır. Bu değer 0,75 ampirik değerinden (Wentzel ve d., 2002) yüksektir ve yüksek çamur canlılığını gösterir.



Şekil 11. C/N 40 ve çamur yaşı 10 gün için AKM ve UAKM değerleri

Şekil 12'de sunulan PHB üretimine bakıldığında; gece beslemesinin ardından alınan numunede (07:30) PHB üretim oranı en yüksek seviyede (268 mg/g) gerçekleşmiştir. Bunun nedeni, gece beslemesinde uzun süreli açlık nedeniyle evsel atıksudan gelen uçucu partiküllerin tüketilmesi ve PHB depolayan bakteri popülasyonu için N yokluğunda uzun süreli substrat kaynağı olarak kullanıldığı ve/veya depolama yapamayan bakteri türlerinin içsel solunuma uğradığı şeklinde açıklanabilir. Mikroorganizmalar azotun bulunmadığı ortamda, uzun açlık periyodunda hücre içi depolanmış PHA kullanılarak hayatta kalacağı için (W. S. Lee ve d., 2015; Silva ve d., 2017) gece periyodunun açlık süresi, gündüz periyodunun açlık süresinden uzun olması nedeniyle mikroorganizma, gece periyodunun açlık fazında daha fazla miktarda PHB üretmiştir. Burada uçucu partiküllerin yavaş ayrışma özelliğinin katkısı kabul edilebilir.

Besleme saatinde (09:30, KOİ 1400 mg O₂/L) PHB seviyesinin 221 mg/g olduğu görülmektedir. Reaksiyon boyunca PHB oranında 190-230 mg/g aralığında artış ve azalmalar fark edilmiştir ve reaksiyon boyunca ortalama 211 mg/g oranı gerçekleşmiştir. Başlangıç oranının korunduğu fakat ilave üretimin gerçekleşmediği gözlenmiştir. Reaksiyon boyunca ortamda azot bulunması ve kullanılması, hücre sentezinin gerçekleştiğini ve PHB depolarının değişikliğe uğramadığını göstermiştir. ORP seviyesinin gece sonunda en düşük değerde gerçekleşmesi, oksijenin, gündüz reaksiyona göre gece döngüsünde daha yoğun olarak kullanıldığını göstermesi bakımından önemlidir.



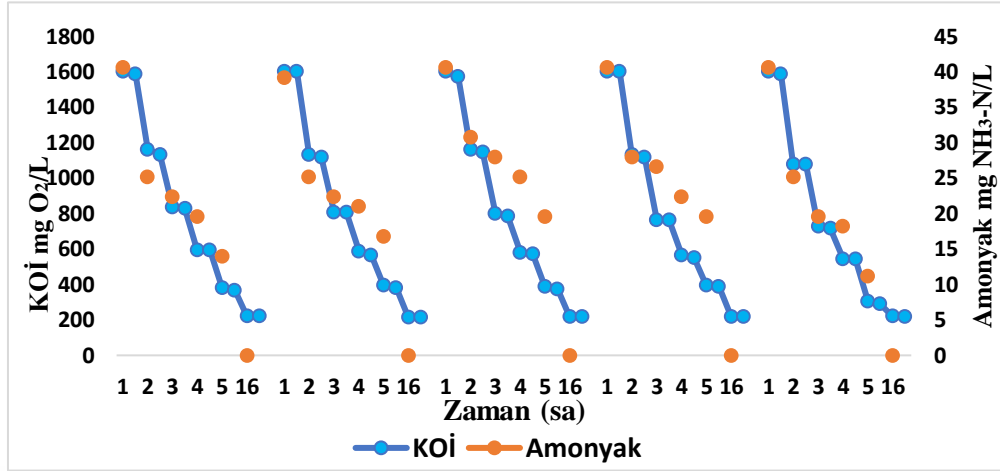
Şekil 12. C/N 40 ve çamur yaşı 10 günlük için PHB üretim oranları ve ORP değerleri

4.1.2 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 5 Gün Deneyleri

Reaktör C/N oranı 40 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenmiştir ve çamur yaşı 5 gün olacak şekilde 5 gün boyunca işletilmiştir.

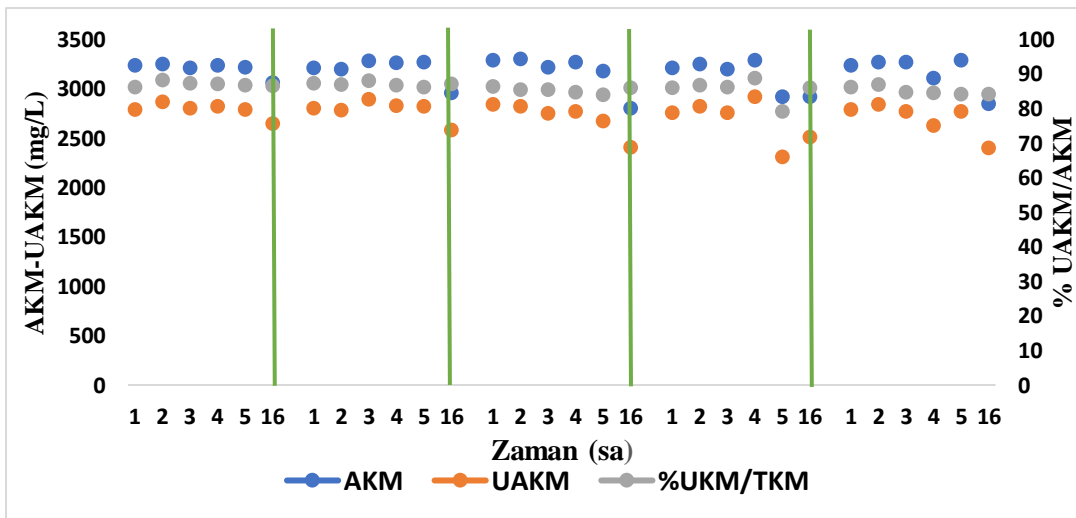
Giriş KOİ değeri 1600 mgO₂/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 200 ± 2 mg O₂/L'ye düşmüştür ve amonyak konsantrasyonunun 40±1 mg NH₃-N/L'den 9-11 mg NH₃-N/L seviyelerine indiği gözlenmiştir (Şekil 13). Amonyumun tamamen tüketilmemesi hücre sentezi reaksiyonlarının döngü boyunca tamamlanmadığını göstermektedir. Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mg NH₃-N/L ölçülmüştür (Şekil 13). Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,280 sa⁻¹ ve k 0,202 sa⁻¹ 'tir. C/N 40 çamur yaşı

10 güne göre k hız katsayıları düşmüştür. Bu da reaksiyon hızının azaldığını göstermektedir.



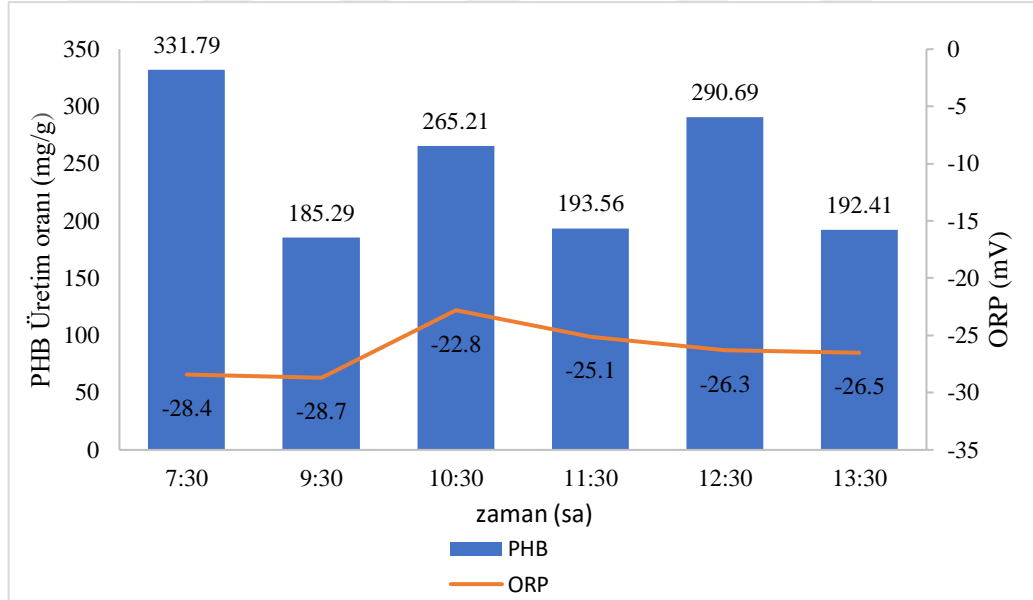
Şekil 13. C/N 40 ve çamur yaşı 5 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

PHB analizinin yapıldığı 5. günün reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 3240 mg/L ve 2790 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 14). Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,85 olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon sonunda 2920 mg AKM/L ve 2310 mg UAKM/L seviyelerinde azalma gerçekleşirken gece beslemesi sonundaki UAKM seviyesi (2400 mg/L) gerçek bakteri konsantrasyonunu göstermektedir. Reaksiyon sonu UAKM/AKM oranı ise 0,79 seviyelerine düşerek reaksiyon sonunda canlılığın düştüğünü göstermektedir.



Şekil 14. C/N 40 ve çamur yaşı 5 gün için AKM ve UAKM değerleri

Şekil 15 PHB üretim grafiğinde gece beslemesinin ardından alınan numunede (07:30) PHB üretim oranının en yüksek seviyede (331 mg/g) olduğu görülmektedir. Bunun nedeninin mikroorganizmalar azotun 0 mg NH₃-N/L olduğu ortamda, uzun açlık periyodunda hücre içi depolanmış PHB kullanılarak hayatta kalacağı için en yüksek PHB miktarının en uzun açlık periyodunda ürettiği bilinmektedir (W. S. Lee ve d., 2015). En düşük üretim besleme saatinde (09:30) ortamdaki karbonun ve azotun en yüksek olduğu seviyede (1600 KOİ mgO₂/L, amonyak 40,6 mg NH₃-N/L) başlangıç PHB oranının 185 mg/g olduğu görülmektedir, sebebi ise çöktürme ardından boşaltma işleminde sistemden çamur kaçma ihtimalidir. Reaksiyon boyunca üretimde artış ve azalışlar gerçekleşmiştir ve reaksiyon boyunca 190-290 mg/g arasında üretim gerçekleşmiştir. 1 saat aralıklarla PHB miktarının artıp azalması bakterinin ürettiği PHB'yi kullandığını sonraki saat tekrar ürettiği tahmin edilmektedir. En düşük ORP değeri gece beslemesinin sonunda gerçekleşmiştir. ORP değerleri gece ve gündüz beslemesinde de aynı seviyelerdedir, bakteri oksijeni her iki döngüde de aynı değerlerde kullanmıştır.

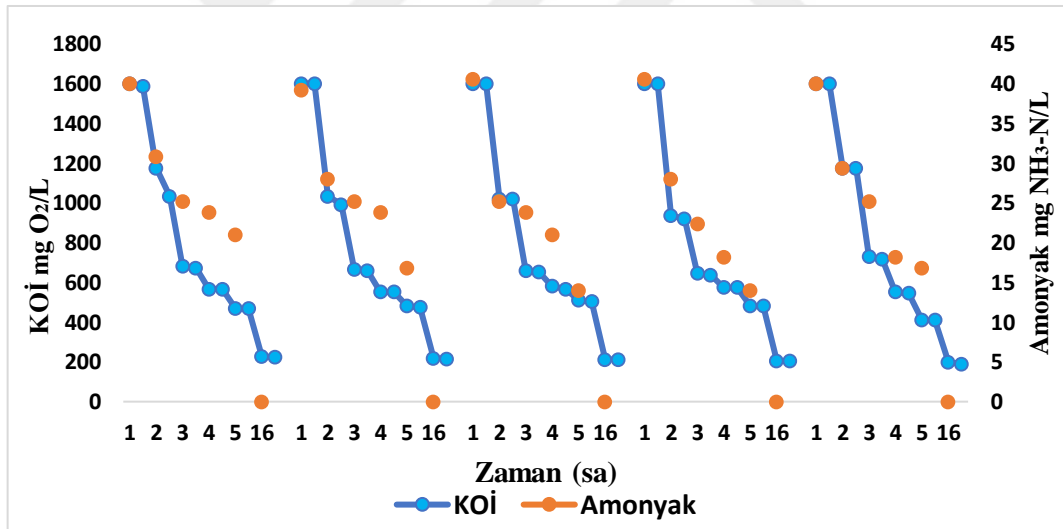


Şekil 15. C/N 40 ve çamur yaşı 5 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri

4.1.3 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 1 Gün Deneyleri

Reaktör C/N oranı 40 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenmiştir ve C/N 40 çamur yaşı 1 gün olacak şekilde 5 gün boyunca işletilmiştir.

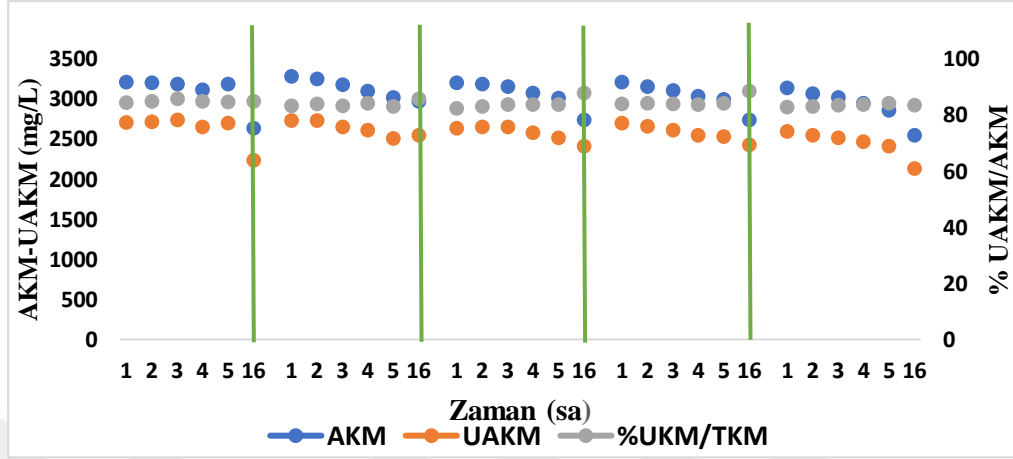
Giriş KOİ değeri 1600 ± 3 mg O₂/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 200-210 mg O₂/L'ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonunun 40 ± 1 mg NH₃-N/L'den 10-14 mg NH₃-N/L seviyelerine indiği gözlenmiştir bu da döngü boyunca hücre sentezi reaksiyonlarının tamamlanmadığını göstermektedir. Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mg NH₃-N/L ölçülmüştür (Şekil 16). Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,242 sa⁻¹ ve k 0,154 sa⁻¹'tir. C/N 40 çamur yaşı 1, 5 ve 10 gün için yapılan çalışmalarda en düşük k hız katsayısı çamur yaşı 1 gün gerçekleşmiştir. K sabiti değeri azaldıkça reaksiyon hızı azalmaktadır.



Şekil 16. C/N 40 ve çamur yaşı 1 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

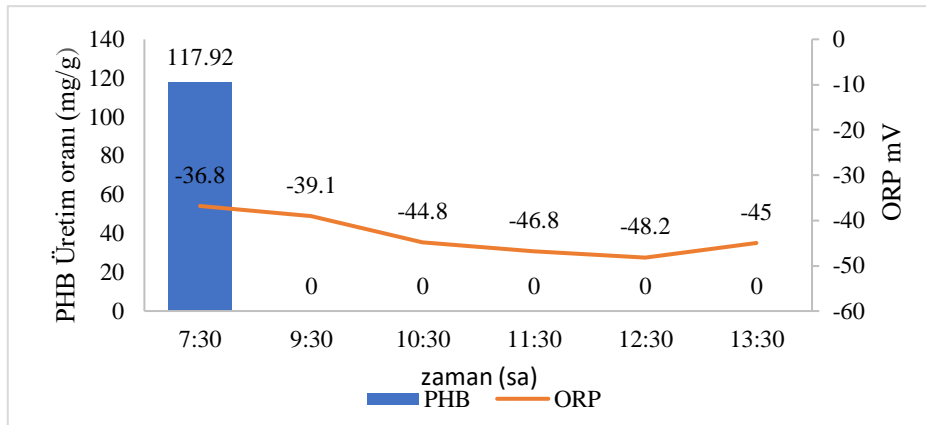
PHB analizinin yapıldığı 5. günün reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 3140 ± 8 mg/L ve 2600 ± 10 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 17). Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,82 olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon sonunda 2860 mg AKM/L ve 2410 mg UAKM/L azalma gerçekleşirken gece beslemesi sonundaki UAKM seviyesi (2100 mg/L) gerçek bakteri konsantrasyonunu göstermektedir. Reaksiyon sonunda UAKM/AKM oranı ise 0,84 olarak benzer seviyede kalmıştır. Bu

değer 0,75 ampirik değerinden (Wentzel ve d., 2002) yüksektir ve yüksek çamur canlılığını gösterir. Başlangıç ve reaksiyon sonundaki değerler benzer seviyede kalarak canlılık seviyesini korumuştur.



Şekil 17. C/N 40 ve çamur yaşı 1 gün için AKM ve UAKM değerleri

Düşük çamur yaşında bakterinin PHB depolama için kullandığı substratın çok az olduğu bilinmektedir. Bakteri düşük çamur yaşında substratın büyük bir kısmını büyüme ve yaşamsal faaliyetler için kullanmaktadır (Dionisi ve d., 2005). Reaksiyon boyunca üretim gerçekleşmemiştir ve düşük çamur yaşının (1 gün) üretimde etkisi görülmektedir. Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunesinde (117 mg/g) uzun açlık periyoduyla PHB üretiminin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 18). Uzun açlık süresinin yaşandığı gece beslemesinde bakteri, evsel atıksudan gelen uçucu partikülleri karbon kaynağı olarak kullanıp PHB üretimi gerçekleştirmiştir. En düşük ORP değerleri gündüz periyodunda ölçülmüştür. Gündüz periyodunda daha fazla oksijen kullanılmıştır.

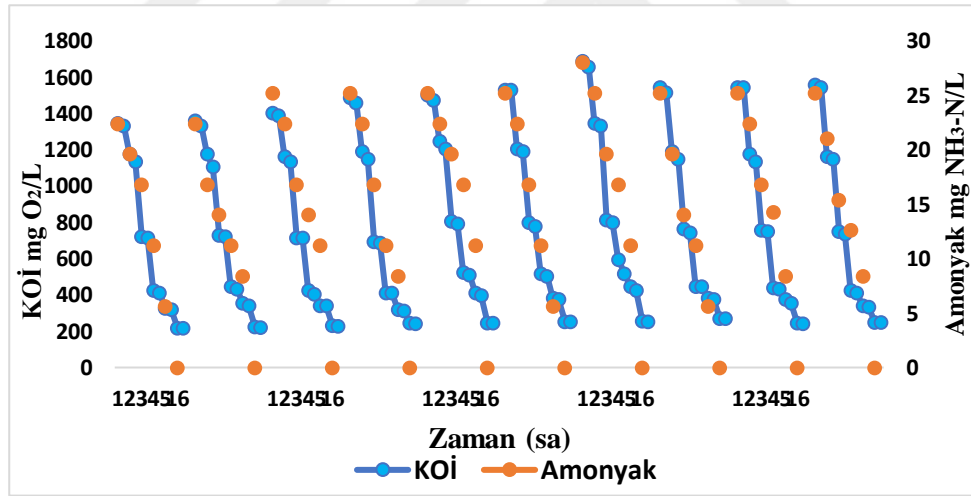


Şekil 18. C/N 40 ve çamur yaşı 1 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri

4.1.4 C/N 60 ve Çamur Yaşı: 10 Gün Deneyleri

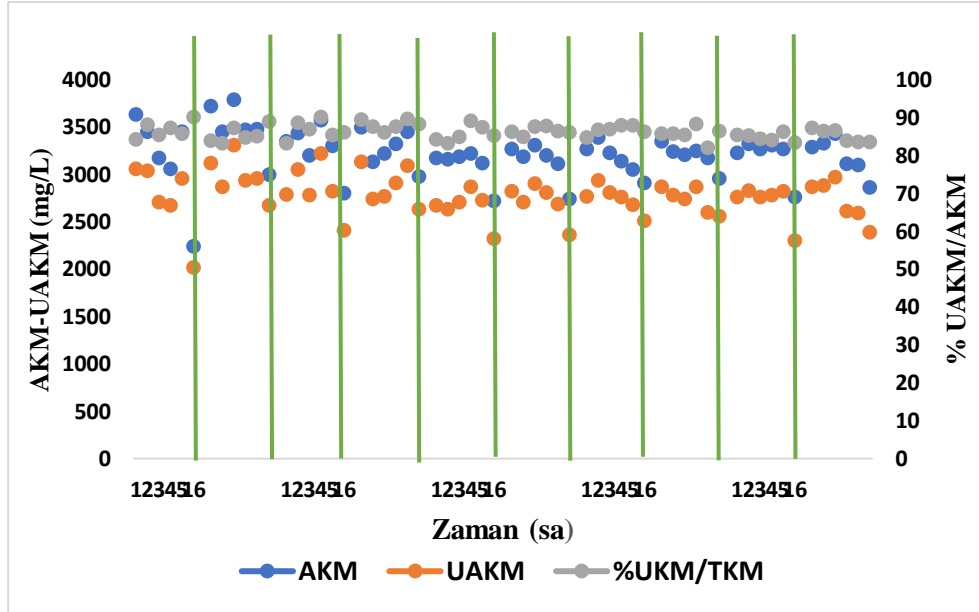
Adaptasyon aşamasında reaktör C/N oranı 60 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenip çamur yaşı 10 gün olacak şekilde işletilmiştir. Adaptasyon sürecinin ardından PHB analizleri için reaktör aynı parametrelerle (C/N 60, çamur yaşı 10 gün) 10 gün boyunca işletilmiştir. 10 gün boyunca reaksiyon süresince alınan numunelerle KOİ, amonyak, AKM ve UAKM değişimi izlenmiştir (Şekil 19, Şekil 20).

Giriş KOİ değeri 1600 ± 3 mgO₂/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 190-200 mg O₂/L'ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonu 25 ± 1 mg NH₃-N/L'den 5 mg NH₃-N/L seviyelerine indiği gözlenmiştir (Şekil 19). Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mg NH₃-N/L ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,299 sa⁻¹ ve k 0,188 sa⁻¹'tir.



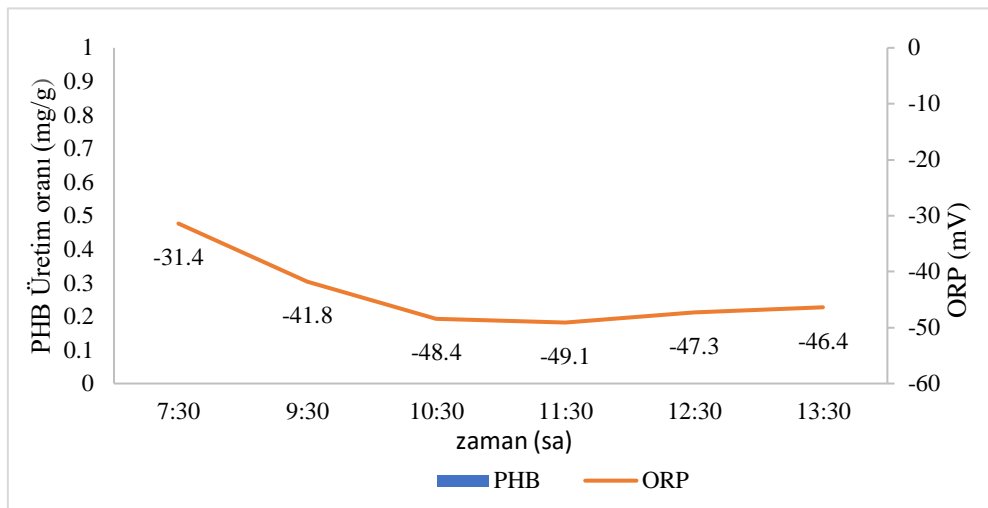
Şekil 19. C/N 60 ve çamur yaşı 10 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

PHB analizinin yapıldığı 10. günün reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 3290 mg/L ve 2870 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 20). Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,87 olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon sonunda 3100 mg AKM/L ve 2590 mg UAKM/L azalma gerçekleşirken gece beslemesi sonundaki UAKM seviyesi (2390 mg/L) gerçek bakteri konsantrasyonunu göstermektedir. Reaksiyon sonunda UAKM/AKM oranı ise 0,83 olarak azalma gerçekleşmiştir. Başlangıca göre azalma gerçekleşmiş ve biyolojik canlılık azalmıştır.



Şekil 20. C/N 60 ve çamur yaşı 10 gün için AKM ve UAKM değerleri

20°C'de C/N 60 çamur yaşı 10 gün için PHB üretimi gerçekleşmemiştir (Şekil 21). Ortamdaki yüksek karbon varlığı (C/N 60) bakteriyel hücresel aktiviteleri inhibe etmesine, bu da yavaş karbon alımına ve daha az biyopolimer üretimine neden olmuştur. Ayrıca yüksek çamur yaşında PHB üretimi azalmaktadır (Chen ve d., 2017). En düşük ORP değerleri gündüz beslemesinde gerçekleşmiştir, oksijen gündüz beslemesinde daha yoğun kullanılmıştır.

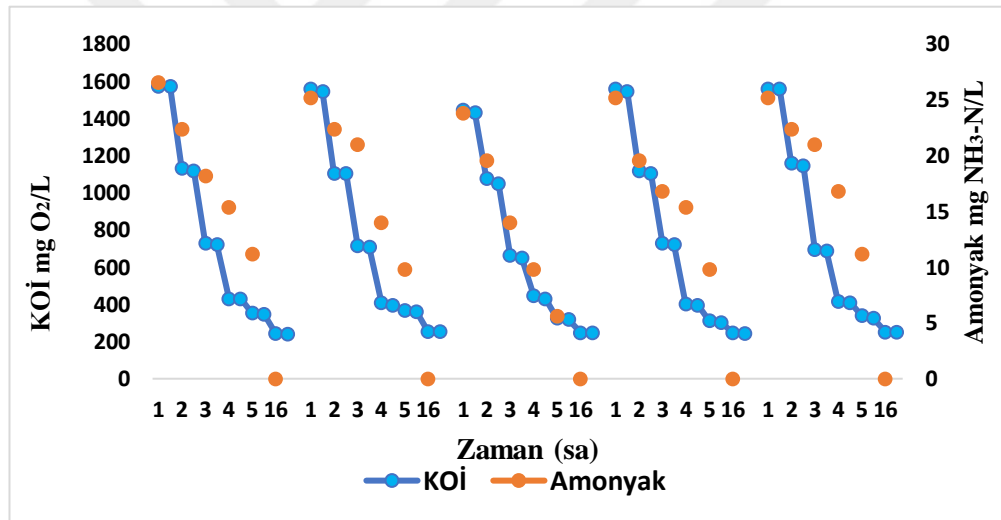


Şekil 21. C/N 60 ve çamur yaşı 10 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri

4.1.5 C/N 60 ve Çamur Yaşı: 5 Gün Deneyleri

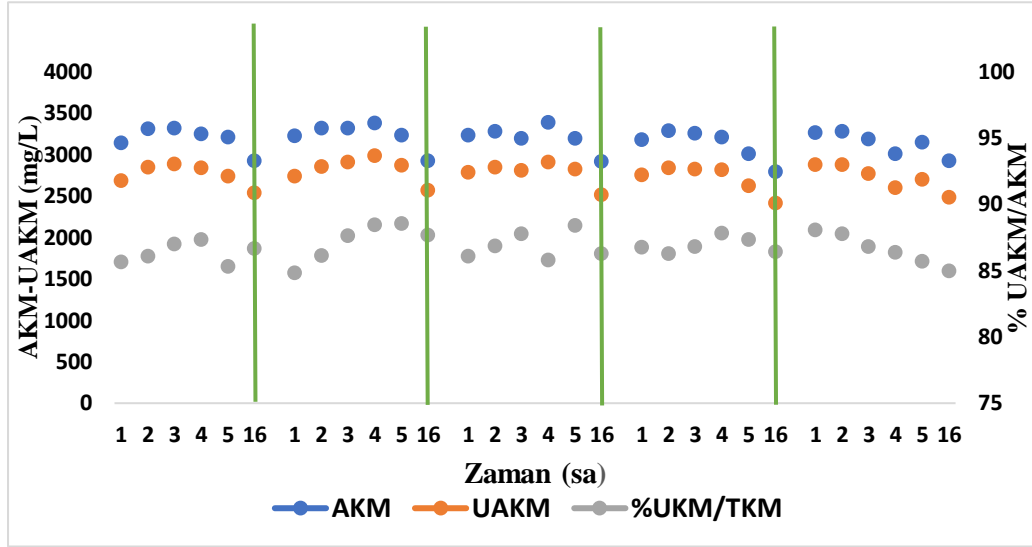
Reaktör C/N oranı 60 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenmiştir ve çamur yaşı 5 gün olacak şekilde 5 gün boyunca işletilmiştir.

Giriş KOİ değeri 1600 mg O₂/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 195-200 mg O₂/L'ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonu 25 mg NH₃-N/L'den 5 mg NH₃-N/L seviyelerine indiği gözlenmiştir (Şekil 22). Amonyumun tamamen tüketilmemesi hücre sentezi reaksiyonlarının döngü boyunca tamamlanmadığını göstermektedir. Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mg NH₃-N/L ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,285 sa⁻¹ ve k 0,148 sa⁻¹'tir.



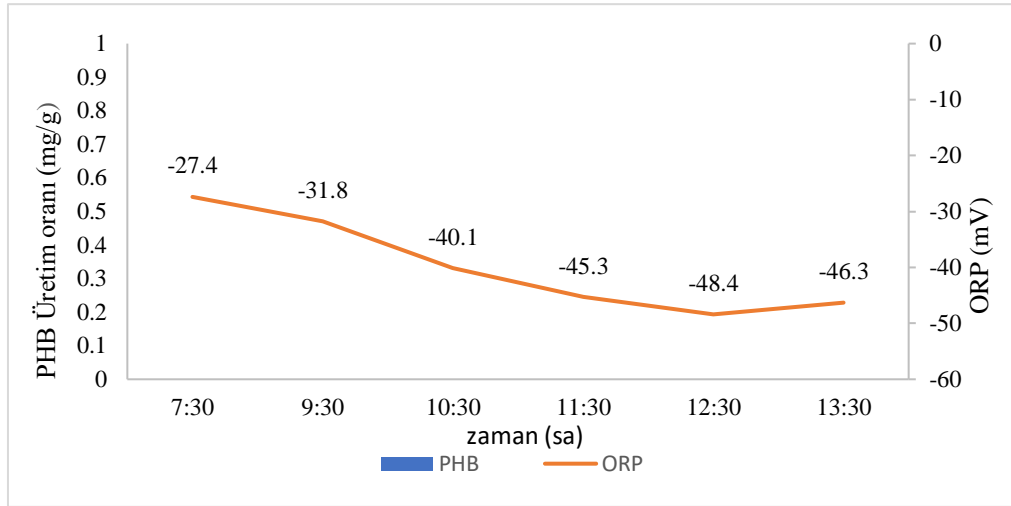
Şekil 22. C/N 60 ve çamur yaşı 5 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

PHB analizinin yapıldığı 5. günde reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 3270 mg/L ve 2880 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 23). Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,88 olarak hesaplanmıştır ve reaksiyon sonunda 3150 mg AKM/L ve 2700 mg UAKM/L seviyelerinde azalma meydana gelirken gece beslemesi sonundaki UAKM seviyesi (2490 mg/L) gerçek bakteri konsantrasyonunu göstermektedir. Reaksiyon sonunda UAKM/AKM oranı ise 0,84'e düşerek biyolojik canlılığın düştüğünü göstermiştir.



Şekil 23. C/N 60 ve çamur yaşı 5 gün için AKM ve UAKM değerleri

20±2°C'de C/N 60 çamur yaşı 5 gün içi PHB üretimi gerçekleşmemiştir (Şekil 24). Ortamdaki yüksek karbon varlığının (C/N 60) bakteriyel hücrel aktiviteyi inhibe etmesine, bu da yavaş karbon alımına ve daha az biyopolimer üretimine neden olmuştur. En düşük ORP değerleri gündüz beslemesinde gerçekleşmiştir, oksijen gündüz beslemesinde daha yoğun kullanılmıştır.

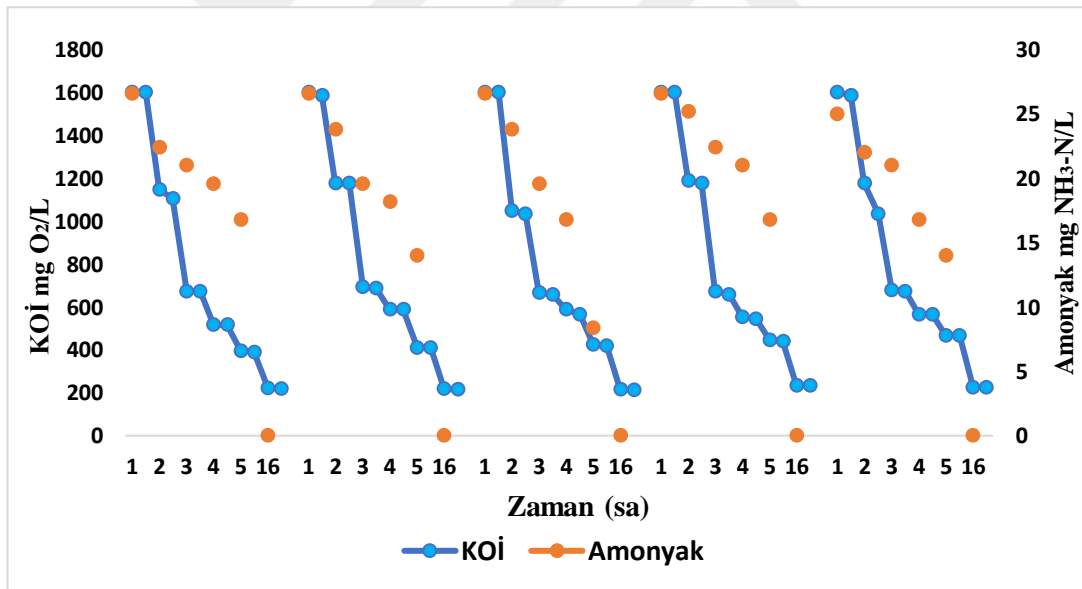


Şekil 24. C/N 60 ve çamur yaşı 5 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri

4.1.6 C/N 60 ve Çamur Yaşı: 1 Gün Deneyleri

Reaktör C/N oranı 60 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenmiştir ve çamur yaşı 1 gün olacak şekilde 5 gün boyunca işletilmiştir.

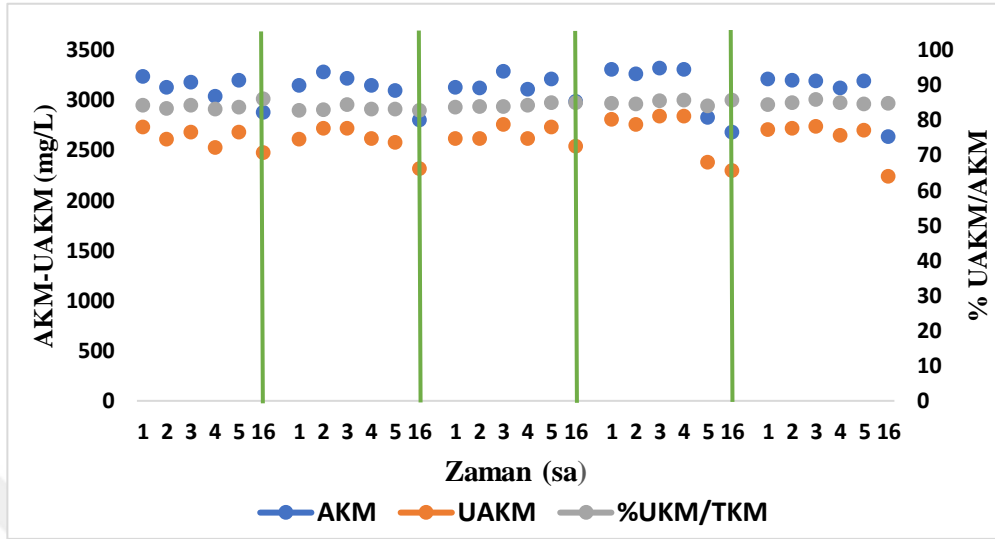
Giriş KOİ değeri 1600 ± 3 mg O₂/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 195-200 mgO₂/L'ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonunun 25 ± 2 mgNH₃-N/L'den 5-8 mgNH₃-N/L seviyelerine indiği gözlenmiştir ve bu değer hücre sentezi reaksiyonlarının döngü boyunca tamamlanmadığını göstermektedir (Şekil 25). Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mgNH₃-N/L ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,217 sa⁻¹ ve k 0,146 sa⁻¹'tir. C/N 60 yapılan çalışmalarda en yüksek KOİ amonyak k hız katsayıları çamur yaşı 10 gün'de, en düşük k hız katsayıları çamur yaşı 1 gün'de elde edilmiştir. k hız kat sayısı arttıkça reaksiyon hızı artmaktadır.



Şekil 25. C/N 60 ve çamur yaşı 1 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

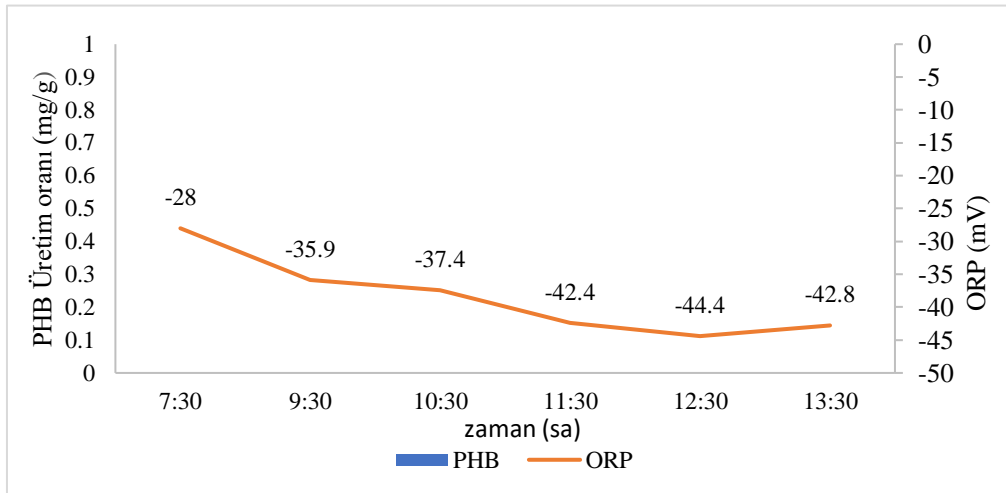
PHB analizinin yapıldığı 5. günde reaksiyon başlangıç AKM ve UAKM değerleri 3310 mg/L ve 2810 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 26). Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,84 olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon sonunda 2830 mg AKM/L ve 2380 mg UAKM/L düzeylerine azalma gerçekleşirken gece beslemesi sonundaki UAKM seviyesi (2240 mg/L) gerçek bakteri konsantrasyonunu

göstermektedir. Reaksiyon sonunda UAKM/AKM oranı ise 0,85'te kalarak biyolojik aktivitenin sistemde stabil olduğu gözlenmiştir.



Şekil 26. C/N 60 ve çamur yaşı 1 gün için AKM ve UAKM değerleri

C/N oranı 60 için yapılan çalışmalarda PHB üretimi gerçekleşmemiştir (Şekil 27). Bunun sebebinin düşük sıcaklığın (20 ± 2 °C) PHB üretimini olumsuz etkilemesine ve ortamdaki yüksek karbon varlığının (C/N 60) bakteriyel hücresel aktiviteleri inhibe etmesine, bu da yavaş karbon alımına ve daha az biyopolimer üretimine neden olmuştur. Bu nedenle bakteri karbon kaynağını PHB üretimi için değil büyüme için kullanmıştır.



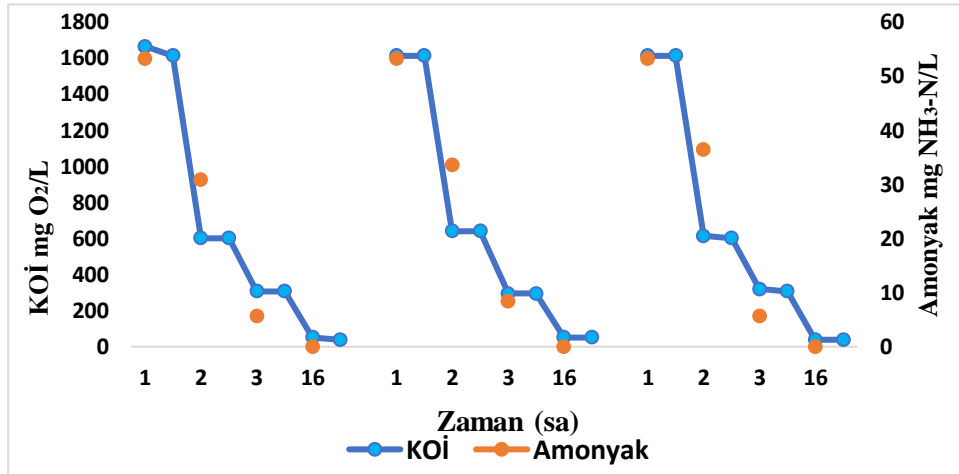
Şekil 27. C/N 60 ve çamur yaşı 5 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri

4.2 28°C’de Yapılan Aktif Çamur AKR Çalışmaları

4.2.2 C/N 30 ve Çamur Yaşı: 5 Gün Deneyleri

Adaptasyon aşamasında reaktör C/N oranı 30 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenip çamur yaşı 5 gün olacak şekilde işletilmiştir. Adaptasyon sürecinin ardından PHB analizleri için reaktör aynı parametrelerle (C/N 30, çamur yaşı 5 gün) 3 gün boyunca işletilmiştir. 3 gün boyunca reaksiyon süresince alınan numunelerden KOİ, amonyak azotu, AKM ve UAKM değişimi izlenmiştir (Şekil 28, Şekil 29).

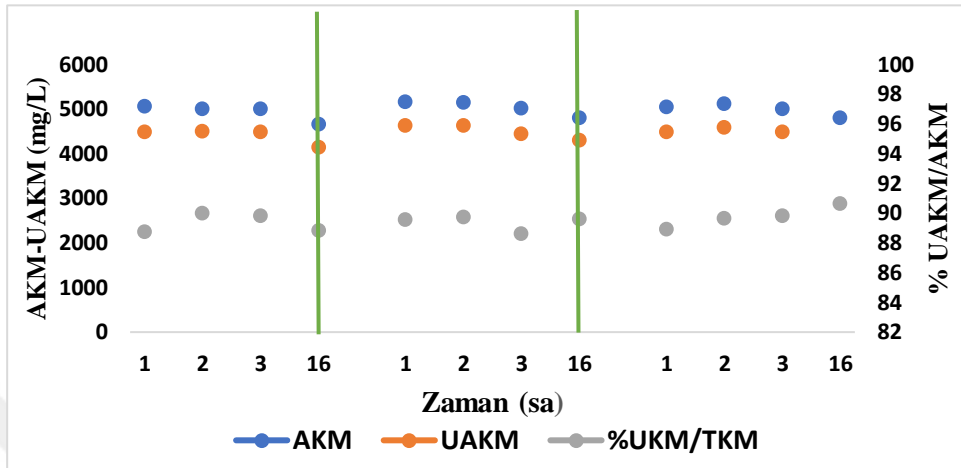
Giriş KOİ değeri 2000 ± 26 mg O₂/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 100 ± 1 mg O₂/L’ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonunu 53 ± 2 mgNH₃-N/L’den 5 mg NH₃-N/L seviyelerine indiği gözlenmiştir, bu da döngü boyunca hücre sentezi reaksiyonlarının tamamlanmadığını göstermektedir (Şekil 28). Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mg NH₃-N/L ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,569 sa⁻¹ ve k 0,464 sa⁻¹’tir. 28 °C’de C/N 30 için yapılan çalışmalarda en yüksek k hız katsayısı çamur yaşı 5 gün içindir ve 20°C’deki k hız kat sayıları ile kıyaslanacak olursa 28°C’de k sabit değerleri daha yüksektir. Sıcaklığın reaksiyon hızını arttırdığı gözlenmiştir. K hız kat sayıları arttıkça reaksiyon hızı artmaktadır.



Şekil 28. C/N 30 ve çamur yaşı 5 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

3. günde reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 5040 mg/L ve 4480 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 29). Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,88 olarak

hesaplanmıştır. Reaksiyon sonunda 5000 mg AKM/L ve 4490 mg UAKM/L olarak benzer seviyelerde kalırken, reaksiyon sonu UAKM/AKM oranı ise 0,89 olarak benzer düzeyde gerçekleşmiştir. Bu değer 0,75 ampirik değerinden (Wentzel ve d., 2002) yüksektir ve yüksek çamur canlılığının gösterir.

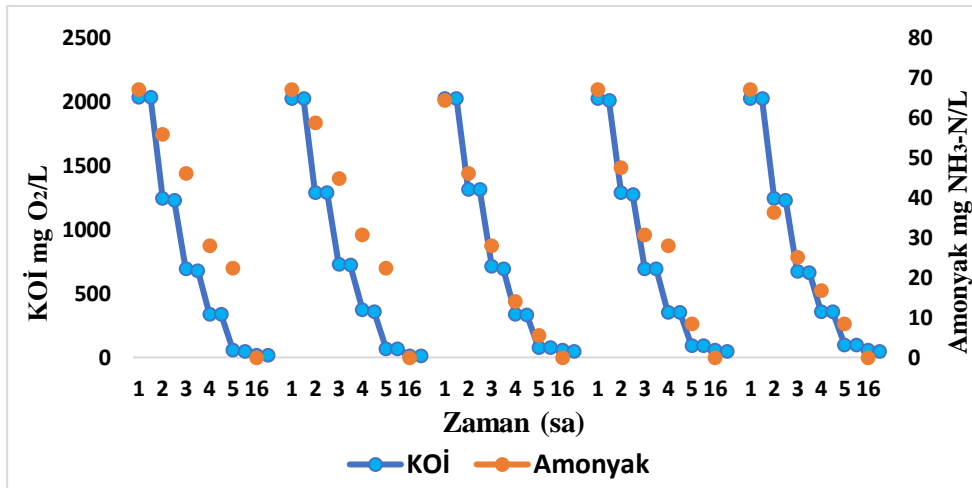


Şekil 29. C/N 30 ve çamur yaşı 5 gün için AKM ve UAKM değerleri

4.2.3 C/N 30 ve Çamur Yaşı: 2 Gün Deneyleri

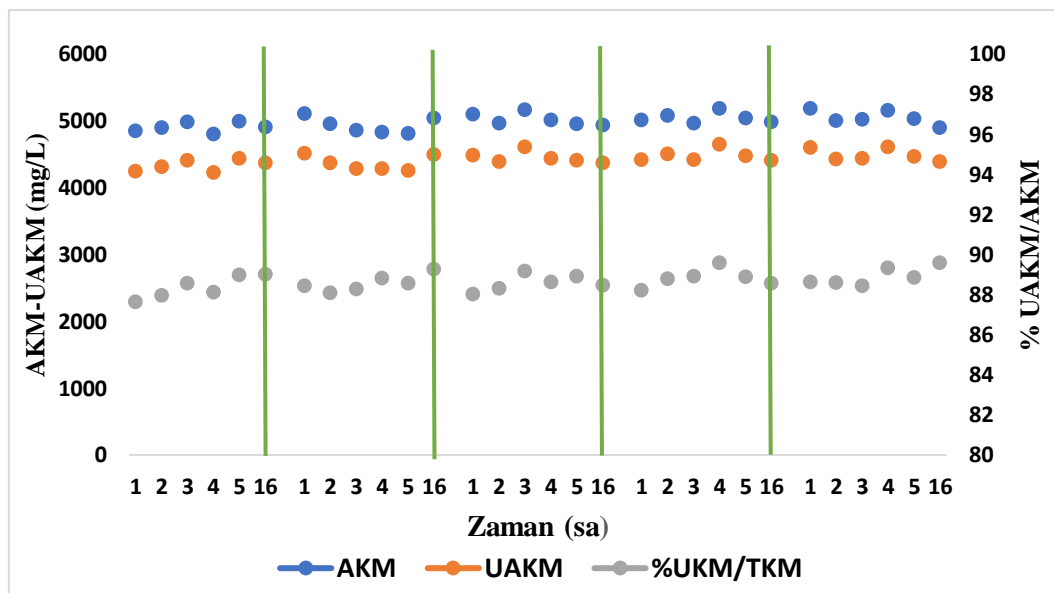
Reaktör C/N oranı 30 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenip çamur yaşı 2 gün olacak şekilde 5 gün boyunca işletilmiştir. 5 gün boyunca reaksiyon süresince alınan numunelerden KOİ, amonyak, AKM ve UAKM değişimi izlenmiştir. (Şekil 30, Şekil 31).

Giriş KOİ değeri 2000 ± 26 mg O_2/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 100 ± 1 mg O_2/L 'ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonunu 67 ± 2 mg NH_3-N/L 'den 8 mg NH_3-N/L seviyelerine indiği gözlenmiştir, bu da döngü boyunca hücre sentezi reaksiyonlarının tamamlanmadığını göstermektedir (Şekil 30). Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mg NH_3-N/L olarak ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla $k 0,505 \text{ sa}^{-1}$ ve $k 0,343 \text{ sa}^{-1}$ 'tir.



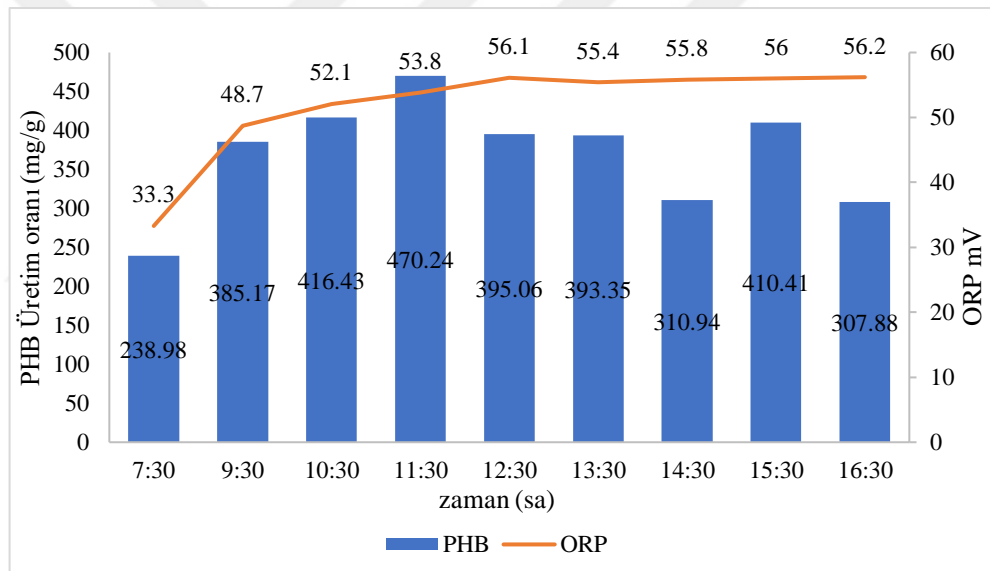
Şekil 30. C/N 30 ve çamur yaşı 2 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

PHB analizinin yapıldığı 5. günde reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 5100 mg/L ve 4600 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 31). Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,88 olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon sonunda 4900 mg AKM/L ve 4300 mg UAKM/L seviyelerine azalma gerçekleşirken reaksiyon sonu UAKM/AKM oranı ise 0,89 olarak benzer düzeyde gerçekleşmiştir. Bu değer 0,75 ampirik değerinden (Wentzel ve d., 2002) yüksektir ve yüksek çamur canlılığının gösterir.



Şekil 31. C/N 30 ve çamur yaşı 2 gün için AKM ve UAKM değerleri

Şekil 32’de sunulan PHB üretim oranlarına baktığımızda en düşük üretimin gece beslemesinin ardından alınan (07:30) numunesinde olduğu görülmektedir. Düşük C/N oranında açlık süresinin uzamasıyla bakteri ürettiği PHB’yi kullanmakta ve üretilen PHB miktarı azalmaktadır (Fradinho ve d., 2016). Ortama karbon kaynağı eklenmesiyle ilk 2 saat boyunca (11:30’ a kadar) PHB üretiminin yükseldiği ve reaksiyon süresince üretimin ortalama 383 mg/g olduğu gözlenmiştir. 13:30’dan sonra ortamdaki karbon ve azotun bitmesiyle açlık periyodu başlamış ve tokluk periyoduna göre daha az PHB üretimi gerçekleşmiştir. 20 °C’de yapılan çalışmalara göre bu çalışmada PHB oranlarının arttığı gözlenmiştir. 20 °C’de yapılan çalışmalarda PHB oranları 200-240 mg/g arasındayken, sıcaklığın artmasıyla birlikte üretimde de artış gerçekleşmiştir. ORP değerleri gündüz beslemesinde reaksiyon boyunca artmıştır. ORP seviyesi gece sonunda en düşük seviyededir ve bakteri oksijeni gece periyodunda yoğun olarak kullanmıştır.



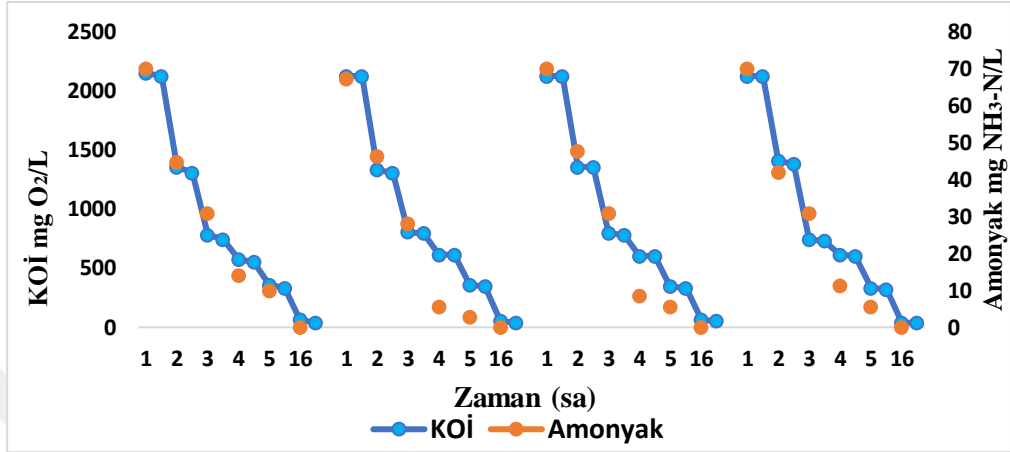
Şekil 32. C/N 30 ve çamur yaşı 2 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri

4.2.4 C/N 30 ve Çamur Yaşı: 1 Gün Deneyleri

Reaktör C/N oranı 30 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenip çamur yaşı 1 gün olacak şekilde 4 gün boyunca işletilmiştir.

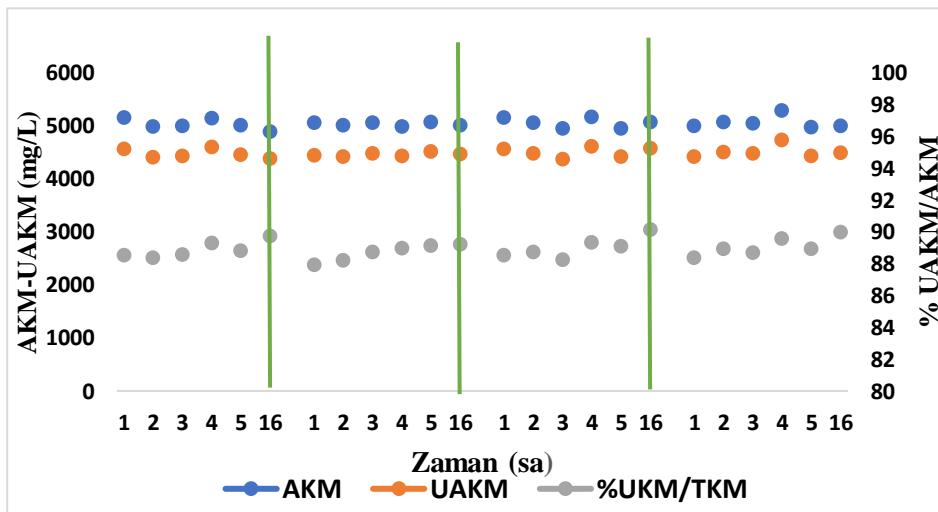
Giriş KOİ değeri 2100 ± 26 mg O₂/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 100 ± 1 mg O₂/L'ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonu 70 ± 2 mg NH₃-N/L'den 5 mg NH₃-N/L seviyelerine indiği gözlenmiştir (Şekil 33). Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mg NH₃-N/L ölçülmüştür. Şekil 28’de KOİ

ve amonyak giderimleri gösterilmiştir. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,386 sa^{-1} ve k 0,309 sa^{-1} 'tir. C/N 30 çamur yaşı 5 ve 2 gün'deki hız katsayıları ile kıyaslandığında bu çalışmadaki k hız kat sayılarının düştüğü gözlenmiştir. K hız katsayıları azaldıkça reaksiyon hızı azalmaktadır.



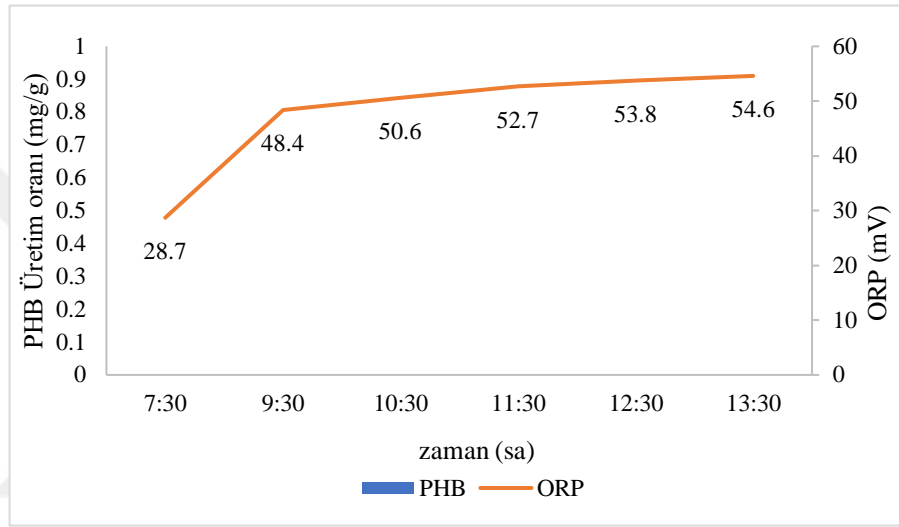
Şekil 33. C/N 30 ve çamur yaşı 1 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

PHB analizinin yapıldığı 4. günde reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 5160 mg/L ve 4570 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 34). Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,88 olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon sonunda 4960 mg AKM/L ve 4420 mg UAKM/L seviyelerine inerken, UAKM/AKM oranı ise 0,89 olarak neredeyse aynı düzeyde kalmıştır. Bu değerler çamur canlılığının reaksiyon boyunca aynı olduğunu göstermiştir.



Şekil 34. C/N 30 ve çamur yaşı 1 gün için AKM ve UAKM değerleri

C/N 30 ve çamur yaşı 1 gün olan çalışmada PHB üretimi olmamıştır (Şekil 35). C/N 30 çamur yaşı 2 gün için ortalama 383 mg/g PHB oranı elde edilmiştir fakat çamur yaşının 1 güne düşmesiyle üretim gerçekleşmemiştir. Bunun nedeni düşük C/N oranında (C/N 30) ve düşük çamur yaşında (1 gün) PHB üretimi az miktarlarda gerçekleşir ya da bakteri karbon kaynağını sadece büyüme için kullanır ve PHB üretimi gerçekleştirmez (Amini ve d., 2020; Dionisi ve d., 2005). ORP değerleri gündüz beslemesinde reaksiyon boyunca artmıştır ve gece sonunda en düşük seviyededir ve bakteri oksijeni gece periyodunda yoğun olarak kullanmıştır.



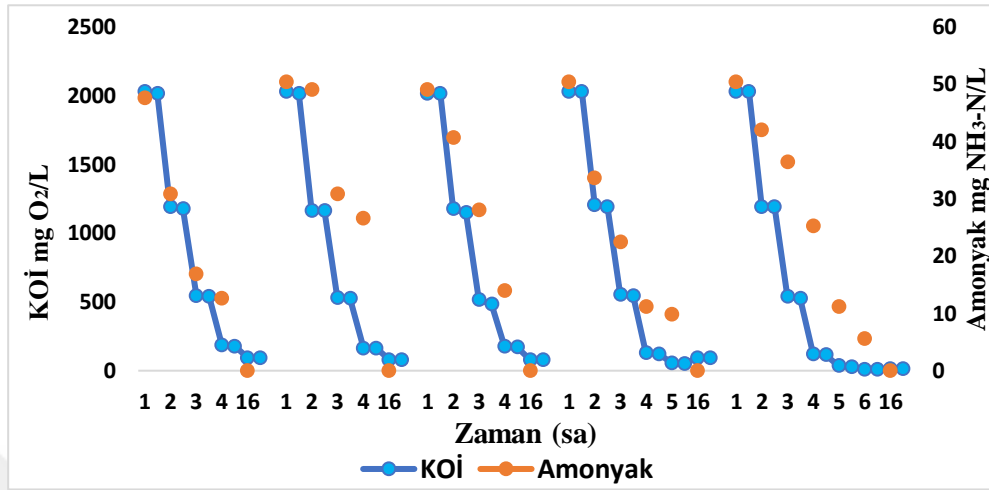
Şekil 35. C/N 30 ve çamur yaşı 1 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri

4.2.5 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 5 Gün Deneyleri

Adaptasyon aşamasında reaktör C/N oranı 40 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenip çamur yaşı 5 gün olacak şekilde işletilmiştir. Adaptasyon sürecinin ardından PHB analizleri için reaktör aynı parametrelerle 5 gün boyunca işletilmiştir. 5 gün boyunca reaksiyon süresince alınan numunelerle KOİ, amonyak, AKM ve UAKM değişimi izlenmiştir (Şekil 36, Şekil 37).

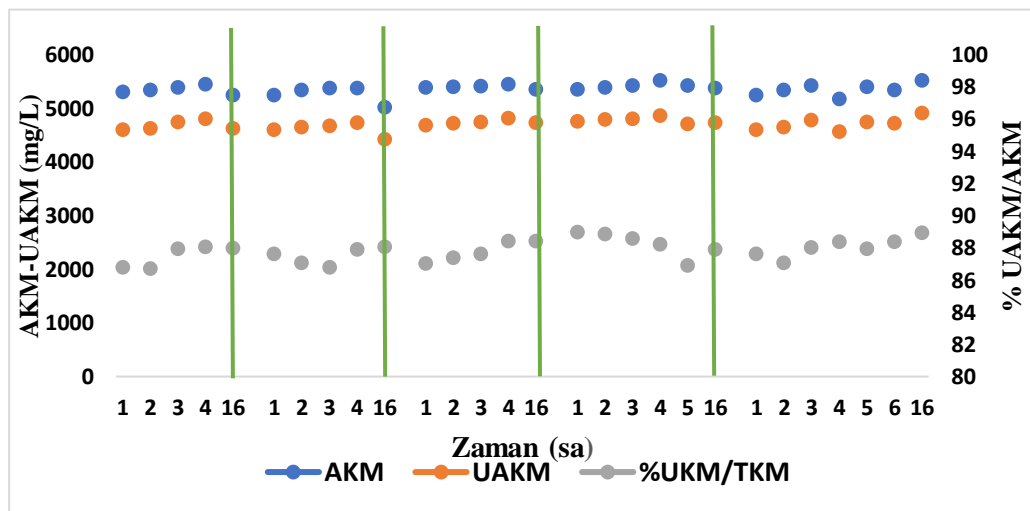
Giriş KOİ değeri 2000 ± 26 mg O₂/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 7 ± 2 mgO₂/L'ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonunun 50 ± 1 mg NH₃-N/L'den $5,6 \pm 1$ mg NH₃-N/L seviyelerine indiği gözlenmiştir (Şekil 36). Amonyumun tamamen tüketilmemesi hücre sentezi reaksiyonlarının döngü boyunca tamamlanmadığını göstermektedir. Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde

amonyak 0 mg NH₃-N/L ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,739 sa⁻¹ ve k 0,291 sa⁻¹'tir.



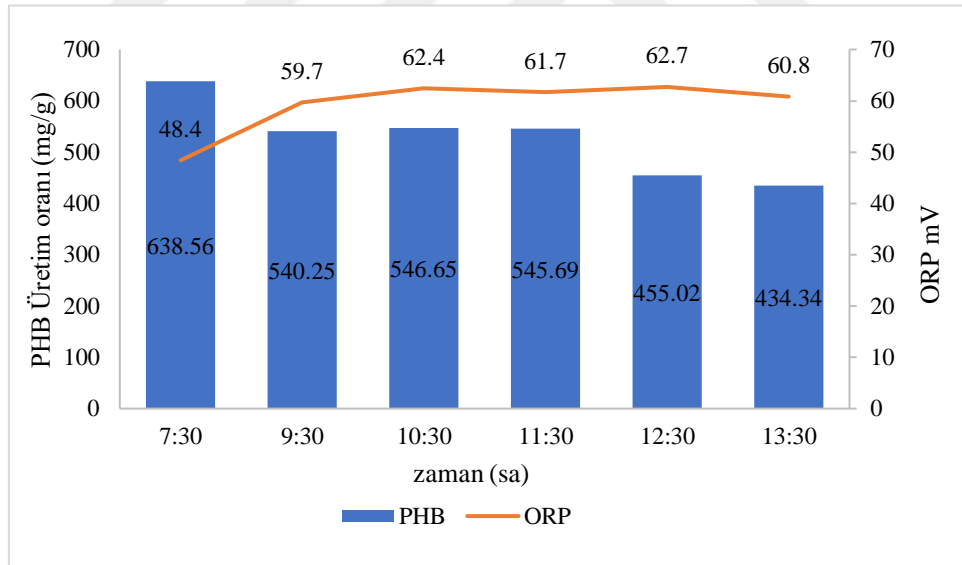
Şekil 36. C/N 40 ve çamur yaşı 5 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

PHB analizinin yapıldığı 5. günde reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 5250 mg/L ve 4600 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 37). Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,87 olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon sonunda 5020 mg AKM/L ve 4420 mg UAKM/L seviyelerine inerken UAKM/AKM oranı ise 0,88 olarak aynı seviyelerde kalmıştır. Bu değerler yüksek biyolojik canlılığını göstermektedir. (Wentzel ve d., 2002)



Şekil 37. C/N 40 ve çamur yaşı 5 gün için AKM ve UAKM değerleri

Şekil 38’de gösterilen PHB üretimine bakıldığında Ortama karbon kaynağı eklenmesiyle ilk 2 saat boyunca (11:30’ a kadar) PHB üretiminin yükseldiği görülmektedir ve reaksiyon süresince PHB üretimi ortalama 527 mg/g’dır. En düşük üretim reaksiyon sonunda (13:30) ortamda karbon kaynağının bulunmadığı saatte gerçekleşmiştir. En yüksek üretim oranının ise gece beslemesinin sonunda 07:30 numunesine ait gözlenmiştir. Gece beslemesinde uzun süren açlık periyodunda bakteri, evsel atıksudan gelen uçucu partikülleri substrat kaynağı olarak kullanarak PHB depolar ve depolama yapamayan bakteriler içsel solunuma uğrar. 09:30-11:30 arasında PHB oranlarında benzerlik vardır ve reaksiyon boyunca bakteri ortamdaki azotu hücre sentezinde kullanmıştır ve PHB depoları değişikliğe uğramamıştır. En düşük ORP değeri gece sonunda alınan 07:30 numunesindedir ve gündüz periyoduna göre gece periyodunda oksijen daha yoğun olarak kullanılmıştır. C/N 30 ve C/N 40 oranları kıyaslandığında karbon/azot oranı arttıkça PHB üretiminin arttığı görülmektedir. C/N 30’da PHB üretimi ortalama 383 mg/g iken; C/N 40’ta ortalama 405 mg/g’dır. Sonuçta C/N 40 için yapılan çalışmada PHB üretimi %19 artış göstermiştir.

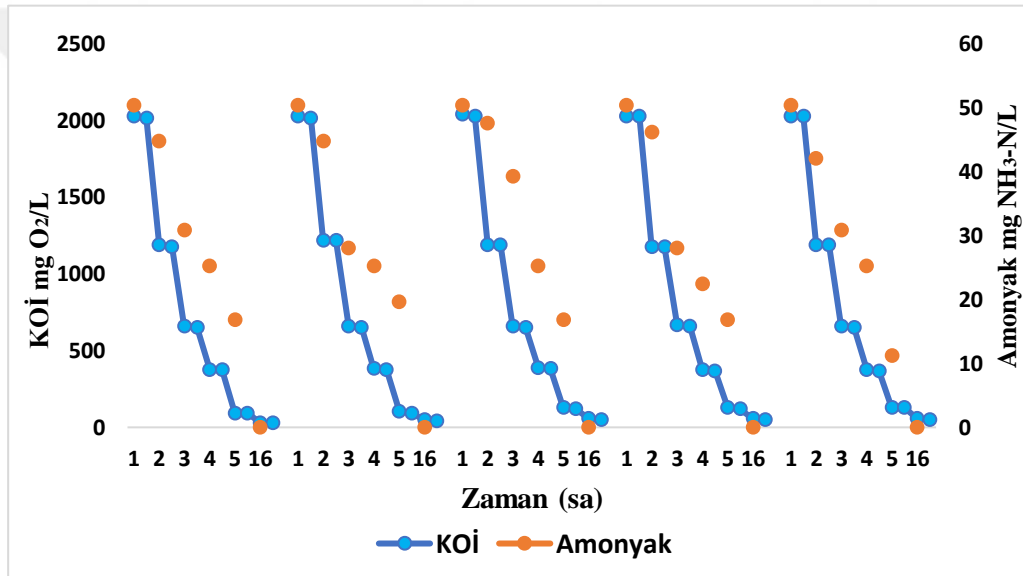


Şekil 38. C/N 40 ve çamur yaşı 5 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri

4.2.6 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 2 Gün Deneyleri

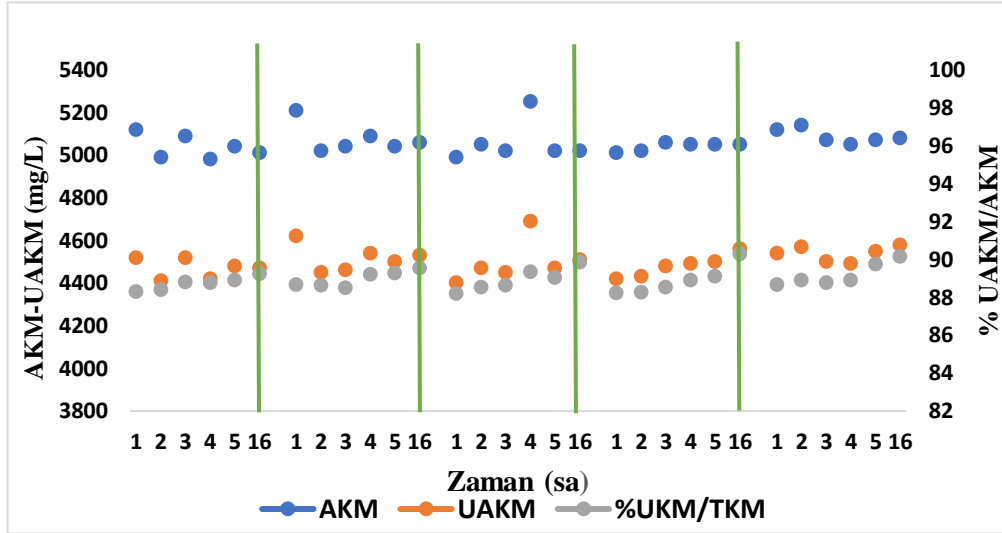
Reaktör C/N oranı 40 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenmiştir ve çamur yaşı 2 gün olacak şekilde 5 gün boyunca işletilmiştir.

Giriş KOİ değeri 2040 ± 20 mg O₂/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 21 ± 5 mg O₂/L'ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonu 50 ± 1 mg NH₃-N/L'den $5,4 \pm 1$ mg NH₃-N/L seviyelerine inmiştir (Şekil 39). Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mg NH₃-N/L olarak ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,465 sa⁻¹ ve k 0,275 sa⁻¹'tir.



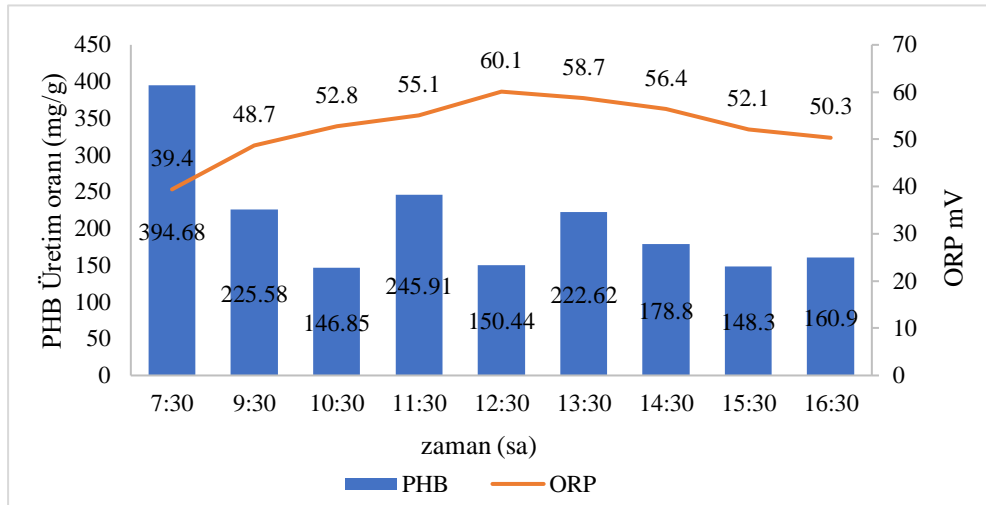
Şekil 39. C/N 40 ve çamur yaşı 2 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

PHB analizinin yapıldığı 5. günün reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 5120 mg/L ve 4540 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 40). Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,88 olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon sonunda 5070 mg AKM/L ve 4400 mg UAKM/L düzeylerinde azalma gerçekleşirken UAKM/AKM oranı ise 0,86 olarak benzer seviyelerde kalmıştır. Bu değerler ampirik değere (0,75) göre yüksek biyolojik canlılığını göstermektedir. (Wentzel ve d., 2002)



Şekil 40. C/N 40 ve çamur yaşı 2 gün için AKM ve UAKM değerleri

Şekil 41’de gösterilen PHB üretim oranlarına bakıldığında, ortama karbon kaynağı eklenmesiyle (09:30 KOİ 2000 mg O₂/L) PHB oranı 225,58 mg/g olarak gerçekleşmiştir. Gece beslemesinin ardından alınan sabah 07:30 numunesinin en yüksek PHB miktarının olması açlık periyodunun uzun olması ve bakterinin ortamdaki karbonunun büyük bir kısmını sadece PHB üretiminde kullandığını göstermiştir ve PHB depolama yapamayan bakteri türlerinin içsel solunuma uğramıştır. 5 günlük çamur yaşında yapılan üretime göre, 2 günlük çamur yaşında PHB üretiminin azaldığı görülmektedir. 2 günlük çamur yaşında PHB üretimi, 5 günlük çamur yaşına göre %55 azalmıştır. En düşük ORP değeri gece periyodundadır ve bakteri oksijeni gündüz periyoduna göre daha yoğun kullanmıştır.

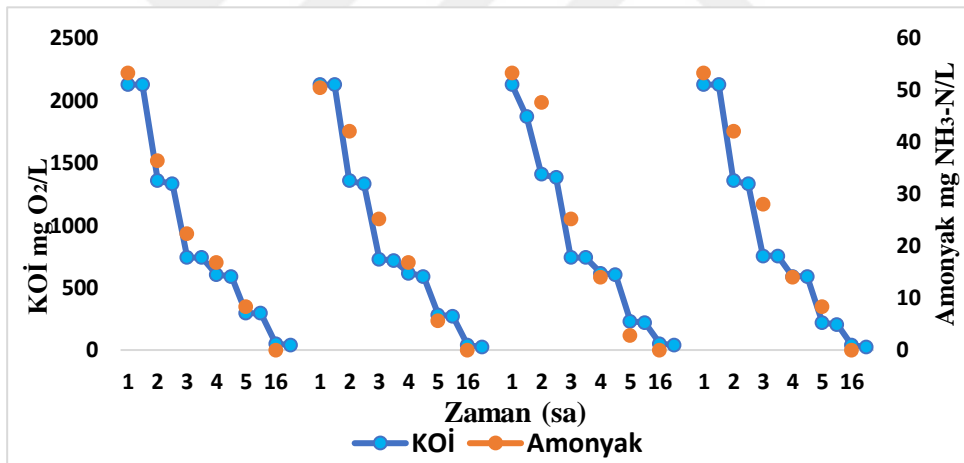


Şekil 41. C/N 40 ve çamur yaşı 2 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri

4.2.7 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 1 Gün Deneyleri

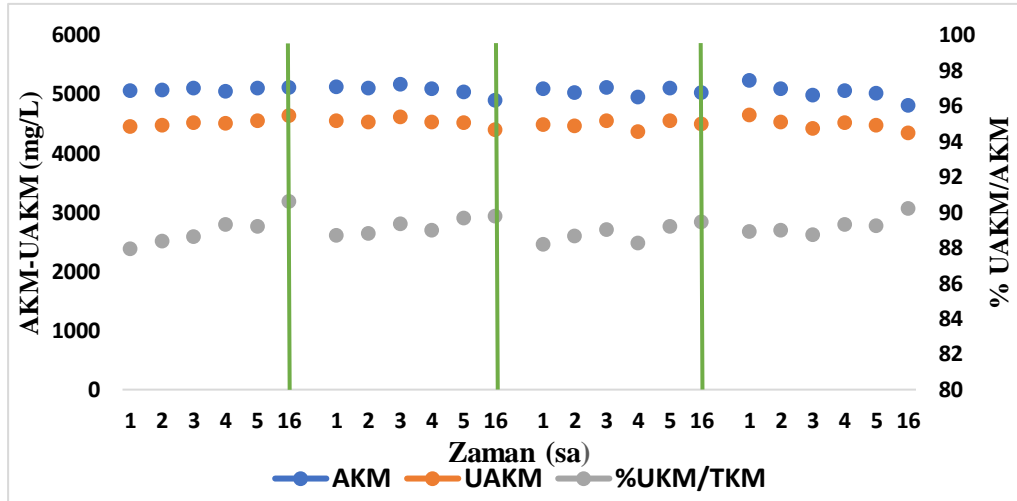
Reaktör C/N oranı 40 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenmiştir ve çamur yaşı 1 gün olacak şekilde 4 gün boyunca işletilmiştir.

Giriş KOİ değeri 2124 ± 10 mg O₂/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 40 ± 5 mg O₂/L'ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonu $53,2 \pm 1$ mg NH₃-N/L'den 5-8 mg NH₃-N/L seviyelerine inmiştir (Şekil 42). Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mg NH₃-N/L ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,378 sa⁻¹ ve k 0,267 sa⁻¹'tir. C/N 40 için çamur yaşı 5, 2 ve 1 gün ile yapılan çalışmalarda en yüksek k kat sayısı çamur yaşı 5 gün için elde edilmiştir. k hız katsayısı arttıkça reaksiyon hızı artmaktadır. 20°C, C/N 40'taki k sabitleri ile kıyaslanacak olursa sıcaklığın 28°C'ye yükseltilmesiyle reaksiyon hızlarının arttığı gözlenmiştir.



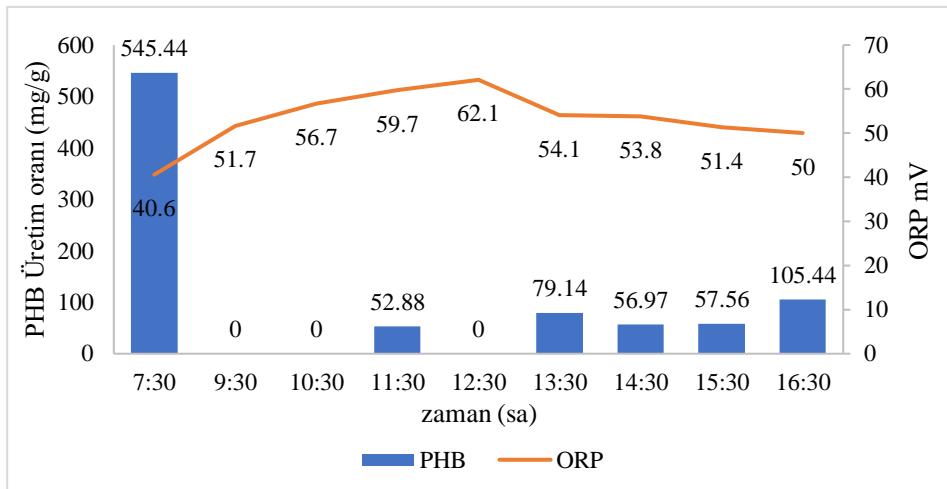
Şekil 42. C/N 40 ve çamur yaşı 1 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

PHB analizinin yapıldı 4. günde reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 5130 mg/L ve 4555 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 43). Ortalama UAKM değeri 4486 ± 111 mg/L'dir. Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,88 olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon sonunda 5040 mg AKM/L ve 4520 mg UAKM/L düzeyine azalma meydana gelirken UAKM/AKM oranı ise 0,89 olarak neredeyse sabit kalmıştır. Bu değerler yüksek çamur aktivesini yani yüksek biyolojik canlılığını göstermektedir. (Wentzel ve d., 2002)



Şekil 43. C/N 40 ve çamur yaşı 1 gün için AKM ve UAKM değerleri

Şekil 44'te PHB üretim oranlarına bakıldığında reaksiyon boyunca sadece belirli saatlerde (09:30, 10:30, 12:30) üretim olmadığı fakat diğer saatlerde ortalama 70 mg/g üretim olduğu gözlenmiştir. Gece beslemesinin ardından alınan sabah 07:30 numunesinin en yüksek PHB miktarının olması açlık periyodunun uzun olması ve bakterinin ortamdaki karbonunun büyük bir kısmını sadece PHB üretiminde kullandığını göstermiştir ve PHB depolama yapamayan bakteri türlerinin içsel solunuma uğramıştır. Çalışılan 3 farklı çamur yaşı (1, 2, 5 gün) arasında en düşük PHB üretimi 1 günlük çamur yaşında gerçekleşmiştir. Bu da düşük çamur yaşında PHB üretimin az olduğu ya da olmadığı durumları destekleyen bir sonuçtur. En düşük ORP değeri gece periyodunun sonunda alınan numunede (07:30) ölçülmüştür. Bakteri oksijeni gündüz periyoduna göre gece periyodunda daha yoğun kullanmıştır.

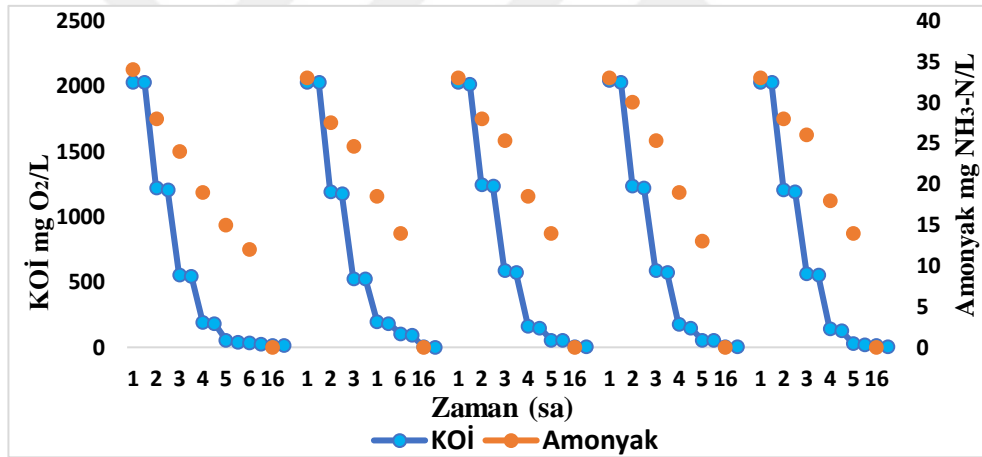


Şekil 44. C/N 40 ve çamur yaşı 1 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri

4.2.8 C/N 60 ve Çamur Yaşı: 5 Gün Deneyleri

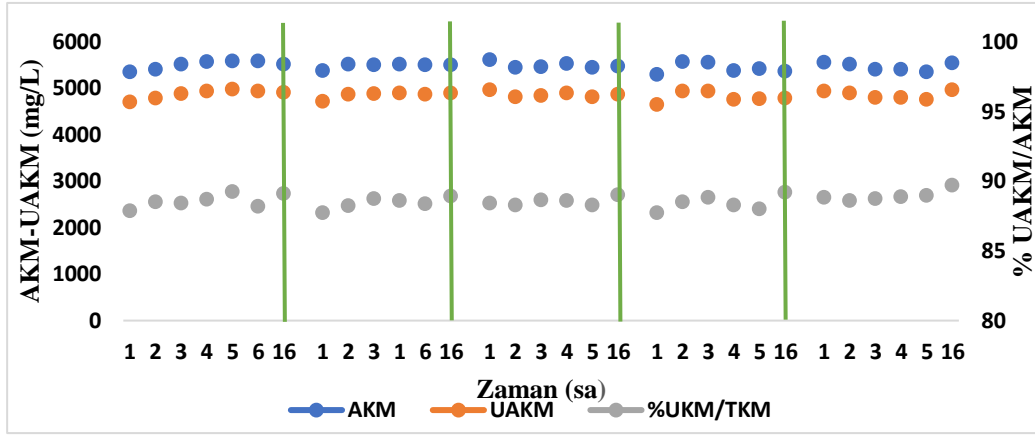
Adaptasyon sürecinde reaktör C/N oranı 60 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenip çamur yaşı 5 gün olacak şekilde işletilmiştir. Adaptasyon sürecinin ardından PHB analizleri için reaktör aynı parametrelerle (C/N 60, çamur yaşı 5 gün) 5 gün boyunca işletilmiştir. 5 gün boyunca reaksiyon süresince alınan numunelerle KOİ, amonyak, AKM ve UAKM değişimi izlenmiştir (Şekil 45, Şekil 46).

Giriş KOİ değeri 2020 ± 5 mg O₂/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 50 ± 5 mg O₂/L'ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonu $33,6 \pm 1$ mg NH₃-N/L'den 5 mg NH₃-N/L seviyelerine inmiştir (Şekil 45). Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mg NH₃-N/L ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak k 0,666 sa⁻¹ ve k 0,259 sa⁻¹'tir.



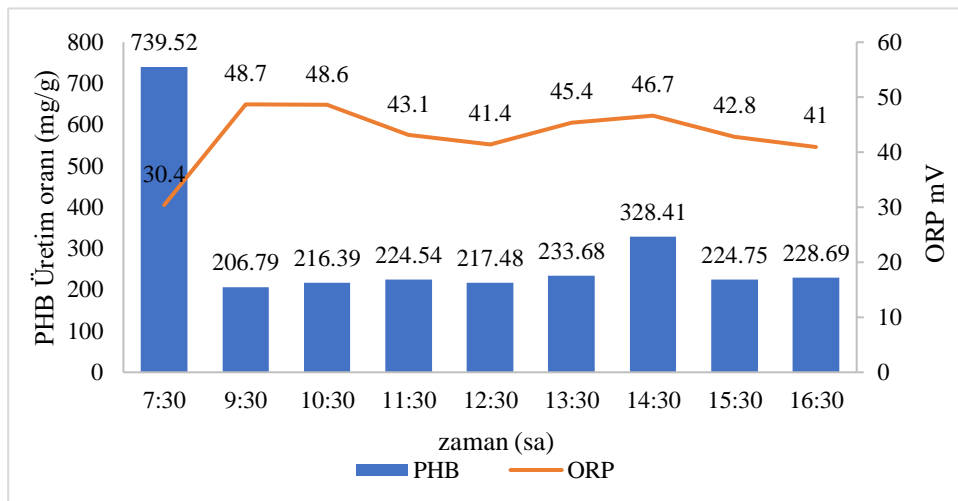
Şekil 45. C/N 60 ve çamur yaşı 5 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

PHB analizinin yapıldığı 5. günde reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 5610 mg/L ve 4960 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 46). Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,88 olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon sonunda 5420 mg AKM/L ve 4810 mg UAKM/L olarak benzer seviyelerde kalırken UAKM/AKM oranı ise 0,89 olarak benzer seviyede gerçekleşmiştir.



Şekil 46. C/N 60 ve çamur yaşı 5 gün için AKM ve UAKM değerleri

Şekil 47’de PHB üretim oranlarına bakıldığında beslenme saatinden (09:30) itibaren her saatte hemen hemen aynı miktarlarda üretim olmuştur. Başlangıç oranının korunduğu fakat ilave üretimin gerçekleşmediği gözlenmiştir. Ortalama 306 mg/g üretim gerçekleşmiştir. Gece beslemesinin ardından alınan sabah 07:30 numunesinin en yüksek PHB miktarının olması açlık periyodunun uzun olması ve bakterinin ortamdaki karbonunun büyük bir kısmını sadece PHB üretiminde kullandığını göstermiştir (Amini ve d., 2020). 16. Saatin sonunda (07:30) ortamda PHB üreten bakteriler baskındır ve PHB depolamayan bakteriler içsel solunuma uğramıştır. C/N 60’ta gerçekleştirilen çalışmalarda, 20 °C’de PHB üretimi olmazken, sıcaklığın artmasıyla (28 °C) bakteriler PHB üretmeye başlamıştır, sonuçta sıcaklık artışının PHB üretimdeki olumlu etkisi gözlenmiştir. ORP seviyesinin gece sonunda en düşük değerde gerçekleşmiştir. Bakteri oksijeni gece periyodunda daha yoğun olarak kullanmıştır.

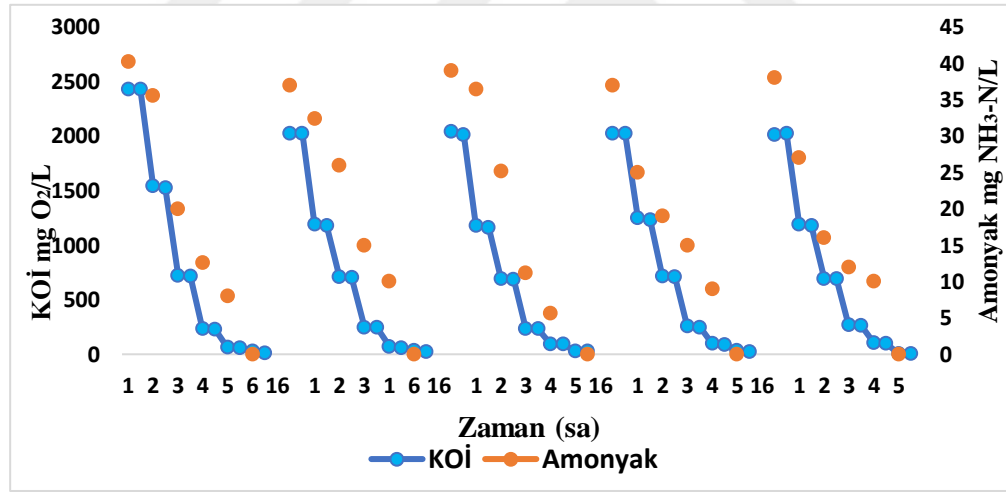


Şekil 47. C/N 60 ve çamur yaşı 5 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri

4.2.9 C/N 60 ve Çamur Yaşı: 2 Gün Deneyleri

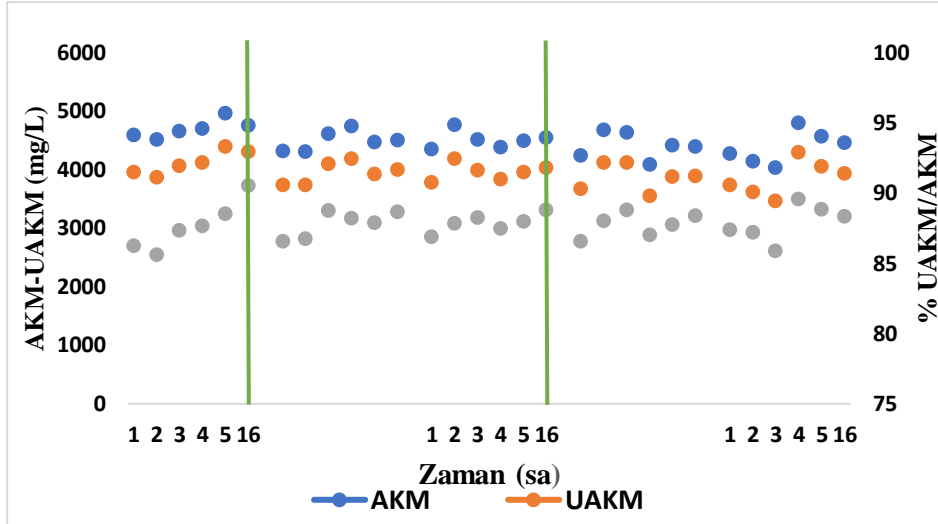
Reaktör C/N oranı 60 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenmiştir ve çamur yaşı 2 gün olacak şekilde 5 gün boyunca işletilmiştir.

Giriş KOİ değeri 2020 ± 5 mg O₂/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 50 ± 5 mg O₂/L'ye düşmüştür (Şekil 48). Amonyak konsantrasyonu $33,6 \pm 1$ mg NH₃-N/L'den 5-8 mg NH₃-N/L seviyelerine indiği gözlenmiştir. Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mg NH₃-N/L ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,518 sa⁻¹ ve k 0,242 sa⁻¹'tir. C/N 60 için çamur yaşı 5 ve 2 gün ile yapılan çalışmalarda en yüksek k kat sayıları çamur yaşı 5 gün'de elde edilmiştir. k hız katsayısı arttıkça reaksiyon hızı artmaktadır. 20°C, C/N 60'taki k sabitleri ile kıyaslanacak olursa sıcaklığın 28°C'ye yükseltilmesiyle reaksiyon hızlarının arttığı gözlenmiştir.



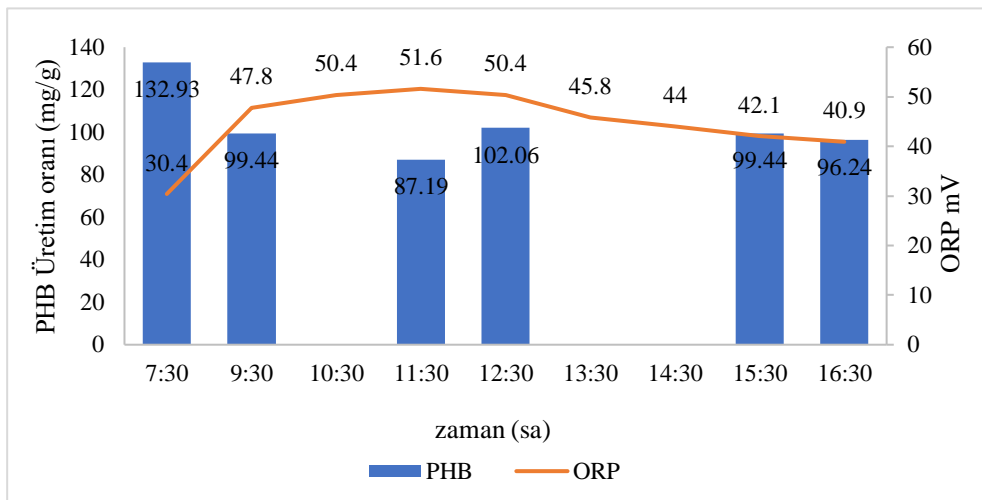
Şekil 48. C/N 60 ve çamur yaşı 2 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

PHB analizinin yapıldığı 5. günde reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 5110 mg/L ve 4520 mg/L olarak ölçülmüştür. Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,88 olarak hesaplanmıştır (Şekil 49). Reaksiyon sonunda 4810 mg AKM/L ve 4260 mg UAKM/L olarak azalma gerçekleşirken UAKM/AKM oranı ise 0,88 olarak sabit kalmıştır. Başlangıç ve reaksiyon sonundaki değerler benzer seviyede kalarak canlılık seviyesini korumuştur.



Şekil 49. C/N 60 ve çamur yaşı 2 gün için AKM ve UAKM değerleri

Şekil 50’de reaksiyon boyunca sadece belirli saatlerde (10:30, 13:30, 14:30) üretim olmadığı gözlenmiştir. C/N 60’ta yapılan çalışmalarda 2 günlük çamur yaşında 5 günlük çamur yaşına göre daha az PHB üretim gerçekleşmiştir. 5 günlük çamur yaşında ortalama 306 mg/g üretim oranı gerçekleşirken; 2 günlük çamur yaşında 70 mg/g üretim gerçekleşmiştir ve PHB oranı 2 günlük çamur yaşında %74 azalmıştır. Çamur yaşının düşmesiyle üretim azalmıştır (Şekil 50). En yüksek PHB üretimi gece sonunda alınan 07:30 numunesinde gerçekleşmiştir. Gece sonunca ortamda PHB depolayan bakteriler baskındır ve depolamayanlar içsel solunuma uğramıştır. En düşük ORP değeri bakterinin oksijeni daha yoğun kullandığı gece periyodunun son numunesinde (07:30) elde edilmiştir.



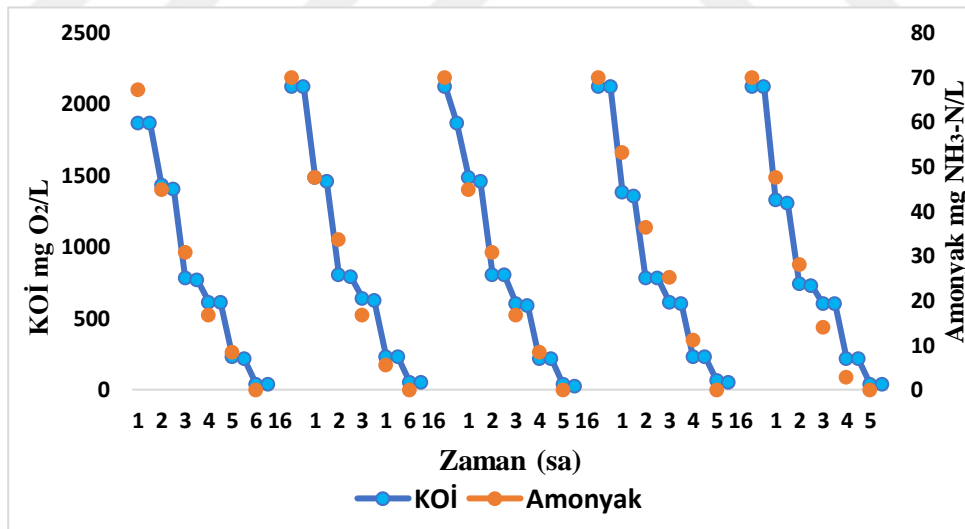
Şekil 50. C/N 60 ve çamur yaşı 2 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri

4.3 30°C’de Yapılan Aktif Çamur AKR Çalışmaları

4.3.1 C/N 30 ve Çamur Yaşı: 5 Gün Deneyleri

Adaptasyon sürecinde reaktör C/N oranı 30 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenip çamur yaşı 5 gün olacak şekilde işletilmiştir. Adaptasyon sürecinin ardından PHB analizleri için reaktör aynı parametrelerle (C/N 30, çamur yaşı 5 gün) 5 gün boyunca işletilmiştir. 5 gün boyunca reaksiyon süresince alınan numunelerden KOİ, amonyak, AKM ve UAKM değişimleri izlenmiştir (Şekil 51, Şekil 52).

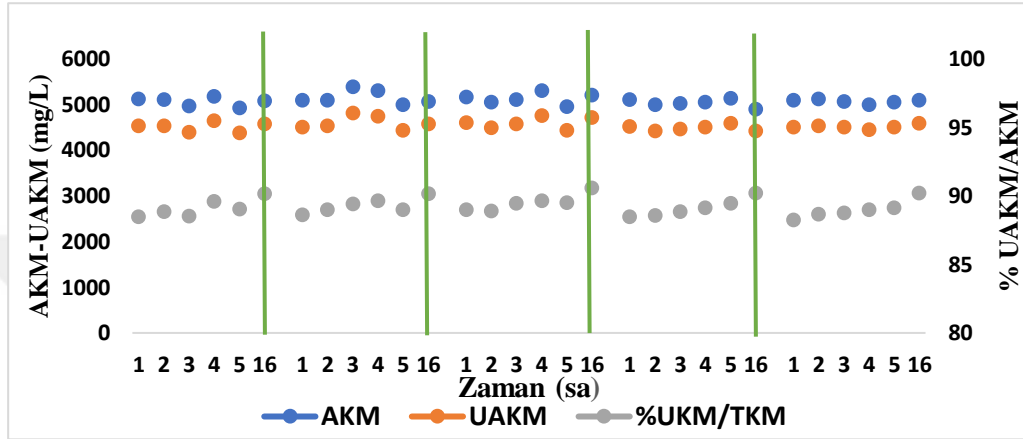
Giriş KOİ değeri 2120 ± 5 mg/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 180-200 mg /L’ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonu 70 ± 1 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ ’den 2,8 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ seviyelerine inmiştir (Şekil 51). Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,371 sa^{-1} ve k 0,342 sa^{-1} ’tir. 30°C’de C/N 30 için yapılan çalışmalarda en yüksek k hız katsayısı çamur yaşı 5 gün için gerçekleşmiştir. 28°C, C/N 30’daki k katsayısı değerlerine göre 30°C, C/N 30’daki k hız katsayıları düşmüştür. k hız kat sayıları azaldıkça reaksiyon hızı azalmaktadır.



Şekil 51. C/N 30 ve çamur yaşı 5 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

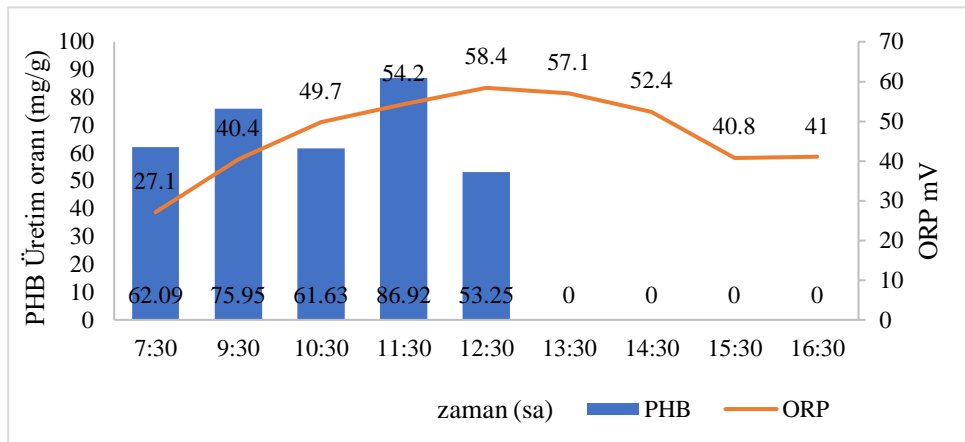
PHB analizinin yapıldığı 5. günün reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 5090 mg/L ve 4490 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 52). Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,88 olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon sonunda 5000 mg

AKM/L ve 4490 mg UAKM/L olarak aynı seviyelerde kalırken UAKM/AKM oranı ise 0,90 olarak yükselmiştir. Reaksiyon süresince biyolojik canlılık korunmuştur. Çamur yaşı 1 ve 2 günde UAKM değerleri düşmektedir, en yüksek UAKM değeri çamur yaşı 5 gün için gerçekleşmiştir. Değişim aralıklarına bakıldığında (Tablo 8) en düşük değişim aralığı (4523 ± 91 mg/L) ile çamur yaşı 5 günde mevcuttur bu değer ortama adapte, biyolojik canlılığı yüksek çamurun varlığını göstermektedir.



Şekil 52. C/N 30 ve çamur yaşı 5 gün için AKM ve UAKM değerleri

Düşük C/N oranında (30) yapılan bu çalışmada besleme sonrasında üretim gerçekleştirilirken 3 saat sonrasında (13:30 ve sonrası) PHB tamamen tüketilmiştir (Şekil 53). Bakteri ürettiği PHB'yi tüketip ortamdaki sınırlı karbonu sadece büyüme ve diğer faaliyetler için kullanabilmektedir. Düşük karbon/azot oranında sınırlı bir PHB üretimi mevcuttur.

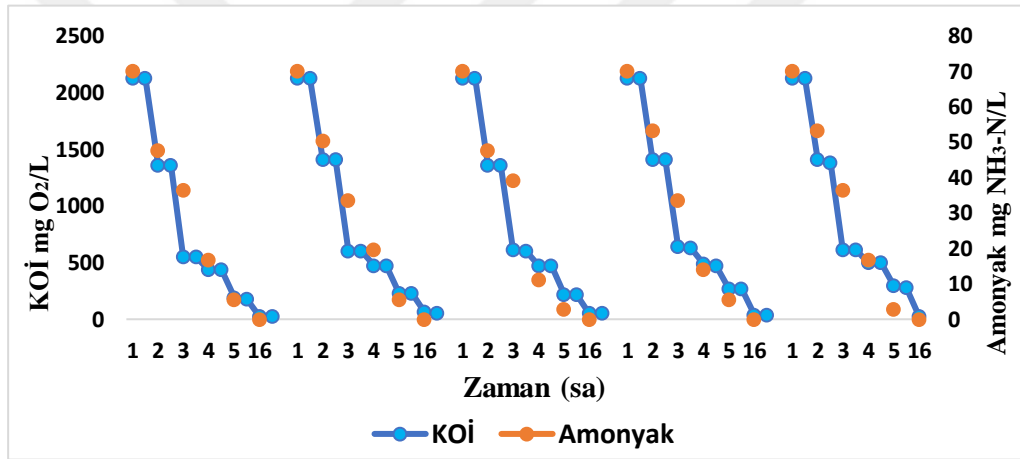


Şekil 53. C/N 30 ve çamur yaşı 5 gün için PHB üretim oranları ve ORP değerleri

4.3.2 C/N 30 ve Çamur Yaşı: 2 Gün Deneyleri

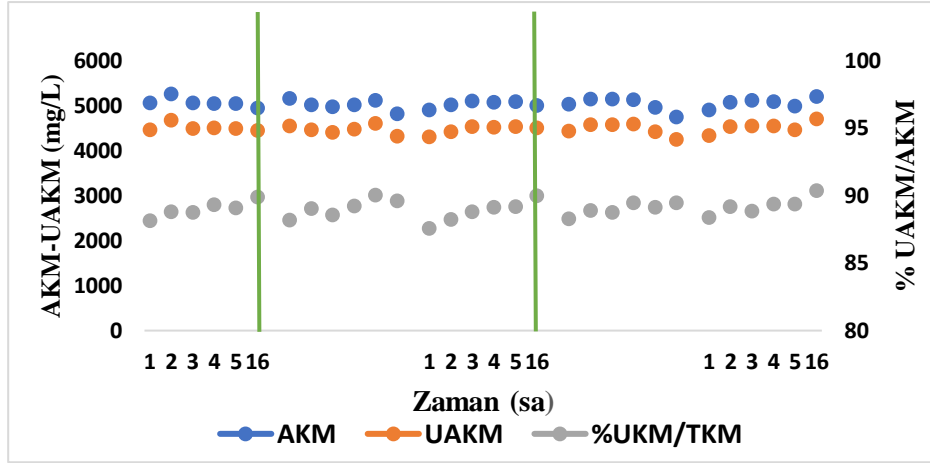
Reaktör C/N oranı 30 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenmiştir ve çamur yaşı 2 gün olacak şekilde 5 gün boyunca işletilmiştir. 5 gün boyunca reaksiyon süresince alınan numunelerden KOİ, amonyak, AKM ve UAKM değişimleri izlenmiştir (Şekil 54, Şekil 55).

Giriş KOİ değeri 2120 ± 5 mg/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 250-260 mg /L'ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonu 70 ± 1 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ 'den 3 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ seviyelerine inmiştir (Şekil 54). Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,350 sa^{-1} ve k 0,337 sa^{-1} 'tir.



Şekil 54. C/N 30 ve çamur yaşı 2 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

5. günde reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 4900 mg/L ve 4330 mg/L olarak ölçülmüştür. Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,88 olarak hesaplanmıştır (Şekil 55). Reaksiyon sonunda 4990 mg AKM/L ve 4460 mg UAKM/L olarak aynı seviyelerde kalırken UAKM/AKM oranı ise benzer seviyelerde kalmıştır. Reaksiyon süresince biyolojik canlılık korunmuştur.

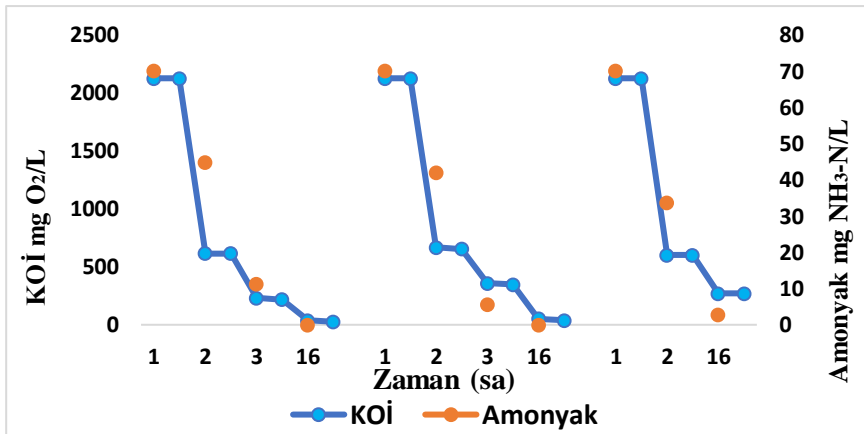


Şekil 55. C/N 30 ve çamur yaşı 2 gün için AKM ve UAKM değerleri

4.3.3 C/N 30 ve Çamur Yaşı: 1 Gün Deneyleri

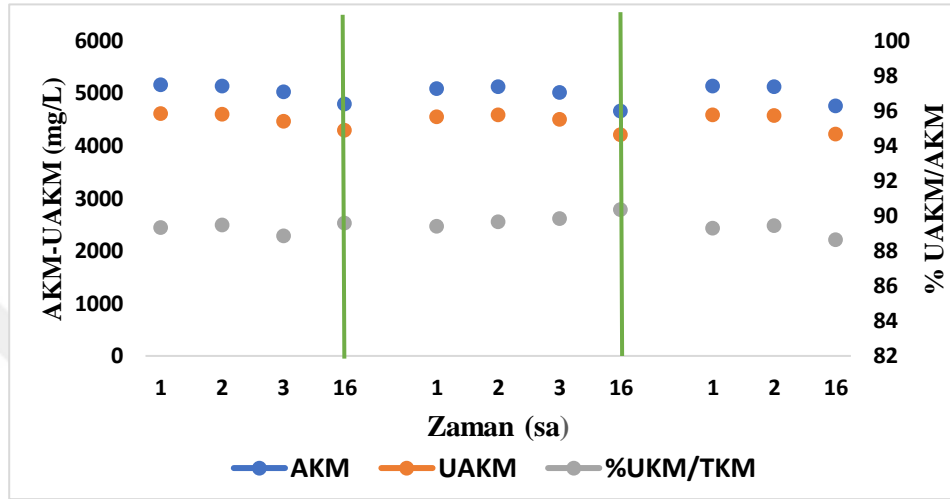
Reaktör C/N oranı 30 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenmiştir ve çamur yaşı 1 gün olacak şekilde 3 gün boyunca işletilmiştir. 3 gün boyunca reaksiyon süresince alınan numunelerden KOİ, amonyak, AKM ve UAKM değişimleri izlenmiştir (Şekil 56, Şekil 57).

Giriş KOİ değeri 2000 mg/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 250-300 mg /L'ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonu 70 ± 1 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ 'den 5 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ seviyelerine inmiştir (Şekil 56). Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,312 sa^{-1} ve k 0,306 sa^{-1} 'tir.



Şekil 56. C/N 30 ve çamur yaşı 1 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

3. günde reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 5090 mg/L ve 4550 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 57). Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,89 olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon sonunda 5020 mg AKM/L ve 4510 mg UAKM/L olarak aynı seviyelerde kalırken UAKM/AKM oranı ise benzer seviyelerde kalmıştır. UAKM/AKM oranı ise 0,89 olarak aynı seviyede kalmıştır. Reaksiyon süresince biyolojik canlılık korunmuştur.



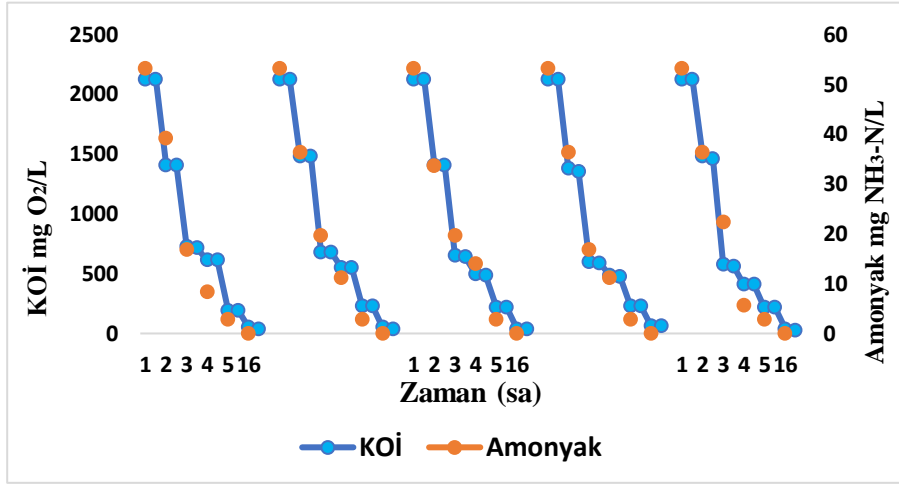
Şekil 57. C/N 30 ve çamur yaşı 1 gün için AKM ve UAKM değerleri

4.3.4 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 5 Gün Deneyleri

Adaptasyon sürecinde reaktör C/N oranı 40 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenip çamur yaşı 5 gün olacak şekilde işletilmiştir. Adaptasyon sürecinin ardından PHB analizleri için reaktör aynı parametrelerle (C/N 40, çamur yaşı 5 gün) 5 gün boyunca işletilmiştir. 5 gün boyunca reaksiyon süresince alınan numunelerden KOİ, amonyak, AKM ve UAKM değişimleri izlenmiştir (Şekil 58, Şekil 59).

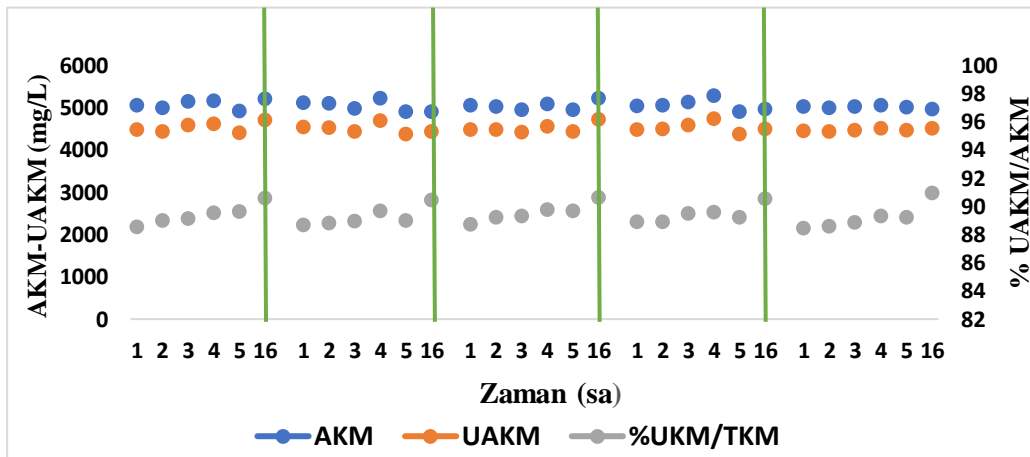
Giriş KOİ değeri 2000 mg/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 190 mg /L'ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonu 53 mg NH₃-N/L'den 3 mg NH₃-N/L seviyelerine inmiştir (Şekil 58). Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 NH₃-N/L ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,417 sa⁻¹ ve k 0,325 sa⁻¹'tir. 30 °C'de C/N 40 için yapılan çalışmalarda k hız katsayıları çamur yaşı 5 gün'de en yüksek

seviyededir. 28°C, C/N 40'taki k katsaylarına göre daha düşük seviyededir. 30°C'de reaksiyon hızı azalmıştır.



Şekil 58. C/N 40 ve çamur yaşı 5 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

5. günde reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 5020 mg/L ve 4440 mg/L olarak ölçülmüştür (Şekil 59). Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,88 olarak hesaplanmıştır. Reaksiyon sonunda 5020 mg AKM/L ve 4510 mg UAKM/L olarak aynı seviyelerde kalırken UAKM/AKM oranı ise benzer seviyelerde kalmıştır. UAKM/AKM oranı ise 0,89 olarak aynı seviyede kalmıştır. Reaksiyon süresince biyolojik canlılık korunmuştur. Değişim aralıklarına bakıldığında (Tablo 8) çamur yaşı 1 gün için 4535±112 mg/L, çamur yaşı 2 gün için 4520±122 mg/L ve çamur yaşı 5 gün için 4463±32 mg/L değerlerindedir. En düşük değişim aralığı (4463±32 mg/L) ile çamur yaşı 5 günde mevcuttur. Bu değer ortama adapte, biyolojik canlılığı yüksek çamurun varlığını göstermektedir.

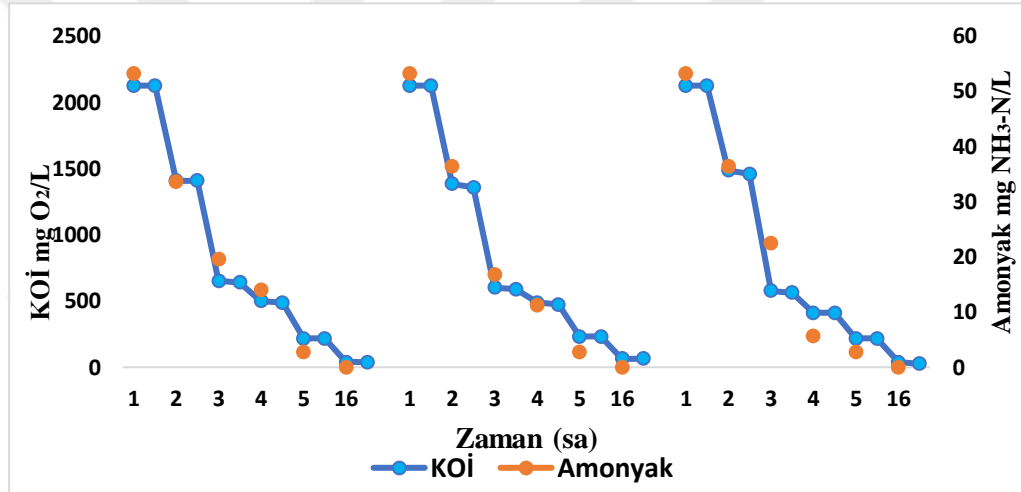


Şekil 59. C/N 40 ve çamur yaşı 5 gün için AKM ve UAKM değerleri

4.3.5 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 2 Gün Deneyleri

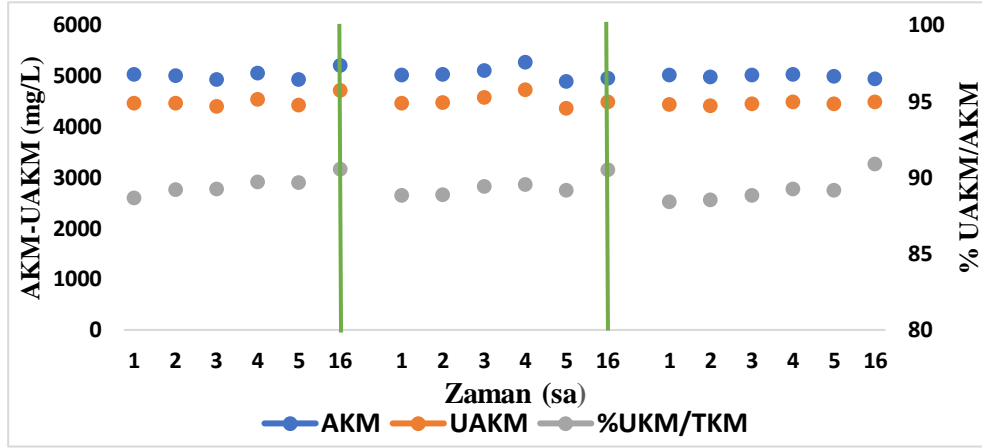
Reaktör C/N oranı 40 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenmiştir ve çamur yaşı 2 gün olacak şekilde 3 gün boyunca işletilmiştir. 3 gün boyunca reaksiyon süresince alınan numunelerden KOİ, amonyak, AKM ve UAKM değişimleri izlenmiştir (Şekil 60, Şekil 61).

Giriş KOİ değeri 2000 mg/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 200 mg /L'ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonu 53 mg NH₃-N/L'den 3 mg NH₃-N/L seviyelerine inmiştir (Şekil 60). Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mg NH₃-N/L ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,406 sa⁻¹ ve k 0,308 sa⁻¹'tir.



Şekil 60. C/N 40 ve çamur yaşı 2 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

3. günde reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 5030 mg/L ve 4470 mg/L olarak ölçülmüştür. Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,88 olarak hesaplanmıştır (Şekil 61). Reaksiyon sonunda 4900 mg AKM/L ve 4370 mg UAKM/L seviyelerine azalma gerçekleşirken, UAKM/AKM oranı ise benzer seviyelerde kalmıştır. UAKM/AKM oranı ise 0,89 olarak aynı seviyede kalmıştır. Reaksiyon süresince biyolojik canlılık korunmuştur.

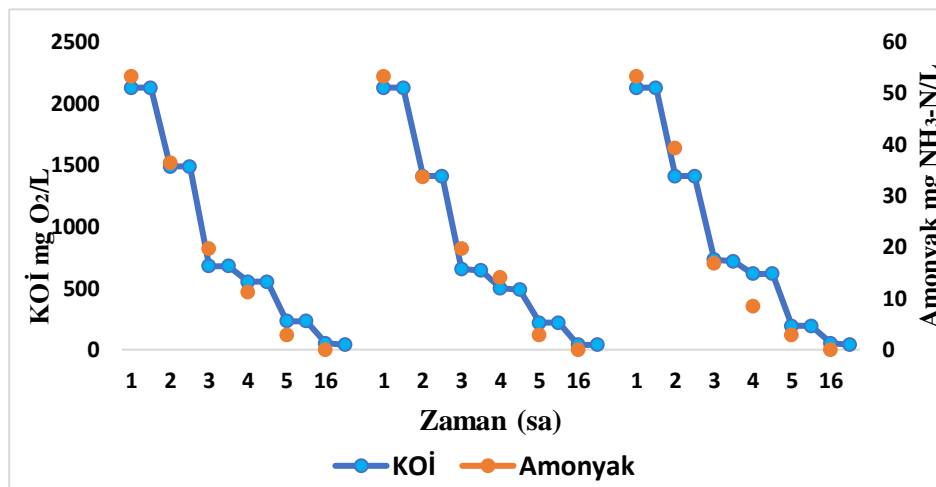


Şekil 61. C/N 40 ve çamur yaşı 2 gün için AKM ve UAKM değerleri

4.3.6 C/N 40 ve Çamur Yaşı: 1 Gün Deneyleri

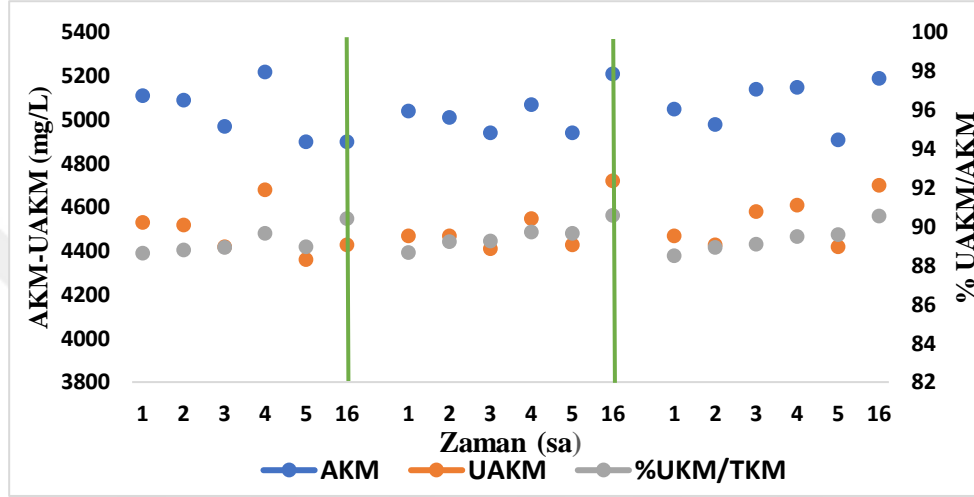
Reaktör C/N oranı 40 olacak şekilde sentetik meyve suyu atıksuyu ve evsel atıksu ile beslenmiştir ve çamur yaşı 1 gün olacak şekilde 3 gün boyunca işletilmiştir. 3 gün boyunca reaksiyon süresince alınan numunelerden KOİ, amonyak, AKM ve UAKM değişimleri izlenmiştir (Şekil 62, Şekil 63).

Giriş KOİ değeri 2000 mg/L iken 4 saatlik reaksiyon sonunda KOİ değeri 190 mg/L'ye düşmüştür. Amonyak konsantrasyonu 53 mg NH₃-N/L'den 3 mg NH₃-N/L seviyelerine inmiştir (Şekil 62). Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde reaktörde amonyak 0 mg NH₃-N/L ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği KOİ ve amonyak giderimi için 1. derece olarak sırayla k 0,392 sa⁻¹ ve k 0,294 sa⁻¹'tir.



Şekil 62. C/N 40 ve çamur yaşı 1 gün için KOİ ve Amonyak giderim değerleri

3. günde reaksiyon başlangıcında AKM ve UAKM değerleri 5050 mg/L ve 4470 mg/L olarak ölçülmüştür. Başlangıç UAKM/AKM oranı ise 0,88 olarak hesaplanmıştır (Şekil 63). Reaksiyon sonunda 4910 mg AKM/L ve 4420 mg UAKM/L seviyelerine azalma gerçekleşirken, UAKM/AKM oranı ise benzer seviyelerde kalmıştır. UAKM/AKM oranı ise 0,89 olarak aynı seviyede kalmıştır. Reaksiyon süresince biyolojik canlılık oransal ve seviye olarak korunmuştur.



Şekil 63. C/N 40 ve çamur yaşı 1 gün için AKM ve UAKM değerleri

PHB analizi yapılamayan numuneler için ORP değerleri Tablo 7'de verilmiştir. Tablo 7'de verilen ORP değerleri reaksiyon boyunca artmıştır ve bakteri oksijeni gece beslemesinde daha yoğun olarak kullanmıştır.

Tablo 7. PHB analizi yapılamayan numunelerin ORP değerleri

Parametre	Zaman (sa)					
	07:30	09:30	10:30	11:30	12:30	13:30
28°C, C/N 30, Çamur yaşı 5 gün	45,7	57	58,4	59,1	62,3	62,5
30°C, C/N 30, Çamur yaşı 2 gün	42,5	46,7	49,9	52,4	55,6	57,3
30°C, C/N 30, Çamur yaşı 1 gün	41,6	47,4	49,8	52,7	55,7	56
30°C, C/N 40, Çamur yaşı 5 gün	38,6	42,5	44,1	46,8	50,9	52,3
30°C, C/N 40, Çamur yaşı 2 gün	39,2	42,3	44,6	49,8	51,4	56,9
30°C, C/N 40, Çamur yaşı 1 gün	35,9	42,5	45,2	47,8	49	52,1

4.4. Genel Sonuç Değerlendirme ve Tartışma

20°C'ye göre 28°C'de UAKM'deki artışla KOİ ve amonyak gideriminin arttığı gözlenmiştir. Sıcaklık artışıyla birlikte bakteriyel faaliyetin artmasıyla PHB üretiminde de artış gerçekleşmiştir. Sıcaklığın artmasıyla üretimde baskın olan türler değişir ve PHB üretimini arttırabilir (Jiang ve d., 2011a; Johnson, van Geest, ve d., 2010). C/N 40 için 20°C'de yapılan çalışmalarda reaksiyon boyunca sırayla 221±26, 243±61, 117 mg/g seviyelerinde PHB üretimi olurken; 28°C'de 527±73, 208±79, 100±171 mg/g üretim gerçekleşmiştir. C/N 60 için 20°C'de yapılan çalışmalarda PHB üretimi gerçekleşmemiştir fakat sıcaklık 28°C'ye yükseltildiğinde bakteri PHB üretmeye başlamıştır. C/N 30 için 30°C'de PHB üretimi, 28°C'deki PHB üretimine göre daha düşüktür. C/N 30 oranında PHB üretimi için uygun sıcaklık 28°C olarak gerçekleşmiştir.

En yüksek üretim 28°C'de, C/N 40'ta, çamur yaşı 5 gün'de gerçekleşmiştir (527±73 mg/g). Aynı sıcaklık ve C/N oranında, çamur yaşının düşmesiyle birlikte üretiminde düştüğü gözlenmiştir. Bu değerler çamur yaşı 2 gün için 208±79 mg/g ve 1 gün için 100±171 mg/g'dır. Düşük çamur yaşında (0,5-1 gün) PHB veriminin düştüğünü, bakterilerin karbon kaynağını büyüme için kullandığını bilinmektedir (Johnson, van Geest, ve d., 2010). Çamur yaşı 10 günden 5 güne düşürüldüğünde PHA üretiminde artışın gerçekleştiği çalışmalar da mevcuttur (Çokgör ve d., 2018; Moita & Lemos, 2012). Yüksek çamur yaşında mikroorganizma içsel solunuma başlar ve ortamda PHB depolayan bakteri konsantrasyonu azalır, böylece PHB üretim oranında azalma meydana gelir.

30°C, C/N 30 için PHB üretim oranı 68±13 mg/g'dır ve en düşük üretim oranı bu parametrelerde elde edilmiştir. Çok düşük C/N oranlarında bakteri ortamdaki karbonu sadece hücrel aktivite için kullanmaktadır. Ortamdaki yüksek ilk karbon konsantrasyonu bakteriyel hücrel aktiviteyi inhibe eder ve bu da yavaş karbon alımına ve daha az biyopolimer üretimine neden olmaktadır (Amini ve d., 2020).

20°C'de çamur yaşı 1, 5 ve 10 gün için yapılan çalışmalarda en düşük PHB üretiminin 1 günlük çamur yaşında gerçekleştiği gözlenmiştir. 28°C'de çamur yaşı 1, 2 ve 5 gün için yapılan çalışmalarda ise en düşük PHB üretiminin çamur yaşı 1 ve 2 günde olduğu gözlenmiştir. 28°C'de C/N oranı 40'ta, çamur yaşı 5 günde PHB üretimi

527±73 mg/g olurken, çamur yaşı 2 gün için 208±79 mg/g, çamur yaşı 1 gün için ise 100±171 mg/g üretim olmuştur. Johnson (2010) yaptığı çalışmada 0,5, 1 ve 4 günlük çamur yaşı kullanılmıştır. Düşük çamur yaşında (0,5-1 gün) PHB veriminin düştüğünü, bakterilerin karbon kaynağını büyüme için kullandığını bildirmiştir. Tablo 8’de ortam şartları ve PHB üretim oranı verilmiştir.

Tablo 8. Ortam şartları ve PHB oranları

Sıcaklık (°C)	C/N (g/g)	Çamur Yaşı (gün)	UAKM (mg/L)	ORP (mV)	PHB (mg/g)
20	40	10	3340±770	-27±6	221±26
20	40	5	2700±162	-26±2	243±61
20	40	1	2447±167	-44±5	117
20	60	10	2636±240	-44±7	0
20	60	5	2720±155	-40±9	0
20	60	1	2626±191	-38±6	0
28	30	5	4477±98	45,7-62,5	(a)
28	30	2	4490±92	33,3-55,4	369±70
28	30	1	4513±116	28,7-54,6	0
28	40	5	4776±57	59±5	527±73
28	40	2	4538±37	52±7	208±79
28	40	1	4486±111	54±8	100±171
28	60	5	4856±90	43±7	291±171
28	60	2	3855±304	46±8	69±53
30	30	5	4523±91	48±12	68±13
30	30	2	4520±121	42,2-57,3	(a)
30	30	1	4465±173	41,6-56	(a)
30	40	5	4463±32	38,6-52,3	(a)
30	40	2	4520±122	39,2-56,9	(a)
30	40	1	4535±112	35,9-52,1	(a)

(a)* : PHB analizi yapılamayan numuneler.

5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada sentetik meyve suyu atıksuyu kullanılarak, karışık kültür ile PHB üretiminde optimum şartları belirlemek amaçlanmıştır. 20, 28 ve 30°C olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta, 30, 40 ve 60 olmak üzere 3 farklı C/N oranında ve 1, 2, 5 ve 10 gün olmak üzere 4 farklı çamur yaşının olduğu şartlarda deneyler yürütülmüştür. Reaktör günde 2 kez beslenmiştir ve bu süreçte reaktör sürekli havalandırılmıştır. KOİ ve amonyak giderimi için 4 saatlik reaksiyon süresinin yeterli olduğu belirlenmiştir. Deneysel sonuçlar doğrultusunda meyve suyu endüstrisi atıksuyunun PHB biyopolimeri üretiminde önemli bir alternatif olduğu ortaya çıkmıştır. Maksimum PHB biyopolimeri üretimi için optimum şartlar; 28°C'de, C/N oranı 40, çamur yaşı 5 gün olarak belirlenmiştir.

- 20°C'de yapılan çalışmalarda C/N 40'ta PHB üretimi gerçekleşirken; C/N 60'ta üretim gerçekleşmemiştir. Bakteri düşük C/N (C/N 30) oranlarında ortamdaki karbonu büyüme ve çoğalma için kullanırken, ortamdaki yüksek karbon miktarından da olumsuz etkilenmektedir. Ortamdaki yüksek karbon konsantrasyonu (C/N 60) bakteriyel hücresel aktiviteleri inhibe eder ve bu da yavaş karbon alımına ve daha az biyopolimer üretimine neden olmaktadır.
- Sıcaklığın 28°C'ye çıkarılmasıyla C/N 30, 40 ve 60'ta PHB üretimi gerçekleşmiştir. Fakat en yüksek üretim C/N 40'ta gerçekleşmiştir (üretim ortalama 527±73 mg/g). Sıcaklığa göre ortamdaki baskın türlerde artma ya da azalma olmaktadır bu da PHB üretimini etkilemektedir. C/N 30 için 28 ve 30°C'de çalışma yapılmıştır. C/N 30 için 28°C'de ortalama 369±70 mg/g üretim gerçekleşirken, 30°C'de ortalama 68±13 mg/g PHB üretim meydana gelmiştir. C/N 30 için PHB üretiminde optimum sıcaklık 28°C'dir.
- Çamur yaşı 1, 2, 5 ve 10 gün için yapılan çalışmalarda en yüksek PHB üretimi çamur yaşı 5 gün için gerçekleşmiştir. Çamur yaşı 1 gün için bazı numunelerde PHB içeriği yoktur. Düşük çamur yaşında (0,5-1 gün) PHB veriminin düştüğünü, bakterilerin karbon kaynağını büyüme için kullandığını rapor eden çalışmalar literatürde mevcuttur. Literatürde çamur yaşı 10 günden 5 güne düşürüldüğünde PHA üretiminde artışın gerçekleştiği çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmada en yüksek biyopolimer üretimi çamur yaşı 5 günde gerçekleşmiştir.

- KOİ 1400-1600 mg O₂/L arasında değiştiği çalışmalarda PHB üretim oranı, KOİ 2000 mg O₂/L'deki çalışmalara göre dūřüktür. En dūřük KOİ değeri 2000 mgO₂/L olmalıdır. Sıcaklık 20°C'de çalışmalardaki UAKM değerlerinde değişim aralığının yüksek olduğu görölmektedir. Deęiřim aralığı yüksek ise bakteri ortama adapte olmaya çalışmakta ve hem üretim hem sentez yapmaktadır. 28°C'deki UAKM değerlerindeki değişim aralığı dūřüktür ve bakteri adapte olmuş ve yüksek PHB üretimi gerçekleştirmektedir.
- Gece beslemesinin ardından alınan 07:30 numunelerinde PHB en yüksek seviyede çıkmıştır. Bu da açlık süresinin uzamasıyla PHB üretiminin arttığını göstermektedir. Bolluk/açlık fazının 0,25'i geçmemesi gerekmektedir. Fakat açlık süresi daha fazla uzatılırsa bakteri ürettiği PHB'nin büyük bir kısmını karbon ve enerji kaynağı olarak kullanacaktır bu da reaktördeki PHB miktarını azaltacaktır.

KAYNAKLAR

- Amini, M., Yousefi-Massumabad, H., Younesi, H., Abyar, H., & Bahramifar, N. (2020). Production of the polyhydroxyalkanoate biopolymer by *Cupriavidus necator* using beer brewery wastewater containing maltose as a primary carbon source. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(1), 1–9.
- Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* 54, 4.
- Brandl, H., Knee, E. J., Fuller, R. C., Gross, R. A., & Lenz, R. W. (1989). Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly (β -hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49–55.
- Braunegg, G., Lefebvre, G., & Genser, K. F. (1998). Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, 65, 127–161.
- Campanari, S., E Silva, F. A., Bertin, L., Villano, M., & Majone, M. (2014). Effect of the organic loading rate on the production of polyhydroxyalkanoates in a multi-stage process aimed at the valorization of olive oil mill wastewater. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 34–41.
- Carlozzi, P., Giovannelli, A., Traversi, M. L., Touloupakis, E., & di Lorenzo, T. (2019). Poly-3-hydroxybutyrate and H₂ production by *Rhodospseudomonas* sp. S16-VOGS3 grown in a new generation photobioreactor under single or combined nutrient deficiency. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 821–828.
- Castro-Aguirre, Iñiguez-Franco, Samsudin, Fang, & Auras. (2016). Poly(lactic acid)-Mass Production, Processing, Industrial Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 333–366.
- Chen, G. Q., König, K. H., & Lafferty, R. M. (1991). Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiology Letters*, 84(2), 173–176.
- Chen, Z., Huang, L., Wen, Q., Zhang, H., & Guo, Z. (2017). Effects of sludge retention time, carbon and initial biomass concentrations on selection process: From activated sludge to polyhydroxyalkanoate accumulating cultures. *Journal of Environmental Sciences*, 52, 76–84.
- Chowdhury, B., & John, M. E. (1998). Thermal evaluation of transgenic cotton containing polyhydroxybutyrate. *Thermochimica Acta*, 313, 43–53.

- Chudakkadu, K., & van Loosdrecht, M. (1999). Effect of Temperature on Storage Polymers and Settleability of Activated Sludge. *Water Research*, 33(10), 2374–2382.
- Çokgör, E., Özkok, İ. P., Güven, D., Zengin, G. E., Okutman Taş, D., Yağcı, N., Sayı Uçar, N., Özyıldız, G., & İnsel, G. (2018). Mikrobiyal Biyopolimerler: Polihidroksialkanoatların Biyoplastik Üretiminde Kullanımı Üzerine Genel Değerlendirme. *TMMOB ÇMO*, 21–52.
- Colombo, B., Sciarria, T. P., Reis, M., Scaglia, B., & Adani, F. (2016). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. *Bioresource Technology*, 218, 692–699.
- Daniel, M., Choi, J. H., Kim, J. H., & Lebeault, J. M. (1992). Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of poly- β -hydroxybutyric acid by methylotrophic bacterium, *Pseudomonas* 135. *Appl Microbiol Biotechnol*, 37.
- Dias, J. M. L., Lemos, P. C., Serafim, L. S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M. G. E., Ramos, A. M., Oliveira, R., & Reis, M. A. M. (2006). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: From the substrate to the final product. *Macromolecular Bioscience*, 6,11, 885–906.
- Dionisi, D., Beccari, M., Gregorio, S. D., Majone, M., Papini, M. P., & Vallini, G. (2005). Storage of biodegradable polymers by an enriched microbial community in a sequencing batch reactor operated at high organic load rate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(11), 1306–1318.
- Duque, A. F., Oliveira, C. S. S., Carmo, I. T. D., Gouveia, A. R., Pardelha, F., Ramos, A. M., & Reis, M. A. M. (2014). Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: Impact on polymer composition. *New Biotechnology*, 31(4), 276–288.
- Ediz, N., & Beyatlı, Y. (2005). Bacillus Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 05, 1–22.
- Fadhil Md Din, M., Ujang, Z., Loosdrecht, M. van, Mohd, & Ahmad, A. (2008). polyhydroxyalkanoates (phas) production from saponified sunflower oil in mixed cultures under aerobic condition. *Jurnal Teknologi*, 48.
- Fradinho, J. C., Reis, M. A. M., & Oehmen, A. (2016). Beyond feast and famine: Selecting a PHA accumulating photosynthetic mixed culture in a permanent feast regime. *Water Research*, 105, 421–428.
- García, A., Segura, D., Espín, G., Galindo, E., Castillo, T., & Peña, C. (2014). High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant

- altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochemical Engineering Journal*, 82, 117–123.
- Gouveia, A. R., Freitas, E. B., Galinha, C. F., Carvalho, G., Duque, A. F., & Reis, M. A. M. (2017). Dynamic change of pH in acidogenic fermentation of cheese whey towards polyhydroxyalkanoates production: Impact on performance and microbial population. *New Biotechnology*, 37, 108–116.
- Grothe, E., Moo-Young, M., & Chisti, Y. (1999). Fermentation optimization for the production of poly(-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme And Microbial Technology*, 25, 132–141.
- Hazar Yoruç, A. B., & Uğraşkan, V. (2017). Green Polymers and Applications. *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering*, 17(1), 318–337.
- Hoffmann, N., Steinbuè, A., & Rehm, B. H. A. (2000). Homologous functional expression of cryptic phaG from *Pseudomonas oleovorans* establishes the transacylase-mediated polyhydroxyalkanoate biosynthetic pathway. *Microbiol Biotechnol*, 54, 665–670.
- Holmes, P. A. (1985). Applications of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in Technology*, 16, 32–36.
- Huisman, G. W., de Leeuw, O., Eggink, G., & Witholt, B. (1989). Synthesis of Poly-3-Hydroxyalkanoates Is a Common Feature of Fluorescent *Pseudomonads*. *Applied And Environmental Microbiology*.
- Jiang, Y., Marang, L., Kleerebezem, R., Muyzer, G., & van Loosdrecht, M. C. M. (2011a). Effect of temperature and cycle length on microbial competition in PHB-producing sequencing batch reactor. *ISME Journal*, 5(5), 896–907.
- Jiang, Y., Marang, L., Kleerebezem, R., Muyzer, G., & van Loosdrecht, M. C. M. (2011b). Polyhydroxybutyrate production from lactate using a mixed microbial culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(9), 2022–2035.
- Johnson, K., Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. C. M. (2010). Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures. *Journal of Biotechnology*, 147(2), 73–79.
- Johnson, K., van Geest, J., Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. C. M. (2010). Short- and long-term temperature effects on aerobic polyhydroxybutyrate producing mixed cultures. *Water Research*, 44(6), 1689–1700.
- Kabir, E., Kaur, R., Lee, J., Kim, K. H., & Kwon, E. E. (2020). Prospects of biopolymer technology as an alternative option for non-degradable plastics and sustainable management of plastic wastes. *Journal of Cleaner Production*, 258.

- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), 607–619.
- Kim So, B., Chul Lee, S., Yup Lee, S., Nam Chang, H., Keun Chang, Y., & Ihl Woo, S. (1994). Production of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) by Fed-Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* with Glucose Concentration Control. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 892–898.
- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., & Reis, M. A. M. (2017). Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*, 4, 2.
- Lee, S. Y. (1996). Review Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(1), 1–14.
- Lee, W. S., Chua, A. S. M., Yeoh, H. K., Nittami, T., & Ngoh, G. C. (2015). Strategy for the biotransformation of fermented palm oil mill effluent into biodegradable polyhydroxyalkanoates by activated sludge. *Chemical Engineering Journal*, 269, 288–297.
- Lee Young, H., Chao, F., Turnbull, C., & Philpott, D. E. (1972). Ultrastructure of *Pseudomonas saccharophila* at Early and Late Log Phase of Growth. *Journal of Bacteriology*, 109(2), 862–870.
- López-Palau, S., Pinto, A., Basset, N., Dosta, J., & Mata-Álvarez, J. (2012). ORP slope and feast-famine strategy as the basis of the control of a granular sequencing batch reactor treating winery wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 68, 190–198.
- Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., & Olivera, E. R. (2003). Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 3, 251–260.
- Luongo, V., Ghimire, A., Frunzo, L., Fabbricino, M., d'Antonio, G., Pirozzi, F., & Esposito, G. (2017). Photofermentative production of hydrogen and poly-B-hydroxybutyrate from dark fermentation products. *Bioresource Technology*, 228, 171–175.
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 63, 1.
- Majgaonkar, P., Hanich, R., Malz, F., & Brüll, R. (2021). Chemical Recycling of Post-Consumer PLA Waste for Sustainable Production of Ethyl Lactate. *Chemical Engineering Journal*, 423.

- Majone, M., Massanisso, P., Carucci, A., Lindrea, K., & Tandoi, V. (1996). Influence of storage on kinetic selection to control aerobic filamentous bulking. *Water Science and Technology*, 34, 223–232.
- Mannina, G., Presti, D., Montiel-Jarillo, G., & Suárez-Ojeda, M. E. (2019). Bioplastic recovery from wastewater: A new protocol for polyhydroxyalkanoates (PHA) extraction from mixed microbial cultures. *Bioresource Technology*, 282, 361–369.
- McCool, G. J., Fernandez, T., Li, N., & Cannon, M. C. (1996). Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiology Letters*, 138(1), 41–48.
- Moita, R., & Lemos, P. C. (2012). Biopolymers production from mixed cultures and pyrolysis by-products. *Journal of Biotechnology*, 157(4), 578–583.
- Monroy, I., & Buitrón, G. (2020). Production of polyhydroxybutyrate by pure and mixed cultures of purple non-sulfur bacteria: A review. *Journal of Biotechnology*, 317, 39–47.
- Nickerson, K. W. (1982). Purification of Poly-3-Hydroxybutyrate by Density Gradient Centrifugation in Sodium Bromide. *Applied And Environmental Microbiology*, 43, 5.
- Palmeiro-Sánchez, T., Oliveira, C. S. S., Gouveia, A. R., Noronha, J. P., Ramos, A. M., Mosquera-Corral, A., & Reis, M. A. M. (2016). NaCl presence and purification affect the properties of mixed culture PHAs. *European Polymer Journal*, 85, 256–265.
- Qu, B., & Liu, J. X. (2009a). Determination of optimum operating conditions for production of polyhydroxybutyrate by activated sludge submitted to dynamic feeding regime. *Chinese Science Bulletin*, 54(1), 142–149.
- Qu, B., & Liu, J. X. (2009b). Determination of optimum operating conditions for production of polyhydroxybutyrate by activated sludge submitted to dynamic feeding regime. *Chinese Science Bulletin*, 54(1), 142–149.
- Reis, M. A. M., Serafim, L. S., Lemos, P. C., Ramos, A. M., Aguiar, F. R., & van Loosdrecht, M. C. M. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 25(6), 377–385.
- ŞAHİN, N. N., Demir, Ö., İLSAY, S., & DOĞDUBAY, M. (2017). Biyoplastiklerin Yiyecek ve İçecek İşletmelerinde Kullanılabilirliği. *2017 International Year of Sustainable Tourism for Development*, 1334–1344.
- Salehizadeh, H., & van Loosdrecht, M. C. M. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*, 22(3), 261–279.

- Serafim, L. S., Lemos, P. C., Oliveira, R., & Reis, M. A. M. (2004). Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(2), 145–160.
- Silva, F., Campanari, S., Matteo, S., Valentino, F., Majone, M., & Villano, M. (2017). Impact of nitrogen feeding regulation on polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. *New Biotechnology*, 37, 90–98.
- Smith, R., Elger, S., & Mleziva, S. (2013). Implementation of Solids Retention Time Control in Wastewater Treatment White Paper. *YSI*, 1–6.
- Taidi, B., Anderson, A. J., Dawes, E. A., & Byrom, D. (1994). Effect of carbon source and concentration on the molecular mass of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40(6), 786–790.
- Vijay, D. A., Sharma, K., & Vary, P. S. (1990). Isolation and characterization of a unique division mutant of *Bacillus megaterium*. *Journal of General Microbiology*, 136.
- Villano, M., Valentino, F., Barbetta, A., Martino, L., Scandola, M., & Majone, M. (2014). Polyhydroxyalkanoates production with mixed microbial cultures: From culture selection to polymer recovery in a high-rate continuous process. *New Biotechnology*, 31(4), 289–296.
- Vincenzini, M., Marchini, A., Ena, A., & de Philippis, R. (1997). H₂ and poly- β -hydroxybutyrate two alternative chemicals from purple non sulfur bacteria. *Biotechnology Letters*, 19, 759–762.
- Wang, X., Bengtsson, S., Oehmen, A., Carvalho, G., Werker, A., & Reis, M. A. M. (2019). Application of dissolved oxygen (DO) level control for polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation with concurrent nitrification in surplus municipal activated sludge. *New Biotechnology*, 50, 37–43.
- Wentzel, M. C., Ubisi, M. F., Lakay, M. T., & Ekama, G. A. (2002). Incorporation of inorganic material in anoxic/aerobic-activated sludge system mixed liquor. *Water Research*, Vol. 36.
- Yılmaz, M., & Beyatlı, Y. (2003). Biyoplastik: Poli- β -Hidroksibütirat (PHB) 1. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji*, 9(1), 1–33.

